

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

**HÉLLIO DANNY NÓBREGA DE SOUZA**

**Padrões de expressão gênica de proteínas  
marcadoras neurais e dos sistemas purinérgico e  
cininérgico durante o desenvolvimento encefálico  
de camundongos *knockout* para o receptor B2 de  
cininas**

VERSÃO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA

**São Paulo**

**Data do depósito na SPG:**

**22 de março de 2013**

HÉLLIO DANNY NÓBREGA DE SOUZA

**Padrões de expressão gênica de proteínas  
marcadoras neurais e dos sistemas purinérgico e  
cininérgico durante o desenvolvimento encefálico  
de camundongos *knockout* para o receptor B2 de  
cininas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de mestre em Ciências  
Biológicas (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich*

São Paulo

2013



*Dedico este trabalho aos meus pais **Haroldo e Maria da Luz.***

*À memória do meu saudoso avô **Sebastião  
Lúcio da Nóbrega**, exemplo de honra e caráter.*

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, Haroldo Nóbrega de Souza e Maria da Luz Nóbrega de Souza, por todo o amor ofertado, pela confiança em mim depositada e, principalmente, pelos exemplos de coragem e de persistência. Nenhuma é dificuldade será grande o bastante sabendo que posso contar com amor de vocês.

Aos meus irmãos Rafaella e Alex, pelo amor e carinho.

Aos familiares que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todos os momentos de dificuldades e de alegrias.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Henning Ulrich por todas as contribuições dadas ao longo da minha formação. Especialmente na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero (UNIFESP) por ter cedido gentilmente os animais utilizados na execução dos experimentos que possibilitaram este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Garcia Abreu (UFRJ) e à Dra. Débora Malta, pela realização de parte dos experimentos de *hibridização in situ*.

A Dra. Claudiana Lameu pela realização de parte dos PCR em tempo real, pela gentil disponibilidade de me ensinar a técnica citada, mas principalmente pela amizade.

A Dra. Kátia Neves Gomes pela ajuda na fase início da execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências, especialmente à Michelli Pillat e Arquimedes Cheffer por todo o carinho e ajuda.

À nossa técnica Zilda, por toda ajuda, amizade e carinho. Ainda a todos os funcionários do Instituto de Química da USP que possibilitaram de algum modo com este trabalho.

Aos meus amigos do Centro de Estudos Universitários do Sumaré.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

*Diante de Deus, nenhuma ocupação é em si grande ou pequena. Tudo adquire o valor do Amor com que se realiza (São Josemaria Escrivá. Sulco, n. 487).*

## Resumo

Souza, H.D.N. de. **Padrões de expressão gênica de proteínas marcadoras neurais e dos sistemas purinérgico e cininérgico durante o desenvolvimento encefálico de camundongos *knockout* para o receptor B2 de cininas**. 2013. 95p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O sistema nervoso central é o mais complexo de todos os sistemas de órgãos dos vertebrados. Células progenitoras neurais ao se diferenciarem em neurônios e outros tipos celulares, desenvolvem um padrão altamente organizado de conexões, criando uma rede neuronal que forma o cérebro e o restante do sistema nervoso. Para que se possa gerar os diferentes tipos de neurônios e glias deste sistema, as células embrionárias proliferam-se e diferenciam-se através de processos altamente controlados. Este estudo visou avaliar a importância do receptor B2BkR durante o desenvolvimento encefálico do camundongo. Como modelo estudo, foram utilizados animais *knockout* (B2BkR<sup>-/-</sup>) para o gene do receptor B2BKR como modelo para avaliação do padrão de expressão de proteínas marcadoras neurais e dos sistemas purinérgicos e de cininas durante o desenvolvimento encefálico de camundongos B2BkR<sup>-/-</sup>. Há evidências que mostram que o sistema nervoso de mamíferos contém todos os componentes do sistema calcitreína-cininas e que as cininas podem atuar como neuromediadores. Os transcritos do receptor B2BkR foram encontrados em células localizadas em regiões neurogênicas a partir do dia 9.5 do desenvolvimento, esta expressão ampliou-se para toda a extensão do sistema nervoso a partir do dia 12,5 do desenvolvimento. A deleção do gene que codificado para o receptor B2BkR levou a um aumento na expressão relativa do receptor B1BkR. No animal *knockout* foi também observado um aumento nos níveis de expressão dos cininogênios 1 e 2, sugerindo a ativação de mecanismos compensatórios devido a falta do gene codificado para o receptor B2BkR. De acordo com resultados obtidos com modelos



de diferenciação *in vitro*, também os padrões de expressão de marcadores neurais foram alterados ao longo do desenvolvimento de animais *knockout*, nos quais houve a diminuição da expressão dos marcadores  $\beta$ 3-tubulina e MAP2, confirmando o papel do receptor B2BkR na neurogênese. O marcador glial GFAP teve sua expressão relativa significativamente aumentada nos animais *knockout* B2BkR<sup>-/-</sup>, confirmando que a inibição deste receptor favorece a gliogênese. A deleção do receptor B2BkR alterou o perfil de expressão dos receptores purinérgicos do subtipo P2X. Os subtipos P2X2 e P2X3 apresentaram níveis de expressão maiores nos animais selvagens. As subunidades P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 apresentam uma expressão maior nos animais B2BkR<sup>-/-</sup>. Efeitos semelhantes a estes já haviam sido observados na expressão gênica durante a diferenciação de neuroesferas do telencéfalo de ratos tratados com antagonistas do B2BkR. No entanto, este trabalho é o primeiro a demonstrar os efeitos da deleção do B2BkR sob a expressão do receptor B1BkR; de marcadores neurais e gliais; dos cininogênios 1 e 2; e receptores purinérgicos do subtipo P2X *in vivo*. Deste modo, estes resultados servem como incentivo para estudos adicionais visando elucidar a participação do receptor B2BkR e do sistema calicreína-cininas na determinação de fenótipos neurais utilizando modelos *in vivo*, bem como os mecanismos envolvidos e o papel do receptor B2BkR na terapia de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** Receptor B2BkR de cininas, sistema calicreína-cininas, receptores purinérgicos, marcadores neuronais, desenvolvimento encefálico.

## Abstract

Souza, H.D.N. de. **Gene expression patterns of neural marker proteins and of purinergic and kininergic systems during embryonic brain development of kinin-B2 receptor knock-out mice.** 2013. 95p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The central nervous system (CNS) is the most complex one of all vertebrate organs. Neural stem and progenitor cells differentiate into neurons and other neural cell types such as glia, originating a highly coordinated network characterizing the brain and the remaining nervous system in strictly controlled processes. It is known that the mammalian nervous system expresses all components of the kallikrein-kinin system, and several functions in the brain have been attributed to bradykinin including neurotransmission, neuroprotection and also lately neurogenesis. The present work aimed at studying the importance of the kinin-B2 receptor (B2BKR) during mouse brain development. A B2BKR knock-out model was used for characterizing changes in the expression patterns of neural marker protein and of the purinergic and kininergic systems. Transcripts of B2BkR-coding sequences were detected in neurogenic regions from embryonic day 9.5 (E9.5) on. Expression of the receptor augmented to the whole extension of the CNS beginning from E12.5. Deletion of the B2BKR-coding gene resulted in increased B1BkR gene expression together with augmented kininogen-1 and -2 expression levels. In agreement with results obtained with in vitro models, expression patterns of neural marker proteins also suffered alterations during neural development of B2BKR(-/-) mice when compared to wild-type animals. Reduction of neuronal protein  $\beta$ 3-tubulina e MAP2 expression was observed in B2BKR(-/-) mice, while at the same time glial GFAP expression was enhanced, indicating that activation of the B2BKR promotes neurogenesis, while its inhibition favors gliogenesis. Deletion of the B2BkR-coding

gene also leads to changes in expression patterns of purinergic P2X receptors. P2X2 and P2X3 subunits were higher expressed in wild-type animals, while P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 subunits revealed increased expression patterns in B2BkR<sup>-/-</sup> animals. These results are in line with previous ones of our group obtained in differentiating neurospheres from embryonic rat telencephalons. In summary, the present work is the first to demonstrate the effects of B2BKR deletion on expression patterns of neural marker proteins, the B1BKR and several purinergic receptor subunits. Additional studies will be incentivized for elucidation of functions and underlying mechanism of B2BKR actions in vivo, with applications in cell therapy of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** kinin B2 receptors, kallikrein-kinin system, purinergic receptors, neural marker, brain development.

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1</b> - Sequências de <i>primers</i> utilizados nas reações de genotipagem .....	45
<b>TABELA 2</b> - Sequências de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR e PCR em tempo real .....	46
<b>TABELA 3</b> - Sequências de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR e PCR em tempo real para produção de sondas de RNA .....	47

## Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento inicial do embrião de mamífero .....	17
Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento do tubo neural e da crista neural .....	18
Figura 3 – Divisão do Sistema Nervoso Central com base em critérios embriológicos e anatômicos .....	20
Figura 4 – Sudivisões primárias do tubo neural durante o desenvolvimento do cérebro dos mamíferos ao longo do eixo ântero-posterior .....	21
Figura 5 – Linhagens celulares no desenvolvimento do sistema nervoso .....	25
Figura 6: As vias de ativação das cininas e os seus receptores .....	30
Figura 7 – Representação esquemática da extensão do gene do receptor B2BKR .....	47
Figura 8 – Representação esquemática da extensão do gene do receptor P2X2 .....	48
Figura 9 - Expressão relativa do RNAm do receptor B1BkR de cininas ao longo do desenvolvimento .....	56
Figura 10 - Expressão relativa do RNAm do receptor B1BkR de cininas ao longo do desenvolvimento embrionário.....	57
Figura 11 - Expressão relativa do RNAm dos receptor B2BkR de cininas ao longo do desenvolvimento.....	58
Figura 12 - Expressão relativa do RNAm do cininogênio 1 ao longo do desenvolvimento embrionário.....	59
Figura 13 - Expressão relativa do RNAm do cininogênio 2 ao longo do desenvolvimento embrionário.....	60
Figura 14 – Padrão de expressão do receptor B2BkR nos estágios 9.5, 11.5 e 12.5 do desenvolvimento embrionário.....	62

Figura 15 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal $\beta$ -tubulina ao longo do desenvolvimento embrionário.....	63
Figura 16 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal $\beta$ 3-tubulina ao longo do desenvolvimento embrionário.....	64
Figura 17 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal MAP2 ao longo do desenvolvimento embrionário.....	65
Figura 18 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal MAP2 ao longo do desenvolvimento embrionário.....	65
Figura 19 - Expressão relativa dos RNAm do marcador glial GFAP ao longo do desenvolvimento embrionário.....	66
Figura 20 - Expressão relativa dos RNAm do marcador glial GFAP ao longo do desenvolvimento embrionário.....	67
Figura 21 - Expressão relativa dos RNAm dos receptores purinérgicos do tipo P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 ao longo da diferenciação neural.....	68
Figura 22 - Padrão de expressão do receptor P2X2 nos estágios 10.5 E 11.5 do desenvolvimento embrionário.....	71

## SUMÁRIO

---

1. Introdução .....	15
1.1 – Desenvolvimento embrionário e formação do sistema nervoso central.....	16
1.2 – Estágios no desenvolvimento cerebral pré-natal .....	19
1.2.1 – Divisão do SNC com base em critérios anatômicos .....	19
1.2.2 – Divisão do SNC com base em critérios embriológicos.....	19
1.3 – A diversidade neuronal: as linhagens do sistema nervoso central.....	23
1.4 – Receptores iono- e metabotrópicos e a diferenciação neuronal.....	27
1.4.1 – O sistema caliceína-cininas.....	29
1.4.2 – Receptores purinérgicos.....	33
2. Objetivos.....	38
2.1 – Objetivo geral.....	39
2.2 – Objetivos específicos.....	39
3. Materiais e métodos.....	41
3.1 – Animais.....	42
3.2 – Genotipagem dos camundongos B2BKR-/- .....	42
3.3 – Extração de rna total e síntese de cDNA.....	43
3.4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	44
3.5 – PCR em tempo real.....	45
3.6 – Produção de sondas de RNA e ensaios de hibridização in situ.....	47
3.6.1 – Construção das sondas de RNA para detecção dos RNAm dos receptores B2BKR de cininas e P2X2 purinérgico de ATP.....	47
3.6.2 – Purificação dos fragmentos de PCR.....	48
3.6.3 – Clonagem do cDNA no vetor pgent-easy e transformação das bactérias dh5 $\alpha$ .....	48
3.6.4 – Max prep – preparação do dna plasmidial das bactérias transformadas.....	49
3.6.5 – Sequenciamento.....	49
3.6.6 – Reações de digestão utilizando enzimas de restrição.....	49
3.6.7 – Transcrição das sondas marcadas com digoxigenina.....	50
3.6.8 – Fixação e desidratação dos embriões.....	50
3.6.9 – Hibridização in situ em embriões inteiros.....	51
3.6.10 – Aquisição das imagens.....	53
3.7 Análises estatísticas.....	53
4. Resultados.....	54
4.1 – Padrão de expressão dos receptores de cininas e dos cininogênios 1 e 2 durante o desenvolvimento embrionário.....	55
4.2 – Padrão de expressão dos marcadores de diferenciação neural durante o desenvolvimento.....	62

4.3 – Padrão de expressão dos receptores purinérgicos ionotrópicos P2X durante o desenvolvimento.....	67
5. Discussão.....	73
6. Conclusões.....	84
7. Referências.....	86
8. Anexos.....	95



# **1. INTRODUÇÃO**



# **1. INTRODUÇÃO**

---

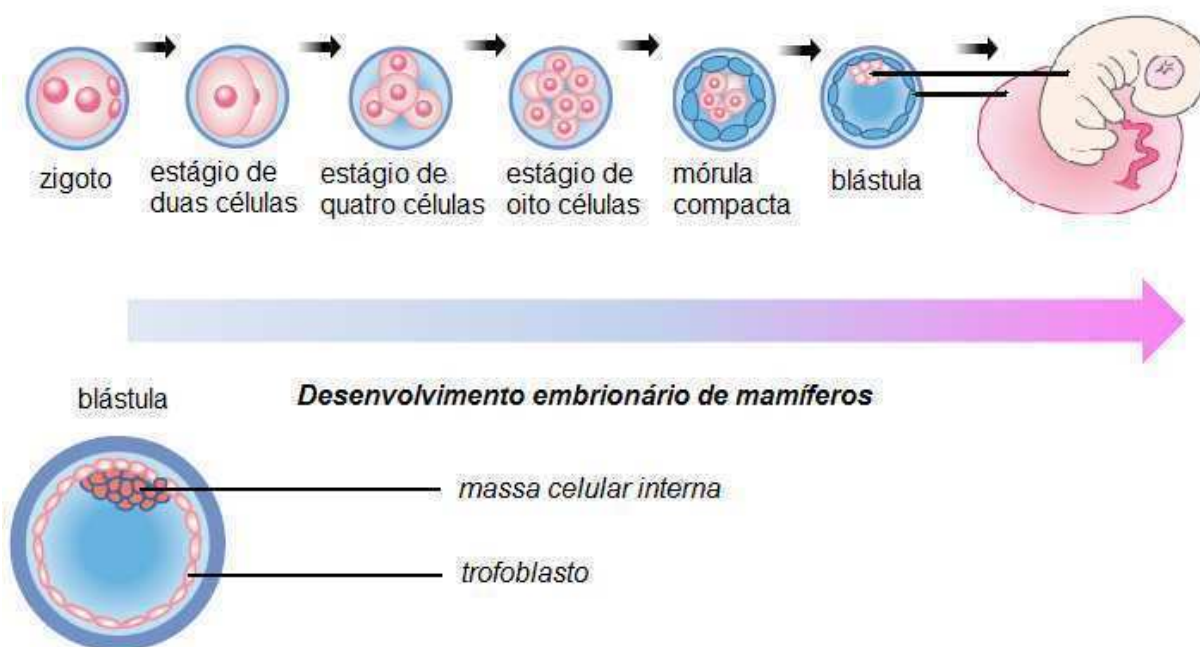
## **1.1 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

O sistema nervoso central (SNC) é o mais complexo de todos os sistemas de órgãos dos vertebrados. Células progenitoras neurais, ao se diferenciarem em neurônios e outros tipos celulares, desenvolvem um padrão altamente organizado de conexões, criando uma rede neuronal que forma um cérebro funcional e o restante do sistema nervoso. A estrutura do sistema nervoso é virtualmente idêntica de indivíduo para indivíduo e reconhecivelmente próxima entre os diferentes mamíferos. A sua função é, em larga maioria, determinada geneticamente (Götz e Huttner, 2005).

No início do desenvolvimento, a célula ovo totipotente sofre sucessivas clivagens passando pelos estágios de mórula, blástula, gástrula e nêurula, quando se inicia a formação do SNC. A célula ovo totipotente, após passar por sucessivas clivagens alcança o estágio de mórula até a formação de uma estrutura semelhante a uma esfera denominada blástula (ou blastocisto) (figura 1). Enquanto a maior parte das células da camada externa se tornará o trofoblasto, indispensável para a formação da placenta e a correta implantação do embrião no útero materno, o embrião propriamente dito se formará a partir de um pequeno grupo de células no interior do trofoblasto. Estas células recebem o nome de massa celular interna, são pluripotentes e darão origem ao embrião, seguindo assim para o estágio de gástrula (Pedersen *et al.*, 1986; Fleming, 1987; Gilbert, 2009).

O processo de gastrulação é um passo essencial na formação do plano corporal dos vertebrados. A gastrulação corresponde a uma série de movimentos

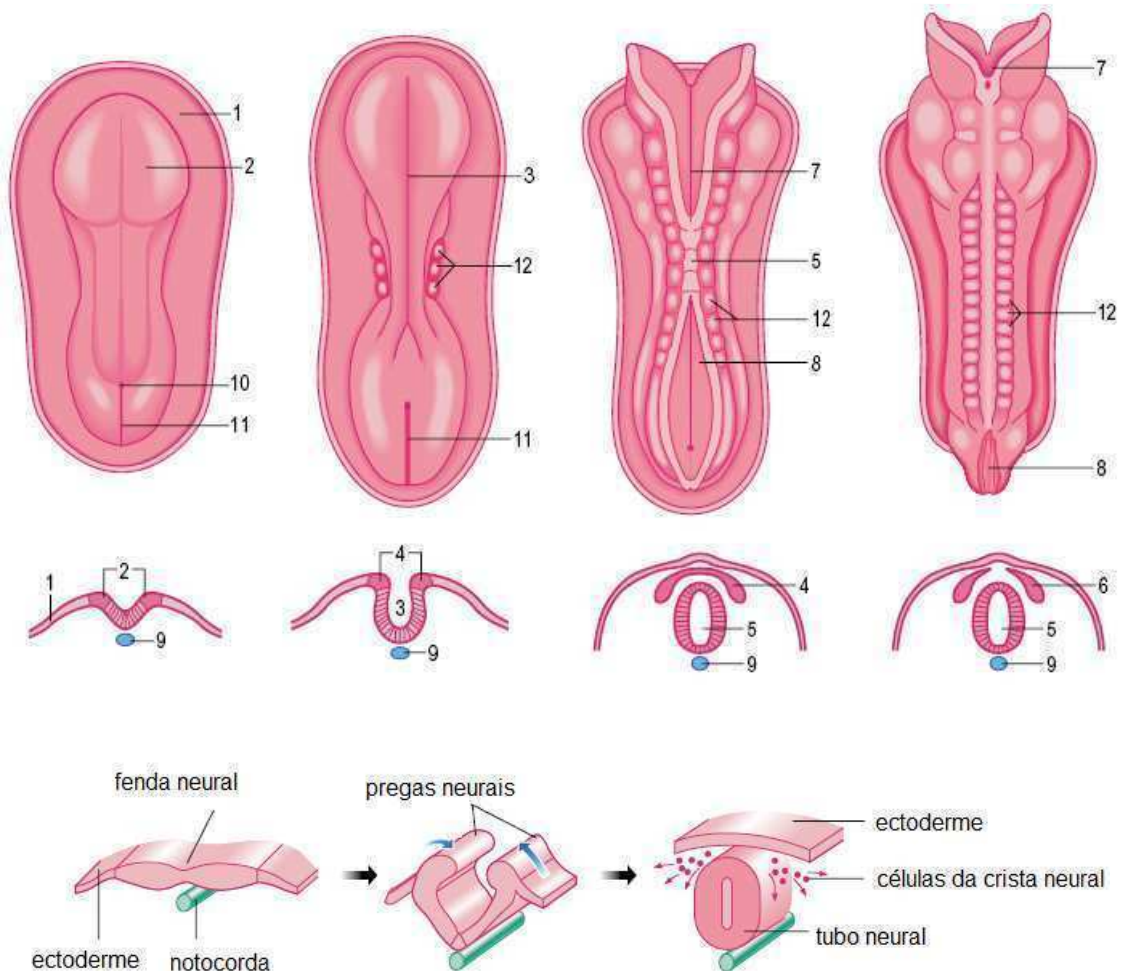
celulares, divisões e invaginações que transformam a pequena massa celular interna nos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme. De modo geral, a endoderme é responsável pela formação do trato digestivo, enquanto a mesoderme formará os tecidos musculares e circulatórios, ossos, rins e órgãos reprodutivos, e a ectoderme originará a pele e o sistema nervoso (Gilbert *et al.*, 2009).



**Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento inicial do embrião de mamífero.** Representação esquemática simplificada dos estágios de diferenciação de duas populações distintas de células: a massa celular interna e o trofoblasto. A primeira dará origem ao embrião, enquanto a segunda formará os anexos embrionários e a porção fetal da placenta. Modificado de Hyttel *et al.* 2010.

O SNC é formado a partir da placa neural, uma camada de tecido epitelial que deriva da ectoderme dorsal do embrião. O processo de formação da placa neural, conhecido como neurulação, inicia-se com a indução na linha média da ectoderme pela notocorda e mesoderme subjacentes, processo chamado de indução neural (figura 2). A invaginação da ectoderme é acompanhada pela intensa proliferação celular da placa neural flanqueada pelas pregas neurais. Com a fusão das pregas

neurais e a formação do tubo neural, células neuroepiteliais migram para formarem a crista neural. A estimulação subsequente das células da crista neural a induzem a se diferenciarem e darem origem a neurônios e glias dos gânglios autonômicos, a células neurosecretoras da glândula adrenal e a neurônios do sistema nervoso entérico, além de contribuem para uma variedade de estruturas não neurais, como células pigmentares presentes no olho, além de contribuir na formação da face e do crânio (Smith e Schoenwolf, 1997; Le Douarin, 2004).



**Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento do tubo neural e da crista neural.** As setas indicam a origem das induções e os movimentos resultantes desta indução. Modificado de Hyttel *et al.* 2010. 1: Superfície da ectoderme; 2: Placa neural; 3: Fenda neural; 4: Crista neural; 5: Tubo neural; 6: Gânglio espinhal; 7: Neuroporo anterior; 8: Neuroporo posterior; 9: Notocorda; 10: Nó primitivo; 11: Linha primitiva, 12: somitos.

Assim, após essa série de movimentos morfogenéticos chamados de neurulação, ocorre a formação do tubo neural e inicia-se o desenvolvimento do encéfalo e da medula espinhal (Liu e Niswander, 2005; Fuccillo *et al.*, 2006; Ciani e Salinas, 2005; Louvi e Artavanis-Tsakonas, 2006; Sporle e Schughart, 1997).

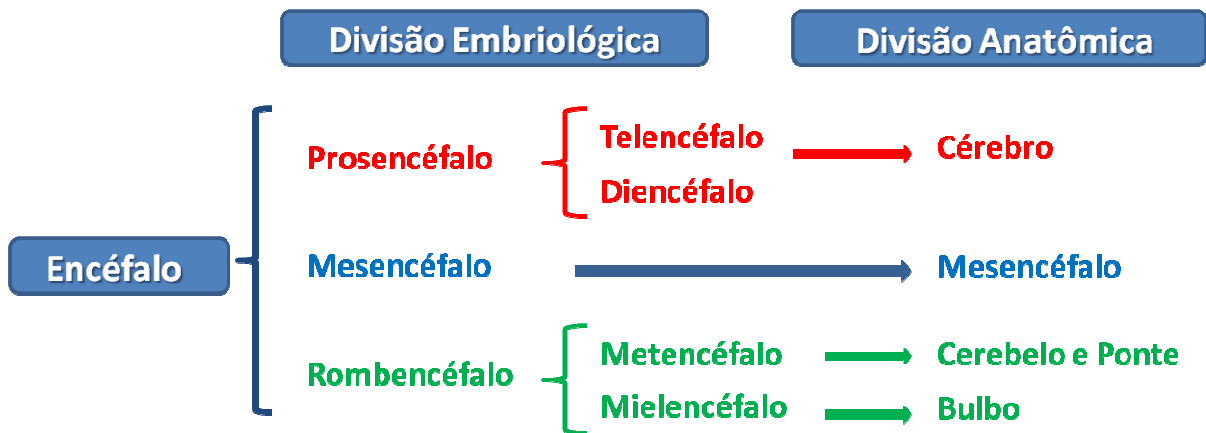
## **1.2 – ESTÁGIOS NO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL PRÉ-NATAL**

### **1.2.1 – Divisão do SNC com Base em Critérios Anatômicos**

O sistema nervoso central é aquele que se localiza dentro do esqueleto axial (cavidade craniana e canal vertebral). O encéfalo é a parte do SNC localizada dentro do crânio neural; a medula, é a porção que se encontra dentro do canal vertebral. O encéfalo é subdividido em cérebro, cerebelo e tronco encefálico. Este último é formado pela ponte que separa o bulbo (ou medula oblonga), posicionada caudalmente, do mesencéfalo, localizada cranialmente. Dorsalmente à ponte e ao bulbo localiza-se o cerebelo (Kaufman, 1994; Theiler, 1989).

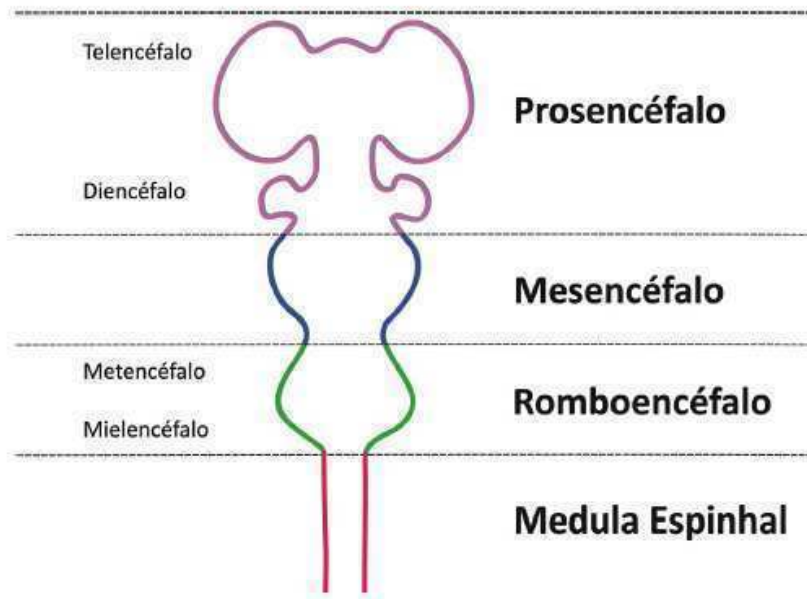
### **1.2.2 – Divisão do SNC com Base em Critérios Embriológicos**

A divisão que adotamos aqui baseia-se naquela que foi proposta por Theiler (1972, revista em 1989), a mesma seguida por Kaufmann em 1994. O desenvolvimento pré-natal do camundongo dura em média 19 dias (considerando o nascimento no 19º dia como parte do desenvolvimento pré-natal), estes 19 dias são divididos em 27 estágios: E1 a E27. E1 é considerado o dia da fecundação, enquanto P0 é o dia do nascimento. As partes do SNC do adulto recebem os nome da vesícula primordial que lhes deu origem embriologicamente. A correspondência entre as vesículas primordiais e os componentes do SNC, são representado a propósito de sua divisão anatômica na chave abaixo:



**Figura 3 – Divisão do Sistema Nervoso Central com base em critérios embriológicos e anatômicos.** Baseado em Theiler, 1972 (revista em 1989), seguida por Kaufmann em 1994, e por Gilbert 2009.

O tubo neural estende-se ao longo do comprimento do tronco do embrião e, com o desenrolar do desenvolvimento, transforma-se no cordão espinhal. Uma região modificada do tubo neural são as vesículas cerebrais na cabeça, ou região cefálica do embrião. Mais comumente, três vesículas cerebrais primárias são distinguidas: o prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro medial) e rombencéfalo (cérebro posterior) (figura 4). A vesícula do prosencéfalo rapidamente torna-se particionada na vesícula telencefálica (a qual origina o córtex cerebral, gânglio basal e outras estruturas) e na vesícula diencefálica (a qual dá origem ao tálamo e hipotálamo) entre os dias 12 (E20) e 15 (E23) do desenvolvimento embrionários. Alguns autores dividem o rombencéfalo em metencéfalo (o primórdio do cerebelo e da ponte) e mielencefalo (o primórdio da medula oblonga). Desde o início do fechamento das vesículas cerebrais, dia 12 (E20), a porção anterior do prosencéfalo (o primórdio do telencéfalo), e a porção posterior do prosencéfalo (o primórdio do diencefalo) são facilmente distinguidos. Classicamente, dividi-se a extensão cefálica do tubo neural em quatro vesículas: o telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo e rombencéfalo.



**Figura 4 – Subdivisões primárias do tubo neural durante o desenvolvimento do cérebro dos mamíferos ao longo do eixo antero-posterior.** A estrutura mais anterior do tubo neural é prosencéfalo, que é subdividido em telencéfalo e diencéfalo, representado em lilás. Em seguida encontra-se o mesencéfalo (azul), seguido pelo romboencéfalo, que se divide em metencéfalo e mielencéfalo, representado em verde. A estrutura mais posterior do tubo neural é a medula espinhal, representada em vermelho. Adaptado de Gilbert, 2009.

O exame das características estruturais do cérebro de camundongo em desenvolvimento entre os dias 8.5 (E13) e 19 (E27) sugere três fases do desenvolvimento cerebral deste animal (ver figura 4):

**Fase Inicial do Desenvolvimento Cerebral:** esta fase estende-se do dia 8 (E13) do desenvolvimento ao dia 9.5 (E14). É relativamente um período curto. Externamente, esta fase é caracterizada pelo início da evidenciação do tubo neural. O coração já é capaz de manter alguma circulação, mas os átrios e os ventrículos ainda não são distintos. Durante esta fase, o crescimento cerebral rápido consiste principalmente na expansão da matriz proliferativa primária, o neuroepitélio. No dia 8.5 (E13), o embrião de camundongo apresenta 7 dos seus futuros 45 somitos. Também a notocorda estende-se caudalmente. A prega neural está em fechamento até à altura entre o 4<sup>o</sup> e o 5<sup>o</sup> somito (no sentido antero-posterior). Durante essa fase,

há uma acentuado aumento no volume da região cefálica. Passando pelo 9º dia da gestação, já no estágio 14 (E14), o tubo neural fecha-se na extremidade rostral. A cauda do embrião aumenta rapidamente, enquanto os órgãos do sistema digestório se expandem fora da cavidade abdominal, dentro da hérnia umbilical. O animal tem entre 1.3 e 3.3 mm de comprimento.

**Fase Intermediária do Desenvolvimento Cerebral:** esta fase cobre o período entre os dias 10 (E17) e 13 (E21). O neuroepitélio permanece proeminente e ativo durante este período de modo particular nas regiões dorsal e rostral, e com a expansão da matriz germinativa secundária há um aumento continuado no estoque dos neuroblastos. Este processo é acoplado ao crescimento progressivo do parênquima cerebral pela diferenciação neuronal. Ao final deste período todos os sistemas cerebrais principais são identificados. Anatomicamente, as mudanças mais marcantes na região cefálica ao final desse estágio são: destacadas vesículas ópticas e um evidente aumento na extensão do cordão espinhal. Um pouco mais tarde, já ao longo do 13º dia de desenvolvimento (E21), a hipófise já encontra-se consideravelmente formada, os olhos também mostram evidente aumento e o cordão espinhal se estendeu ainda mais antero-posteriormente, sendo ainda mais visível. Externamente, os membros já apresentam os digitos recortados e completamente sepados da palma dos membros. A hérnia umbilical é ainda notável. O comprimento do embrião varia, aumentando de 3.5 mm no 10º dia para 12 mm ao final do 13º dia (E21).

**Fase Final do Desenvolvimento Cerebral:** esta fase cobre o intervalo entre os dias 14 (E22) e 18-19 (E26-27). Este estágio é marcado pela dissolução gradual do neuroepitélio e o rápido crescimento do parênquima cerebral. Ao final deste estágio (no nascimento) muito das grandes estruturas cerebrais são identificadas em

seus locais finais. A neurogênese continua no camundongo após o nascimento, primariamente como um resultado da contínua geração de neuroblastos na matriz germinativa secundária em regiões cerebrais selecionadas (particularmente no córtex cerebelar e o giro dentado hipocampal). Entretanto, o principal evento no desenvolvimento cerebral pós-natal é a diferenciação acelerada dos neurônios e a mielinização dos nervos. Por volta do 17º dia do desenvolvimento (E25), a hérnia umbilical já regrediu completamente e os órgãos do aparelho digestivo foram internalizados na cavidade abdominal. Isso acontece devido ao aumento da cavidade abdominal, que agora comporta toda a extensão das alças abdominais. Na altura do dia 17 do desenvolvimento, o animal tem em torno de 18mm e segue crescendo, porém em ritmo lento. No dia final do desenvolvimento pré-natal, o animal apresenta seu sistema circulatório completamente formado, seus olhos já podem ser abertos e a pele é espessa, mas sem pelos. Os primeiros dentes estão formados (os molares). Os pulmões já podem funcionar logo em seguida ao nascimento. Os ossos estão ainda em fase de ossificação. O cérebro e o bulbo olfatório estão bem desenvolvidos. No dia 19 (E27), o recém nascido é muito semelhante ao animal de 18 dias (E26), porém seus olhos e ouvidos ainda são histologicamente imaturos e continuam fechados. O comprimento do corpo varia, mas pode alcançar 23 mm.

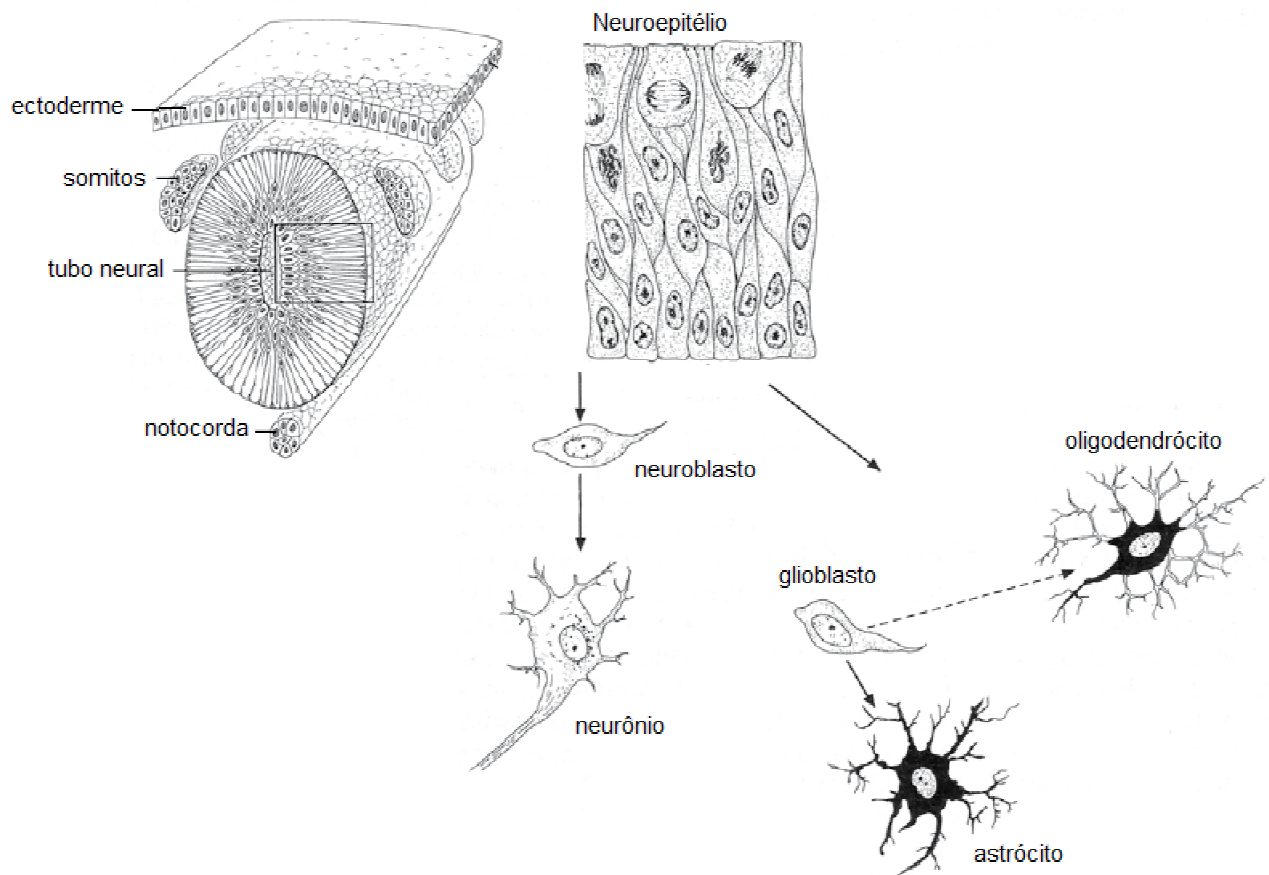
### **1.3 – A DIVERSIDADE NEURONAL: AS LINHAGENS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

A diversidade neural surge durante o desenvolvimento embrionário a partir de regiões proliferativas situadas próximo ao tubo neural. Este tubo é inicialmente uma única camada de células pseudo-estratificada, que se prolifera rapidamente e dá origem a diversos tipos neurais (figura 5) (Wilson e Madem, 2005). Neste contexto,



para que se possa gerar os diferentes tipos de neurônios e glias do sistema nervoso, as células embrionárias devem proliferar e se diferenciar, sendo tais processos altamente controlados. A neurogênese é acompanhada pelo desenvolvimento sucessivo de células progenitoras e glias radiais, as quais se diferenciam em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e em células progenitoras que persistem no indivíduo adulto, mesmo que dotadas de capacidade restrita de desenvolvimento e de proliferação (Frisén *et al.*, 1998). Uma característica fundamental do desenvolvimento neural em vertebrados é que os diferentes tipos celulares são gerados em uma precisa sequência de eventos: primeiro neurônios, seguido por oligodendrócitos e astrócitos (Bayer e Altman, 1991; Moutri e Gage, 2006).

Para uma melhor compreensão do progresso de geração da diversidade neural durante o desenvolvimento o acesso a confiáveis marcadores moleculares é uma condição fundamental. A expressão sequencial de diferentes membros da família dos genes de filamentos intermediários provou ser útil para identificar vários tipos de células no sistema nervoso central ao longo do desenvolvimento. O filamento intermediário nestina é expresso precocemente em células proliferativas do tubo neural, em seguida é substituído pelo filamento intermediário *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), mais tardiamente são expressos os neurofilamentos nos neurônios, tais como  $\beta$ 3-tubulina e *microtubule-associated protein II* (MAP2) (Frisén *et al.*, 1998).



**Figura 5 – Linhagens celulares no desenvolvimento do sistema nervoso.** Adaptado de Sinowatz and Rüssel (2007).

A formação das linhagens gliais e neuronais está essencialmente relacionada a divisões simétricas e assimétricas, caracterizadas pela distribuição igual ou desigual do conteúdo citoplasmático. A neurogênese se inicia pela mudança da proliferação para divisão assimétrica (ou neurogênica), fazendo com que a célula pluripotente gere outro progenitor e uma célula mais diferenciada. Portanto, a divisão assimétrica seria responsável pela geração da diversidade do córtex cerebral (Gotz e Huttner, 2005; Trujillo *et al.*, 2009). A transição para gliogênese envolve um retorno dos progenitores às divisões simétricas. O mecanismo básico dessa extraordinária mudança no comportamento dos progenitores neurais e o destino durante o desenvolvimento não são compreendidos totalmente, porém é bem aceita a ideia de que propriedades intrínsecas dos progenitores neurais, bem como mudanças na

sinalização no ambiente direcionam esses eventos (Guillemont, 2007; Trujillo *et al.*, 2009).

Durante a sua gênese e diferenciação, as células tronco interpretam sinais extrínsecos e intrínsecos que, dependendo da localização da sinalização recebida e do padrão gênico expresso naquele momento, ativa um novo repertório de expressão gênica que codifica fatores de transição fenotípica que conduzem à formação de progenitores neurais. Entre os fatores extrínsecos estão os neurotransmissores, os hormônios, os fatores de crescimento e a matriz extracelular. Os fatores intrínsecos compreendem os fatores de transcrição, rearranjo do DNA, edição dos RNAs e modificações proteicas epigenéticas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Guillemont, 2007; Moutri e Gage, 2006).

Em relação aos fatores extrínsecos, uma das primeiras moléculas indutoras identificadas foi o ácido retinóico, derivado da vitamina A e membro da família dos esteroides, este ativa a expressão gênica em diferentes regiões do sistema nervoso ao longo do desenvolvimento embrionário (Johnson e Tabin, 1997). Outras vias de sinalização relacionadas à indução neural *in vivo* são mediadas por *BMPs* (proteína morfogenética de osso), *Sonic hedgehog (SHH)*, *Wnt*, *Notch* e *FGFs* (*fibroblast growth factors*). Assim, a identidade e o destino celular inicialmente dependem destas moléculas sinalizadoras e de suas localizações, uma vez que são produzidas em diversos centros de sinalização, como a notocorda ou tecido mesodérmico (Liu e Niswander, 2005; Fuccillo *et al.*, 2006; Ciani e Salinas, 2005; Louvi e Artavanis-Tsakonas, 2006).

Enquanto o papel dos fatores de crescimento está bem documentado (Temple e Quian, 1995; Gross *et al.*, 1996; 1996; Quian *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999), crescem as evidências do envolvimento dos neurotransmissores e

de seus receptores na regulação dos processos de geração da diversidade neuronal durante do desenvolvimento embrionário (Trujillo *et al.*, 2009). Um indicador desta importância funcional é a mudança da expressão de neurotransmissores e de seus receptores durante o desenvolvimento. É bem conhecido atualmente que a coordenação entre a proliferação e a diferenciação de células progenitoras é a base para a produção de um número apropriado de neurônios e glias durante o desenvolvimento neuronal. Neste sentido, aumentam os indícios de que os neurotransmissores atuam regulando a proliferação, a diferenciação e a expressão gênica pela ativação de diversas vias de sinalização (Martins *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2009; Zimmermann, 2006).

Atualmente existem inúmeras moléculas que transmitem informações neuromoduladoras, podendo ser aminoácidos, purinas, aminas biogênicas, peptídeos, entre outros. Um grande número de aminoácidos preenche todos os critérios de um neurotransmissor. Os três mais bem estudados são: GABA (Ácido gama-amino-butírico), o principal neurotransmissor inibitório; glutamato, o principal excitatório; e a glicina, também um mediador inibitório. As purinas são compreendidas pelo ATP (adenosina 5'-trifosfato) e outros nucleotídeos relacionados. Já as aminas compreendem a acetilcolina, dopamina, adrenalina, histamina, noradrenalina e serotonina.

#### **1.4 – RECEPTORES IONO- E METABOTRÓPICOS E A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL**

É bem conhecido que a coordenação entre a proliferação e a diferenciação de células progenitoras é a base para a produção de um número apropriado de neurônios e glias durante o desenvolvimento neuronal. Nesse sentido, aumentam os

indícios de que os neurotransmissores atuam como sinais de regulação no controle celular da proliferação, diferenciação e expressão gênica por ativação de diversas vias de sinalização (Martins *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2009).

Os neurônios do sistema SNC são células polarizadas com um único axônio e com múltiplos dendritos, que estão ligados às células vizinhas por sinapses. Durante este processo, os neurônios expressam canais voltagem dependentes, geram potenciais de ação, liberando e detectando neurotransmissores nas suas sinapses para a transmissão de sinais (Ulrich e Majumder, 2006).

A fim de garantir a funcionalidade das ligações neuronais, o processo de diferenciação de uma célula indiferenciada para um neurônio maduro tem de ser altamente coordenado. A excitabilidade de neurônios e células gliais é conhecida por ser a base da sinalização e da comunicação celular no sistema nervoso adulto, mas há evidências recentes que indicando que os processos, tais como indução da proliferação e da diferenciação, são controlados por fluxos de íons e alterações dos potenciais de membrana das células progenitoras. Isto requer estágios de expressão específica dos genes de neuropeptídeos, neurotransmissores e seus respectivos receptores. Picos de cálcio que alteram a concentração intracelular deste íon podem desencadear a diferenciação neuronal, e alterações no padrão dos picos de  $Ca^{2+}$  em neurônios embrionários durante a diferenciação conduz a um fenótipo neuronal diferente (Borodinsky *et al.* 2004).

Para além das suas bem estabelecidas ações no sistema nervoso central maduro, os receptores de neuropeptídeos e neurotransmissores, e os seus respectivos ligantes devem desempenhar papéis fundamentais durante a maturação deste sistema. Portanto, esses receptores e seus ligantes já são muitas vezes

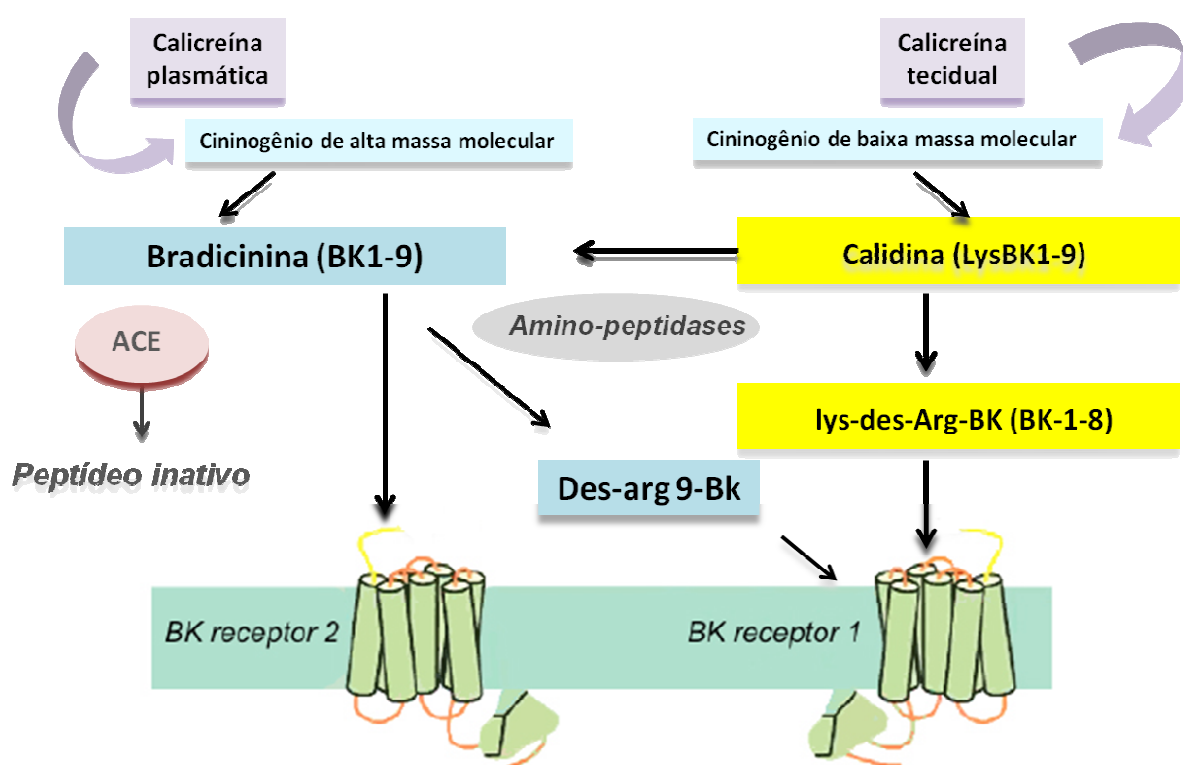
expressos no início do desenvolvimento embrionário, quando as conexões sinápticas são ainda imaturas (Ulrich and Majumder, 2006).

#### **1.4.1 – O Sistema Calicreína-cininas**

O sistema calicreínas cininas é constituído de um grande número de proteínas, tais como os cininogênios; enzimas, que são as calicreínas teciduais e plasmáticas; e peptídeos biologicamente ativos, como a bradicinina (BK), a calidina, des-Arg<sup>9</sup>-BK e des-Arg<sup>9</sup>-calidina. Os peptídeos mediam seus efeitos via receptor B1 (B1BKR) e B2 (B2BKR) de cininas (Bhoola *et al.*, 1992). Em relação à participação de neurotransmissores e neuropeptídeos que atuam durante a diferenciação, têm sido extensivamente demonstradas as participações dos integrantes do sistema calicreína-cinina durante a diferenciação neuronal. Interessantemente, um trabalho recente do nosso laboratório comprovou o papel do receptor B2 de cininas *in vitro*, durante a diferenciação neuronal de células pluripotentes de carcinoma embrionário murino P19 (Martins *et al.*, 2005) e de progenitores neurais do telencéfalo embrionário (Trujillo, *et al.*; 2012).

As cininas são oligopeptídeos gerados pela clivagem proteolítica de cininogênios de baixa e alta massa molecular por serino-proteases da família calicreína. Cininogênios de alta massa molecular são precursores da bradicinina (BK), enquanto cininogênios de baixa massa molecular originam a calidina (figura 6). As cininas atuam na regulação de processos fisiológicos como homeostase cardiovascular, angiogênese, dor, inflamação, coagulação e desenvolvimento. Na verdade, todo ou quase todo sistema calicreína-cininas está ativado após injúria tecidual, onde regula a função vascular, crescimento celular, diferenciação e angiogênese (Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000). Há evidências de que o

sistema nervoso contém todos os componentes do sistema caliceína-cininas e que as cininas podem atuar como neuromediadores em várias funções (Bhoola *et al.*, 1992; Borkowski *et al.* 1995), incluindo diferenciação neuronal e neuroproteção (Martins *et al.* 2012; Trujillo *et al.*; 2012). A expressão de caliceínas no desenvolvimento encefálico de ratos (Iwadate *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2008) suporta a idéia de que receptores induzidos por cininas podem ser necessários durante o desenvolvimento neuronal.



**Figura 6: As vias de ativação das cininas e os seus receptores.** Geração das cininas pelas caliceínas teciduais e plasmáticas. Nos tecidos, a caliceína gera calidina; enquanto a caliceína plasmática gera bradicinina (BK) a partir do cininogênio de alta massa molecular. A Bradicینina [BK-(1-9)] e a calidina [Lys-BK-(1-9)] são agonistas mais potentes do receptor B2BKR. Já o BK-1-8, calidina-(Lys-BK1-8) e Des-arg9-Bk são agonistas do B1BKR. A sinalização através dos receptores de bradicinina resultará no aumento da concentração intracelular do  $[Ca^{2+}]_i$ , na formação de NO, cGMP e  $\Delta$ AMP, através de etapas posteriores que envolvem enzimas não mostradas na figura. Baseada em El Dahr, 1997.

Nesse sentido, a bradicinina também tem se mostrado um fator estimulador da liberação de neurotransmissores como noradrenalina e neuropeptídeo Y por neurônios simpáticos, células cromafins e células de feocromocitoma (Kansui *et al.*,

2002; Kurz *et al.*, 1997; Eurin *et al.*, 2002; Dendorfer *et al.*, 1996). Além disso, o envolvimento da BK na sinalização induzida por variações nos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  foi demonstrado em neurônios sensoriais de rato adulto (Thayer *et al.*, 1998) e em neuroesferas do telencéfalo de rato (Martins *et al.*, 2008).

Martins e colaboradores (2005) comprovaram a participação do receptor B2BKR durante a diferenciação neuronal em células de carcinoma embrionário murino P19. Este trabalho verificou que a expressão gênica e protéica do receptor B2BkR de cininas aumenta após a indução da diferenciação neuronal juntamente com um aumento da secreção do peptídeo bradicinina no meio de cultura. Também foi avaliada a importância da ativação do receptor B2BkR na fase primária da diferenciação (dia 2) e na fase tardia (a partir do dia 5) utilizando o antagonista específico para o receptor B2BkR de cininas, HOE-140. Verificou-se que inibição do receptor B2BkR comprometeu a diferenciação terminal das células P19 para neurônios com fenótipo colinérgico, diminuindo a expressão e funcionalidade dos receptores muscarínicos de acetilcolina, mostrando uma inter-relação entre os receptores durante a diferenciação e indicando que o receptor B2BkR possui uma função essencial durante a diferenciação neuronal.

Em adição, o nosso grupo mostrou a presença do sistema caliceína-cininas e caracterizou a expressão de seus componentes durante a diferenciação de neuroesferas do telencéfalo embrionário de ratos, além de comprovar a liberação de bradicinina por essas células (Martins *et al.*, 2008). Vale ainda ressaltar que o aumento da expressão do receptor B2BkR de cininas durante a diferenciação celular foi observado não somente em tecido nervoso, mas também na diferenciação de células-tronco embrionárias em linhagens epiteliais (Huang *et al.*, 2007).



Trujillo e colaboradores (2012) caracterizaram o papel da bradicinina e seus receptores durante a diferenciação *in vitro* de células-tronco neurais isoladas de telencéfalo de embriões de rato (dia 14 do desenvolvimento), sugerindo a existência de um efeito autócrino durante a diferenciação neural. Essas células proliferam como neuroesferas e apresentam uma diferenciação semelhante aos eventos do desenvolvimento do córtex *in vivo*, com migração radial e aumento da expressão de marcadores neuronais e gliais específicos, ao mesmo tempo em que houve a diminuição de da expressão dos marcadores de progenitores. A presença do antagonista do receptor B2BkR de cininas, HOE-140, durante a diferenciação de células-tronco neurais isoladas de telencéfalo embrionário resultou na inibição da expressão de  $\beta$ 3-tubulina e enolase neuronal específica, simultaneamente ao aumento da expressão de GFAP. Deste modo, a neurogênese foi favorecida na presença de bradicinina ou pela inibição de sua degradação pelo captopril em momentos intermediários e finais do processo de diferenciação. Em adição, observou-se que o uso de agonistas e antagonistas do receptor B1, assim como o tratamento com HOE-140, em células diferenciadas de cultura primária, não interfere na expressão dos marcadores neurais, sugerindo a especificidade deste efeito via receptor B2BkR ao longo do processo de diferenciação *in vitro* (Huang et al. 2007; Trujillo et al., 2012).

As ações biológicas da bradicinina e da calidina são mediadas por um receptor acoplado à proteína G, o receptor B2 de cininas (B2BkR). Este é constitutivamente expresso e amplamente distribuído, sob condições fisiológicas, em tecidos periféricos e centrais. Com relação sistema nervoso, a expressão gênica e protéica do receptor B2 foi detectada no córtex cerebral, hipocampo, gânglio basal, tálamo,

hipotálamo, cerebelo e núcleos do tronco cerebral (Chen *et al.*, 2000; Mahabeer *et al.*, 2000).

Há fortes evidências de que a expressão do receptor B2BkR de cininas é regulada durante o desenvolvimento. Por exemplo, tem sido demonstrado que a expressão deste receptor é importante para o desenvolvimento dos sistemas cardiovascular e urinário (El-Dahr, 1997). Também foi demonstrada sua participação na diferenciação muscular (Alves, 2009). A inibição da atividade do receptor B2 em embriões de rato resulta em animais com distúrbio no desenvolvimento do fígado. Também há evidências que demonstram que ocorre uma modulação da expressão e da função do receptor B2BkR durante o desenvolvimento neuronal. Este foi detectado em neurônios noradrenérgicos centrais e periféricos, na medula espinhal, em células de feocromocitoma PC12 durante a diferenciação neuronal e em linhagens celulares derivadas de neuroblastoma e glia (Schelb *et al.*, 2001; Ma e Heavens, 2001; Kozlowski *et al.*, 1988; Bush *et al.*, 1991; Stephens *et al.*, 1993; Yano *et al.*, 1984). Além disso, na literatura também são encontrados trabalhos relatando a regulação intrínseca entre B2BkR e outros receptores de neurotransmissores e de hormônio envolvidos em função neuronal e desenvolvimento, como receptores de endotelina, de serotonina e receptores purinérgicos (Chau *et al.*, 1993; Reetz e Reiser, 1994; Willars *et al.* 2009).

#### **1.4.2 – Receptores purinérgicos**

A primeira evidência farmacológica da geração de potenciais de ação desencadeados pela adenosina foi publicada por Drury e Szent-Gyorgyi (Dury e Szent-Gyorgyi, 1929) ao constatarem que administração de adenosina era capaz de promover alterações na frequência cardíaca, diminuir a pressão arterial. Contudo,

somente em 1972, Burnstock sugeriu que o ATP e outros nucleotídeos relacionados seriam neurotransmissores ou cotransmissores (Burnstock, 1972), ocasião em que surge o termo “transmissão purinérgica”. Implícito ao conceito de neurotransmissão purinérgica está a proposta da existência de receptores pós-juncionais de ATP (Trujillo, *et al.*, 2009). Estudos farmacológicos, comparando as respectivas respostas em diferentes tecidos levou a uma primeira divisão destes receptores em P1 (receptores de adenosina) e P2 (receptores purinérgicos) (Burnstock, 1985), com os últimos sendo subdivididos nos subtipos ionotrópicos P2X(1-7) e metabotrópicos P2Y(1-14). O conceito de sinalização purinérgica expandiu-se ao longo dos anos, incluindo a cotransmissão junto a outros neurotransmissores em diferentes tipos de nervos periféricos e do sistema nervoso central. Assim, têm se prestado muito atenção à função da sinalização purinérgica e a avaliação das alterações na atividade celular de curta duração. No entanto, existem trabalhos que demonstram que os receptores purinérgicos participam na comunicação celular de longa duração, incluindo a proliferação celular, apoptose e diferenciação (Majumder, *et al.*, 2007).

Os receptores P2Y são divididos em subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y8, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14. Esses receptores também são acoplados à proteína G e possuem uma grande variedade de ligantes, sendo os principais ATP, ADP, UTP e UDP. A resposta à ligação nesses receptores ocorre com a liberação de cálcio citosólico ou alteração nos níveis de AMPc (Burnstock e Ulrich, 2011; Zimmermann, 2008).

Os receptores P2X são canais iônicos ativados por ligantes e sua ativação induz uma condutância rápida e seletiva dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (North, 1996). As subunidades de receptores ionotrópicos P2X(1-7) podem se agrupar de modo homomérico ou heteromérico para formar canais com condutância não seletiva a

cátions. Cada subunidade de P2X compartilha a mesma estrutura geral: tendo N- e C-terminais intracelular, duas regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana e um domínio extracelular contendo dez resíduos de cisteína conservados (Barrera *et al.*, 2005, 2008; Abbracchio *et al.*, 2006). Os receptores P2X são amplamente expressos em neurônios e glias, e, na maioria das vezes, medeiam uma transmissão rápida nas sinapses do sistema nervoso. O ATP evoca correntes nas células pós-sinápticas, cuja significância funcional está relacionada a geração de transientes de cálcio.

Os receptores purinérgicos possuem um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, induzindo a diferenciação celular, apoptose, proliferação e a síntese e liberação de fatores neurotróficos (Neary *et al.*, 1996; Rathbone *et al.*, 1999). Sua ação no desenvolvimento do sistema nervoso central também se dá através da modulação da concentração de cálcio citosólico, algo já observado tanto em modelos animais quanto em humanos (Ryu *et al.*, 2003).

Resende e colaboradores (2007 e 2008) caracterizaram a participação dos receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y) durante a proliferação neuronal das células P19. A expressão gênica e protéica dos receptores P2X2, P2X6, P2Y2 e P2Y6 aumenta durante o curso da diferenciação, enquanto os receptores P2X3, P2X4, P2Y1 e P2Y4 são expressos em altos níveis nas células no início e decrescem após a indução da diferenciação.

O ATP também pode atuar no desenvolvimento embrionário em células neuronais e não neuronais principalmente favorecendo a elevação de cálcio citosólico. Segundo Cheung e colaboradores (2005), todas as subunidades de P2X, exceto o P2X1, estão altamente expressas no desenvolvimento encefálico do rato. O

ATP gerou uma inibição do crescimento de axônios motores via P2X3; especula-se que o receptor P2X7 pode estar envolvido em apoptose durante a embriogênese e os receptores P2X4, P2X5 e P2X6 podem estar envolvidos na neurogênese pós-natal. Já os receptores P2Y estariam associados a proliferação e migração dos progenitores neurais, atuando como inibidores da neurogênese (Burnstock e Ulrich, 2011; Lin *et al.*, 2007).

No período pré-natal o ATP já foi associado ao controle do crescimento axonal, como no crescimento de axônios no hipocampo (Heine *et al.*, 2006) e na inibição do crescimento de axônios de neurônios motores (Cheun *et al.*, 2005). Vários receptores que são expressos durante o desenvolvimento embrionário não possuem correspondentes no sistema nervoso central e periférico adulto, sugerindo que seu papel é específico no desenvolvimento (Burnstock e Ulrich, 2011).

Estudos morfológicos descreveram tanto um aumento como um decréscimo dependente da idade na expressão dos receptores P2X no sistema nervoso de rato. Sendo os mRNAs codificados para as subunidades P2X1 e P2X2 encontrados em níveis significativamente baixos em cérebros e gânglio cervical superior de ratos adultos em comparação com aqueles obtidos de animais neonatos com 5 dias (Kidd *et al.*, 1998). Similarmente, a imunoreatividade da subunidade P2X3 em cérebro de rato declinou durante o desenvolvimento pós-natal recente (Kidd *et al.*, 1998). Em contraste com estes achados, Brändle e colaboradores (1999) caracterizaram a expressão das subunidades dos P2X em diferentes tecidos do ouvido interno. O receptor P2X2 foi detectado no bulbo olfatório, córtex cerebral, núcleo putâmen, núcleo caudado, núcleo amigdalóide, hipocampo, tálamo, hipotálamo, córtex cerebelar, núcleo medular e mesencéfalo (Kanjhan *et al.*, 1999).

Cheung e Burnstosk (2002) reportaram que a expressão dos receptores P2X2 e P2X3 ocorre separadamente durante a embriogênese e a co-expressão de ambos aparece no desenvolvimento tardio.

Além do entendimento da formação do sistema nervoso dos mamíferos, o conhecimento de como os receptores purinérgicos atuam no seu desenvolvimento também é essencial para que se possam criar métodos que permitam controlar o ciclo e o destino celular e diferenciação das células troncos neurais, para que essas possam ter novas aplicações terapêuticas.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

---

A diferenciação neural e a formação do sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário apresentam enorme complexidade e importância. No entanto, pouco se conhece a respeito do papel do receptor B2BKR de cininas ao longo desse processo.

Apesar dos estudos *in vitro* desenvolvidos em modelos como células-tronco embrionárias e progenitores neurais de cultura primária serem úteis para o entendimento do papel do receptor B2BKR na diferenciação precoce, estes sistemas são limitados, visto a sua simplicidade quando em comparação aos eventos *in vivo*.

Já em 2008, Martins e colaboradores caracterizaram a presença dos componentes do sistema caliceína-cininas e a liberação de bradicinina durante a diferenciação neural de neuroesferas. Em adição, Trujillo e colegas (2012), caracterizaram o papel da bradicinina e seus receptores durante a diferenciação *in vitro* de células-tronco neurais isoladas de telencéfalo de embriões de rato, sugerindo a existência de um efeito autócrino durante a diferenciação neural. Desse modo, estes três trabalhos fundamentam a investigação do papel do receptor B2BKR de cininas na diferenciação e determinação do destino neural *in vivo*.

Observando que não há estudos que relacionem o receptor B2BKR de cininas com o desenvolvimento do sistema nervoso central *in vivo*, desenvolvemos um projeto onde avaliamos importância do receptor B2BKR *in vivo* durante do desenvolvimento embrionário camundongo. Como modelo de estudos, utilizamos camundongos *knockout* para o gene do receptor B2BKR. Assim, avaliamos o perfil de expressão gênica do receptor B2BKR nos animais selvagens e *knockout* para o gene do receptor B2BKR.



## 2.1 – Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão gênica dos receptores B2BkR em camundongos selvagens e avaliar a influência da deleção deste gene na expressão gênica dos outros componentes do sistema calcitrina cininas, de marcadores de sistema nervoso e de receptores purinérgicos do tipo P2X em animais *knockout* ao longo de diversos estágios desenvolvimento embrionário.

## 2.2 – Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de expressão gênica por PCR em tempo real dos receptores de cininas B2BkR e B1BkR; dos marcadores de sistema nervoso,  $\beta$ 3-tubulina, MAP2 e GFAP; dos cininogênios 1 a 2; e dos receptores purinérgicos, P2X2, P2X3, P2X4 P2X5, P2X6 e P2X7, nos estágios intermediários (dias 9,5 e 11,5) e tardios (dias 14,5, 17,5 e P0) do desenvolvimento;
- Descrever o padrão espacial de expressão do gene B2BKR e do receptor purinérgico P2X2 *in vivo* nos estágios intermediários (dias 9,5 - 12,5).

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1 – ANIMAIS**

Para os experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e *knockout* para o receptor B2 de cininas B2BkR<sup>-/-</sup> (Bdkrb<sup>2tm1Jfh</sup>) (The Jackson Laboratory, EUA). Os animais B2BkR<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Joao Bosco Pesquero (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP). A genotipagem será detalhada no item 3.2.

Os embriões dos camundongos foram coletados em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário: dia 9,5 (E14); dia 10,5 (E18); dia 11,5 (E19); dia 12,5 (E20); dia 14,5 (E22); e dia 17,5 (E24). Além dos embriões, foram coletados ainda cérebros de animais neonatos e de animais adultos.

Camundongos C57BL6 selvagens e C57BL6 *knockouts* entre 3 e 6 meses de idade, provenientes da colônia do biotério do Departamento de Biofísica da UNIFESP. A eficiência do acasalamento foi confirmada pela presença de *plug vaginal* – um tampão mucoso que fica visível na vulva do camundongo fêmea após o coito. Nos estágios descritos anteriormente, as fêmeas foram sacrificadas em câmaras com atmosfera saturada de CO<sub>2</sub>. Os fetos foram retirados de modo asséptico e fixados como descritos no item 3.8.

#### **3.2 – GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS B2BKR<sup>-/-</sup>**

O DNA genômico dos camundongos foi extraído de pequenas biópsias (2-3 mm) provenientes da ponta da cauda ou de tecido embrionário. Cada amostra foi colocada em um tubo de 1,5 mL e o DNA extraído conforme protocolo modificado fornecido pela *Jackson Laboratories* (disponível em: <http://www.jax.org/>).

Resumidamente, em cada tubo contendo a biópsia foram adicionados 300 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Após 5 minutos sob agitação adicionou-se 300 µL de água e submetemos a mistura a 3 minutos de centrifugação a 14.000 × g. Ao sobrenadante coletado foi adicionado igual volume de clorofórmio, seguida de uma nova agitação e centrifugação. O sobrenadante foi coletado e amplificado por PCR com *primers* específicos conforme descrito no item 3.3. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/µl).

### **3.3 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA**

O RNA total dos embriões e dos tecidos embrinários neuroesferas foi isolado com o reagente TRIzol® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação das amostras de RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) nas absorvâncias 260 e 280 nm. A razão entre a leitura destes dois comprimentos de ondas foi utilizada para verificar a pureza do RNA, sendo considerada pura entre 1,8 e 2,0. A qualidade das amostras de RNA foi medida pela análise da integridade dos RNAs ribossômicos por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Huggett *et al.*, 2005). Após a coloração, o gel foi visualizado no transiluminador com luz UV. Posteriormente à extração do RNA total, o DNA contaminante foi removido pela ação da DNase I (1 U/µg de RNA, Ambion) em tampão de reação (40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> e 20 mM de EDTA ) a 37 °C por 15 min. Em seguida, a enzima foi inativada (10 min a 65 °C) e o RNA total utilizado para reação de transcrição reversa (RT). A RT e síntese dos cDNA foram feitas a partir de 2 mg de RNA total utilizando-se 200 U MMLV-RT (RevertAid H *minus Moloney murine leukemia virus-reverse*

*transcriptase*, Fermentas) na presença de 40 U de inibidor de RNase, 0,2 mM de dNTPs, 50 ng de hexâmeros randômicos, 50 ng de oligodT18, 50 mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão da enzima num volume final de 20 µL. As condições das reações, feitas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, foram as seguintes: 20 °C por 10 min, 42 °C por 45 min e 95 °C por 5 min.

### 3.4 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Utilizamos a reação em cadeia da polimerase para os seguintes fins: genotipagem de camundongos a partir de DNA genômico, detecção da expressão gênica dos genes dos receptores B2BKR e B1BKR de cininas, dos cininogênios 1 e 2, dos receptores purinérgicos (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> e P2X<sub>7</sub>), e dos marcadores de diferenciação neural (GFAP, β3-tubulina e MAP2).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se oligonucleotídeos como *primers* específicos dos respectivos mRNA. Os *primers* foram desenvolvidos com o auxílio do programa PrimerExpress versão 2.0 (Applied Biosystems), de acordo com a sequência consenso de cDNA depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para garantir a especificidade dos *primers* exclusivamente na sequência de RNAm de interesse, utilizou-se a ferramenta Primer-BLAST para verificar a similaridade dos oligonucleotídeos com as demais sequências depositadas no GenBank (Tabela 2).

Para cada reação de PCR foram utilizados: 5 µL do RT como fita molde, 0,2 mM dNTPs, 5 µL de tampão da enzima (10x), 10 µM de *primer* senso (*forward*), 10 mM de *primer* anti-senso (*reverse*), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U Taq DNA polimerase (Fermentas), em um volume final de 50 µL. As reações foram conduzidas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient nas seguintes condições: as reações

foram inicialmente denaturadas a 94 °C por 5 min, para em seguida serem submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 60 s, hibridização a 60 °C por 60 s e uma extensão a 72 °C por 1,5 min. Após este ciclo, as reações passaram por uma etapa final de extensão das fitas a 72 °C por 10 min. Nas reações de PCR foram utilizada a expressão de GAPDH como controle interno. O DNA foi colocado nos poços do gel com tampão de carregamento (10x, 50% glicerol; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25% azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol em água).

**Tabela 1** - Sequências de *primers* utilizados nas reações de genotipagem

<i>cDNA</i>	<i>Primer Forward (5'- 3')</i>	<i>Primer Reverse (5'- 3')</i>	<b>Amplicon (pb)</b>
<i>Genotipagem</i>			
<b>B2BkR</b>	TGTCCTCAGCGTGTTCTTC	GGTCCTGAACACCAACATGG	361
<b>IMR434/IMR435</b>			
<b>Neomicina</b>	CTGGGTGGAGAGGCTATTC	AGGTGAGATGACAGGAGATC	280
<b>IMR013/ IMR014</b>			

### 3.5 – PCR EM TEMPO REAL

A análise quantitativa da expressão dos mRNA foi feita utilizando-se o *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) como sistema de detecção. A PCR em tempo real é semelhante à preparação da PCR convencional, exceto pela presença de uma sonda fluorescente localizada no interior do *amplicon*. A intensidade da fluorescência emitida por esta sonda é proporcional ao número de moléculas amplificadas. É esta fluorescência é captada pelo equipamento e analisada.

As reações foram feitas em triplicata num volume final de 25 µL, a partir do cDNA sintetizado por transcrição reversa (RT), tal como descrito anteriormente, a partir de 2 µg de RNA, 12,5 µL de SYBR-Green® (Applied Biosystems) e 200 nM de cada *primer* (Tabela 2). As reações de PCR em tempo real foram feitas nas

seguintes condições: 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min; seguidos pela verificação da especificidade do *amplicon* pela curva de dissociação. Como a eficiência de todas as reações foi maior que 98%, o parâmetro de expressão  $2^{-\Delta Ct}$  foi utilizado para avaliar a expressão relativa ao GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), controle endógeno.  $\Delta Ct$  = variação de ciclos acima do limiar. A análise das expressões relativas de cada transcrito foi feita de acordo com Ueno e colaboradores (2002).

É importante dizer que a padronização das condições de temperatura e tempo de hibridização dos *primers*, diluição do cDNA e eficiência dos *primers* específicos (> 98%) da PCR em tempo real foi realizada previamente (dados não mostrados).

**Tabela 2** - Sequências de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e PCR em tempo real

<i>cDNA</i>	<i>Primer Forward (5'- 3')</i>	<i>Primer Reverse (5'- 3')</i>	<b>Amplicon (pb)</b>
<b>B1BkR</b>	CCAGGGTTCGTCATCACTATCTG	GCAAAAGGAAGAAGGAAAGTAA	73
<b>B2BkR</b>	CCCTTCCTCTGGGTCCTCTT	CAGAACACGCTGAGGACAAAGA	65
<b>Cininogênio 1</b>	AGGGCAACTGCTCTGCTCAG	TGAAGTCACAGTCCTGCCATG	115
<b>Cininogênio 2</b>	AGGCTGTGGATGCCTCTCTG	TGCCGCTTTGTAACCTAGCA	115
<b><math>\beta</math>3-tubulina</b>	GAGACCTACTGCATCGACAATGAAG	GCTCATGGTAGCAGACACAAGG	111
<b>GFAP</b>	AAGAGTGGTATCGGTCCAAGTTTG	CAGTTGGCGGCGATAGTCAT	107
<b>MAP2</b>			
<b>GAPDH</b>	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTC	117
<b>P2X2</b>	TCCCTCCCCACCTAGTCAC	CACCACCTGCTCAGTCAGAGC	149
<b>P2X3</b>	CTGCCTAACCTACCGACAAG	AATACCCAGAACGCCACCC	150
<b>P2X4</b>	CCCTTGCCTGCCAGATAT	CCGTACGCTTGGTGAGTGT	145
<b>P2X5</b>	GGATGCCAATGTTGAGGTTGA	TCCTGACGAACCCTCTCCAGT	81
<b>P2X6</b>	CCCAGAGCATCCTTCTGTTCC	GGCACCAGCTCCAGATCTCA	156
<b>P2X7</b>	GCACGAATTATGGCACCGTC	CCCCACCCTCTGTGACATTCT	171

### 3.6 – PRODUÇÃO DE SONDAS DE RNA E ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

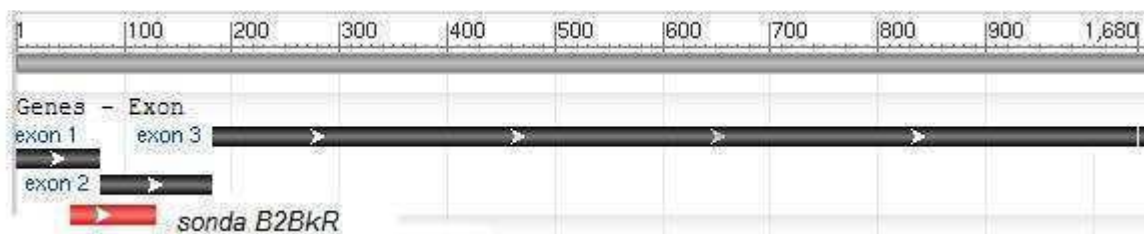
#### 3.6.1 – Construção das sondas de RNA para detecção dos RNAm dos receptores B2BkR de cininas e P2X2 purinérgico de ATP

Os iniciadores que serão utilizados e o tamanho das sondas estão especificados na tabela abaixo:

**Tabela 3** - Sequências de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e PCR em tempo real para produção de sondas de RNA

Iniciadores	Seqüências	Tamanhos das sondas
B2 sense	5'-GGACTCCCTACAACACAGAAC-3'	310 pb
B2 anti-sense	5'-GGACAAAGAGGTTCTCCAGTG-3'	
P2X2	5'-CAAAGTGTGGGACGTGGAG-3'	698 pb
P2X2 anti-sense	5'CATAGGCTTTGATGAGAGTTC-3'	

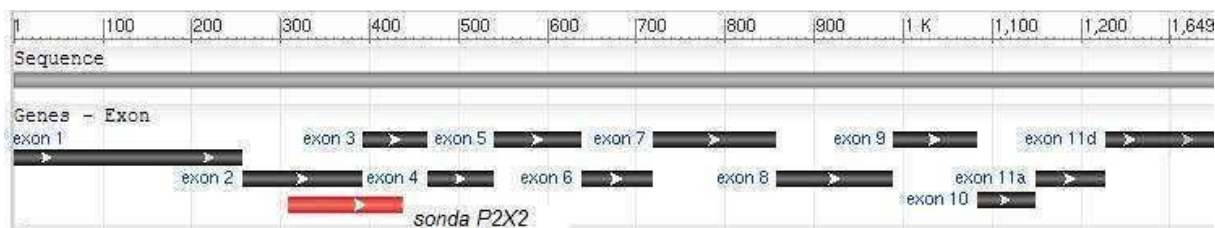
A região clonada do gene do receptor B2BKR, cujo transcrito possui 310 pb, cobre porções dos éxons 1 e 2. Este gene é composto por três éxons, com uma extensão total de 1680 pb. A sonda utilizada abrange os éxons 1 e 2 (figura 7).



**Figura 7** – Representação esquemática da extensão do gene do receptor B2BKR. O B2BkR é mostrando seus três éxons (em preto). Em vermelho é mostrado a região de anelamento da sonda produzida para detecção da expressão deste gene.

Por sua vez, a região clonada do gene do receptor P2X2, cujo transcrito possui 698 pb, situa-se entre os éxons 2 e 3 do gene. Este gene é composto por 11 éxons, com uma extensão total de 1649 pb (figura 8).





**Figura 8 – Representação esquemática da extensão do gene do receptor P2X2.** São mostrados os seus 11 éxons (em preto) deste receptor. Em vermelho é mostrado a região de anelamento da sonda produzida para detecção da expressão deste gene.

### 3.6.2 – Purificação dos fragmentos de PCR

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, submetido à corrida eletroforética a 100 V, e purificado utilizando o Kit Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer Corporation).

### 3.6.3 – Clonagem do cDNA no vetor pGemT-easy e transformação das bactérias DH5 $\alpha$

Os fragmentos de DNA amplificados e purificados foram clonados utilizando o Kit pGem-T Easy Vector System I de acordo com instruções do fabricante.

A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , estocada à -70°C, foi crescida em meio *Luria-Bertani* ágar (LB ágar - triptona 1%, extrato de levedura 1%, cloreto de sódio 0,5%, pH 7,5) a 37° durante 16 horas. Uma colônia dessa cultura foi inoculada em 3,0 ml de meio LB e incubada sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm) nas mesmas condições descritas acima. Após este período, utilizamos alíquotas de 1,0 ml dessa cultura para inocular 100 ml de meio LB, mantido a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO<sub>600nm</sub> próxima de 0.8. Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 1.000g, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento celular foi suspenso em 40 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e mantido em gelo por 1 hora. Após centrifugação, as células foram suspensas em 1,0 ml de CaCl<sub>2</sub> 1,0 M. As células

competentes foram aliquotadas e usadas imediatamente ou estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol, concentração final de 25%.

Cerca de 10 ng de mistura da reação de ligação foi adicionada a tubos tipo Eppendorf de 1,8 ml, contendo 50  $\mu\text{l}$  de bactérias DH5 $\alpha$  competentes. Este material foi mantido em gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos. Em seguida, as células foram mantidas em 1,0 ml de meio LB, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 50 minutos. Após centrifugação a 5000 g por 1 minutos, o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 100  $\mu\text{l}$  de LB e plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 20  $\mu\text{g/ml}$  de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase), 1,0 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) e 1 $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina e crescidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. As colônias brancas contendo o inserto do DNA desejado foram isoladas e inoculadas em 5,0 ml de meio LB contendo ampicilina (1 $\mu\text{g/ml}$ ) e crescidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16 horas.

#### **3.6.4 – Max prep – preparação do DNA plasmidial das bactérias transformadas**

Obtivemos o DNA plasmidial das bactérias selecionadas no item anterior, utilizando o Kit Accuprep Plasmid Extration Kit (Bioneer Corporation).

#### **3.6.5 – Sequenciamento**

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas usando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), performadas pelo serviço de seqüenciamento disponível no Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da USP – IQ-USP.

#### **3.6.6 – Reações de digestão utilizando enzimas de restrição**

Os plasmídeos contendo as seqüências de interesse foram linearizados com enzimas de restrição adequadas e purificados. Nas reações foram utilizadas cerca de 2 unidades de enzima para cada  $\mu\text{g}$  de DNA e a mistura de reação foi incubada

por 2 horas a 37°C. Os plasmídeos linearizados foram então purificados através de extrações de sequências de Fenol e clorofórmio (1:10). Em seguida, o DNA foi então precipitado usando-se 3M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol 75%, incubados a 80°C por pelo menos 15 minutos. Após este período centrifugamos amostras por 30 minutos a 14.000g a 4°C. O DNA precipitado e ressuspensas com tampão TE numa concentração de 0,2 µg/µl.

### **3.6.7 – Transcrição das sondas marcadas com digoxigenina (DIG)**

A detecção dos transcritos de RNA mensageiro (RNAm) nos ensaios de hibridização *in situ* foi realizado utilizando-se sondas de RNA *anti-sense*. As sondas marcadas com digoxigenina foram obtidas fazendo-se uma transcrição *in vitro* nas seguintes etapas: 2,0µL de tampão de transcrição 10X (Ambion), 1,0 µL de mistura de marcação de DIG (contendo ATP 10mM, CTP 10mM, GTP 10mM, UTP 6,5mM e DIG-UTP 3,5mM), 0,5µL de RNAsin - inibidor de RNAses (40u/µL), 1,0 µg de plasmídeo linearizado, 2,0 µL de enzima de transcrição adequada (T7 ou SP6 RNA polimerase a 10 U/µl). O volume foi completado para 50µL com H<sub>2</sub>O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01%. A mistura foi mantida por 2 horas a 37°C. Após esta etapa, a reação de transcrição foi incubada durante 15 min a 37°C com 1,0 U DNase I. O RNA transcrito foi purificado com colunas *illustra ProbeQuant™ G50 Micro* (GE), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

### **3.6.8 – Fixação e desidratação dos embriões**

Os embriões foram coletados para a fixação nos estágios de desenvolvimento descritos no item 3.1. Essa fixação será a mesma tanto para os embriões que serão utilizados nas hibridizações *in situ* quando aqueles que serão utilizados para imunohistoquímica.

Inicialmente os embriões foram lavados por uma hora em paraformaldeído (PFA) 4% diluído em PBS em temperatura ambiente e posteriormente lavados por mais 16 horas em PFA 4% a uma temperatura de 4°C. Em seguida os embriões foram lavados duas vezes em PBST (PBS + Tween 20 a 1%) durante 15 minutos. O passo final é foi a desidratação dos embriões, essa etapa foi feita com lavagens seriadas em solução de PBST/metanol (1:3, 1:1, 3:1) seguida de duas lavagens em metanol, durante 15 minutos. Neste ponto, os embriões foram acondicionados em metanol e mantidos a - 20°C.

### **3.6.9 – Hibridização *in situ* em embriões inteiros**

Os embriões que fixados de acordo com o protocolo descrito no item anterior foram utilizados para a hibridização *in situ*. Os experimentos foram realizados ao longo de 4 dias. No primeiro dia os embriões foram reidratados através de lavagens seriadas em metanol/PBT (3:1, 1:1, 1:3, MeOH/PBST – 5 min.), seguido de duas lavagens em PBST por 5 minutos. O passo seguinte, o clareamento (*bleaching*) dos embriões, foi obtido com 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBST (1,0 ml de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4,0 ml de PBT) por 1 hora, à temperatura ambiente sob agitação e lavagem por três vezes com PBST por 5 minutos. Na seqüência, os embriões foram tratados com 10 µg/ml de Proteinase K (Boehringer Mannheim) em PBST. Para inibir a ação da proteinase K, os embriões foram lavados em 2,0 mg/ml de glicina (Sigma G-7403) em PBT – 10 min. à temperatura ambiente. Mais adiante, os embriões foram pós-fixados em PFA 4%/0.2% glutaraldeído em PBST por 20 minutos à temperatura ambiente. Para remoção do PFA lavaremos os embriões em PBT por 5 minutos duas vezes. Ao final do primeiro dia os embriões foram tratados com solução de pré-hibridização (*Pre-hyb* – 50% de formamida, 25% de cloreto de sódio e citrato de sódio (SSC – 0.75M Citrato de sódio e 70mM de citrato de sódio), 20 mg/ml de tRNA, 10% de sulfato de

sódio (SDS) e 1.25 mg de heparina) pré-aquecida, seguido da sua remoção e adição de 1,0 ml de *pre-hyb* fresco, em seguida os embriões foram incubados a 65°C por duas horas. Finalmente, o *pre-hyb* foi removido e adicionou-se 0.25 ml da sonda pré-aquecida, seguido da sua remoção e adição de mais 0.75 ml da sonda. A hibridização será por 16 horas a 65°C.

No segundo dia, é feita a remoção da solução contendo a sonda, seguido de três lavagens por 30 minutos com Solução I (50% de paraformaldeído, 5x SSC, pH 4.5, 1% SDS) pré-aquecida, seguido de três lavagens com solução II (50% de paraformaldeído, 2x SSC, pH 4.5, 1% SDS) pré-aquecida a 65°C, três vezes de 30 minutos. Os embriões foram mantidos em agitação durante as lavagens. Depois os embriões foram lavados em tampão de ácido maléico-MAB<sub>Lev,Tw</sub> *buffer* (Ácido maléico, NaCl e NaOH) com 2,0 mM (levamisole), 0,1% Tween 20, três vezes de 30 minutos e pré-bloquearemos (*Pre-blocking*) em MAB<sub>Lev,Tw</sub> *buffer*/2% de reagente *Boehringer blocking*/10% de soro ovino (*Sheep serum*) por três horas, agitando em temperatura ambiente. O próximo passo é a pré-absorção do anticorpo: são colocados aproximadamente 3,0 mg de pó de embrião por tubo eppendorf. Adicionaremos 0,5 ml MAB<sub>Lev,Tw</sub> + 2% de reagente bloqueador (Boehringer) e incuba-se os embriões a 65°C por 30 minutos, depois disso adiciona-se 5,0 ul de soro bovino e 1,0ul de anti-digoxigenina Ab. (1:500).

No terceiro dia os embriões passaram por três lavagens: três vezes por cinco minutos em MAB<sub>Lev,Tw</sub> *buffer*, cinco vezes em MAB<sub>Lev,Tw</sub> *buffer*, por 1 hora cada lavagem; e uma lavagem em MAB<sub>Lev,Tw</sub> *buffer*, sob agitação, a 4°C por 16 horas.

O último dia começou com lavagens por três vezes em NTMT (100 mM de NaCl, 100 mM de Tris – pH 9.5, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1% de Tween 20, 2 mM Levamisole), 10 minutos cada. Após isso, adiciona-se o reagente bloqueador

(Boehring) + 2 mM levamisole, 0,1% de Tween 20 e incubou-se por 20 minutos protegido da luz. Ao final os embriões foram lavados em PBST, pH 5.5, protegido da luz, por 10 minutos e realiza-se uma pós-fixação em PFA 4%, acrescido de 0,1% glutamina, por uma hora. Após todas essas etapas foram observados os padrões de hibridização das sondas e feita as fotografias dos embriões.

#### **3.6.10 – Aquisição das imagens**

Para a aquisição das imagens dos embriões inteiros foi utilizado um microscópio Nikon (SMZ800) com câmera digital Nikon (DXM12000C), utilizando o programa NIS Elements.

### **3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados estão mostrados como media  $\pm$  desvio padrão. A análise foi feita com o auxílio do programa GraphPad Prism5 e submetida à estatística usando os testes ANOVA (*Analysis of Variance*) com a comparação múltipla de Tukey, e teste-*t* com nível de significância fixado em  $P < 0,05$ . Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando-se três amostras de diferentes preparações, feitas em triplicata.

## ***4. RESULTADOS***

---

## 4. RESULTADOS

---

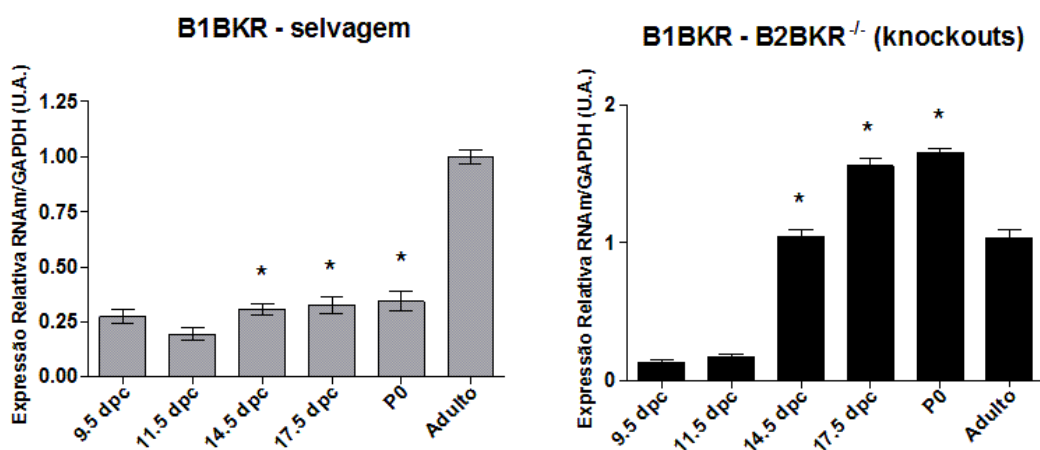
### 4.1 – Padrão de expressão dos receptores de cininas e dos cininogênios 1 e 2 durante o desenvolvimento embrionário

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar o perfil de expressão gênica dos receptores de cininas, e dos cininogênios ao longo do desenvolvimento cerebral do camundongo. Neste contexto, a expressão dos receptores B1BkR e B2BkR foi analisada quantitativamente por PCR em tempo real. Em adição, comparou-se a expressão gênica do receptor B1BkR e dos cininogênios 1 e 2 entre os animais selvagens e *knockout* para o gene B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) para verificar possíveis mecanismos modulatórios. Para tanto, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real e os níveis de expressão foram normalizados pela expressão do GAPDH, cuja expressão não está sujeita a alterações nestas condições de análise.

Durante os dias do desenvolvimento embrionário do animal selvagem o receptor B1BkR é expresso em níveis estáveis, com um pequeno aumento da expressão entre os dias 14.5 e o nascimento (P0). A expressão é menor no cérebro dos embriões que no cérebro adulto (figura 9).

Já os animais *knockout* para o gene B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) apresentam um padrão de expressão distinto daquele do animal selvagem. Nestes animais a expressão gênica do receptor B1BkR aumenta a partir do dia 14,5 do desenvolvimento embrionário, sendo ainda no dia 17.5 e no animal neonato (P0) que no animal adulto (figura 9).





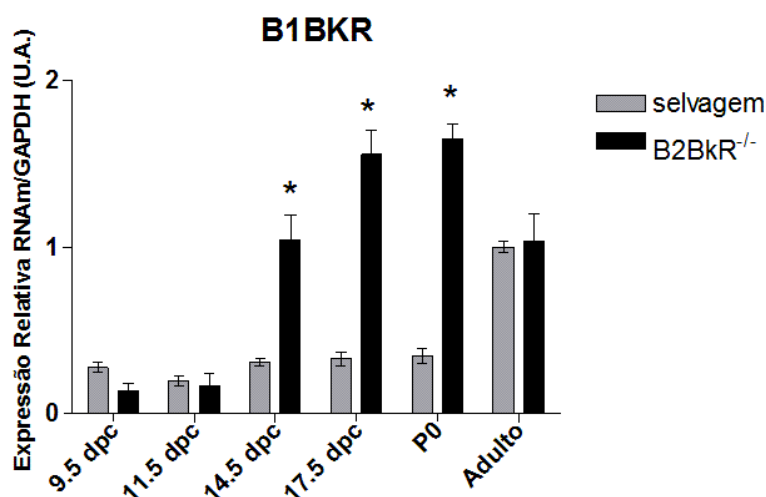
**Figura 9 - Expressão relativa do RNAm do receptor B1BkR de cininas ao longo do desenvolvimento.** A análise quantitativa da expressão relativa do receptor B1BkR durante o desenvolvimento feito por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O receptor B1BkR tem baixos níveis de expressão durante o desenvolvimento do animal selvagem até o nascimento (P0). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. O perfil de expressão é alterado no animal *knockout* para B2BkR de cininas (B2BkR<sup>-/-</sup>) (\* $P < 0,05$ ).

Quando se compara a expressão do receptor B1BkR entre os animais selvagens e *knockout* para B2BkR, observa-se que deleção do gene que codifica os transcritos para este receptor aumentou significativamente a expressão do receptor B1BkR. A Figura 10 mostra comparativamente a expressão relativa do B1BkR entre os animais selvagens e *knockout* para o receptor B2BkR, tendo como referência a expressão deste receptor no cérebro do animal selvagem adulto.

Enquanto nos animais selvagens a expressão do receptor B1BkR é baixa durante o desenvolvimento embrionário, esta aumenta progressivamente no animal *knockout* para o receptor B2BkR, sendo maior nos embriões e nos animais neonatos que no animal adulto.

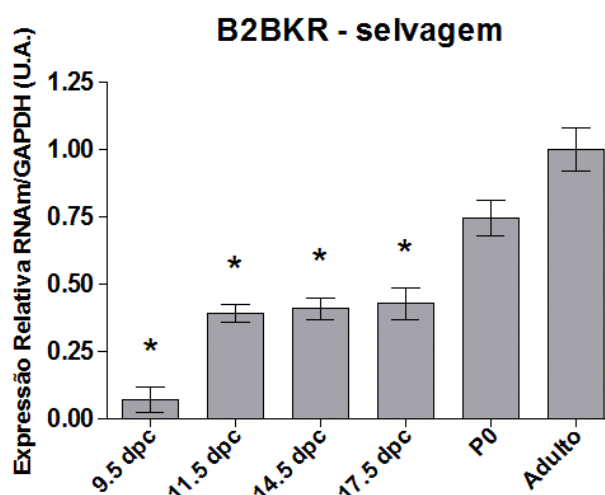
Observa-se que a expressão do receptor é diferencialmente alterada pela deleção do gene codificado para o receptor B2BkR. A análise quantitativa mostra um aumento significativo na expressão do receptor B1BkR nos animais *knockout* para B2BkR em relação ao animal selvagem. Também observa-se que a expressão do receptor B1BkR é relativamente maior que a do receptor B2BkR. Portanto

quantitativamente pode-se afirmar que a expressão dos receptores B1BkR é alterada pela deleção do gene codificado para o receptor B2BkR de cininas durante o desenvolvimento embrionário.



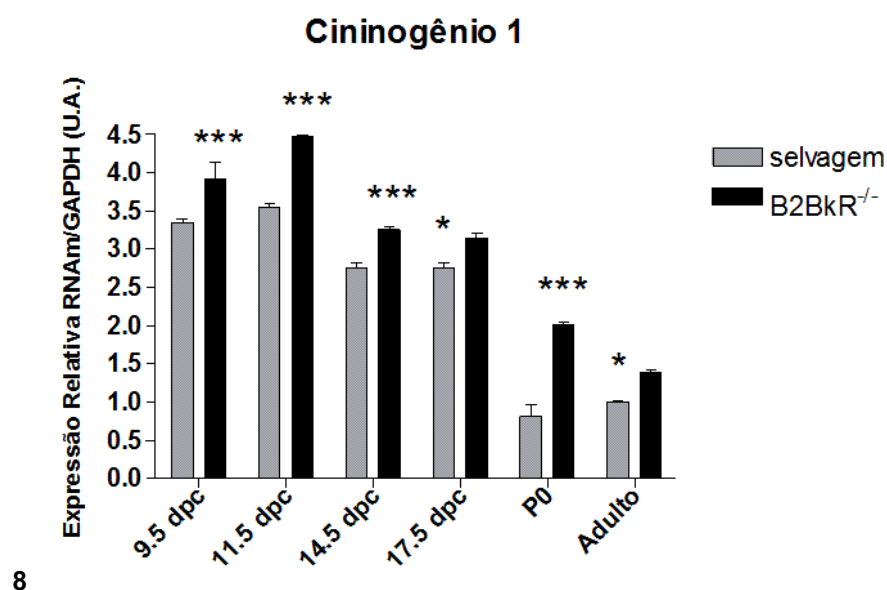
**Figura 10 - Expressão relativa do RNAm do receptor B1BkR de cininas ao longo do desenvolvimento embrionário.** A análise quantitativa da expressão relativa dos receptores B1BkR, B2BkR durante o desenvolvimento embrionário feito por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O receptor B1BkR tem baixos níveis expressão durante o desenvolvimento do animal selvagem. A deleção do B2BkR de cininas causou aumento da expressão do receptor B1BkR nos animais *knockout* para B2BkR de cininas (B2BkR<sup>-/-</sup>). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

O receptor B2BkR, por sua vez, teve seus níveis de expressão analisados nos animais selvagens (figura 11). Em experimentos controles realizados com animais *knockout* não foi a expressão dos transcritos deste receptor (dados não mostrados). A expressão deste receptor é alterada ao longo do desenvolvimento embrionário. Observa-se um aumento progressivo entre os dias 11.5 e 17.5 do desenvolvimento, que atingirá níveis mais elevados no animal neonato (P0).



**Figura 11 - Expressão relativa do RNAm dos receptor B2BkR de cininas ao longo do desenvolvimento.** A análise quantitativa da expressão relativa do receptor B2BkR durante o desenvolvimento embrionário feito por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O receptor B2BkR aumenta progressivamente durante o desenvolvimento embrionário. Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

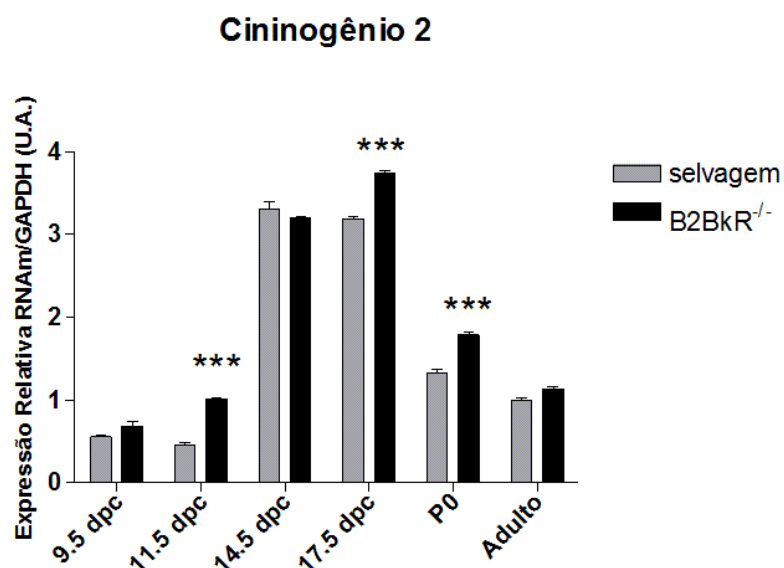
Os cininogênios são os precursores dos ligantes dos receptores B1BkR e B2BkR (El-Dahr, 1997). Conforme descrito por Martins e colaboradores 2008, os transcritos dos cininogênios 1 e 2 são encontrados ao longo da diferenciação neuronal *in vitro* de celular progenitoras extraídas do telencéfalo embrionário de ratos.



**Figura 12 - Expressão relativa do RNAm do cininogênio 1 ao longo do desenvolvimento embrionário.** A análise quantitativa da expressão relativa do cininogênio 1, durante o desenvolvimento embrionário feito por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O cininogênio 1 tem altos níveis de expressão durante o desenvolvimento do animal selvagem. A deleção do B2BkR de cininas levou ao aumento da expressão do cininogênio nos animais *knockout* (B2BkR<sup>-/-</sup>). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ ).

O cininogênio 1 tem sua expressão alterada ao longo do desenvolvimento embrionário (figura 12). Os transcritos deste gene estão aumentados nos embriões em desenvolvimento em relação aos animais adultos. Além disso, a expressão é regulada, sendo maior nas fases mais precoces do desenvolvimento aqui analisadas em relação às mais tardias (17.5 dpc e neonato).

A deleção do gene para o receptor B2BkR aumenta a expressão do cininogênio 1 (animal B2BkR<sup>-/-</sup>) em relação aos animais selvagens.



**Figura 13 - Expressão relativa do RNAm do cininogênio 2 ao longo do desenvolvimento embrionário.** A análise quantitativa da expressão relativa dos receptores B1BkR, B2BkR durante o desenvolvimento embrionário feito por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O cininogênio 2 níveis expressão variados durante o desenvolvimento do animal selvagem. A deleção do B2BkR de cininas levou ao aumento da expressão do cininogênio nos animais *knockout* (B2BkR<sup>-/-</sup>). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ ).

O cininogênio 2 apresentou-se um perfil distinto da expressão do cininogênio 1 (figura 13). Os transcritos deste gene estão aumentados nos cérebros dos embriões em desenvolvimento em relação aos cérebros dos animais adultos apenas nos estágios mais avançados do desenvolvimento, nos dias 14.5 e 17.5 e no animal neonato (P0).

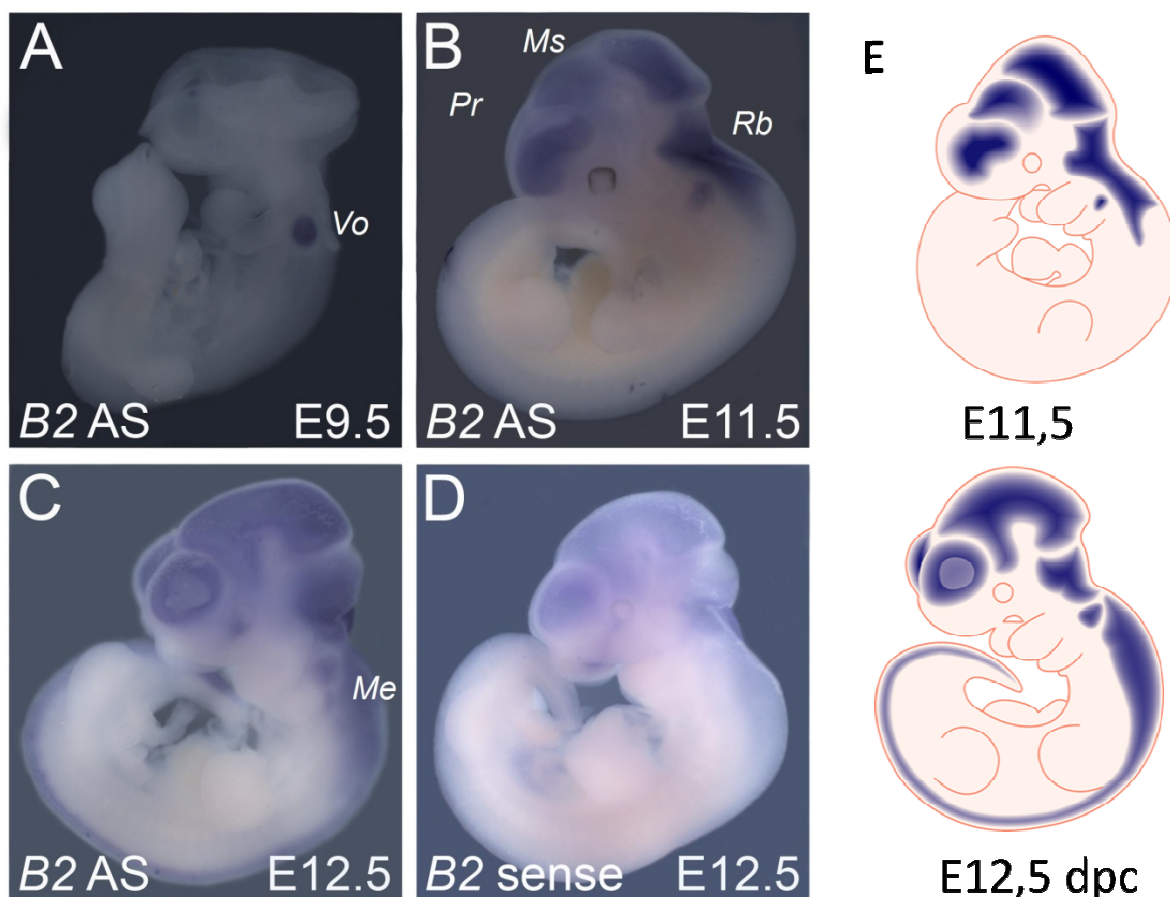
Também no caso do cininogênio 2, a deleção do gene para o receptor B2BkR (animal B2BkR<sup>-/-</sup>) aumenta sua expressão em relação ao animal selvagem, fenômeno igualmente observado na expressão do cininogênio 1.

Após obtermos os perfis quantitativos de expressão gênica dos receptores dos sistemas caliceína cininas por PCR em tempo real, passamos a investigar as regiões específicas onde o gene é expresso. A técnica de hibridização *in situ* whole mount (WISH) permite uma visualização espacial tridimensional de genes de

interesse. Vale ressaltar que para as hibridizações *in situ* foram utilizadas sondas de RNA *sense* (controle negativo – a sequência de DNA está na orientação *sense* em relação ao gene, portanto não hibridiza com o transcrito alvo) e *anti-sense*, (ou seja, complementar ao transcrito do gene alvo).

A expressão do receptor B2BkR em embriões de camundongos C57BL/6 selvagens foi obtida por hibridização *in situ* nos estágios de desenvolvimento correspondentes aos dias 9.5, 11.5 e 12.5 (figura 14).

Os transcritos do gene do receptor B2BkR foram encontrados em células neurogênicas no dia 9.5 do desenvolvimento, começando na vesícula ótica (Fig. 14A), em seguida, aumentando o seu padrão de expressão para a totalidade do sistema nervoso nos dias 11.5 (Fig. 15B) e 12.5 (Fig. 14C). O controle negativo feito com sondas *sense* para o gene do receptor B2BkR não revelou qualquer marcação específica (Fig. 14D). Somos os primeiros a relatar que o gene do receptor B2BkR é fortemente expresso no cérebro de camundongos em desenvolvimento, incluindo telencéfalo, diencefalo, região ventral do mesencefalo e rombencefalo, bem como na medula espinhal.



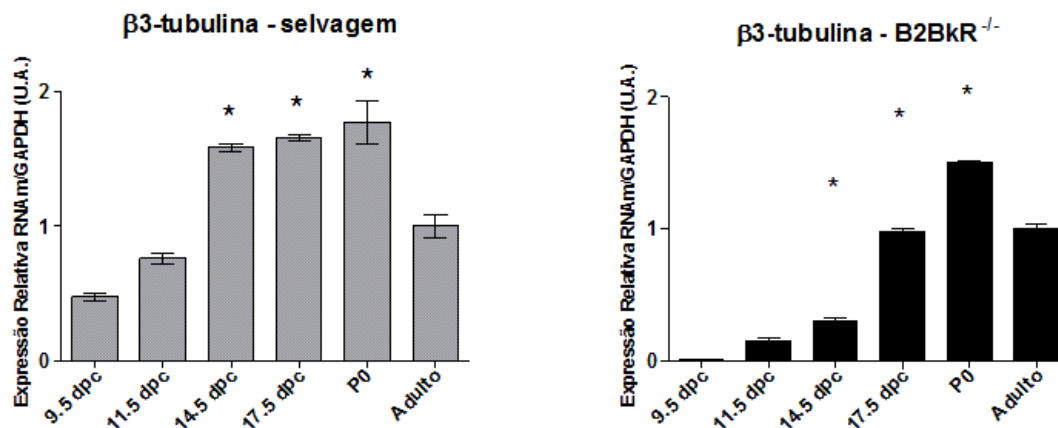
**Figura 14 – Padrão de expressão do receptor B2BkR nos estágios 9,5, 11,5 e 12,5 do desenvolvimento embrionário.** Experimentos de Hibridização *in situ* em embriões inteiros (*Whole Mount*) de camundongos C57BL/6 selvagens utilizando sondas para a detecção da expressão gênica do receptor B2BkR de cininas. A: estágio E9,5 em vista lateral. B: E11,5 em vista lateral. C: E12,5 em vista lateral e D: sonda sense (controle negativo) E12,5 em vista lateral. E: ilustração do padrão de expressão do gene do receptor B2BkR correspondente aos dias 11,5 e 12,5 do desenvolvimento. Vo: vesícula óptica; Pr: prosencéfalo; Ms: mesencéfalo; Rb: rombencéfalo; Me: medula espinhal.

#### 4.2 – Padrão de expressão dos marcadores de diferenciação neural durante o desenvolvimento

Visando complementar os resultados anteriores apresentados, investigou-se a expressão dos genes das proteínas utilizadas como marcadores neuronais ( $\beta$ -tubulina e MAP2) e gliais (GFAP) durante do desenvolvimento embrionário.

A expressão, tanto da  $\beta$ 3-tubulina, do MAP2 e do GFAP foi significativamente regulada durante o desenvolvimento, tendo seus níveis máximos de expressão registrados nos dias finais do desenvolvimento embrionário e no animal neonato

(figuras 15 - 20). No entanto, há diferenças entre a expressão dos três genes estudados.

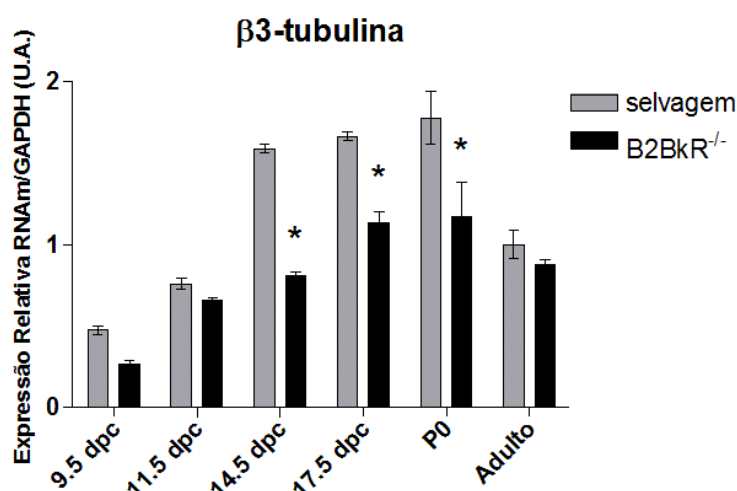


**Figura 15 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal  $\beta$ 3-tubulina ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador neuronal  $\beta$ -tubulina durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O marcador neuronal  $\beta$ 3-tubulina tem sua expressão regulada ao longo do desenvolvimento, alcançando níveis maiores nos dias finais do desenvolvimento (E17,5) e no cérebro dos animais neonatos (P0). O padrão de expressão é similar nos animais selvagens e *knockout*, quando analisados separadamente. Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

A expressão da  $\beta$ 3-tubulina é inicialmente baixa, estando aumentada nos estágios mais tardios do desenvolvimento (dias 14.5 e 17.5), atingindo seus níveis mais elevados, mais que o dobro, nos animais neonatos (P0). Tantos nos animais neonatos selvagens quanto nos *knockout* para o gene B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) a expressão gênica é significativamente maior do que nos animais adultos (figura 15).

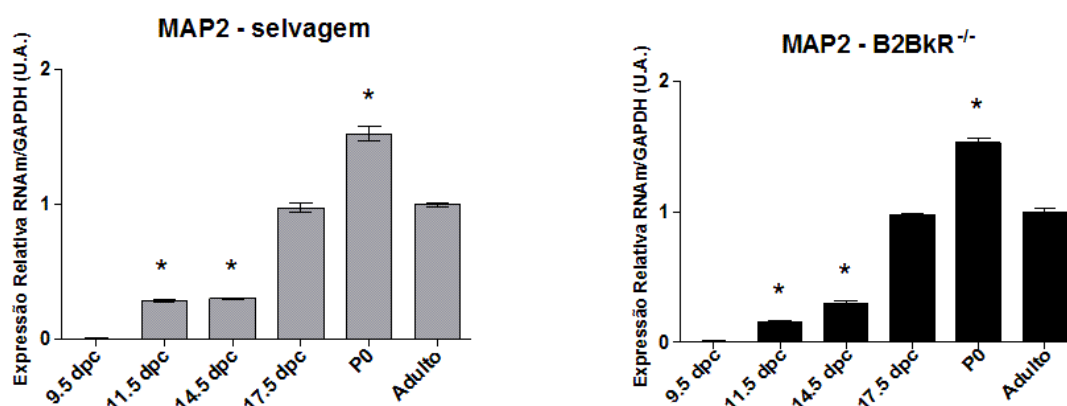
Na comparação da expressão do marcador  $\beta$ 3-tubulina entre os animais selvagens e os animais B2BkR<sup>-/-</sup> durante o desenvolvimento neuronal, vemos que nestes últimos os níveis de expressão da  $\beta$ 3-tubulina são significativamente menores (figura 16). Estes resultados mostram pela primeira vez uma possível alteração na determinação dos fenótipos neurais *in vivo* causadas pela deleção do receptor B2BkR.



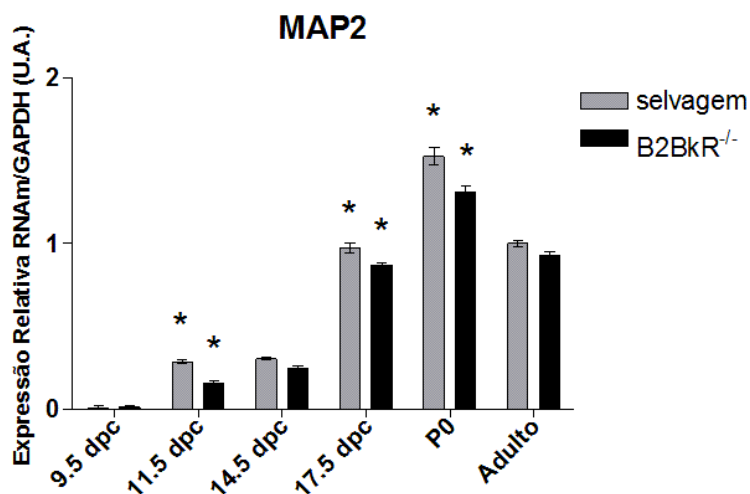


**Figura 16 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal  $\beta$ 3-tubulina ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador neuronal  $\beta$ 3-tubulina durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). Quando comparamos os níveis de expressão do gene nos animais selvagens e *knockout* verifica-se uma diminuição da expressão deste marcador neural nos animais cujo gene do B2BkR foi deletado. Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

A expressão do gene da proteína MAP2, um marcador fenotípico para genes maduros, também variou ao longo do desenvolvimento embrionário, seguindo um perfil semelhante ao da expressão da  $\beta$ 3-tubulina (figura 15). A diferença é que neste caso, o aumento significativo da expressão foi mais tardio, sendo observado no estágio 17,5 e no cérebro do neonato (P0). Também para este marcador, conforme já observado para  $\beta$ 3-tubulina, a expressão ao longo do desenvolvimento embrionário do encéfalo (E17,5 e P0) foi maior do que no cérebro adulto. Embora haja uma diferença significativa entre os níveis de expressão nos animais selvagens e nos animais *knockout* para B2BkR, para esse marcador neuronal a diferença foi menos acentuada do que a observada na  $\beta$ 3-tubulina (figura 17).



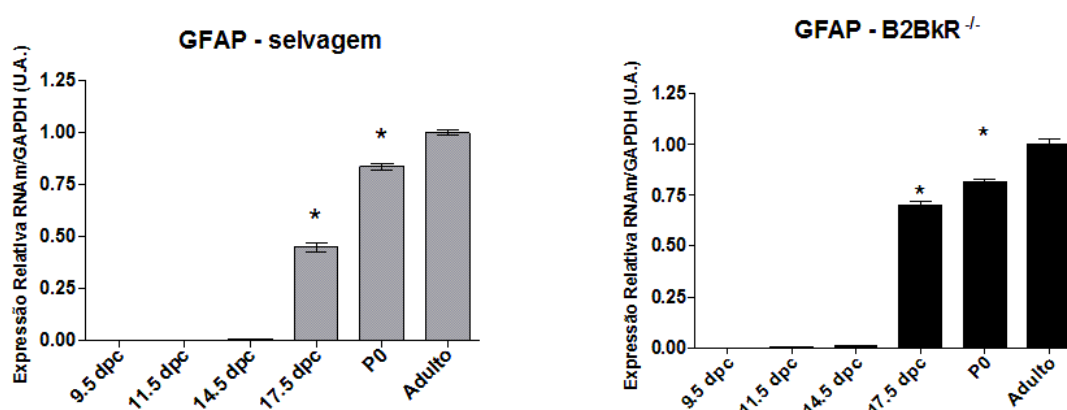
**Figura 17 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal MAP2 ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador neuronal MAP2 durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O marcador neuronal MAP2 tem sua expressão regulada ao longo do desenvolvimento, alcançando níveis maiores nos dias finais do desenvolvimento (E17,5) e no cérebro dos animais neonatos (P0). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).



**Figura 18 - Expressão relativa dos RNAm do marcador neuronal MAP2 ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador neuronal MAP2 durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). Quando comparamos os níveis de expressão do gene nos animais selvagens e *knockout* B2BkR verifica-se uma diminuição da expressão deste marcador neural. Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

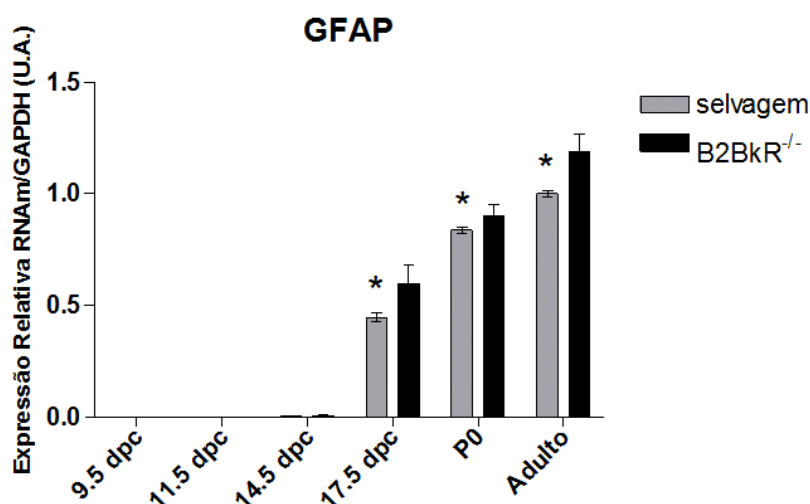
O GFAP também teve sua expressão regulada e aumentada durante o desenvolvimento embrionário (figura 19). O padrão de expressão gênica do marcador glial GFAP é distinto daqueles observados para os marcadores neuronais

$\beta$ 3-tubulina e MAP2. Nos estágios mais precoces do desenvolvimento aqui analisados não há praticamente nenhum transcrito do gene sendo expresso, porém a expressão aumenta progressivamente a partir do dia 14.5 do desenvolvimento embrionário, sendo esse perfil de aumento da expressão idêntico nos animais selvagens e *knockout* para B2BkR.



**Figura 19 - Expressão relativa dos RNAm do marcador glial GFAP ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador glial GFAP durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). O marcador glial GFAP tem sua expressão regulada ao longo do desenvolvimento, alcançando níveis maiores nos dias finais do desenvolvimento (E17,5) e no cérebro dos animais neonatos (P0). Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

Ao contrário dos marcadores neuronais  $\beta$ 3-tubulina e MAP2, o marcador glial GFAP teve sua expressão aumentada nos animais *knockout* para B2BkR em relação aos animais selvagens (figura 20). Apesar de ser uma diferença pequena, está e estatisticamente significativa. E e evidente em todos os estágios embrionário analisados, se repetindo também nos animais adultos.



**Figura 20 - Expressão relativa dos RNAm do marcador glial GFAP ao longo do desenvolvimento embrionário.** As análises quantitativas da expressão do marcador glial GFAP durante o desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão do GAPDH (*housekeeping gene*). Quando comparamos os níveis de expressão do gene nos animais selvagens e *knockout* para B2BkR verifica-se um aumento da expressão deste marcador glial. Onde, dpc: dias depois da concepção; P0: neonatos. Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ ).

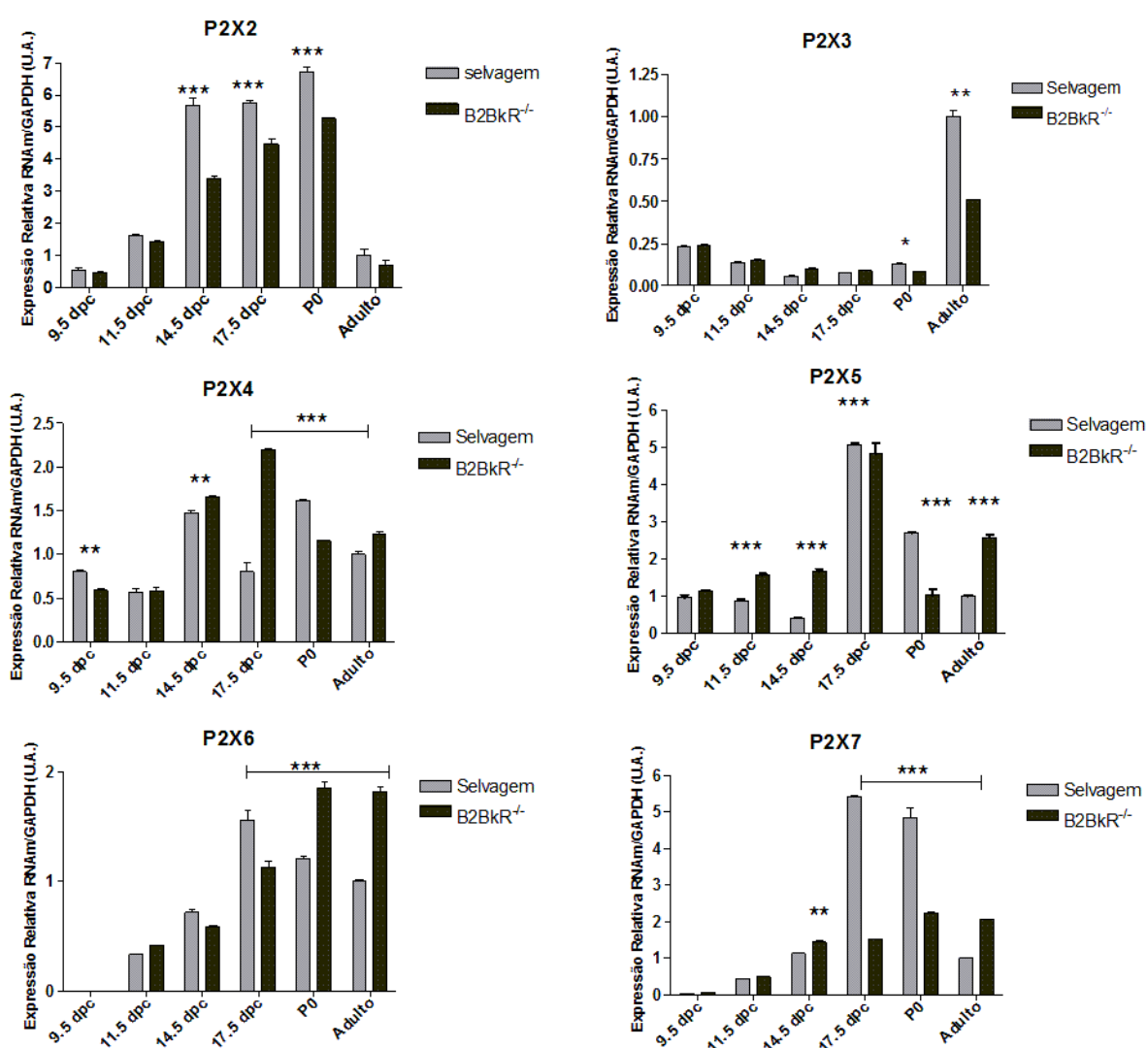
Embora Trujillo e colaboradores 2012 tenham mostrado um efeito semelhante pela inibição do receptor B2BkR pelo tratamento crônico da cultura ao longo da diferenciação neural *in vitro*, estes resultados mostram pela primeira vez as alterações causadas no fenótipo neural ao longo do desenvolvimento embrionário causado pela deleção do gene do receptor B2BkR de cininas *in vivo*.

#### 4.3 – Padrão de expressão dos receptores purinérgicos ionotrópicos P2X durante o desenvolvimento

Juntamente à caracterização da expressão gênica relativa dos receptores B1BkR e B2BkR de cininas e dos cininogênios 1 e 2, investigou-se a presença de transcritos dos receptores purinérgicos.

Trujillo e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão dos receptores purinérgicos ionotrópicos é alterada pela inibição crônica do receptor B2 de cininas durante a diferenciação neural. Mais especificamente observou-se um

aumento significativo na expressão das subunidades de receptores P2X2, P2X3 e P2X4; enquanto houve uma diminuição da expressão de P2X5, P2X6 e P2X7. Portanto, por terem apresentado importantes variações ao longo da diferenciação neuronal *in vitro*, analisou-se quantitativamente por PCR em tempo real a expressão gênica dos receptores purinérgicos. A concentração de transcritos de RNAm dos receptores purinérgicos em relação ao GAPDH é mostrada na figura 22.



**Figura 21 - Expressão relativa dos RNAm dos receptores purinérgicos do tipo P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 ao longo da diferenciação neural.** A análise quantitativa da expressão relativa dos receptores purinérgicos ao longo do desenvolvimento embrionário foi feita por PCR em tempo real tendo como referência a expressão de GAPDH (*housekeeping gene*). Os dados são representativos de três experimentos independentes conduzidos em triplicatas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

Os padrões de expressão de todas as subunidades de receptores purinérgicos ionotrópicos aqui analisadas se mostraram reguladas durante o desenvolvimento embrionário. Nota-se uma expressão crescente dos subtipos P2X2, P2X6 e P2X7; por outro lado, a expressão as subunidades P2X3 variou pouco, enquanto as subunidades P2X4 e P2X5 apresentou uma expressão variada com uma elevação mais nítida a partir do estágio equivalente ao dia 14.5 do desenvolvimento (14.5 dpc).

Quando comparamos a expressão gênica relativa destas subunidades entre os estágios embrionários, o animal neonato (P0) e os cérebros de animais adultos notamos que há destacada variação entre os níveis máximos de expressão destas subunidades. A subunidade P2X2, P2X4 e P2X5 apresentam níveis de expressões inferiores nos animais adultos do que nos animais em estágio embrionário ou neonatos. Já a subunidade P2X6 apresenta-se mais expresso apenas no animal adulto *knockout* para o receptor B2BkR; enquanto no animal selvagem a expressão é menor no animal adulto quando em comparação aos estágios embrionários ou ao animal neonato.

Além disso, há diferenças nos padrões de expressão de todos os subtipos entre os animais selvagens e animais *knockout* (B2BkR<sup>-/-</sup>). Claramente a subunidade P2X2 apresenta uma expressão relativa maior nos animais selvagens do que nos animais *knockout*. No caso do P2X3, apenas os cérebros de animais adultos apresentam padrões distintos de expressão quando comparados, enquanto que durante os estágios embrionários não há diferenças significativas.

Por sua vez, os receptores P2X4 e P2X5 apresentara uma inversão nos níveis de expressão entre animais selvagens e animais *knockout*. Neste caso, a

expressão destas subunidades é maior nos animais B2BkR<sup>-/-</sup> em relação aos selvagens, inclusive no cérebro adulto.

A subunidade P2X6 mostrou um padrão diferente. Nos estágios embrionários os transcritos são relativamente mais abundantes nos animais selvagens, embora essa relação seja modificada nos animais neonatos e adultos, quando os animais *knockout* passam a apresentar valores maiores de expressão desta subunidade em relação aos selvagens.

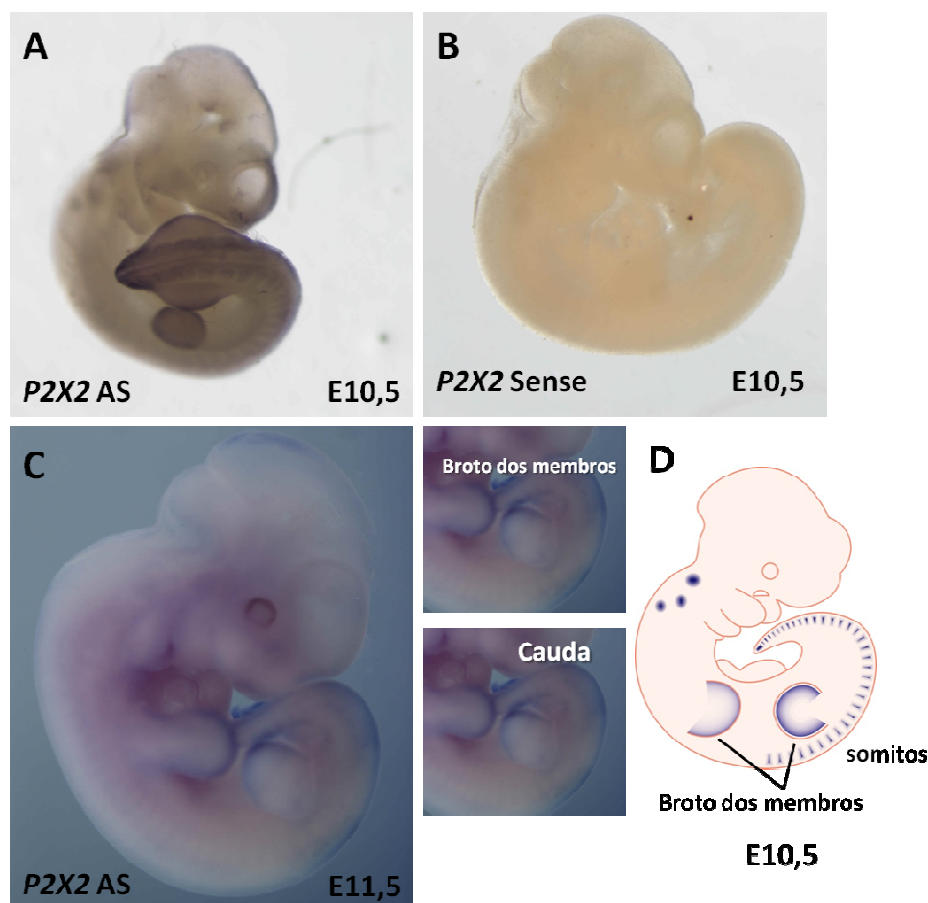
Por último, a subunidade P2X7 apresenta um padrão também distinto. Tanto nos estágios embrionários mais precoces (11.5 e 14.5) quanto nos cérebros de animais adultos, há expressão é relativamente maior nos animais *knockout*, porém, no estágio embrionário correspondente ao dia 17.5 e no animal neonato, a expressão é relativamente maior nos animais selvagens.

Portanto, mesmo considerando que esta comparação foi realizada apenas para verificar uma inter-relação entre os sistemas, sem priorizar a análise individual da alteração da expressão gênica observada, pode-se afirmar que a expressão dos receptores purinérgicos ionotrópicos é alterada pela deleção do gene que codifica para o receptor B2BkR durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal.

Finalmente, realizamos o mesmo experimento utilizando sondas *anti-sense* para a localização dos transcritos do gene da subunidade P2X2 durante do desenvolvimento.

Na figura 22 está apresentado o padrão de expressão do gene P2X2 em embriões de animais selvagens. Foi possível detectar a expressão do receptor P2X2 em embriões de animais selvagens nos dias 10.5 e 11.5. Mais uma vez, para verificar se as marcações eram específicas, preparamos *sondas sense* que não hibridizam com os transcritos de interesse. Deste modo, em embriões selvagens no

dia 10,5 do desenvolvimento nenhuma marcação com *sonda sense* foi observada, confirmando a especificidade da marcação no receptor P2X2.



**Figura 22 - Padrão de expressão do receptor P2X2 nos estágios 10.5 e 11.5 do desenvolvimento embrionário.** Experimentos de Hibridização *in situ* em embriões inteiros (*Whole Mount*) de camundongos C57BL/6 selvagens utilizando sondas para a detecção da expressão gênica do receptor purinérgico P2X2. A: estágio E10,5 em vista lateral, sonda anti-sense. B: E10,5 em vista lateral, sonda sense. C: E11,5 em vista lateral, sonda anti-sense. D: sonda sense (controle negativo) D: ilustração do padrão de expressão do gene do receptor P2X2 correspondente no dia 10.5 do desenvolvimento.

Na figura 22C (embrião selvagem E11,5) observamos também marcações tênues, porém específicas, que comprovam a expressão do receptor P2X2. A expressão do gene parece ser restrita às regiões de brotamento dos membros e aos somitos da região caudal (figuras 22A e 22C). Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por PCR em tempo real, onde é observada a presença dos transcritos do gene do receptor P2X2 no estágio correspondente ao que foi realizada



a hibridização *in situ*. Porém, nenhuma expressão foi observada em áreas cerebrais, sugerindo que sua expressão é induzida mais tardiamente.

## **5. DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

---

Há evidências que mostram que o sistema nervoso de mamíferos contém todos os componentes do sistema caliceína-cininas e que as cininas podem atuar como neuromediadores em várias funções (Bhoola et al., 1992). A presença de componentes do sistema caliceína-cininas em neurônios do cérebro de mamíferos sugere que a bradicinina desempenha um papel fisiológico importante no sistema nervoso central através dos receptores B1BkR e B2BkR de cininas (Iwadate *et al.*, 2002). Além disso, o envolvimento da bradicinina no controle da homeostase do cálcio já foi demonstrado em neurônios sensoriais de ratos adultos (Thayer *et al.*, 1998).

Martins e colaboradores (2005) demonstraram que a bradicinina seria importante na formação de corpos embrióides de células P19 via receptor B2BkR e na determinação do fenótipo colinérgico destes neurônios diferenciados, formando um laço autocrino para liberação de bradicinina, a qual foi capaz de induzir a neurogênese. Pouco tempo depois, Martins e colaboradores (2008) caracterizaram a expressão e funcionalidade do sistema caliceína-cininas em neuroesferas extraídas do telencéfalo embrionário de ratos (E14). Mais recentemente, Trujillo e colaboradores (2012) demonstraram que a sinalização induzida pela bradicinina via receptor B2BkR é essencial para a determinação do destino neural assim como a especificação da expressão de receptores de neurotransmissores em células diferenciadas.

Assim, unindo-se a estes três trabalhos, iniciamos a investigação do efeito da deleção do gene do B2BkR na determinação do fenótipo neural, tanto na gliogênese

quanto na neurogênese *in vivo*, bem como na expressão de receptores purinérgicos do tipo P2X.

Inicialmente, analisamos o padrão de expressão quantitativo por PCR em tempo real do receptor B1BkR durante o desenvolvimento (figura 9). Os resultados apontam que durante os dias do desenvolvimento embrionário do animal selvagem o receptor B1BkR é expresso em níveis estáveis, sendo esta expressão significativamente menor nos estágios embrionários do que no cérebro de animais adultos. De fato, Trujillo e colaboradores (2012) demonstraram o receptor B1BkR não está expresso durante a diferenciação de células progenitoras neurais extraídas do telencéfalo embrionário de ratos.

Já a análise dos animais *knockout* para o gene B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) mostra que a expressão gênica do receptor B1BkR aumenta ao longo do desenvolvimento embrionário (figuras 9 e 10). Isso sugere que a deleção do gene do receptor B2BkR alterou a expressão do receptor B1BkR. Este resultado é diferente daquele obtido por Trujillo e colaboradores (2012), onde foi observado que na diferenciação *in vitro* de células progenitoras neurais, o bloqueio do receptor B2BkR não alterou a expressão gênica do receptor B1BkR. Porém, Lu e colaboradores (2010) relataram que em células de glioma, o aumento da migração celular na presença de bradicinina, sendo que este efeito foi igualmente reproduzido por agonistas do B1BkR, o que os levou concluir que este mecanismo depende da ativação do B1BkR. Assim, é possível que *in vivo* haja um efeito compensatório, onde uma vez ausente B2BkR, passe a favorecer uma maior expressão do B1BkR. De fato, alguns trabalhos demonstraram que animais *knockout* em genes que compõem determinados sistemas de sinalização podem compensar a ausência do gene deletado superexpressando outros constituintes do sistema. No caso do sistema

calicreína-cininas, alguns trabalhos demonstraram que os animais *knockout* para o receptor B2 compensam essa ausência através da acentuação da expressão dos receptores B1 (Austinat *et al.*, 2009).

A expressão quantitativa do receptor B2BkR (figura 11) mostra-se progressivamente maior ao longo do desenvolvimento embrionário. Porém, a expressão quantitativa máxima observada é no cérebro de animais adultos. Este padrão de expressão ao longo do desenvolvimento pode ser comparado ao perfil de expressão deste gene ao longo da diferenciação *in vitro*. Por exemplo, durante a diferenciação neural de células de carcinoma embrionário murino P19, anteriormente citadas, observa-se que a expressão do receptor B2BkR aumenta durante a diferenciação celular. Observou-se também que a inibição do receptor B2BkR por HOE-140 comprometeu a diferenciação terminal das células P19 para neurônios, diminuindo a expressão e funcionalidade dos receptores muscarínicos de acetilcolina e a neurogênese, demonstrando uma inter-relação entre esses receptores durante a diferenciação neuronal e indicando que o receptor B2BkR possui uma função essencial durante a diferenciação *in vitro* (Martins *et al.*, 2005, Trujillo *et al.*, 2012). Também em modelos de diferenciação de células progenitoras obtidos de telencéfalo embrionário, observa-se que a expressão do receptor B2BkR é regulada ao longo da diferenciação neuronal (Martins *et al.*, 2008). Trujillo e colaboradores (2012) mostram que o receptor B2BkR tem sua expressão relativa aumentada durante o processo de diferenciação *in vitro*.

Estes trabalhos mostraram que a expressão gênica do receptor B2BkR aumenta após a indução da diferenciação neuronal, juntamente com um aumento da secreção do peptídeo bradicinina no meio de cultura. (Martins *et al.*, 2008, Trujillo *et al.* 2012).

Embora a participação do receptor B2BkR de cininas seja bem descrita em durante a diferenciação *in vitro*, seu papel permanece quase que totalmente desconhecido durante a formação do sistema nervoso central e periférico de mamíferos. Porém, para alguns sistemas de órgão, o papel do receptor B2BkR já foi parcialmente elucidado. Foi demonstrado que a expressão deste receptor é importante para o desenvolvimento do sistema cardiovascular e urinário e que a inibição da atividade do receptor B2BkR em embriões de rato resulta em animais com distúrbio no desenvolvimento do fígado (El-Dahr, 1997).

Uma vez que obtivemos os resultados referentes à expressão quantitativa do receptor B2BkR durante o desenvolvimento, surgiu o interesse de determinar as áreas do sistema nervoso central, onde os transcritos do gene do deste receptor estão sendo expressos. Assim, estes mRNA foram encontrados em áreas neurogênicas no dia 9.5 do desenvolvimento, começando na vesícula ótica, em seguida, aumentando o seu padrão de expressão para a totalidade sistema nervoso nos dias 11.5 e 12.5. Estes resultados confirmam que o receptor B2BkR de fato está presente no sistema nervoso central do embrião, embora não se possa confirmar que este receptor esteja expresso em células neurais. É possível, por exemplo, que esta expressão seja restrita a vasos sanguíneos. Há uma ampla literatura relatando a presença de integrantes do sistema caliceína-cininas *in vivo*, porém essas referências são escassas em si tratando da descrição do período embrionário (Bhoola *et al.*, 1992; Borkowski *et al.* 1995.; Chen *et al.*, 2000; El-Dahr, 1997; Iwadate *et al.*, 2002; Mahabeer *et al.*, 2000)

Sendo assim, a caracterização do perfil de expressão do receptor B2BkR é a primeira a ser feita durante o desenvolvimento do sistema nervoso de camundongos. Porém, como trata-se de um modelo amplamente utilizado, pode-se falar que trata-

se da primeira descrição da presença dos receptor B2BkR ao longo do desenvolvimento do SNC de mamíferos.

Seguindo com a análise de parte dos componentes do sistema caliceína-cininas, resolveu-se investigar qual é o perfil de expressão dos cininogênios 1 e 2 e quais são as consequências acarretadas pela deleção do gene B2BkR em tal perfil de expressão. Primeiramente podemos verificamos que o cininogênio 1 tem um perfil de expressão distinto do cininogênio 2. O primeiro deles tem seus níveis de expressão máximos nos estágios mais precoces do desenvolvimento, decrescendo ao longo do avanço dos estágios embrionários, enquanto o segundo apresenta um perfil variado, estando expresso em níveis crescentes até os estágios finais do desenvolvimento e decrescendo outra vez nos animais neonatos e adultos. Porém, o mais importante aqui é verificar que a expressão de ambos os cininogênios está aumentada nos animais *knockout* B2BkR. Este resultado pode estar de acordo com o que descrevemos anteriormente para o receptor B1BkR. Se pensarmos que a expressão deste receptor é aumentada nos animais *knockout* para B2BkR em função de um provável efeito compensatório, é legítimo pensar que o mesmo ocorra com os precursores das moléculas que irão ativar estes receptores (literatura).

Sabendo que o receptor B2BkR de cininas participa de diversos processos relacionados à neurogênese, tais como: crescimento de neuritos, indução de ondas de cálcio, maturação e migração celular (Huang, *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2012), decidimos iniciar a investigação dos efeitos da deleção do receptor B2BkR na expressão dos marcadores neurais  $\beta$ 3-tubulina e MAP2; e gliais GFAP.

Conforme esperado, a expressão destes marcadores neurais  $\beta$ 3-tubulina e MAP aumento significativamente ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso. A expressão relativa de ambos os marcadores, que foi inicialmente baixa aumentou,

aumentou acentuadamente a partir de estágios mais tardios da embriogênese. Mais precisamente a partir do estágio correspondente ao dia 14.5 do desenvolvimento para a  $\beta$ 3-tubulina e do dia 17.5 no caso do MAP. A deleção do gene do receptor B2BkR levou à diminuição da expressão de ambos os marcadores.

Quando analisamos a expressão do marcador glial GFAP, temos um perfil de expressão semelhante aqueles dos marcadores neurais, ou seja, um aumento progressivo da expressão do marcador durante o desenvolvimento embrionário. Porém, o GFAP tem sua expressão relativa significativamente aumentada nos animais *knockout* para o receptor B2BkR. Trujillo e colaboradores (2012) já haviam relatado que durante a diferenciação neuronal e glial, a expressão destes marcadores aumenta progressivamente à medida que a cultura deixa para trás as marcações de progenitores neurais (*nestina*<sup>+</sup>) a passam a expressar marcadores específicos de diferenciação. Curiosamente, o tratamento crônico com HOE-140, inibidor seletivo do receptor B2BkR levou a uma diminuição da expressão do marcador  $\beta$ 3-tubulina, ao passo que a do GFAP foi consideravelmente aumentada. Portanto, este trabalho corrobora com os resultados aqui descritos.

Quanto à determinação do perfil de expressão dos marcadores de diferenciação neuronal, nos surpreendeu inicialmente o fato de que nos estágios embrionários tardios (correspondentes aos dias 14,5 e 17,5 para  $\beta$ 3-tubulina; somente a partir do dia 17.5 no caso do MAP) e animais neonatos, apresentarem níveis de expressão maiores que os animais adultos. Porém, há na literatura relatos precisos de que os marcadores  $\beta$ 3-tubulina e MAP2 não são específicos para neurônios maduros, os quais seriam os tipos de neurônios predominantes nos cérebros de animais adultos (McConnel, 1988; Menezes e Luskin, 1994). Realmente, tanto  $\beta$ 3-tubulina quanto MAP2 têm suas expressões aumentadas em áreas ativas



de neurogêneses, como no telencéfalo embrionários de mamíferos. A expressão deste marcador é maior nestes estágios embrionários justamente porque é a partir do 12º dia do desenvolvimento que o cérebro de camundongos apresenta uma maior intensidade na proliferação de linhagens celulares especializadas, estando estas regiões restritas a três áreas: nas camadas que rodeiam o ventrículo lateral, na zona ventricular e na zona subventricular sobrejacente (para uma revisão ver McConnel, 1988; Menezes e Luskin, 1994).

A neurofilamento MAP2 está presente em neurônios pós-migratórios e diferenciados, porém esta proteína de microtúbulo aparece pela primeira vez em células das zonas marginais, antes de ser detectado no córtex do encéfalo de embriões (Crandall *et al.*, 1986; Chun e Shatz, 1989). Além disso, MAP2 faz parte de uma família de proteínas cujas isoformas são altamente reguladas durante o desenvolvimento, sendo que a isoforma embrionária (MAP2c) é apenas uma das variantes de *splicing* expressas (variante de baixa massa molecular) durante o desenvolvimento embriológico (Jalava *et al.*, 2007; Riederer e Matus, 1985). Ainda sobre a mudança na expressão de marcadores de diferenciação neuronal, a explicação para uma maior expressão relativa dos transcritos da  $\beta$ 3-tubulina, sabe-se que a expressão de alguns isotipos transcritos a partir do quatro genes de tubulina aumentam durante o desenvolvimento pos-natal, enquanto outras isoformas diminuem após o nascimento (Lewis *et al.*, 1985).

Dentre os diversos tipos de receptores de neurotransmissores é sugerido que os purinérgicos desempenham um papel durante o desenvolvimento embrionário e na diferenciação neural (para revisão ver Burnstock e Ulrich, 2011 e Ulrich *et al.*, 2012). 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 *et al.*, 1996; Rathbone *et al.*, 1999). Sua ação no desenvolvimento do SNC se dá através da modulação da concentração de cálcio citosólico. Já no desenvolvimento embrionário os receptores purinérgicos são, juntamente com os colinérgicos, os primeiros a serem expressos (Laasberg, 1990). Schwindt e colaboradores (2009) documentaram a expressão das subunidades P2X2-7, onde verificaram a relação do aumento da expressão gênica de marcadores neuronais com os subtipos P2X2 e P2X6. No período pré-natal, o ATP já foi associado ao controle do crescimento axonal, como no crescimento de axônios no hipocampo (Heine *et al.*, 2006) e na inibição do crescimento de axônios de neurônios motores (Cheun *et al.*, 2005). Finalmente, vários receptores que são expressos ao longo do desenvolvimento embrionário não possuem correspondentes no sistema nervoso central e periférico adulto, sugerindo que seu papel é específico no desenvolvimento (Burnstock e Ulrich, 2011).

O padrão de expressão relativo apresentado na figura 21 mostra claramente um aumento nos níveis dos transcritos das subunidades P2X2, P2X6 e P2X7, a subunidade P2X3 variado pouco, enquanto que subunidade P2X5 apresentou uma elevação mais nítida a partir do estágio equivalente ao dia 14.5 do desenvolvimento. Estes resultados condizem com aqueles obtidos por Cheung e colaboradores (2004, 2005) que observaram a expressão desses receptores ao longo do desenvolvimento do cérebro de embrião de rato. Estes autores constataram a expressão elevada dos receptores P2X2, P2X4 e P2X7, ao mesmo tempo em que a expressão de P2X1 não foi encontrada.

Nos receptores purinérgicos há diferenças nos padrões de expressão de todas as subunidades entre os animais selvagens e *knockout* (B2BkR<sup>-/-</sup>). A

subunidade P2X2 apresenta níveis de expressão maiores nos animais selvagens do que nos animais *knockout*. No do subtipo P2X3, apenas os cérebros de animais adultos apresentam padrões distintos de expressão quando comparados. As subunidades P2X4 e P2X5 apresentam uma expressão maior nos animais B2BkR<sup>-/-</sup> em relação aos selvagens. Para a subunidade P2X6 o nível dos transcritos detectados é maior nos animais selvagens, porém os animais neonatos e adultos *knockout* passam a apresentar níveis de expressão mais elevados em relação aos selvagens. A subunidade P2X7 também tem um padrão distinto. Nos estágios embrionários mais precoces (11.5 e 14.5) e nos animais adultos, a expressão é relativamente maior nos animais *knockout*. Efeitos semelhantes a estes já haviam sido observados na expressão gênica durante a diferenciação em modelos celulares, como em células P19 e neuroesferas do telencéfalo de ratos (Resende *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2012).

Com a obtenção dos resultados referentes à expressão quantitativa dos receptores purinérgicos durante o desenvolvimento, surgiu o interesse de determinar as áreas do sistema nervoso onde os transcritos da subunidade P2X2 estão expressos. Isso porque Cheung e Burnstock (2002) já haviam descrito a presença desta subunidade durante o desenvolvimento de rato (E16.5), enquanto que durante a diferenciação neuronal *in vitro* a expressão deste receptor se mostra aumentada ao longo do processo da neurogênese (Resende *et al.*, 2007; Schwindt *et al.*, 2010). Na figura 22 observamos que em animais selvagens os transcritos desta subunidade encontram-se localizados em áreas restritas às regiões de brotamento dos membros e aos somitos da região caudal.

Os resultados apresentados aqui fortalecem a hipótese sugerida em trabalhos *in vitro* realizados anteriormente, os quais demonstram a participação do receptor

B2BkR de cininas na modulação do destino neural e sua influência na neurogênese (Martins *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2012), mas antes é fundamental destacar que os camundongos B2BkR<sup>-/-</sup> são viáveis. É certo que investigações adicionais e posteriores estudos *in vivo* destes camundongos podem trazer novos dados relacionando o receptor B2BkR de cininas e se estas diferenças no desenvolvimento podem representar alterações comportamentais.

Este trabalho pode incentivar estudos adicionais para elucidar a participação do receptor B2BkR e do sistema calicrina-cininas em dirigir diferenciação para um fenótipo determinado neural utilizando um modelo *in vivo*. Tanto assim que nosso grupo investigou os possíveis efeitos neuroprotetores da bradicinina na lesão de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) – um modelo animal da Doença de Parkinson. Foi demonstrado que o tratamento com este peptídeo leva à neuroregeneração em animais submetidos à lesão da via nigro-estriatal por 6-OHDA *in vivo*. Prova disto é que nos propomos a investigar os mecanismos envolvidos e o papel do receptor B2BkR de cininas no processo de neuroproteção e regeneração neural desencadeado pela bradicinina na terapia da Doença de Parkinson.

## **6. CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

---

- Os receptores do sistema caliceína-cininas (B1BkR e B2BkR) têm suas expressões relativas reguladas ao longo do desenvolvimento embrionário;
- A deleção do gene que codificado para o receptor B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) leva a um aumento na expressão relativa do receptor B1BkR de cininas;
- Os transcritos do receptor B2BkR foram encontrados em células de regiões neurogênicas a partir do dia 9.5 do desenvolvimento, começando na vesícula ótica, tendo sua expressão ampliada para toda a extensão do sistema nervoso do embrião a partir do estágio 12,5 do desenvolvimento;
- O cininogênios 1 tem seus níveis de expressão máximos nos estágios embrionários mais precoces, enquanto o cininogênio 2 é expresso em níveis crescentes até os estágios finais do desenvolvimento e diminui nos animais neonatos e adultos. A deleção do gene B2BkR (B2BkR<sup>-/-</sup>) levou a um aumento nos níveis de expressão de ambos os cininogênios;
- As expressões dos marcadores neurais  $\beta$ 3-tubulina e MAP aumentaram significativamente ao longo do desenvolvimento. A deleção do gene do receptor B2BkR levou à diminuição da expressão de ambos os marcadores, confirmando que ativação deste receptor favorece a neurogênese *in vivo*.
- O marcador glial GFAP tem sua expressão relativa significativamente aumentada nos animais *knockout* para o receptor B2BkR, confirmando que inibição deste receptor favorece a gliogênese *in vivo*.
- A deleção do receptor B2BkR altera o perfil de expressão dos receptores purinérgicos do subtipo P2X.

- Este trabalho é o primeiro a demonstrar os efeitos da deleção do receptor B2BkR sob a expressão de marcadores neurais e gliais; cininogênios 1 e 2; e receptores purinérgicos do suptipo P2X *in vivo*.

## ***7. REFERÊNCIAS***

---



## 7. REFERÊNCIAS

---

Abbracchio MP, Burnstock G. (1998). Purinergic signalling: pathophysiological roles. *pn J Pharmacol.* 78, 113-45.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2, 287-93.

Alves, JM (2009). Múltiplas funções do sistema caliceína-cininas: Diferenciação muscular e neuronal e neuroproteção. Tese (Doutorado em Neurologia e Neurociências) - Universidade Federal de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador:* Alexander Henning Ulrich.

Austinat, M.; Braeuninger, S.; Pesquero, J. B.; Brede, M. ; Bader, M.; Stoll, G.; Renne, T.; Kleinschnitz, C. (2009). Blockade of Bradykinin Receptor B1 but Not Bradykinin Receptor B2 Provides Protection From Cerebral Infarction and Brain Edema. *Stroke*, v. 40, p. 285-293.

Barrera NP, Ge H, Henderson RM, Fitzgerald WJ, Edwardson JM. (2008). Automated analysis of the architecture of receptors, imaged by atomic force microscopy. *Micron.* 39,101-10.

Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. (2005). Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem.* 280, 10759-65.

Bayer, S.A., Altman, J. (1991). *Neocortical Development*, First ed. Raven Press, New York.

Bhoola KD, Elson CJ, Dieppe PA. (1992). Kinins-key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol.* 31, 509-18.

Borkowski, J.A., Ranson, R.W., Seabrook, G.R., Trumbauer, M., Chen, H., Hill, R.G., Strader, C.D. AND Hess, J.F. (1995). Targeted disruption of a B<sub>2</sub> bradykinin receptor in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J. Biol. Chemistry* 270, 13706–13710.

Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC. (2004). Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature.* 429, 523-30.

Brändle, U.; Zenner, H. P.; Ruppertsberg, J. P. (1999) Gene expression of P2X-receptors in the developing inner ear of the rat. *Neurosci Lett*, v. 273, p. 105-108.

Burnstock G, Kennedy C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433-40.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. (1972). Evidence that adenosine triphosphate or related nucleotide is the transmitter substance release by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 40, 668-88.

Burnstock G, Ulrich H. (2011). Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci.*

Bush, A. B., Borden, L. A., Greene, L. A., AND Maxfield, F. R. (1991). Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *J. Neurochem* 57, 562-574.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1-5.

Ciani L, Salinas PC. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews.* 6, 351-362.

Chau, L. Y., Lin, T. A., Chang, W. T., Chen, C. H., Shue, M. J., Hsu, Y. S., Hu, C. Y., Tsai, W. H., Sun, G. Y. (1993). Endothelin-mediated calcium response and inositol 1,4,5-trisphosphate release in neuroblastoma-glioma hybrid cells (NG108-15): cross talk with ATP and bradykinin *J. Neurochem.* 60, 454-460.

Chen, E.Y., Emerich, D.F. Bartus, T.R., Kordower, J.H. (2000) B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *The J. C. Neurolo.* 427, 1-18.

Cheung KK, Chan, WY, Burnstock, G (2005) Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neurosc.* 4, 937-45.

Cheung KK, Ryten M, Burnstock G. (2003). Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn.* 228, 254-66.

Chun JJM, Shatz CJ (1989) The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. *J Neurosci* 9: 1648-1667.

Ciani L, Salinas PC. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews.* 6, 351-62.

Crandall JE, Jacobson M, Kosik KS (1986) Ontoanesis of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in embryonic mouse cortex. *Dev Brain Res* 28:127-133.

Dendorfer, A., Hauser, W., Falias, D., Dominiak, P. (1996). Bradykinin increases catecholamine release via B2 receptors. *Pflugers Arch.* 432, R99-R106.

Drury AN, Szent-Gyorgyi A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68, 213-37.

El-Dahr, S.S.(1997). Ontogeny of the intrarenal kallikrein-kinin system: proposed role in renal development. *Microsc. Res. Tec.*39,222-232.

Eurin, J., Barthelemy, C., Masson, F., Soualmia, H., Sarfati, E., Carayon, A. (2002). Bradykinin-induced neuropeptide Y release by human pheochromocytoma tissue. *Neuropeptides* 36, 257-262.

Fleming TP. (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol.* 119, 520-31.

Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews.* 7, 772-783.

Frisén J, Johansson CB, Lothian C, Lendahl U. (1998). Central nervous system stem cells in the embryo and adult. *Cell Mol Life Sci.* 54, 935-45.

Götz M, Huttner WB. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 777- 88.

Gilbert, SF. *Developmental Biology.* 8<sup>th</sup> ed. Sunderland. Sinauer Associates; 2009.

Guillemot, F. (2007). Cell fate specification in the mammalian telecephalon. *Progress in Neurobiology.* v. 83, p. 37-52.

Gross, R. E., Mehler M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., and Kessler, J. A. (1996). Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17, 595–606.

Heine, C., Heimrich, B., Vogt, J., Wegner, A., Illes, P., Franke, H. (2006). P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neurosc.* 1, 303-3011.

Huang Z, Yu J, Toselli P, Bhawan J, Sudireddy V, Taylor L, Polgar P. (2007). Angiotensin II type 1 and bradykinin B2 receptors expressed in early stage epithelial cells derived from human embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 211, 816-25.

Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M, Betteridge K. (2010) Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto.

Iwadate H, Kudo M, Kizuki K. (2002). Expression of tissue kallikrein mRNA in developing rat brains. *Can J Physiol Pharmacol.* 80, 245-8.

Jalava N. S., Francisco R. Lopez-Picon a, Tiina-Kaisa Kukko-Lukjanov a, Irma Holopainen E. (2007). Changes in microtubule-associated protein-2 (MAP2) expression during development and after status epilepticus in the immature rat hippocampus. *Int. J. Devl Neuroscience* 25, 121–131.

Johnson RL, Tabin CJ. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell.* 90,979-90.

- Kaufman, M.H., Bard, J.B.L. (1999). The anatomical basis of mouse development. *Academic Press*. London NW1 7DX UK, 171-193.
- Kansui, Y., Fujii, K., Goto, K., Abe, I. (2002). Bradykinin enhances sympathetic neurotransmission in rat blood vessels. *Hypertension* 39, 29-34.
- Kurz, T., Tolg, R., Richardt, G. (1997). Bradykinin B2-receptor-mediated stimulation of exocytotic noradrenaline release from cardiac sympathetic neurons. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 2561-25619.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors
- Kanjhan, R., Housley, G.D., Burton, L.D., Christie, D.I.L, Kippenberger, A., Thorne, P.R., Luo, I., Ryan, AF (1999). Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*407,11-32.
- Kozlowski, M. R., Rosser, M. P., and HALL, E. Identification of 3H-bradykinin binding sites in PC-12 cells and brain (1988). *Neuropeptides* 12, 207-211
- Le Douarin NM. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech Dev.* 121, 1089-02.
- Liu A, Niswander LA. (2005). Bone morphogenetic protein signaling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews.* 6, 945-954.
- Louvi A, Artavanis-tsakonas S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *NatureReviews.* 7, 93-102.
- Lin JH, Takano T, Arcuino G, Wang X, Hu F, Darzynkiewicz Z, Nunes M, Goldman SA, Nedergaard M. (2007). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol.* 302, 356-66.
- Lu DY, Leung YM, Huang SM, Wong KL. (2010). Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J Cell Biochem.* 110, 141-50.
- Lewis S. A., M. G. Lee, and Nicholas J. C. (1985) Five Mouse Tubulin Isotypes and Their Regulated Expression during Development. *The journal of cell biology* - volume 101 september. 852-861.
- Laasberg T. (1990). Ca<sup>2+</sup>-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. *Comp Biochem Physiol C.* 97, 1-12.
- Moutri, A.; Gage, F.H (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature.* v. 441, p. 1087-1093.
- Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Ver.* 50; 357-86.

- Martins, A. H. B. ; Alves, J. M. ; Perez, D. ; Carrasco, M. ; Torres-Rivera, W.; Eterovic, V. A. ; Ferchmin, P. A. ; Ulrich, H. (2012). Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists. *Plos One*, v. 7, p. e30755.
- Martins AH, Alves JM, Trujillo CA, Schwindt TT, Barnabé GF, Motta FL, Guimaraes AO, Casarini DE, Mello LE, Pesquero JB, Ulrich H. (2008). Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry A*. 73, 361- 68.
- Martins AH, Resende RR, Majumder P, Faria M, Casarini DE, Tamok A, Colli W, Pesquero JB, Ulrich H. (2005). Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *J Biol Chem*. 280, 19576- 86.
- Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM. (2000). Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis*. 15, 325-35.
- Ma W, Li BS, Zhang L, Pant HC. (2004). Signaling cascades implicated in muscarinic regulation of proliferation of neural stem and progenitor cells. *Drug News Perspect*. 17, 258-66.
- Majumder P, Trujillo CA, Lopes CG, Resende RR, Gomes KN, Yuahasi KK, Britto LR, Ulrich H. (2007). New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal*. 3, 317-31.
- McConnell S (1988) Development and decision making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res Rev* 13: 1-23.
- Menezes J. R. L. and Luskin, M. (1994) Expression of Neuron-Specific Tubulin Defines a Novel Population in the Proliferative Layers of the Developing Telencephalon. *The Journal of Neuroscience*, September, 14(g): 5399-5416
- North, R. A.; Barnard, E. A. Nucleotide receptors. (1996) *Curr Opin Neurobiol*, v. 7, n. 3, p. 346-357,.
- Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci*. 19, 13-18.
- Park, J. K., Williams, B. P., Alberta, J. A., Stiles C. D. (1999). Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J. Neurosci*. 19, 10383–10389.
- Pedersen RA, Wu K, Balakier H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol*. 117, 581-95.

Quian, X., Davis, A. A., Goderie, S. K., Temple, S. (1997) FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18, 81–93.

Reetz, G. and Reiser, G. (1994). Cross-talk of the receptors for bradykinin, serotonin, and ATP shown by single cell  $Ca^{+2}$  responses indicating different modes of  $Ca^{+2}$  activation in a neuroblastoma x glioma hybrid cell line.

Riederer B, Matus A (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6006-6009.

Ryu JK, Choi HB, Hatori K, Heisel RL, Pelech SL, McLarnon JG, Kim SU. (2003). Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J Neurosci Res.* 72, 352-62.

Rathbone, M. P.; Middlemiss, P. J.; Gysbers, J. W.; Andrew, C.; Herman, M. A. R.; Reed, J. K.; Ciccarelli, R.; Iorio, P. D.; Caciagli, F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells, *Prog Neurobiol*, v. 59, p. 663-690.

Resende, R. R. ; Majumder, P. ; Gomes, K. N. ; Britto, L.R.G. ; Ulrich, H. (2007). 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, p. 1169-1181.

Resende, R. R. ; Britto, L.R.G. ; Ulrich, H. (2008). Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 26, p. 763-777.

Schwindt TT, Motta FL, Barnabé GF, Massant CG, Guimarães AO, Calcagnotto ME, Pesquêro JB, Mello LE (2009) Effects of FGF-2 and EGF removal on the differentiation of mouse neural precursor cells. *An Acad Bras Cienc* 81:443-452

Smith JL, Schoenwolf GC. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510-17.

Schelb, V., Gobel, I., Khairallah, L., Zhou, H., Cox, S. L., Trendelenburg, A. U., HEIN, L., and Starke, K. (2001). Postnatal development of presynaptic receptors that modulate noradrenaline release in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364, 359-571.

Stephens, G. J., Cholewinski, A. J., Wilkin, G. P., and Djamgoz, M. B. (1993.) Calcium-mobilizing and electrophysiological effects of bradykinin on cortical astrocyte subtypes in culture. *Glia* 9, 269-279

Sporle R, Schughart K. (1997). Neural tube morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 7, 507-512.

Temple, S. and Qian, X. (1995) bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* 15, 249–252.

Thayer, S. A., Perney, T. M., and Miller, R. J. (1988). Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *J. Neurosci.* 8, 4089-4097.

Theiler K. (1978). The house mouse Atlas of embryonic development. Springer-Verlag, New York.

Trujillo, C. A.; Schwindt, T.T.; Martins, A.H.B. ; Alves, J.M.; Mello, L.E.A.M.; Ulrich, H..(2009) Novel perspectives of neural stem cell differentiation: From neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry. Part A*, v. 75A, p. 38-53.

Trujillo, C. A. ; Negraes, P.D. ; Schwindt TT ; Lameu C ; Carromeu, C. ; Muotri, A. R. Pesquero, J. B. ; Cerqueira, D. M. ; Pillat, M. M. ; Souza, H. D. N. ; Turaca, L. T. ; Abreu, J. G. ; Ulrich, H. (2012) . Kinin-B2 Receptor Activity Determines the Differentiation Fate of Neural Stem Cells. *The Journal of Biological Chemistry (Print)*, v. 287, p. 44046-44061.

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

Ulrich, H. ; Abbracchio, M.P. ; Burnstock G. (2012) Extrinsic Purinergic Regulation of Neural Stem/Progenitor Cells: Implications for CNS Development and Repair. *Stem Cell Reviews*, v. 8, p. 755-767.

Yano K, Higashida H, Hattori H, Nozawa Y. (1985). Bradykinin-induced transient accumulation of inositol trisphosphate in neuron-like cell line NG108-15 cells. *FEBS Lett.* 181, 403-6.

Willars, G.B., Esterl W.M., Nahorski, S.R. (1999). Receptor phosphorylation does not mediate cross talk between muscarinic M3 and bradykinin receptor. *Am. J. Cell Physiol.* 227, 859-869.

Williams, B. P., Park, J. K., Alberta, J. A., Muhlebach S., G., Hwang, G. Y., Roberts, T. M., Stiles, C. D. (1997). A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron* 18, 553–562.

Wilson L, Maden M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol.* 282, 1-13.

Zimmermann H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch.* 452, 573-88.

Zimmermann H. (2008) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, v. 32, n.1, p. 19-29.

## **8. ANEXOS**

---



# SÚMULA CURRICULAR

## DADOS PESSOAIS

Nome: Hélio Danny Nóbrega de Souza

Local e data de nascimento: Patos-PB, 13/10/1984

## EDUCAÇÃO

- Escola Estadual Monsenhor Manuel Vieira – 2003
- Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa – 2009
- Graduação em Ciências Biológicas (licenciatura e bacharelado)

## FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

**01/2006 a 12/2007** – Participação como extensionista colaborador no projeto de extensão universitária em Bioinformática: *Bioinformática: área de potencial para Formação de pessoal, Serviços, Aplicações e Desenvolvimento*. Laboratório de Bioinformática - no Departamento de Biologia Molecular – DBM da Universidade Federal da Paraíba. Sob a orientação do Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo.

**01/2008 a 12/2008** – Bolsista do projeto de extensão universitária em Bioinformática: *Bioinformática: área de potencial para Formação de pessoal, Serviços, Aplicações e Desenvolvimento*. Laboratório de Bioinformática – DBM/UFPB. Sob a orientação do Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo.

**01/2007 a 12/2008** – Participação como estagiário no projeto de pesquisa: *Desenvolvimento e Aplicação de Recursos Educativos para difusão da biotecnologia em escolas públicas* (CNPq – chamada 12/2006). Laboratório de Bioinformática - no Departamento de Biologia Molecular – DBM/UFPB. Sob a orientação do Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo.

**01/2008 a 12/2008** – Monitor Bolsista de Disciplina “*Fisiologia Animal Comparada*”, do Departamento de Sistemática e Ecologia/UFPB. Sob a responsabilidade do Prof. Gildo Gomes Filho.

**01/2007 a 02/2007** – Participação no II Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular. (Carga horária: 80h). Instituto de Química, IQ, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

**12/2006 a 02/2009** – Participação como estagiário voluntário no projeto de pesquisa: *Análise proteômica em Leishmania chagasi: Avaliação de compostos naturais isolados com perspectiva fitofarmacológica* – Laboratório de Bioquímica e Ecologia – LABIME, no Departamento de Biologia Molecular – DBM/UFPB.

## **OCUPAÇÃO**

Bolsista de mestrado. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. 2009-2011.

Bolsista de treinamento de nível técnico. Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP. 2011-2012.

## **PUBLICAÇÕES**

### **- Artigos**

1. Gonçalves, J.C.R.; Silveira, A. L.; **Souza, H. D. N.**; Nery, A. A. Prado, V. F. Prado, M. A. M.; Ulrich, H.; Araújo, D.A.M.. The monoterpene ( )-carvone: A novel agonist of TRPV1 channels. Cytometry. Part A, 2013

2. Trujillo, C. A.; Negraes, P.D.; Schwindt TT; Lameu C ; Carromeu, c. Muotri, A.R.; Pesquero, J. B.; Cerqueira, D. M. ; Pillat, M. M. ; **Souza, H. D. N.** ; Turaca, L. T.; Abreu, J. G.; Ulrich, H. Kinin-B2 Receptor Activity Determines the Differentiation Fate of Neural Stem Cells. The Journal of Biological Chemistry (Print), v. 287, p. 44046-44061, 2012

## **Congressos, Simpósios e Reuniões**

– Participação no Simpósio Agenda do Futuro nas Ciências Biomédicas. ICB/UFRJ. 2009

– GONÇALVES, J.C.R. ; SILVEIRA, A.L. ; **DE SOUZA, H. D. N.** ; NERY, A.A. ; ULRICH, H. ; ARAUJO, D. A. M. . (-)-Carvone increase intracellular calcium levels in drg neurons. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo-SP. XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.

– Participação no “1º Encontro de pesquisadores do NAPNA – Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada” – no dia 15 de Outubro de 2011. (Carga Horária: 10h). Instituto de Psiquiatria da USP – HSFMUSP. São Paulo-SP.

– GONCALVES, J.C.R. ; **DE SOUZA, H. D. N.** ; NERY, A.A. ; ULRICH, A.H. ; PRADO, V. F. ; PRADO, M. A. M. ; ARAUJO, D. A. M. . (-)-Carvone activates trpv1 channels in drg neurons and trpv1-expressing hek cells. In: XXVI Reunião Anual da FeSBE, 2011, Rio de Janeiro.

- **DE SOUZA, H. D. N.** ; CAMPOS, M. ; Demasi M.A. ; NERY, A.A. ; Negraes, P.D. ; Sogayar. M.C. ; ULRICH, H. . Characterization of Allosteric Effects in Murine Heteromeric P2X4/6 Receptors and its Splicing Variants. In: XL Annual Meeting of The Brazilian of Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), 2011, Foz do Iguaçu. XL Annual Meeting of The Brazilian of Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), 2011.

# The Monoterpene (–)-Carvone: A Novel Agonist of TRPV1 Channels

Juan Carlos R. Gonçalves,<sup>1</sup> Alethéia L. Silveira,<sup>1</sup> Héllio D. N. de Souza,<sup>2</sup> Arthur A. Nery,<sup>2</sup> Vania F. Prado,<sup>3</sup> Marco A. M. Prado,<sup>3</sup> \* Henning Ulrich,<sup>2</sup> \* Demetrius A. M. Araújo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa—PB, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Robarts Research Institute, Department of Anatomy & Cell Biology and Department of Physiology & Pharmacology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Received 28 July 2012; Revision Received 8 October 2012; Accepted 31 October 2012

Grant sponsor: Provost's Office for Research of the University of São Paulo (Programa de Incentivo à Pesquisa, NAPNA-USP); Grant number: 2011.1.9333.1.3; Grant sponsors: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

\*Correspondence to: Henning Ulrich, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 748, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: henning@iq.usp.br; Marco A.M. Prado, Department of Physiology & Pharmacology and Department of Anatomy & Cell Biology, Robarts Research Institute, The University of Western Ontario, P.O. Box 5015, 100 Perth Drive, London, ON N6A 5K8, Canada. E-mail: mprado@robarts.ca; Demetrius A. M. Araújo, Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, Campus I. 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: demetrius.araujo@pq.cnpq.br

Published online 10 January 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22236

© 2013 International Society for Advancement of Cytometry

## • Abstract

(–)-Carvone is an antinociceptive monoterpene found as the main active constituent of essential oils obtained from plants of the genus *Mentha*. Here, we have investigated the pharmacology of this monoterpene in dorsal root ganglia (DRG) neurons and TRPV1-expressing HEK293 cells. (–)-carvone at pharmacological active concentrations did not reveal significant cytotoxicity to the cells used in this study, as investigated by neutral red and propidium iodide flow cytometry assays. In calcium imaging experiments 1 mM (–)-carvone increased the cytosolic calcium levels in DRG neurons from  $120.6 \pm 5.0$  nM (basal) to  $310.7 \pm 23.1$  nM ( $P < 0.05$ ). These effects were completely abolished when neurons were preincubated with calcium-free bath solution or ruthenium-red (5  $\mu$ M) and capsazepine (10  $\mu$ M), suggesting the possibility of TRPV1 channel-activation by (–)-carvone. Activity of (–)-carvone on TRPV1 channels was further investigated in HEK293 cells expressing recombinant human TRPV1 channels revealing dose-dependent calcium transients with an  $EC_{50}$  of  $1.3 \pm 0.2$  mM (Hill coefficient = 2.5). In conclusion, we show for the first time the ability of (–)-carvone to induce increases in cytosolic calcium concentration through TRPV1 activation. © 2013 International Society for Advancement of Cytometry

## • Key terms

natural products; (–)-carvone; DRG neurons; calcium imaging; TRPV1 channels

## INTRODUCTION

Monoterpenes are the main components of essential oils (EO) extracted from aromatic plants and possess distinct biological activities, already described elsewhere (1). Carvone is a monoterpene representing the main active constituent of the EO of *Mentha sp.* and commonly extracted from its leaves (2). R-(–)-carvone (abbreviated as (–)-Cv) is an enantiomer of carvone being the major constituent of peppermint (*Mentha spicata*) EO and displaying antinociceptive and anticonvulsant activities in addition to other pharmacological effects (3,4). However, few studies have been proposed to elucidate the mechanisms involved with these pharmacological profiles of (–)-Cv at the cellular level. Regarding nociception, channels of the transient receptor potential (TRP) family have become increasingly important as novel sources of action for effective analgesic drugs (5). Among these channels, the TRP vanilloid type 1 (TRPV1) is well-known due to its role on nociception (5,6). This channel is sensitive to protons, heat and chemicals like capsaicin, vanilloids, cannabinoids, and various inflammatory mediators (7). In a different context, Calixto et al. (8) highlighted the great contribution of plant-derived compounds such as capsaicin, menthol, or resiniferatoxin as chemical tools to better understand the roles of TRP channels and their functions. Similar to menthol, camphor is another example for an antinociceptive monoterpene acting via TRP channels of the TRPV1 and TRPV3 types (9). Our hypothesis has been that (–)-Cv also affects nociceptors. In fact, it was described that (–)-Cv presents some activity on TRPV3

types (10). Therefore, we have now studied whether (–)-carvone directly activates TRPV1 channels.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All salts used in physiological solutions, glucose and NaOH, were purchased from Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil) or Sigma-Aldrich, Canada. Ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA), acid-*N*-[2-hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), capsaicin (Cap), capsaizepine (CPZ), dimethylsulfoxide (DMSO), caffeine (Caff), propidium iodide (PI), ionomycin (Iono), poly-*L*-lysine, thapsigargin (Thaps), and ruthenium red (Ru-red) were purchased from Sigma-Aldrich (USA or Canada). The enzymes papain and collagenase type-IA were purchased from Worthington Biochem. Corp. (USA) and Invitrogen (USA), respectively.

Before all experiments, R-(–)-carvone (Sigma-Aldrich, USA or Canada) was vigorously dissolved in a Krebs-Ringer-HEPES (KRH) solution (containing in mM: NaCl 140, KCl 4.5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, glucose 10, pH = 7.4 adjusted with NaOH) supplemented with 0.1% DMSO. All lipophilic compounds used in this study were diluted to form a final volume ≤0.1% of DMSO.

TRPV1-cDNA from *Rattus norvegicus* (rTRPV1) was kindly donated by Dr. David Julius (UCSF, USA) which had been cloned as described by Caterina et al. (11). The plasmid pmCherry-N1 was purchased from Clontech (USA).

### Animals

In this study, we used 4-week old Wistar rats (*R. norvegicus*) weighing around 100 g, randomly housed in appropriate cages at 22°C ± 2°C on a 12-h light cycle with free access to food (Purina, Brazil) and water. They were killed by cervical dislocation, and all procedures were carried out in accordance with the guide lines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Paraíba, Brazil (CEPA, process number #306/08).

### Primary Culture of Dorsal Root Ganglion Neurons

Dorsal root ganglion (DRG) neurons were surgically dissected from thoracic and lumbar levels and immediately washed three times by centrifugation (150× g/1 min) with cold phosphate-buffered saline (PBS) (low Ca<sup>2+</sup>), consisting of (in mM): NaCl 137, KCl 5.6, MgCl<sub>2</sub> 3.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4, NaHCO<sub>3</sub> 4.2, CaCl<sub>2</sub> 0.05, HEPES 10, pH = 7.4 (adjusted with NaOH). Then, DRG neurons were exposed for 20 min to 0.1% papain at 37°C and then for an additional 30 min to 0.25% collagenase type-I. Thereafter, ganglia were mechanically dissociated using fired-polished glass Pasteur pipettes and resuspended in DMEM (Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Neurons were then plated onto coverslips pretreated with poly-*L*-lysine (10 µg/ml) and cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### HEK293 Cell Culture

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in MEM medium (Invitrogen, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The cells were handled under sterile environment and cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Neutral Red Assay for Determination of Cell Viability

The neutral red assay is an indicator of intact cell membrane integrity. This test is based on the uptake of neutral red, a supravital dye, by uninjured cells accumulating it in the lysosome. The neutral red assay was performed in a modified form as described by Borenfreund and Puerner (12). Briefly, freshly isolated DRG neurons from *Wistar* Rats were plated at density of 5 × 10<sup>5</sup> per mL in 96-well plates using DMEM, supplemented with 10% FBS, penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The culture medium was removed 24 h after cell seeding and replaced with medium containing (–)-Cv at 0.5, 1, 2, or 4 mM concentrations. Doxorubicin was used at 1, 10, and 100 µM, as a positive control to induce cell death. After 24 h of treatment with the drugs, neutral red solution (50 µg/mL) was added followed by incubation for 3 h at 37°C. The cells were then washed rapidly with PBS containing calcium and following addition of a solution containing 1% glacial acetic acid and 50% ethanol. The reaction was agitated for 20 min on a plate shaker, and the absorbance was then measured at 540 nm in a spectrophotometer (Biotek Instruments EL800, USA).

### Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry for Quantification of Dead Cells

HEK293 cells (5 × 10<sup>5</sup> cells/ml) were treated with (–)-Cv at 0.5, 1, 5, or 10 mM concentrations and compared to cells treated with doxorubicin (25 µM). After 6 h of exposure, the samples were collected by centrifugation for 5 min at 150×g, resuspended and stained for 5 min with propidium iodide (2 µg/ml) in the dark, at room temperature. The cells were analyzed using a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipped with a 488-nm argon ion laser. Samples were detected with photomultiplier tubes (PMTs) at 585 nm ± 20 nm (channel FL-2) and acquired as list mode files (FCS files). The PMT signal was amplified logarithmically to distinguish populations of permeable to propidium iodide, which are presumably dead cells, from viable one. To exclude cell debris from the analysis, a polygon gate was set according to their light scattering properties (in a forward vs. side scatter plot), based on the acquisition of data for 10,000 cells. Fluorescence signals were collected in logarithmic mode, and the cytofluorimetric data were analyzed by the Summit software (Dako, USA) and plotted as a histogram of FL2 staining. Further details are in Supporting Information Table 1 (Author Checklist: Location of MIFlowCyt-Compliant Items).

### Heterologous Expression of rTRPV1

In this study, HEK293 cells were transiently transfected with rTRPV1 plasmids by the modified calcium phosphate co-precipitation method (13,14). In brief, 0.5  $\mu\text{g}$  of rTRPV1 was mixed into 300  $\mu\text{l}$  Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich, USA) followed by dropwise addition of 15  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2.5 M). The mix was carefully added to a 30 mm Petri dish containing HEK293 cells in 80% confluence. After 10 h of incubation (5%  $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$ ), the medium was replaced by complete MEM, and the cells were assayed after 12–24 h. Fifty ng pmCherry-N1 was co-transfected with rTRPV1 to indicate cells positive for TRPV1 (mCh+). Mock-transfected cells were transfected only with pmCherry-N1 (mCh-), and the control group was submitted to the same protocol, however in the absence of DNA.

### Calcium Imaging

DRG neurons ( $3 \times 10^4/\text{well}$ ) were loaded with 5  $\mu\text{M}$  Fluo-3/AM in the presence of 0.1% pluronic acid (both reagents from Invitrogen, USA) for 20 min in DMEM medium containing 10% FBS. Then, cells were gently washed with  $\text{Mg}^{2+}$ - or  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs-Ringer-HEPES (KRH) buffer, incubated in this solution for further 30 min, then subjected to calcium imaging with the inverted Microscope ECLIPSE -TiS (Nikon, Melville, NY) coupled to a 14-bit high-resolution CCD camera CoolSNAP HQ2 (Photometrics, Tucson, AZ). Data were analyzed with NIS-Element for advanced research software (Nikon) using image acquisition rates of one frame per second collected by an automatic shutter system. Fluorescence excitation and emission wavelengths were 488 and 515 nm, respectively (15).

TRPV1 activity was further evaluated by labeling transfected HEK293 cells with Fura-2/AM (Invitrogen, USA) followed by calcium imaging using a fluorescence microscope (Leica, Germany) equipped with Ex340/380; Em510 nm filters. In these experiments cells were incubated with Fura-2/AM (5  $\mu\text{M}$ ) for 20 min and then gently washed with KRH for additional 30 min. Fluorescence ratio ( $R$ ) was later analyzed with the Leica AF6000 software (Leica, Germany). Transfected cells were selected using mCherryFP filters (Ex587; Em610 nm).

The cytosolic calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was estimated by applying the equation  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d * (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$  where  $K_d$  is the dissociation constants of Fluo-3 (450 nM) or Fura-2 (224 nM),  $F$  is the variable fluorescence intensity,  $F_{\max}$  and  $F_{\min}$  are, respectively, the maximum and minimum fluorescence obtained in the presence of ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ) or EGTA (20 mM) (16).  $F$  was substituted for  $R$  in the formula above when Fura-2 was used as fluorophore. Calcium imaging data, using DRG neurons or HEK293 transfected cells were representative for three independent experiments of single cell analysis of at least 10 cells each.

### Statistical Analysis

All data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Levels for statistical significance were set at  $P < 0.05$  using ANOVA followed by Dunnet or Tukey tests.  $\text{EC}_{50}$  values were acquired by plotting normalized data to the Hill equation:  $f = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + \text{EC}_{50}/[\text{CvOL}]^n)$ , where Max and Min

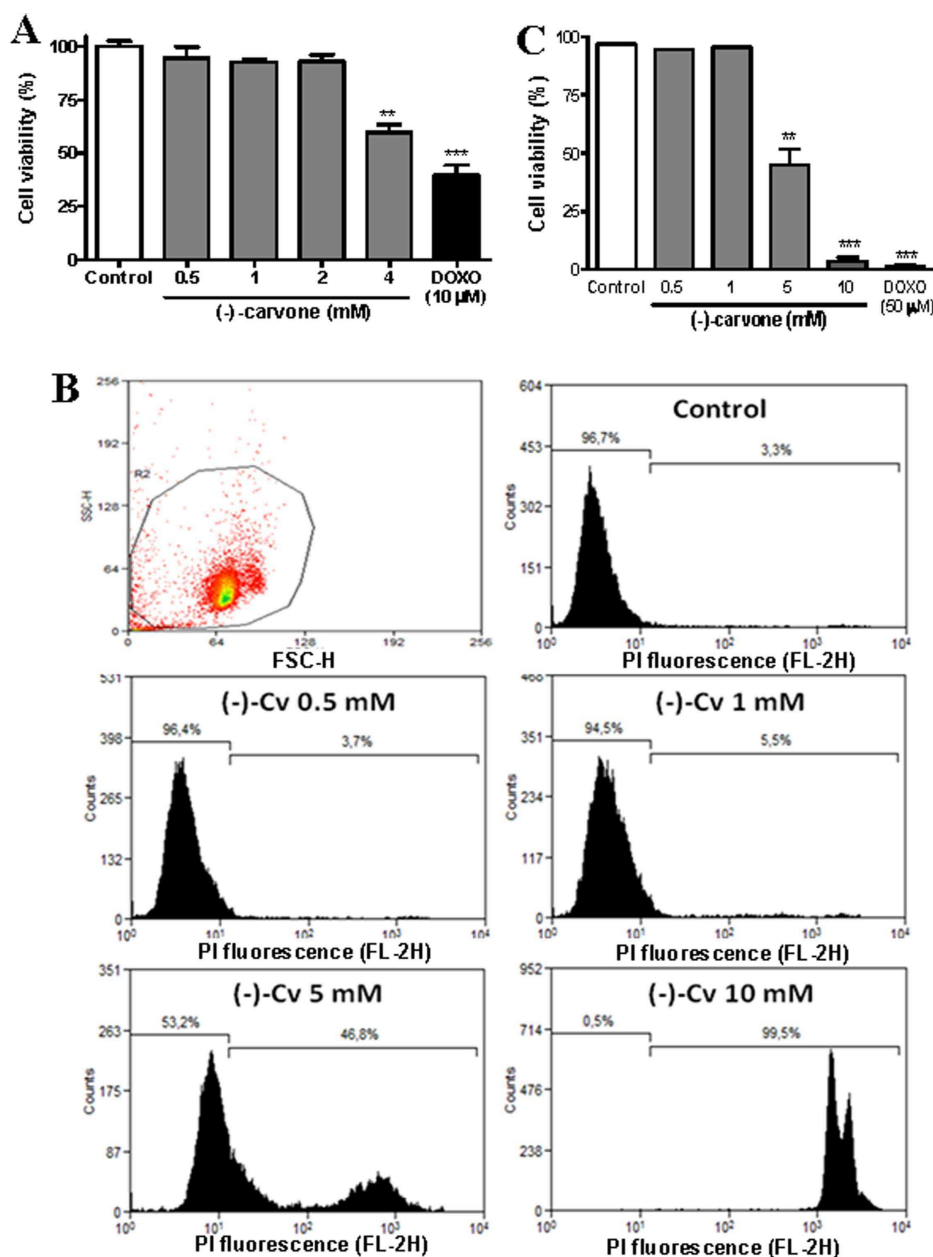
represent the maximum and minimum values, respectively;  $\text{EC}_{50}$  is the half-maximal effective concentration of the tested drug, and  $n$  is the Hill coefficient.

### RESULTS

To determine the non-toxic concentration range of (–)-Cv, we have performed cytotoxicity assays using the same cell types used subsequent calcium imaging. During these tests doxorubicin was used as positive control. Neutral red assays in DRG neurons indicated that (–)-Cv did not show any cytotoxic effect on these cells after 24 h of incubation when used at concentrations lower than 2 mM (Fig. 1). However, 4 mM of the monoterpene reduced cell viability by about  $40.0\% \pm 2.1\%$  ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1A). The vehicle (0.1% DMSO) did not reveal any cytotoxic effects under the same experimental conditions (Fig. 1A). Flow cytometry experiments of HEK293 cells stained with propidium iodide demonstrated that concentrations higher than 5 mM of (–)-Cv resulted in a reduction of cell viability ( $55.0 \pm 6.7\%$  compared to control experiments) with an  $\text{EC}_{50}$  of  $4.9 \pm 0.1$  mM (Figs. 1B and 1C).

Small-diameter DRG neurons (15–30  $\mu\text{m}$ ) responded with transient increases of cytosolic calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) upon stimulation with 1 mM (–)-Cv. In calcium imaging experiments, the relative fluorescence intensity increased from  $1.0 \pm 0.0$  (basal) to  $2.0 \pm 0.6$  arbitrary units a few seconds after drug application (Fig. 2A); however, no changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were observed when the vehicle alone was incubated under the same conditions (Fig. 2A). Ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ) was used to induce the maximum fluorescence in these cells and to verify the population of vital cells. To investigate whether the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients induced by (–)-Cv resulted from calcium release of intracellular stores, DRG neurons were bathed in calcium-free KRH. A caffeine (3 mM) and thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) solution was used to induce internal calcium release (17,18). While (–)-Cv (1 mM) in the absence of extracellular calcium was not able to cause any fluorescence change in these conditions,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients were observed following application of caffeine plus thapsigargin solution (Fig. 2B).

To assess the activation of TRPV1 channels as part of (–)-Cv-mediated effects, DRG neurons were pre-incubated with the TRPV1 blockers Ru-red (5  $\mu\text{M}$ ) and CPZ (10  $\mu\text{M}$ ) (7), separately, for 5 min before application of the vehicle and 1 mM (–)-Cv. Capsaicin (Cap; 10  $\mu\text{M}$ ) was used as TRPV1-activator (11) which increased, as expected, the relative fluorescence from  $1.0 \pm 0.0$  (basal) to  $2.4 \pm 0.2$  arbitrary units (F340/F380) ( $P < 0.05$ ). The Cap-induced effect was reduced to fluorescence levels of unstimulated cells ( $1.0 \pm 0.04$  ( $P < 0.05$ ) and  $1.1 \pm 0.02$  ( $P < 0.05$ )) by Ru-red and CPZ, respectively (data not shown). Interestingly, a similar effect was also observed with (–)-Cv, since the fluorescence increase induced by this monoterpene ( $2.0 \pm 0.9$  arbitrary units,  $P < 0.05$ ) was completely blocked ( $0.9 \pm 0.02$  and  $0.0 \pm 0.03$  arbitrary units) in the presence of 5  $\mu\text{M}$  Ru-red and 10  $\mu\text{M}$  CPZ, respectively (Fig. 2C). Quantification of measured fluorescence emission values showed that basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levels of  $120.6 \pm 5.0$  nM increased to  $310.7 \pm 23.1$  nM ( $P < 0.001$ ) after addition of 1



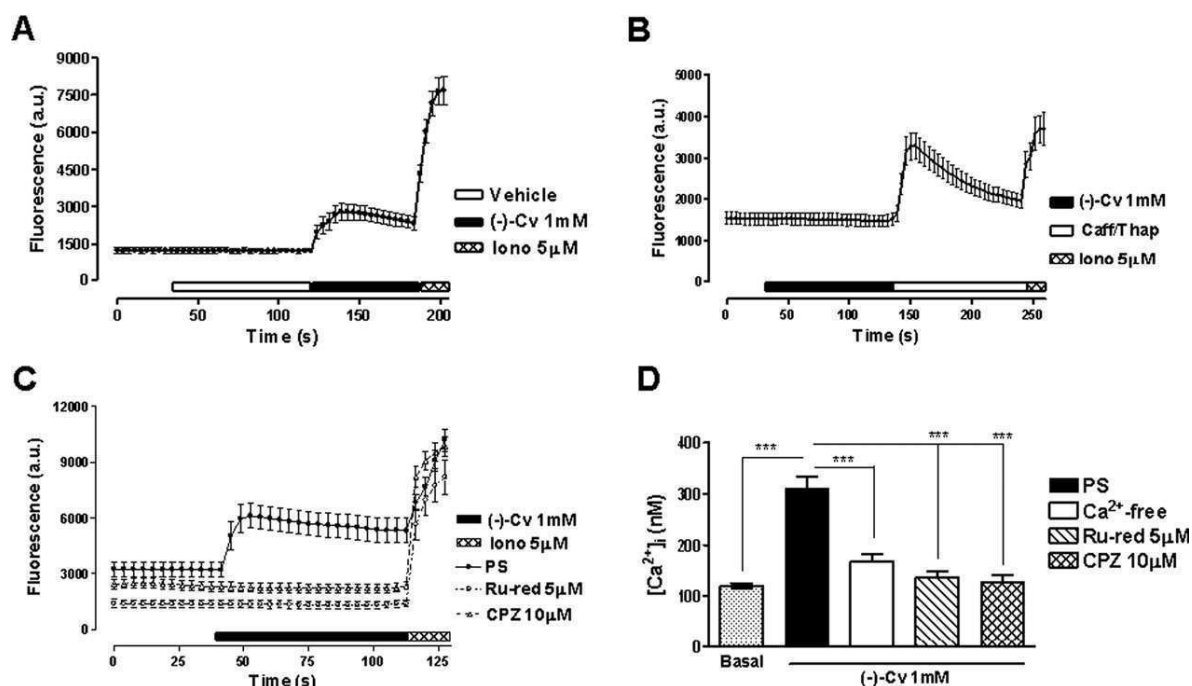
**Figure 1.** Determination of (-)-carvone cytotoxicity on DRG neurons and HEK293 cells. (A) Neutral red assay in DRG neurons ( $5 \times 10^5$  cells/ml), after 24 h of incubation with (-)-Cv (0.5–4 mM), doxorubicin (Doxo,  $10 \mu\text{M}$ ) or vehicle. Absorbance levels were normalized to the control group which had not been exposed to any drug. (B) Cytotoxicity of (-)-carvone, (-)-Cv, on HEK293 cells determined by flow cytometry using propidium iodide staining. HEK293 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were submitted to 6 h-treatment with (-)-Cv (0.5–10 mM), Doxo ( $50 \mu\text{M}$ ) or vehicle. (C) Bar plot showing statistical analysis of data shown in (B). Data are reported as mean values  $\pm$  S.E.  $n =$  three independent experiments with each of them carried out in duplicate, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , as determined by ANOVA followed by the Dunnett test. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)]

mM (-)-Cv. Such effect was diminished to  $168.9 \pm 13.0$  nM ( $P < 0.001$ ),  $136.1 \pm 12.2$  nM ( $P < 0.001$ ) and  $127.2 \pm 14.1$  nM ( $P < 0.001$ ), when the neurons had been pre-incubated with calcium-free KRH, Ru-red ( $5 \mu\text{M}$ ) or CPZ ( $10 \mu\text{M}$ ), respectively (Fig. 2D).

For further confirmation of interaction between (-)-Cv and the TRPV1 channels, calcium imaging was performed

with HEK293 cells expressing recombinant rat TRPV1 channels. As observed for DRG neurons, 1 mM (-)-Cv increased Fura-2 fluorescence in HEK cells co-transfected with rTRPV1 and mCherry (TRPV1+) but not in mock-transfected cells (TRPV1-) (Figs. 3A and 3B). As expected,  $5 \mu\text{M}$  Cap increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levels in these cells when applied after (-)-Cv (Fig. 3B). It is important to mention that neither (-)-Cv





**Figure 2.** (–)-Carvone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients in DRG neurons. Calcium responses were measured as increases in fluorescence emission (Ex488, Em515 nm) following exposure of DRG neurons to agonists/antagonists in KRH solution (A). Calcium-free KRH solution (B). TRPV1 blockers Ru-red (5  $\mu$ M) and 10  $\mu$ M CPZ (C). After treatment with vehicle (DMSO 0.1%). Cells were stimulated with 1 mM (–)-Cv followed by ionomycin (Iono, 5  $\mu$ M). (D) The plot shows the peak values of  $[Ca^{2+}]_i$  levels along the measured time kinetics (see methods). Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E. of three independent experiments in which the response of each 10 cells were measured in duplicate. PS means physiological solution. \*\*\* $P < 0.001$ , ANOVA followed by the Tukey test.

(1 mM) nor Cap (10  $\mu$ M) induced any changes in  $[Ca^{2+}]_i$  levels of untransfected HEK293 cells (MCh-) (Fig. 3B). We further quantified (–)-Cv-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients in TRPV1+ cells and observed that (–)-Cv increased the calcium levels in these cells in a concentration-dependent manner, exhibiting an  $EC_{50}$  of  $1.3 \pm 0.2$  mM ( $R^2 = 0.95$ ; Hill coefficient = 2.5) (Fig. 3B). At 1 mM (–)-Cv concentration we observed a  $[Ca^{2+}]_i$  increase from  $96.6 \pm 3.7$  nM (basal) to  $729.0 \pm 55.2$  nM ( $P < 0.05$ ) in cells bathed with physiological solution alone. Such effect was completely blocked ( $04.7 \pm 3.9$  nM) when cells had been preincubated for 5 min with 10  $\mu$ M CPZ (Fig. 3C). As expected,  $[Ca^{2+}]_i$  transients induced by 5  $\mu$ M Cap were also blocked by CPZ under the same experimental conditions (data not shown).

## DISCUSSION

Compounds derived from natural products are potential targets for the development of new analgesic drugs (1). Recent studies have demonstrated that the monoterpene (–)-Cv is a neuroactive molecule with promising therapeutic applications, since this substance exerts distinct effects on both central and peripheral nervous systems (3,4). Nevertheless, more data are still required for better understanding of possible therapeutic applications for (–)-Cv.

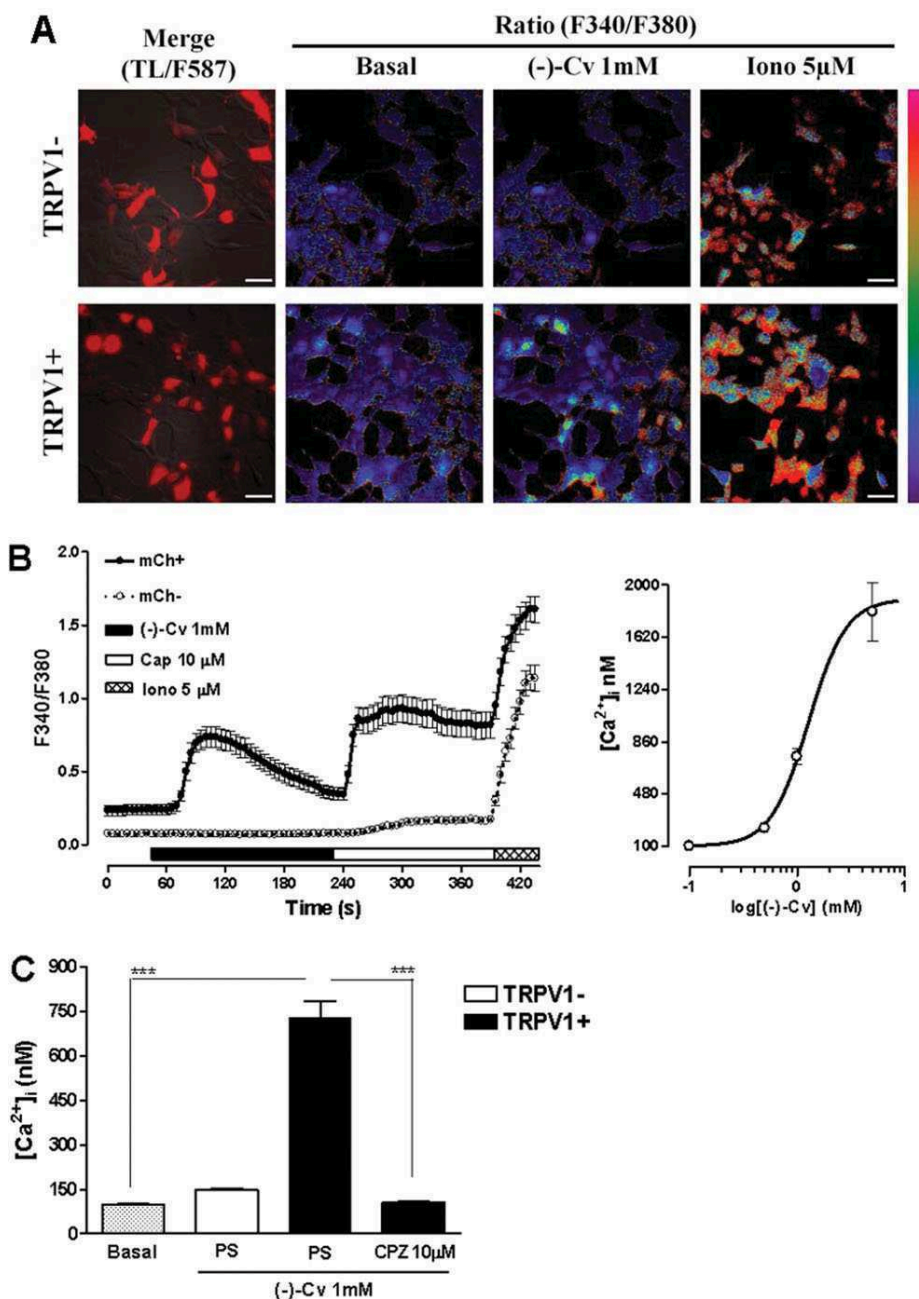
Cellular cytotoxicity tests belong to the most commonly used tools for efficient screening in drug discovery and

development. These assays usually evaluate the integrity of the cell membrane, lysosomes, or mitochondria, since interruptions of these structures are indicative of cell death and can provide information about the susceptibility of cellular organelles and compartments (19,20). The neutral red assay, for example, is a valuable cytotoxicity assay based on the cell ability to incorporate the neutral red, a supravital dye, within the lysosomes of viable cells (21,22). According to our data, (–)-Cv induced minor cytotoxic effects on DRG neurons with concentrations less than 4 mM, and the drug did not cause any membrane damage (Fig. 1A).

This was further confirmed by flow cytometry assays using the DNA-sensitive dye propidium iodide (23,24) in HEK293 cells pre-incubated with (–)-Cv (0.5–10 mM). The data showed that (–)-Cv exert low cytotoxicity on HEK293 cells, presenting an  $EC_{50}$  of about 5 mM for cell death (Fig. 1B). These results indicate that pharmacological activities of lower concentrations of (–)-Cv would not be related to changes in cell death.

It is well known that  $Ca^{2+}$  is an essential ion involved directly or indirectly in several intracellular events; thus monitoring its concentrations experimentally can be an appropriate choice for initial evaluation of the pharmacological activity of many bioactive molecules (25,26). (–)-Cv promoted a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_i$  of DRG neurons (Fig. 2A). The rapid increase of  $[Ca^{2+}]_i$  levels in eukaryotic cells may result from





**Figure 3.** Induction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients by (-)-carvone in HEK293 cells expressing rat recombinant TRPV1 channels. **(A)** Calcium imaging experiments with Fura-2 (340/380 nm) in transfected cells (TRPV1+) or mock cells (TRPV1-). Images in the left panel represent the merging between transmitted light (TL) and mCherry fluorescence (mCh) at 587 nm for identification of transfected cells (red). The other images represent the ratio of fluorescence emission following excitation (340/380 nm) during calcium imaging experiment without any drug (basal) (upper panels), followed by incubation with 1 mM (-)-Cv and 5  $\mu$ M ionomycin (Iono) (lower panels). **(B)** Left panel: Representative traces reflecting ratios of fluorescence emission at F340/F380 excitation after incubation with 1 mM (-)-Cv, 5  $\mu$ M capsaicin (Cap) and 5  $\mu$ M ionomycin (Iono) in TRPV1+ and TRPV1- cells. Right panel: Concentration-dependent induction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels of TRPV1+ cells (for equation see Method Section). **(C)** Effects of 1 mM (-)-Cv on TRPV1+ cells pre-incubated with capsazepine (CPZ, 10  $\mu$ M) or physiological solution (PS) alone. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E. of 15 individually analyzed cells ( $n = 3$ ). \*\*\* $P < 0.001$ , ANOVA followed by the Tukey test.

ion-channel activation for example, or can be originated internally from intracellular stores (27,28). To evaluate which of these pathways were activated by (-)-Cv in DRG neurons,

the cells were pre-incubated in calcium-free bath solution prior to application of the monoterpene. Changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels were no longer induced by 1 mM (-)-Cv under these

conditions, but persisted when caffeine and thapsigargin solution was added to the cell culture, indicating that (-)-Cv effects in DRG neurons depended on the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2B).

DRG neurons express a wide variety of calcium-permeable ion channels. Some of these channels are part of the transient receptor potential (TRP) family, which has been widely studied in the recent years and provide confirmed targets for several natural compounds like monoterpenes (8–10). In particular, the TRP vanilloid type 1 (TRPV1) is certainly the most investigated channel in this regard, and several studies have demonstrated its importance in nociception mediated by DRG neurons. TRPV1 modulators are being investigated as potential analgesic candidates for a variety of pain complications (5). To investigate whether (-)-Cv acts on TRP channels and specifically on TRPV1, DRG neurons were preincubated with TRP and TRPV1 antagonists such as Ru-red or CPZ. In these experiments, we demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  influx in these cells induced by 1 mM (-)-Cv was completely blocked by Ru-red or CPZ (Figs. 2C and 2D) suggesting for the first time TRPV1 channel-activation by (-)-Cv. Regarding the concentration range in which the monoterpenes have shown their effects, our work is consistent with the literature, since previous studies point at mM activity ranges of monoterpenes with similar structure to (-)-carvone. For instance, camphor activated TRPV1 at 10 mM concentration. Other monoterpenes with similar structure to carvone, have also demonstrated effects on TRPV3 only in the mM range (29,30) and TRPA1 (31).

For further confirmation of the effects of (-)-Cv on TRPV1 channels, we heterologously expressed this channel in HEK293 cells (see methods). In these experiments, capsaicin was used as positive control to confirm the functionality of hTRPV1 channels in HEK293 cells. (-)-Cv increased cytosolic calcium levels only in cells transfected with hTRPV1 (TRPV1+), while mock transfected cells (TRPV1-) or non-transfected cells (mCh-) remained inertly during the same conditions (Figs. 3A and 3B). Additionally, we demonstrated that (-)-Cv acts in a concentration-dependent manner exhibiting an  $\text{EC}_{50}$  of  $1.3 \pm 0.2$  mM (Hill = 2.5) for the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 3B). Subsequently, by using the TRPV1-specific antagonist CPZ, we confirmed that (-)-Cv is a TRPV1-channel activator (Fig. 3C) supporting the conclusions of our experiments with DRG neurons. Recent studies suggested that activation of TRPV1 channels, followed by their rapid desensitization, is a plausible explanation for the analgesic effects of other monoterpenes such as camphor for example (26). The same hypothesis has been used to explain the paradoxical analgesic effect of capsaicin (32). From these findings, we suggest that the antinociceptive effect of (-)-Cv is related to the desensitization of TRPV1 channels. However, additional experiments are needed to confirm this hypothesis.

In conclusion, this study demonstrates for the first time, that (-)-Cv, an antinociceptive monoterpene present in distinct aromatic plants, exhibited low cytotoxicity in both neural and epithelial cells. We have also shown the ability

of (-)-Cv to induce increases of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in DRG neurons through TRPV1 activation, which was further confirmed in recombinant TRPV1-expressing HEK293 cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful for Dr. David Julius for kindly providing us the rTRPV1 construct. J.C.R.G.'s work at the University of Western Ontario was partially supported by internal funds to M.A.M.P. and to V.F.P. H.D.N.S.'s master thesis and A.N.N.'s Ph.D. thesis research were funded by CNPq and FAPESP, respectively. H.U. and D.A.M.A. are CNPq fellows and J.C.R.G. is CAPES fellow.

#### LITERATURE CITED

1. Araújo DAM, Freitas C, Cruz JS. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. *Life Sci* 2011; 89: 540–544.
2. Younis YMH, Beshir SM. Carvone-rich essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperi* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. *J Essent Oil Res* 2004; 16: 539–541.
3. De Sousa DP, Júnior EVM, Oliveira FS, Almeida RN, Nunes XP, Barbosa-Filho JM. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: Structure-activity relationship. *Zeitschr Naturforsch* 2007; 62: 39–42.
4. Gonçalves JCR, Oliveira FS, Benedito RB, Sousa DP, Almeida RN, Araújo DAM. Antinociceptive activity of (-)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Bio Pharm Bull* 2008; 311: 1017–1020.
5. McDougall JJ. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 459–467.
6. Fernandes E, Fernandes M, Keeble J. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 510–521.
7. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Rev Drug Discov* 2007; 6: 357–372.
8. Calixto JB, Kassuya CAL, Andre E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Therapeut* 2005; 106: 179–208.
9. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus J, Murray N, Spencer HSR. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 2005; 307: 1468–1472.
10. Vogt-Eisele AK, Kweber S, herkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* 2007; 51:530–540.
11. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389:816–824.
12. Borefreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (Htd/NR 90). *J Tissue Cult Meth* 1984; 9:7–9.
13. Wigler M, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng Y, Axel R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 1977; 11:223–232.
14. Jordan M, Wurm FM. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 2004; 33: 136–143.
15. Montiel-Eulefi E, Nery AA, Rodrigues LC, Sánchez R, Romero F, Ulrich H. Neural differentiation of rat aorta pericyte cells. *Cytometry A* 2012; 81A: 65–71.
16. Negraes PD, Lameu C, Hayashi MA, Melo RL, Camargo AC, Ulrich H. The snake venom peptide B $\beta$ -PRO-7a is a M1 muscarinic acetylcholine receptor agonist. *Cytometry A* 2011; 79A: 77–83.
17. Cheng LZ, Lü N, Zhang YQ, Zhao ZQ. Ryanodine receptors contribute to the induction of nociceptive input-evoked long-term potentiation in the rat spinal cord slice. *Mol Pain* 2010; 20: 6–1.
18. Rankovic V, Ehling P, Coulon P, Landgraf P, Kreutz MR, Munsch T, Budde T. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release-dependent inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in thalamocortical relay neurons. *Eur J Neurosci* 2010; 31: 439–449.
19. Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett* 2009; 184: 13–17.
20. Melo PS, De Azevedo MBM, Zullo MAT, Fabrin-Neto JB, Haun M. Cytotoxicity of the phytoesterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. *Human Exp Toxicol* 2004; 23: 487–493.
21. Schröterová L, Králová V, Voráčová A, Hašková P, Rudolf E, Cervinka M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 1406–1411.
22. Vieira MD, de Oliveira V, Lima EM, Kato MJ, Valadares MC. In vitro basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63:505–510.
23. Darzynkiewicz Z, Huang X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2004; 5:5. 7.
24. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975; 66: 188–193.

25. Anand U, Otto WR, Anand P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain* 2010; 6: 82.
26. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 2005; 25: 8924–8937.
27. Haworth RA, Goknur AB, Biggs AV, Redon D, Potter KT. Ca uptake by heart cells. I. Ca uptake by the sarcoplasmic reticulum of intact heart cells in suspension. *Cell Calcium* 1998; 23: 181–198.
28. Sasaki N, Dayanithi G, Shibuya I. Ca<sup>2+</sup> clearance mechanisms in neurohypophysial terminals of the rat. *Cell Calcium* 2005; 37: 45–56.
29. Sherkheli MA, Benecke H, Doerner JF, Kletke O, Vogt-Eisele AK, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoids induce agonist-specific desensitization of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channels. *J Pharm Sci* 2009; 12: 116–128.
30. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 530–540.
31. Zhong J, Minassi A, Prenen J, Tagliatela-Scafati O, Appendino G, Nilius B. Umbellulone modulates TRP channels. *Pflugers Arch* 2011; 462: 861–870.
32. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology. *Neuropeptides* 2004; 38: 377–384.

# Kinin-B2 Receptor Activity Determines the Differentiation Fate of Neural Stem Cells\*

Received for publication, August 2, 2012, and in revised form, November 5, 2012. Published, JBC Papers in Press, November 6, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.407197

Cleber A. Trujillo<sup>†1</sup>, Priscilla D. Negraes<sup>†1</sup>, Telma T. Schwindt<sup>†1</sup>, Claudiana Lameu<sup>‡</sup>, Cassiano Carromeu<sup>§2</sup>, Alysso R. Muotri<sup>§3</sup>, João B. Pesquero<sup>¶</sup>, Débora M. Cerqueira<sup>||</sup>, Micheli M. Pillat<sup>†4</sup>, Hélio D. N. de Souza<sup>†5</sup>, Lauro T. Turaça<sup>¶</sup>, José G. Abreu<sup>||</sup>, and Henning Ulrich<sup>†6</sup>

From the <sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 05508-000, the <sup>§</sup>Departments of Pediatrics and Cellular and Molecular Medicine, University of California at San Diego, San Diego, California 92093, the <sup>¶</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil 04023-062, and the <sup>||</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil 21941-902

**Background:** Recent studies point at functions of bradykinin in the CNS including neuromodulation and neuroprotection.

**Results:** Bradykinin augments neurogenesis of neural stem cells from embryonic telencephalon, whereas bradykinin receptor inhibition promotes gliogenesis.

**Conclusion:** Bradykinin acts as switch for phenotype determination using an *in vitro* system of migrating cells, closely reflecting conditions of cortex development.

**Significance:** Novel functions are described for bradykinin with therapeutic relevance.

Bradykinin is not only important for inflammation and blood pressure regulation, but also involved in neuromodulation and neuroprotection. Here we describe novel functions for bradykinin and the kinin-B2 receptor (B2BkR) in differentiation of neural stem cells. In the presence of the B2BkR antagonist HOE-140 during rat neurosphere differentiation, neuron-specific  $\beta 3$ -tubulin and *enolase* expression was reduced together with an increase in glial protein expression, indicating that bradykinin-induced receptor activity contributes to neurogenesis. In agreement, HOE-140 affected in the same way expression levels of neural markers during neural differentiation of murine P19 and human iPS cells. Kinin-B1 receptor agonists and antagonists did not affect expression levels of neural markers, suggesting that bradykinin-mediated effects are exclusively mediated via B2BkR. Neurogenesis was augmented by bradykinin in the middle and late stages of the differentiation process. Chronic treatment with HOE-140 diminished *eNOS* and *nNOS* as well as *M1–M4 muscarinic receptor* expression and also affected purinergic receptor expression and activity. Neurogenesis, gliogenesis, and neural migration were altered during differentiation of

neurospheres isolated from *B2BkR* knock-out mice. Whole mount *in situ* hybridization revealed the presence of *B2BkR* mRNA throughout the nervous system in mouse embryos, and less  $\beta 3$ -tubulin and more glial proteins were expressed in developing and adult *B2BkR* knock-out mice brains. As a underlying transcriptional mechanism for neural fate determination, HOE-140 induced up-regulation of *Notch1* and *Stat3* gene expression. Because pharmacological treatments did not affect cell viability and proliferation, we conclude that bradykinin-induced signaling provides a switch for neural fate determination and specification of neurotransmitter receptor expression.

The central nervous system is originated from a monolayer of neuroepithelial cells from which single neural progenitors arise, proliferate, and differentiate into a complex neural network (1–3). One of the most important steps during brain development is the generation of cellular diversity, *i.e.* the decision to form neurons or glial cells. This dynamic process is tightly regulated by spatial and temporal patterns (4, 5). The mechanisms underlying progenitor proliferation and differentiation during development are related to both extrinsic and intrinsic factors (6). Extrinsic factors, including neurotransmitters, cytokines, hormones and growth factors, have been shown to influence the acquisition of neuronal or glial phenotypes (7, 8). These diffusible factors activate membrane-bound receptors, which act as morphogens and regulate the progress of neural differentiation (9).

One factor that may play a role in neural differentiation that has not been previously studied in this context is bradykinin (Bk).<sup>7</sup> Kinins are biologically active peptides released into the

\* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Director's New Innovator Award Program Grant 1-DP2-OD006495-01 (to A. R. M.), research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (number 2006/61285-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Provost's Office for Research of the University of São Paulo Programa de Incentivo à Pesquisa, Project numbers 2011.1.9333.1.3 and NAPNA-USP, Brazil (to H. U.).

<sup>1</sup> Supported by fellowships from FAPESP.

<sup>2</sup> Supported by a fellowship from the International Rett Syndrome Foundation, 2517.

<sup>3</sup> Supported by the Emerald Foundation and the California Institute for Regenerative Medicine Grant TR2-01814.

<sup>4</sup> Supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

<sup>5</sup> Supported by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

<sup>6</sup> To whom correspondence should be addressed: Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: 55-11-3091-8512; Fax: 55-11-3815-5579; E-mail: henning@iq.usp.br.

<sup>7</sup> The abbreviations used are: Bk, bradykinin; NPC, neural progenitor cell; iPS, induced pluripotent stem; ACE, angiotensin-converting enzyme; ASS, argininosuccinate synthetase; eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; nNOS, neuronal nitric-oxide synthase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NO, nitric oxide; CNS, central nervous system.



plasma or interstitial fluid after proteolytic cleavage of kininogens by kallikreins. The kallikrein-kinin system is best known for its involvement in cardiovascular homeostasis, coagulation, inflammation, pain, and development (10–12). Moreover, there are also effects on neuronal physiology of Bk and related kinins (13, 14). B1 (B1BkR) and B2 (B2BkR) G protein-coupled receptors are present in the CNS and participate in many signaling cascades and physiological consequences including NO formation and glutamate release (15–18).

Previously, we have shown that Bk secretion and *B2BkR* expression are regulated during *in vitro* neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. Receptor expression and activity as well as generation of Bk rose with ongoing neuronal differentiation. Carbachol-induced intracellular calcium transients and gene expression of muscarinic receptors were suppressed following chronic treatment of differentiating cells with HOE-140, a specific B2BkR-antagonist (19). Thus, B2BkR activity was essential for differentiation of P19 cells into neurons with a cholinergic phenotype.

Here we report novel functions for Bk in phenotype determination whether a neural progenitor cell (NPC) differentiates into a neuron or a glial cell. Three *in vitro* differentiation models, P19 mouse embryonal carcinoma cells, rat NPCs, and human induced pluripotent stem cells were used to demonstrate the importance of B2BkR in neural fate and neurotransmitter receptor expression determination. As an underlying mechanism, we found that migration of NPCs was largely restricted when B2BkR activity was inhibited. These results were confirmed in migration assays with neurospheres obtained from *B2BkR* knock-out mice, which also revealed reduced migration. We also observed a strong expression of *B2BkR* in the developing mouse brain, and reduced  $\beta$ 3-tubulin expression in *B2BkR* knock-out embryos. Together, these results indicate a novel function of Bk in the determination of cell fate in the process of neural differentiation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals**—This work was approved by the Ethics on Animal Care and Use Committee of the Instituto de Química of the Universidade de São Paulo. Wistar Hannover rats, wild type and *B2BkR*<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice (provided by Instituto de Química and Center for Development of Experimental Models for Medicine and Biology, UNIFESP, respectively), were used for neural progenitor isolation and neurosphere formation. Animals were housed under optimal light, temperature, and humidity conditions, with food and water provided *ad libitum*. Timed-pregnant animals were obtained by overnight mating. The efficiency of mating was confirmed by the presence of sperm after vaginal smear or appearance of the vaginal plug. Comparison of the *B2BkR*<sup>-/-</sup> mice was made with their wild-type littermates. Following 14 (rats) and 12.5 days (mice) of gestation, females were sacrificed in a chamber with a saturated CO<sub>2</sub> atmosphere. Genotyping of the *B2BkR*<sup>-/-</sup> mice was performed using polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA extracted from tails. Detailed genotyping procedure and primers for PCR have been previously described (20).

**Cortical Primary Culture**—Newborn rats were decapitated and their brains removed aseptically in ice-cold phosphate-

buffered saline (PBS). Briefly, after removal of meninges, the cerebral cortex was dissected and dissociated by incubation with 0.05% trypsin solution at 37 °C for 5 min followed by light trituration. After cell counting, cells were plated in DMEM/F-12 (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum (FBS) at a density of  $3 \times 10^5$  cells/ml in poly-L-lysine (1 mg/ml) pre-treated dishes. The medium was replaced every other day for 7 days, and the cells remained in the incubator at 37 °C with controlled humidity and 5% CO<sub>2</sub>.

**Neurosphere Culture and Differentiation**—NPCs were isolated from telencephalon of E14 rats or E12.5 mice embryos, using techniques previously described (21). After brain dissection, telencephalon was subjected to mechanical and enzymatic dissociation. Cells were grown in suspension at a density of  $2 \times 10^5$  cells/ml in DMEM/F-12 in the presence of 100 IU/ml of penicillin, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, 2 mM L-glutamine, 5  $\mu$ g/ml of heparin, 20 ng/ml of FGF-2, 20 ng/ml of EGF, and 2% B-27 (Life Technologies) at 37 °C in 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. Cultures were grown for 10 days with one passage prior to neural differentiation. For differentiation studies, primary whole neurospheres were allowed to attach to poly-L-lysine and laminin-coated coverslips or culture flasks with DMEM/F-12, 2% B-27 in the absence of FGF-2 and EGF. Progenitor cells were differentiated for 7 days and treated with 1  $\mu$ M HOE-140 (Tocris Bioscience) or 1  $\mu$ M Bk (Tocris Bioscience). The migration assay was evaluated on the seventh day of differentiation as the distance of the foremost cells to the neurosphere boundary. Neurospheres of similar diameter were used in this assay.

**P19 Embryonal Carcinoma Cell Culture and Neural Differentiation**—P19 mouse embryonic carcinoma cells were grown and differentiated as described previously (19, 21). In brief, for the induction of neural differentiation, 1  $\mu$ M all-trans-retinoic acid was added to  $5 \times 10^5$  cells/ml, kept in suspension to form embryoid bodies (DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 2.4  $\mu$ g/ml of sodium bicarbonate, 5  $\mu$ g/ml of insulin, 30  $\mu$ g/ml of human apo-transferrin, 100 mM ethanolamine, 30 nM sodium selenite, 100 IU/ml of penicillin, 100 mg/ml of streptomycin, and 10 mM HEPES, pH 7.4). After 2 days of treatment, embryoid bodies were transferred to culture flasks, and the medium was replaced with DMEM supplemented with 10% FBS to allow cell adhesion. After another 2 days, the medium was replaced by defined medium and maintained until the end of differentiation (day 8).

**Human iPS Cell Formation and Neural Differentiation**—The human-induced pluripotent stem (iPS) cell lineage was obtained and characterized as described previously (22). Human fibroblasts were generated from dermal biopsies of healthy individuals following informed consent under protocols approved by the University of California, San Diego. Briefly, fibroblasts were infected with retrovirus containing *OCT4*, *c-MYC*, *KLF4*, and *SOX2* human cDNAs (23). After 2 days, fibroblasts were plated on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (Millipore) with human embryonic stem cell medium. Following formation of iPS cell colonies, they were directly transferred into Matrigel-coated dishes (BD) containing mTeSR1 (StemCell Technologies). After embryoid body formation in low-adherence dishes in the absence of FGF-2, cell aggregates were allowed to attach to polyornithine-

## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation

and laminin-coated dishes in DMEM/F-12 (Life Technologies) supplemented with 1% N2 (Life Technologies). Following rosette visualization, they were dissociated with accutase (Millipore) and plated into coated dishes with NPC medium (DMEM/F-12 supplemented with 0.5% N2; 1% B-27 and FGF-2) to achieve a homogeneous population of NPC. Neural differentiation was induced with 1  $\mu$ M retinoic acid in NPC medium in the absence of FGF-2 for 3 weeks. Mature embryoid bodies were dissociated and plated in polyornithine- and laminin-coated dishes in NPC media without FGF-2.

**Immunocytochemistry**—Immunofluorescence procedures have been described in detail elsewhere (24, 25). Plated neurospheres were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min and then blocked/permeabilized in 3% FBS, 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min. After 2 h of incubation with primary antibodies against  $\beta$ 3-tubulin (Sigma), MAP-2 (Cell Signaling), S100 $\beta$  (Calbiochem), nestin (Millipore), GFAP (DAKO) at 1:500 dilutions, and against B2Bkr (1:1000, BD) in PBS with 3% FBS, 0.1% Triton X-100, NPCs were washed, and anti-mouse Alexa 555-conjugated and anti-rabbit Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) at 1:500 dilutions were added. After washing with PBS, DAPI solution (Sigma; 0.3  $\mu$ g/ml) was used as a nuclear stain. Coverslips were mounted, and slides were analyzed under a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss).

**BrdU Incorporation Assay**—Cell proliferation was measured following incubation with 0.2  $\mu$ M 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma) for 14 h. Antigen retrieval was performed following fixation of cells with 4% PFA. Cells were incubated for 30 min in 1.5 M HCl, washed in PBS, and incubated for 2 h with rat anti-BrdU (1:500, Abcam). Alexa 488-conjugated secondary antibodies were used at 1:500 dilutions. After washing with PBS, DAPI solution (0.3  $\mu$ g/ml) was used as a nuclear stain. Slides were mounted and analyzed by fluorescence microscopy. In this assay, only migrated cells were considered for analysis. The percentages of BrdU-positive cells were calculated as the ratio of immunolabeled cells over the total number of DAPI-stained cells.

**Western Blot Analysis**—*In vitro* neural-differentiated cells obtained from different sources or cells from cortical primary cultures were washed once with PBS then incubated in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% Nonidet P-40 supplemented with protease inhibitors mixture (Amresco)). Cells were harvested and homogenized on ice. The lysates were then centrifuged for 10 min at 14,000  $\times$  *g*. The concentration of soluble protein in the supernatant was determined by using the Bradford reagent. For Western blot analysis, 10  $\mu$ g of soluble protein extracts were separated in a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted using antibodies against  $\beta$ 3-tubulin (1:1000, Sigma), GFAP (1:1000, DAKO), tyrosine hydroxylase (1:1000, Millipore), 5-hydroxytryptamine (1:1000, Abcam), GAD65 (glutamic acid decarboxylase, 1:1000, Millipore), and  $\beta$ -actin (1:2000, Sigma). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were added (1:2000, Jackson ImmunoResearch), and antibody binding was detected by using the enhanced chemiluminescence Luminol reagent (Santa Cruz). Autoradiography films were

exposed to the membranes and developed using a Kodak film processor. Band intensities were determined by densitometry and reported as ratios of neuronal and glial markers over  $\beta$ -actin contents. Densitometry analysis was performed using ImageJ software (NIH). Background values were subtracted from all densitometric determinations.

**Flow Cytometry Analysis**—Flow cytometry procedures were in agreement with previously published protocols (24, 26). Neurospheres and cortical primary cultures were centrifuged for 5 min at 200  $\times$  *g* and dissociated to a single cell suspension. Cells were fixed for 20 min in ice-cold 1% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS, and incubated for 2 h with primary antibodies specific for neural markers ( $\beta$ 3-tubulin, GFAP, nestin, and neuronal specific enolase (NSE, BioMeda, Foster City, CA)) at 1:500 dilutions. Following a washing step with PBS, cells were incubated with 1:500 Alexa 488- or 555-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and then analyzed on a flow cytometer (Fc500, Beckman Coulter, Fullerton, CA). An argon laser line was used for fluorescence excitation (FL1 525 nm and FL2 575 nm, band pass filter). Fifty-thousand events were acquired per sample with fluorescence measured in logarithmic scales. Background fluorescence was measured using unlabeled cells and cells labeled with secondary antibody alone and used to set gating parameters between positive and negative cell populations. Forward and side light-scatter gates were used to exclude cell aggregates and small debris.

Data were analyzed using the Cyflogic software and plotted in a histogram format. All histograms were smoothed by the software. Fluorescence gates were set below 2% of blank histogram and events corresponding to a fluorescence signal exceeding this percentage were considered as positive events. The results are reported as mean  $\pm$  S.D. of positively stained cells.

**TUNEL Assay**—The effect of HOE-140 treatment on NPC viability was determined using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science), according to the protocol provided by the manufacturer. For the negative control, instead of being incubated with the TUNEL reaction mixture, cells were kept in the absence of terminal transferase. For the positive control, cells were incubated with DNase I (3 units/ml, Ambion) for 10 min at room temperature. Thirty-thousand events were acquired in a flow cytometer (Beckman Coulter, Fc500) and analyzed with the Cyflogic software.

**Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction**—Total neurosphere RNA was extracted using the TRIzol reagent (Life Technologies). Following DNase I treatment, 3  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed into cDNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Quantitative SYBR Green real-time PCR was performed with the Step One Plus Instrument (Life Technologies). Each 25  $\mu$ l of SYBR Green reaction consisted of 25 ng of cDNA, 12.5  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR Green Universal PCR Master Mix (Life Technologies), and 200 nM of each forward and reverse primers. Unless otherwise stated, primer sequences were designed using Primer Express Software and can be found in Table 1. Real-time PCR were performed using the temperature protocol 50  $^{\circ}$ C for 2 min, 95  $^{\circ}$ C for 10 min, and 50 cycles of 95  $^{\circ}$ C for 15 s and 60  $^{\circ}$ C for 1 min, followed by a dissociation curve protocol for evalua-

TABLE 1

Primer sequences and amplicon sizes (base pairs, bp) of cDNAs coding for neurotransmitter receptors, nitric oxide-related enzymes, neural markers, transcription factors, and GAPDH used for real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	bp	Ref.
P2X1	GAGAGTCGGGCCAGGACTTC	GCGAATCCCAAACACCTTGA	233	66
P2X2	TCCCTCCCCACCTAGTCAC	CACCACCTGCTCAGTCAGAGC	149	66
P2X3	CTGCCTAACCTCACCGACAAAG	AATACCCAGAACGCCACCC	150	66
P2X4	CCCTTTGCCCTGCCAGATAT	CCGTACGCCTTGGTGAGTGT	145	66
P2X5	GGATGCCAATGTTGAGGTTGA	TCCTGACGAACCCTCTCCAGT	81	66
P2X6	CCCAGAGCATCCTTCTGTTC	GGCACCAGCTCCAGATCTCA	152	66
P2X7	GCACGAATTATGGCACCGTC	CCCCACCCTCTGTGACATTCT	171	66
P2Y1	AACCGTGATGTGACCACTGA	TTCAACTTGTCCGTTCCACA	216	67
P2Y2	TGCTGGGTCTGCTTTTGTGCT	ATCGGAAGGAGTAATAGA	209	67
P2Y4	TCGATTTGCAAGCCTTCTCT	CCATAGGAGACCAGGGTGAT	215	67
P2Y6	TGCTGCTACCCCCAGTTTAC	TGGCATAGAAGAGGAAGCGT	246	67
P2Y12	CTGTTTTTTGCTGGGCTCATC	GCGGATCTGGAAGAAAATCCT	60	
P2Y13	GGATGCAGGGCTTCAACAA	GCAGCTGTGTCATCCGAGTGT	60	
P2Y14	GGTGGGTTTCGCCTCATGT	CCTCAGGTGACCGGCATCT	56	
M1 mAChR	CTGTACCGTTCATGTACTACTGT	CCGGGCTCGGTTTTCTGT	62	
M2 mAChR	CAAAAATGGCAGGCATGATG	GGCCAGAGGATGAAGGAAA	59	
M3 mAChR	CGACGTGGTGTGATGATTGG	ATGGCAGGAGCCCATAGGA	62	
M4 mAChR	CACCAAACCCCTCACCTATCC	CGATCATGAGACCCTGCCATCT	59	
M5 mAChR	CCATAATCCTGTCCGAATGGA	ATCCCGTGGCATTAGTTAGCA	64	
eNOS	GACTTTTTAAGGAAGTACCAATGCA	CCATACAGGATAAGTCGCCTTAC	93	
nNOS	CCAATGTTTCAAAAAACGAGTCT	TCGGCTGGACTTAGGGCTTT	77	
Argininosuccinate synthetase	TGCACTCTATGAGGACCGCTATC	AGGCTTGGCGAGAGAGGTGCCTAG	49	
B1BkR	CCAGGGTTCGTCATCACTATCTG	GCAAAAGGAAGAAGGACAAGACTAA	73	68
B2BkR	CCCTTCTCTGGGTCCTCTT	CAGAACACGCTGAGGACAAAAGA	65	68
$\beta$ 3-Tubulin	GAGACCTACTGCATCGACAATGAAG	GCTCATGGTAGCAGACACAAGG	111	25
GFAP	AAGAGTGGTATCGGTCCAAGTTTG	CAGTTGGCGGCGATAGTCAT	107	25
S100 $\beta$	TGGTTGCCCTCATTGATGTCT	CCCATCCCCATCTTCCGTCC	179	
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTT	117	66
Ngn1	CAGTAGTCCCTCGGCTTACAG	AAGCAGGGTGTCTGATGGAG	102	69
Notch1	CACACGCCTCTCCACCTGCCTGTAGC	TGCTGTGTGCTTAGTGTGCCCGGAGTC	209	70
Stat3	TATCTTGGCCCTTGGAAATG	GTGGGGATACCAGGATGTTG	284	71
NeuroD1	CTTCCCGGTGCATCCCTACTCCTACC	AGGAAGGGCTGGTGAATCAGTTAGG	167	70

tion of the specificity of the amplicon produced in each reaction. A distinct peak indicated that a single DNA sequence was amplified during PCR.

Standard curves were measured for each primer set and cDNA sample to verify the efficiency of the reaction. As the efficiency of all reactions was >95%, the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  parameter was used for relative quantification of gene expression. The data shown were obtained from three independent samples and RT-PCR real-time reactions were prepared in triplicates for each analyzed gene. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* gene expression was determined as endogenous control.

**Calcium Imaging by Confocal Microscopy**—Intracellular calcium transients were measured by fluorescence imaging of differentiated cells using the calcium indicator dye fluo-3 AM as described elsewhere (19). Differentiated neurospheres were loaded with 5  $\mu$ M fluo-3 AM in 0.5% DMSO and 0.1% of F-127 pluronic acid for 1 h at 37 °C. After three washes with culture medium, cells were placed in a warm chamber and fluorescence emissions were captured by a LSM 510-Meta confocal microscope (Zeiss). Following chronic treatment with HOE-140, the inhibitor was removed from the cell culture 1 h prior to calcium measurements by medium change and washing the cell layers five times. Fluo-3 AM was excited using the 488 nm line of argon ion laser, and the emitted light was detected at 515–530 nm using a band-pass filter. Time kinetics of free intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) variations were constructed from over 300 images collected in 1-s intervals. The fluorescence intensities ( $F$ ) were calibrated in a solution containing 5 mM ionophore ( $F_{max}$ ) and 10 mM EGTA ( $F_{min}$ ) to provide an estimation of the

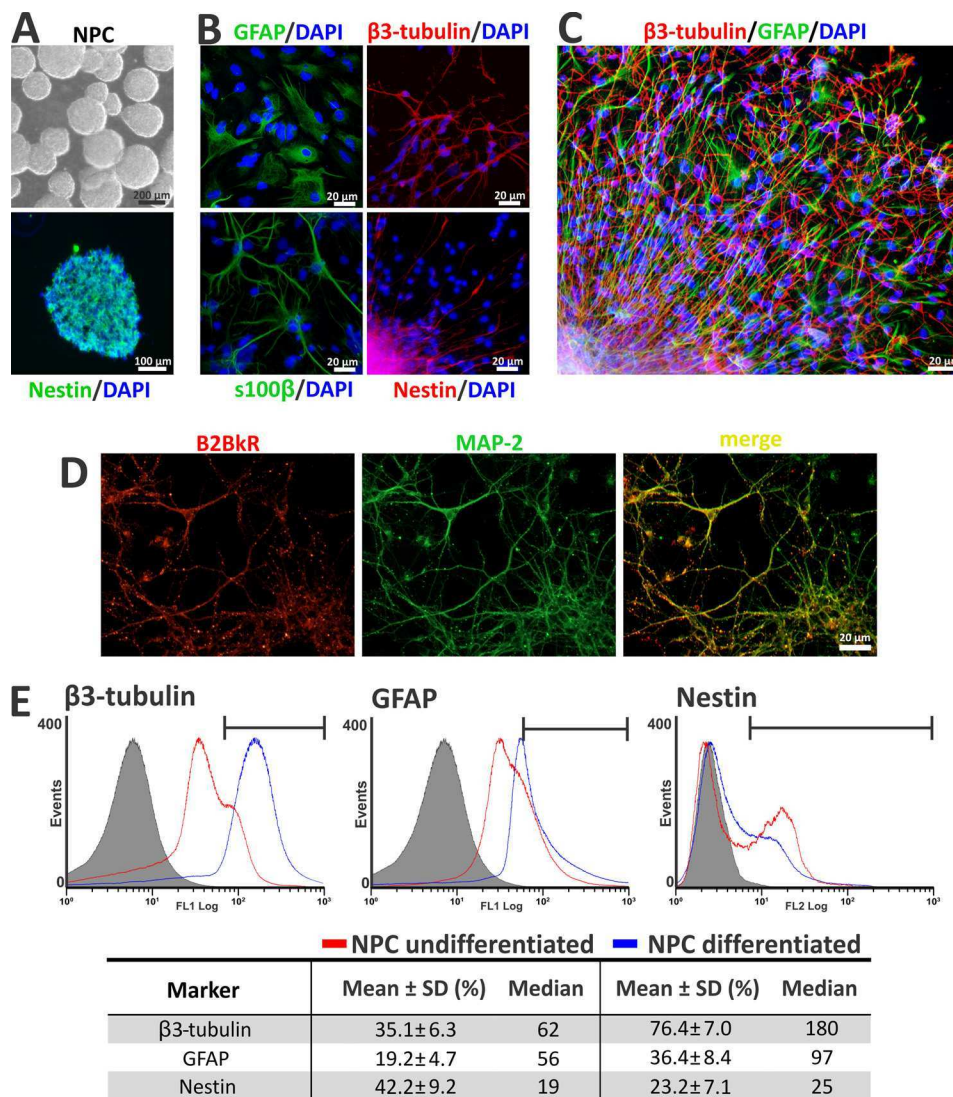
absolute change in the intracellular calcium concentration using the following equation:  $[Ca^{2+}]_i = K_d[(F - F_{min})/(F_{max} - F)]$ ; assuming a 450 nM  $K_d$  for fluo-3 AM.  $[Ca^{2+}]_i$  levels of cell populations prior and following stimulation were calculated using the average value of at least five fields of observation in independent experiments.

**Whole Mount *in Situ* Hybridization**—Whole mount *in situ* hybridizations were adapted from a protocol described elsewhere (27). In summary, mouse embryos were fixed in 4% PFA, treated with proteinase K, re-fixed with 4% PFA, 0.1% glutaraldehyde and hybridized overnight with 1  $\mu$ g of digoxigenin-labeled RNA sense and antisense probes. After the wash, embryos were treated with a solution containing 10% goat serum, 1% Boehringer Block, and 0.1% Tween 20 in PBS at 4 °C for 2 h and then incubated overnight with anti-digoxigenin alkaline phosphatase antibodies at 4 °C. Finally, the embryos were washed in 0.1% BSA and stained overnight with alkaline phosphatase substrate at 4 °C. *B2BkR* sense (5'-GGACTCCCTACAACACAGAAC-3') and antisense (5'-GGACAAAGAGGTTCTCCAGTG-3') probes were generated by linearization and *in vitro* transcription of pBluescript II KS-*B2BkR* (NM\_009747.2) with XbaI/T3 and XhoI/T7, respectively.

**Statistical Analyses**—The results were expressed as mean  $\pm$  S.D. from three or more independent experiments, unless otherwise stated. Statistical comparisons between different treatments were done by either a Student's *t* test or one-way analysis of variance by using GraphPad Prism 5.1 software (Graph-Pad Software Inc.). For quantification of immunolabeled BrdU<sup>+</sup> cells, a minimum of 300 and up to 800 cells per sample was analyzed using ImageJ software. For



## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation



**FIGURE 1. *In vitro* neural progenitor differentiation.** *A*, neural progenitor was obtained from rat embryo telencephalon (E14) induced for 7 days to proliferation for formation of neurospheres. *Upper panel*, phase-contrast image of primary undifferentiated neurosphere (NPC). *Lower panel*, nestin is highly expressed in undifferentiated neurospheres. *B*, typical immunofluorescence images of neurospheres on day 7 of differentiation. Differentiated neurospheres express specific protein markers for progenitor cells (nestin), astrocytes (GFAP and  $s100\beta$ ), and neurons ( $\beta3$ -tubulin). *C*, radial cell migration pattern and neural maturation. The radial migration observed near the neurospheres consists mainly of precursor cells and astrocytes, whereas neuronal migration occurs to form a distal network. *D*, detection of co-expression of B2BkR and MAP-2, indicating that B2BkR are expressed in mature neurons. *E*, flow cytometry analysis of neural markers expression of undifferentiated (red lines) and differentiated (blue lines) neurospheres. Events with higher fluorescence as those in the control histograms (within the area delimited by bars) were considered positive and quantified in the table below. The data shown are representative of at least three independent experiments.

flow cytometry, a minimum of 30,000 cells was analyzed per sample. The criteria for statistical significance were set at  $p < 0.05$ .

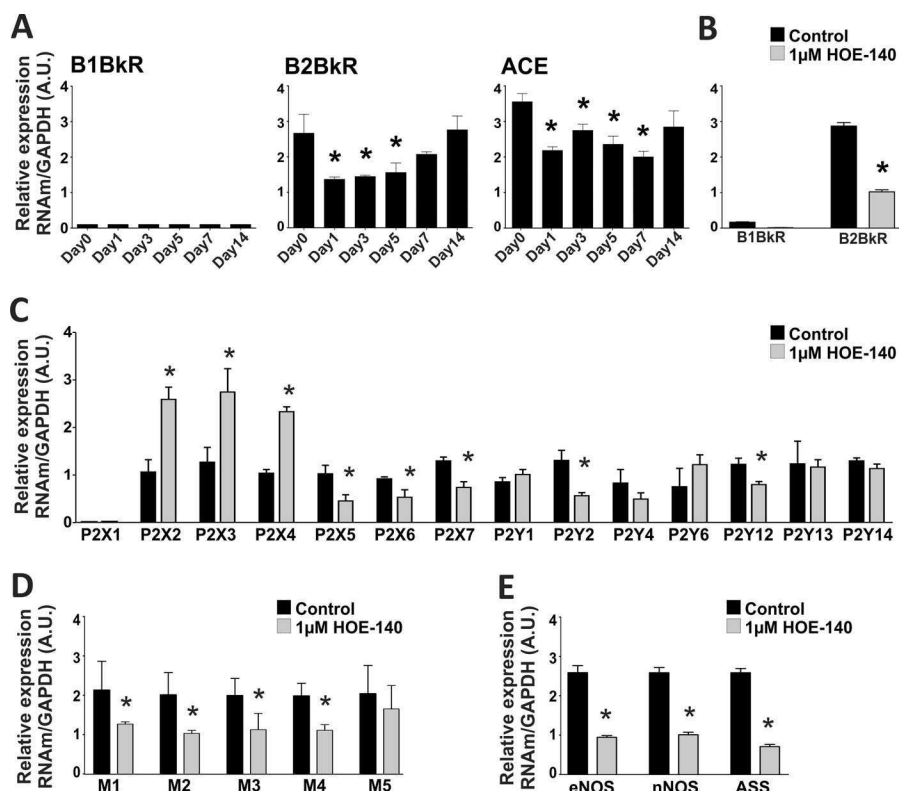
### RESULTS

**B2BkR and Neural-specific Protein Expression Profile during Neurosphere Differentiation**—Rat telencephalon cells were cultured in growth medium to allow neural stem cells and NPCs to proliferate and form neurospheres (Fig. 1A). Consistent with Martins *et al.* (24), undifferentiated neurospheres expressed high levels of GFAP and nestin, in some cases co-expressed in the same cell. Following induction of differentiation, the number of nestin-positive cells in the outer layers of migrating cells decreased, whereas cells within the neurosphere remained undifferentiated (24). Neuron-specific protein  $\beta3$ -tubulin, and

astrocyte-specific  $s100\beta$  were expressed at high levels in differentiated cells (Fig. 1B). Cells elongated in a radial pattern with intense staining for GFAP and nestin. Network-forming differentiated cells were located most distally (Fig. 1C). Double-immunostaining against MAP-2 and B2BkR on day 7 of differentiation revealed that the B2BkR was expressed by mature neurons, as shown in Fig. 1D.

Analysis by flow cytometry clearly confirmed the difference in the expression of proteins specific for un- or differentiated neurospheres (Fig. 1E). Expression of the neuronal marker  $\beta3$ -tubulin was detected in 35 and 76% of undifferentiated and differentiated cells, respectively. GFAP and nestin were present in 19 and 42% of undifferentiated cells, respectively. In differentiated cells, the expression of GFAP increased to 36%, and nestin expression was reduced to 23% of the cell population.





**FIGURE 2. Gene expression of components of the kallikrein-kinin system and neurotransmitter receptors after chronic treatment with 1  $\mu$ M HOE-140 along rat neural differentiation.** A, *B1BkR* gene expression could not be detected during 14 days of neurosphere differentiation, whereas *B2BkR* and angiotensin-converting enzyme (*ACE*) expression showed an initial reduction after differentiation induction. *B2BkR* expression increased again during the final differentiation. B, *B2BkR* gene expression after NPC treatment with HOE-140 during 7 days. C, specific *B2BkR* inhibition for 7 days caused an alteration in ionotropic and metabotropic purinergic receptor gene expression. D and E, chronic HOE-140 treatment led to reduced muscarinic receptor gene expression as well as key proteins involved in nitric oxide formation (neuronal nitric-oxide synthase, *nNOS*; endothelial nitric-oxide synthase, *eNOS*; argininosuccinate synthetase, *ASS*). The data are representative for three independent experiments conducted in triplicate and shown as mean  $\pm$  S.D. (\*,  $p < 0.05$ ).

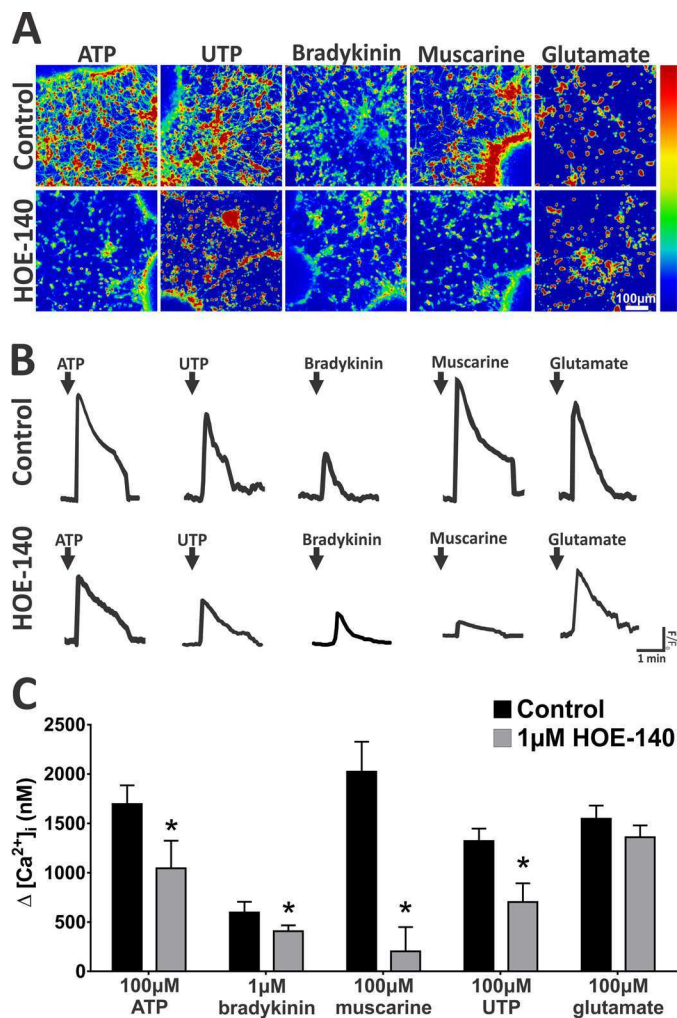
Throughout differentiation, percentages of neuronal and glial phenotypes increased in the cell population, whereas percentages of NPCs decreased.

***B2BkR* Inhibition during Differentiation Alters Expression and Activity of Neurotransmitter Receptors**—A large number of membrane receptors are expressed to initiate complex sets of sequential transcriptional events important for cell fate determination. The expression of kinin, purinergic, and muscarinic receptors during rat differentiation was quantitatively evaluated by real-time PCR. The expression of the *B1BkR* was lower than the detection limits of the methodology employed, whereas *B2BkR* expression decreased initially and increased during later differentiation. The transcriptional levels of angiotensin-converting enzyme (*ACE*) mRNA controlling lifetime of biologically active kinins remained stable (Fig. 2A). Chronic treatment of differentiating rat neurospheres with HOE-140, a specific antagonist of the *B2BkR*, significantly decreased the gene expression of *B2BkR* (Fig. 2B). The expression of other components of the kallikrein-kinin system in neurospheres and Bk release were already reported in a previous publication of our group (24). Quantitative real-time PCR analysis revealed a significant increased expression of rat purinergic *P2X2*, *P2X3*, and *P2X4* receptor subunits and decreased expression of *P2X5*, *P2X6*, *P2X7*, *P2Y2*, and *P2Y12* subtypes (Fig. 2C). The expression of *M1–M4* muscarinic receptors decreased following chronic treatment with HOE-140, corroborating previous data

obtained from P19 cells (19) and supporting the existence of an interrelationship between cholinergic and kallikrein-kinin systems (Fig. 2D). Thus, Bk influences the expression of purinergic and cholinergic receptors during neural differentiation. We also investigated the presence of transcripts of *endothelial* and *neuronal nitric-oxide synthase* (*eNOS* and *nNOS*) and *argininosuccinate synthetase* (*ASS*) along neural differentiation. Considering the role of NO in neural differentiation and proliferation (28–30), the inhibitory effects of HOE-140 on gene expression of *eNOS*, *nNOS*, and *ASS* further indicate functions for the *B2BkR* during neural differentiation (Fig. 2E).

HOE-140-induced effects on iono- and metabotropic receptors in differentiated rat neurospheres were also studied by using calcium imaging. HOE-140 was completely removed from the cells following several washes 1 h before the beginning of the experiment. ATP- and UTP-induced receptor responses diminished in the presence of HOE-140, reflected by changes in  $[Ca^{2+}]_i$  peak values from  $\Delta 1695 \pm 190$  to  $\Delta 1044 \pm 279$  nM ( $p = 0.0371$ ) and from  $\Delta 1320 \pm 126$  to  $\Delta 703 \pm 189$  nM ( $p = 0.0055$ ), respectively (Fig. 3). Effects of chronic *B2BkR* blockade on muscarinic receptor activity were even more evident. Muscarine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients with peak values of  $\Delta 2023 \pm 304$  nM were reduced to  $\Delta 243 \pm 205$  nM ( $p = 0.0016$ ) when HOE-140 was present during the course of differentiation. *B2BkR* activity was also reduced by 37% following chronic blockade of

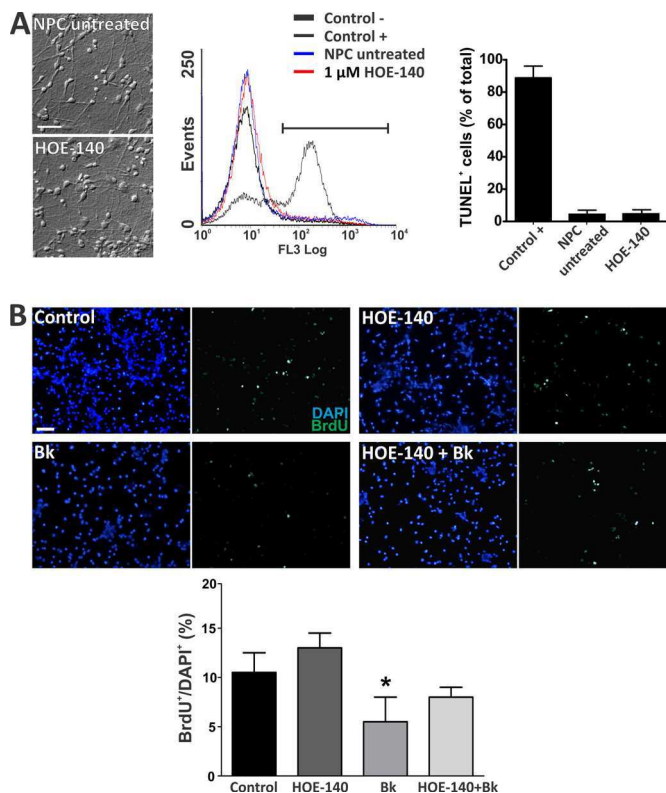
## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation



**FIGURE 3. Effects of chronic B2BkR blockade on neurotransmitter-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients in differentiated rat neurospheres.** *A*, representative images following stimulation by 100  $\mu$ M ATP, 100  $\mu$ M UTP, 1  $\mu$ M Bk, 100  $\mu$ M muscarine, or 100  $\mu$ M glutamate in cells differentiated for 7 days in the absence or presence of 1  $\mu$ M HOE-140. HOE-140 was removed from cell cultures by medium change and washing the cell layers five times 1 h before staining cells with fluo-3 AM.  $[Ca^{2+}]_i$  levels were monitored using calcium imaging by confocal microscopy, calculated using the average value of at least five fields of observation and represented in a color gradient. *B*, kinetics of  $[Ca^{2+}]_i$  transients. Arrows indicate the time point of agonist application ( $F_o$  values represent basal  $[Ca^{2+}]_i$  levels of nonstimulated cells). *C*, mean values of  $[Ca^{2+}]_i$  peak amplitudes in differentiated neurospheres pre-treated or not with 1  $\mu$ M HOE-140 were calculated as described under "Experimental Procedures" and shown as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ) (\*,  $p < 0.05$  by Student's *t* test. ATP,  $p = 0.0371$ ; Bk,  $p = 0.0058$ ; muscarine,  $p = 0.0016$ ; UTP,  $p = 0.0055$ ; glutamate,  $p = 0.1688$ ).

kinin-B2 receptors followed by wash-out of the antagonist prior to calcium measurements (control =  $\Delta 596 \pm 109$  nM; treated with HOE-140 =  $\Delta 407 \pm 59$  nM) ( $p = 0.0058$ ). The observed changes did not affect all signaling systems as no significant changes in glutamate-induced  $[Ca^{2+}]_i$  peak values were observed in cells treated with HOE-140 ( $p = 0.1688$ ).

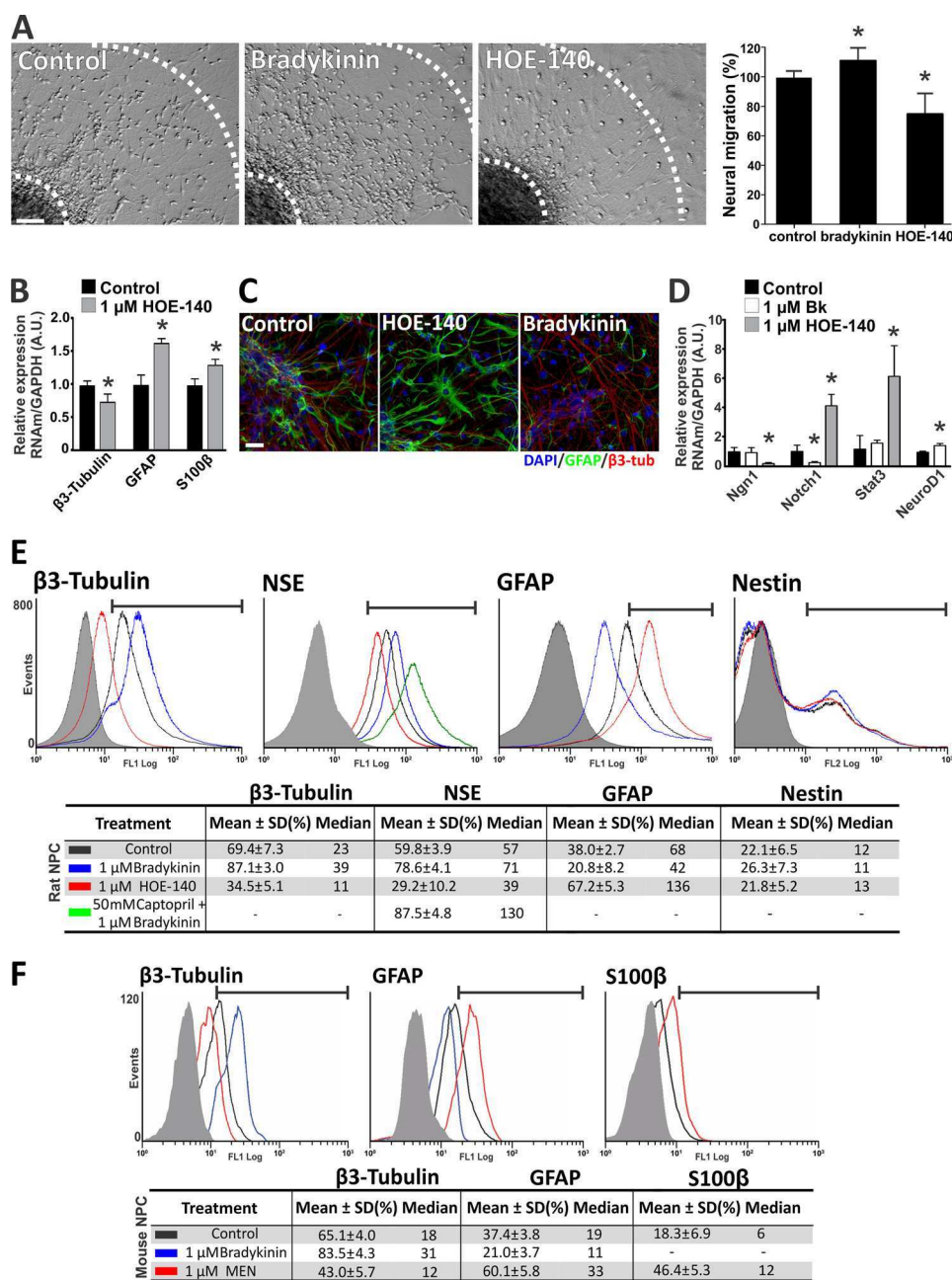
**Effects of Bradykinin and HOE-140 on Cell Death and Proliferation**—We evaluated the effects of B2BkR activation and inhibition on cellular proliferation and whether HOE-140 treatment would induce cell death or have any visible effects on cellular morphology and cell viability. To this end, rat neurospheres were differentiated for 7 days in the absence or presence of 1  $\mu$ M HOE-140 (Fig. 4) and analyzed by TUNEL stain-



**FIGURE 4. Effects of B2BkR inhibition on rat neural progenitor cell death and proliferation.** *A*, the images show the cellular morphology of rat NPCs differentiated for 7 days in the presence or absence of 1  $\mu$ M HOE-140. Percentages of cells on day 7 of differentiation undergoing cell death were determined by flow cytometry using the TUNEL assay. For negative control, we used only the marker reagent. For the positive control, NPCs were treated with DNase I to induce DNA strand breaks and verify their positive staining. Thirty-thousand events were acquired in a flow cytometer (Beckman Coulter, Fc500) and analyzed with the Cyflogic software. Cell death measured by the TUNEL assay was not significantly altered in the presence of 1  $\mu$ M HOE-140 ( $n = 2$ ). Scale bars = 20  $\mu$ m. *B*, immunodetection of BrdU (0.2  $\mu$ M) after a 14-h pulse in differentiated neurospheres in the presence of 1  $\mu$ M Bk in the absence or presence of 1  $\mu$ M HOE-140. BrdU incorporating nuclei are shown in green. The graph shows the quantification of proliferation in different treatments as the ratio of BrdU<sup>+</sup> over DAPI<sup>+</sup> cells. The percentage of proliferating BrdU<sup>+</sup> cells is significantly lower in NPCs treated with bradykinin. Six fields were evaluated for each treatment (\*,  $p < 0.05$ ). Scale = 50  $\mu$ m.

ing. Flow cytometry analysis revealed that the chronic treatment with 1  $\mu$ M HOE-140 did not affect the number of TUNEL<sup>+</sup> cells when compared with control experiments ( $5.1 \pm 0.3\%$  TUNEL<sup>+</sup> cells) (Fig. 4A). The effect of B2BkR blockade on cell proliferation was analyzed by the BrdU incorporation assay (Fig. 4B). Approximately 11% of the cells on day 7 of differentiation were proliferative. Similar values were obtained in cells co-treated with 1  $\mu$ M HOE-140 and 1  $\mu$ M Bk ( $9.8 \pm 1.3\%$ ) or treated with HOE-140 alone ( $12.5 \pm 1.7\%$ ). However, in the presence of Bk, cell proliferation was inhibited by  $\sim 40\%$  ( $5.4 \pm 2.7\%$  of the cell population;  $p = 0.0187$ ).

**Bradykinin Favors Neurogenesis in Distinct Cell Models**—The progress of neural differentiation is closely related to cell migration and neuron-glia interactions (31–33). In this process, different factors act on neural progenitor cells for defining their fate. Thus, we studied whether the effects of B2BkR activation or blockade would influence migration prior to neuronal and glial maturation. Seven days after rat neurospheres were plated onto adherent surfaces in medium deprived of growth factors;



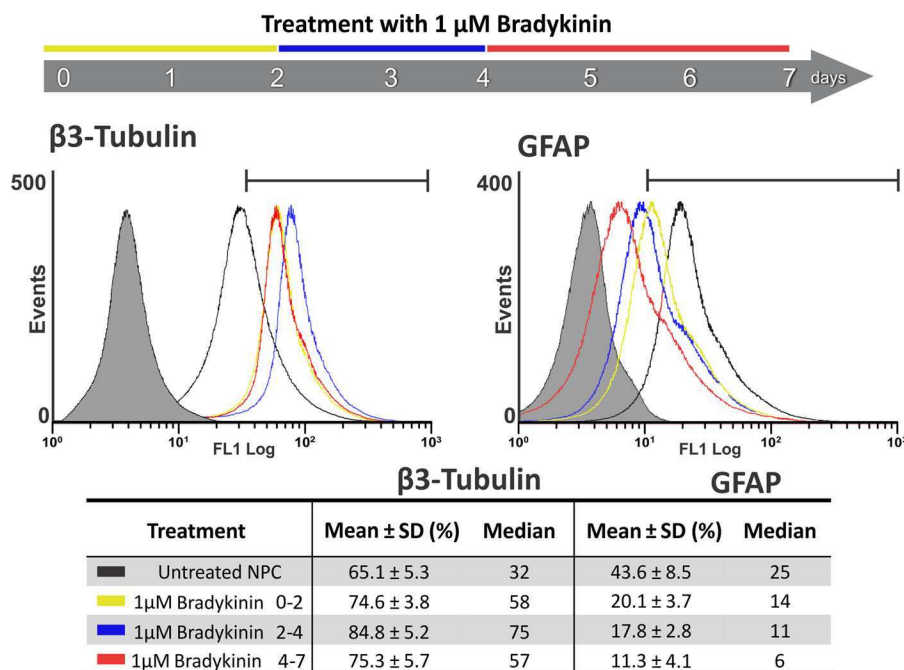
**FIGURE 5. Bradykinin enhances neurogenesis, whereas HOE-140 promotes gliogenesis in neurosphere differentiation.** *A*, phase-contrast images representing radial migration pattern after 7 days of neural differentiation in the presence of 1  $\mu$ M bradykinin (Bk) or 1  $\mu$ M HOE-140. The region enclosed between the dotted lines comprises  $\sim$ 95% of migrated cells. Scale = 100  $\mu$ m. *B*, neural markers gene expression was changed upon B2BkR inhibition. Note that the GFAP and S100 $\beta$  expression levels were increased, whereas  $\beta$ 3-tubulin expression was decreased. The data are representative of three independent experiments conducted in triplicate and show as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ) (\*,  $p < 0.05$ ). *C*, immunostaining of rat neurospheres differentiated in the presence of 1  $\mu$ M Bk or 1  $\mu$ M HOE-140. Scale, 20  $\mu$ m. *D*, transcription factor and neural marker gene expression was changed upon B2BkR inhibition or activation. The data are representative of three independent experiments conducted in triplicate and shown as mean  $\pm$  S.D. (\*,  $p < 0.05$  by Student's  $t$  test compared with control data. *Ngn1* (*neurogenin 1*), Bk,  $p = 0.8304$ ; HOE-140,  $p = 0.0098$ ; *notch 1*, Bk,  $p = 0.0139$ ; HOE-140,  $p = 0.0038$ ; *Stat3*, Bk,  $p = 0.0178$ ; HOE-140,  $p = 0.0008$ ; *NeuroD1*, Bk,  $p = 0.0302$ ). *E*, flow cytometry analysis of GFAP,  $\beta$ 3-tubulin, neuronal specific enolase (*NSE*), and nestin expression in rat neurospheres differentiated for 7 days in the presence of Bk, HOE-140, or captopril, and Bk. Representative histograms compare expression levels of neural markers in differentiated rat neurospheres, treated with Bk, HOE-140, and captopril + Bk. *F*, analysis of  $\beta$ 3-tubulin, GFAP, and S100 $\beta$  expression in mouse neurospheres differentiated for 7 days in the presence of 1  $\mu$ M bradykinin or 1  $\mu$ M MEN-11270 (MEN), a B2BkR antagonist. The data shown are representative of at least two independent experiments. The blank histograms in gray reveal fluorescence emission data in the absence of primary antibodies. The data shown are representative of at least five independent experiments.

NPCs presented a radial migration pattern closely linked to a gradient of maturation (Fig. 5). Fig. 5A shows representative images of differentiated neurospheres, where the region enclosed between the dotted lines comprises  $\sim$ 95% of migrating cells. Cells migrated 15% farther from the edge of neurospheres

in the presence of Bk compared with control cultures. Conversely, blockade of B2BkR by HOE-140 treatment resulted in a 25% smaller migration distance despite displaying the same radial pattern. These results suggest that alteration of migration may also influence neurogenesis and gliogenesis.



## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation



Additionally, chronic treatment of NPCs with HOE-140 decreased the expression of  $\beta$ 3-tubulin by  $25 \pm 13\%$  ( $p = 0.0477$ ), whereas GFAP and S100 $\beta$  expression levels were significantly increased by  $65 \pm 9\%$  ( $p = 0.0024$ ) and  $31 \pm 8\%$  ( $p = 0.0032$ ), respectively (Fig. 5B). These results indicate, for the first time, an important role of the B2BkR in neural fate determination, where inhibition of B2BkR activity favors gliogenesis over neurogenesis. B2BkR-mediated effects were confirmed by microscopic analysis of immunostained cells (Fig. 5C). Although gliogenesis was reduced, neurogenesis visualized by  $\beta$ 3-tubulin expression was much more evident in neurospheres treated with 1  $\mu$ M Bk throughout the course of differentiation when compared with neurospheres differentiated in the absence of the Bk or in the presence of HOE-140.

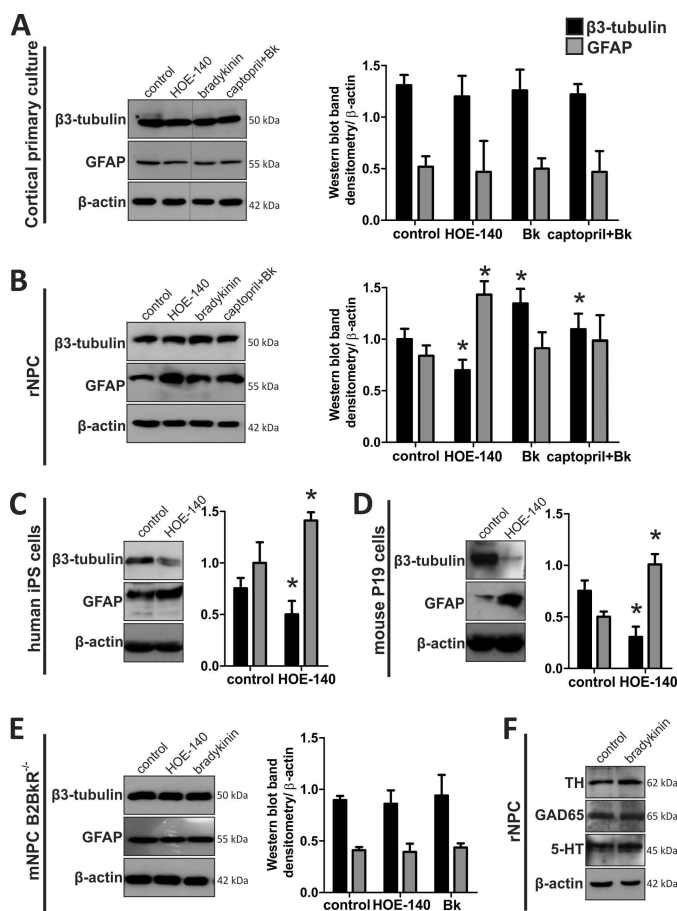
We further investigated the expression of neurogenic and transcription factors genes, such as *ngn1* (*neurogenin 1*), *notch1*, *Stat3* (signal transducer and activator of transcription 3), and *NeuroD1*, in differentiated NPCs in the absence or presence of HOE-140 or Bk. Real-time PCR revealed that the treatment with HOE-140 significantly increased the expression of genes related to gliogenesis (*notch 1* and *Stat3*), whereas in the presence of Bk a significant difference of *NeuroD1* expression was obtained compared with the control group (Fig. 5D). Conversely, *Ngn1* expression levels were decreased with HOE-140 treatment and *notch 1* levels diminished after Bk treatment.

Flow cytometry analysis revealed that the expression of the neuronal markers  $\beta$ 3-tubulin and NSE following Bk treatment were increased from  $69.4 \pm 7.3$  to  $87.1 \pm 3.0\%$  and  $59.8 \pm 3.9$  to  $78.6 \pm 4.1\%$ , respectively (Fig. 5E). Co-treatment with captopril and Bk greatly increased the percentage of NSE<sup>+</sup> cells, reaching  $87.5 \pm 4.8\%$  after ACE inhibition, given by the increased availability of Bk. In contrast, prolonged activation of B2BkR

decreased the glial population from  $38.0 \pm 2.7$  to  $20.8 \pm 8.2\%$ , whereas the population of nestin<sup>+</sup> cells did not show any significant variation, remaining at  $\sim 22\%$ . Chronic treatment with HOE-140 also altered the phenotypic population features; however, this treatment showed a bias of gliogenesis. The percentage of GFAP<sup>+</sup> cells almost doubled from  $38.0 \pm 2.7$  to  $67.2 \pm 5.3\%$ . Percentages of nestin<sup>+</sup> cells did not change significantly under Bk treatment. Similar results were obtained by flow cytometry analysis of mouse NPCs differentiated in the presence of Bk or MEN-11270 (another B2BkR specific inhibitor) (Fig. 5F).

Effects of Bk on neural fate determination may depend on the time of application, *i.e.* its action could be more evident at the beginning or end of differentiation, considering other external and internal factors participating in this process. Thus, Bk was added and removed at specific times during differentiation: 0–2, 2–4, or 4–7 days. Quantification of glia and neuronal populations by flow cytometry revealed that most significant favoring of neurogenesis by Bk occurred in intermediate and late days of differentiation (Fig. 6). Although discrete, the expression of  $\beta$ 3-tubulin during this period peaked ( $84.8 \pm 5.2\%$ ) and was comparable with those obtained by chronic treatment with Bk along the whole course of differentiation. This may be related mainly to the migration of cells from neurospheres, which is enhanced at intermediate and late stages of differentiation. On the other hand, the decreased GFAP expression was most evident when cells were treated with Bk between days 4 and 7 ( $11.3 \pm 4.1\%$ ), in agreement with reversal of the proliferation blockade at the end of differentiation in the presence of HOE-140.

Additionally to immunocytochemistry and flow cytometry, we used Western blot analysis to evaluate relative protein con-



**FIGURE 7. Western blot analysis of neural marker expression.** A, immunoblots of protein extracts from newborn rat cortical primary culture after treatment with 1  $\mu$ M Bk, 1  $\mu$ M HOE-140, or 50 mM captopril + 1  $\mu$ M bradykinin. B, densitometry of protein extracts from differentiated rat neurospheres ( $n = 4$ ). C, densitometry of protein extracts from human-induced pluripotent stem cells ( $n = 2$ ). D, densitometry of protein extracts from differentiated mouse P19 carcinoma cells ( $n = 3$ ). E, densitometry of protein extracts of differentiated mouse neurospheres obtained from *B2BKR* knock-out mice ( $n = 2$ ). F, immunoblots of protein extracts from differentiated rat neurospheres after treatment with 1  $\mu$ M bradykinin along differentiation (TH, tyrosine hydroxylase; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; GAD65, glutamic acid decarboxylase).

tents of  $\beta$ 3-tubulin and GFAP in different cell models (Fig. 7). In accordance with the results so far shown, Western blot analysis showed no change in the number of neuronal and glial proteins in primary cortical cultures previously treated with HOE-140 or Bk. We noticed a clear increase in  $\beta$ 3-tubulin protein after treatment with Bk or captopril + Bk in rat neurosphere, murine P19, and human iPS cell differentiation. The opposite effect, increased GFAP content, could be observed after differentiation of the same models of rat, mouse, and human cells in the presence of the specific blocker of B2BkR, HOE-140 (Fig. 7, A–D). To verify that promotion of neurogenesis resulted from B2BkR activation, neurospheres from the B2BkR knock-out mice were differentiated in the presence of 1  $\mu$ M Bk or 1  $\mu$ M HOE-140. After these treatments we found no significant change in neural marker protein content, confirming that neural differentiation was specifically modulated by B2BkR and not by possible side effects of HOE-140 treatment (Fig. 7E). The presence of Bk along differentiation did not induce any changes of subpopulation-specific neurotransmitter expression. Im-

munoblotting against tyrosine hydroxylase (dopaminergic marker), 5-hydroxytryptamine (serotonergic marker), and GAD65 (GABAergic marker) in neurospheres did not reveal any differences in expression of these markers (Fig. 7F).

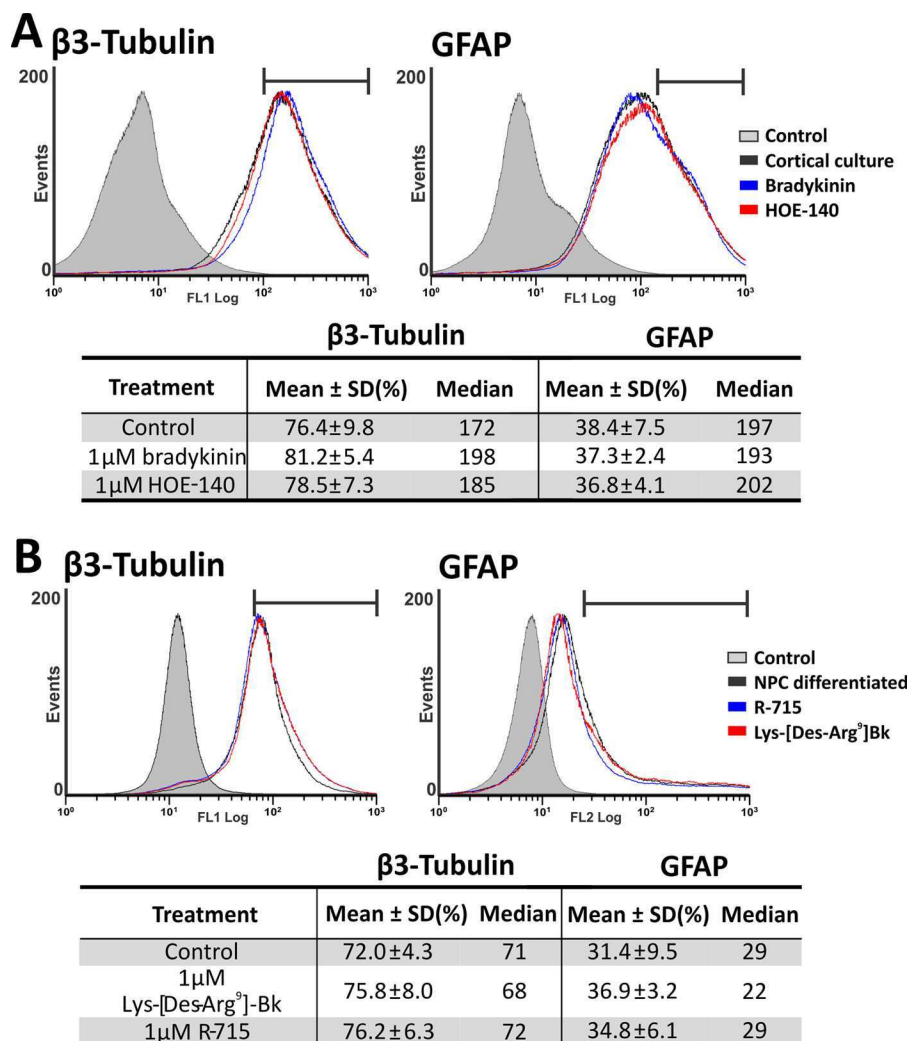
**Neurogenesis Is Favored via B2BkR Only in Differentiating Cells**—For confirming specific neurogenic roles of Bk, we investigated whether these effects occur only in the differentiation process or could also be observed in differentiated neural cells. For this purpose, we used cortical primary cultured cells of newborn rats treated for 7 days without or with 1  $\mu$ M Bk or 1  $\mu$ M HOE-140. Flow cytometry analysis of cortical primary cultures pre-treated with Bk or HOE-140 did not reveal any change in percentages of neuronal and glial cells (Fig. 8A). Thus, the occurrence of neurons and glia remained constant regardless of treatment, suggesting that the effect of neuronal cell enrichment by Bk via B2BkR occurs only during the process of differentiation.

Considering the influence of the B2BkR in modulating neural differentiation by promoting neurogenesis, we assessed whether this effect would be caused by enzymatic cleavage of Bk with consequent formation of metabolites and activation of the B1BkR. In this context, rat neurospheres were plated and differentiated in the presence of 1  $\mu$ M Lys-[des-Arg<sup>9</sup>]-Bk, an agonist of the B1BkR, or 1  $\mu$ M R-715, a specific B1BkR antagonist. After this period, we performed flow cytometry analysis to quantify neural marker expression (Fig. 8B). There was no change in the number of cells expressing neural markers  $\beta$ 3-tubulin and GFAP. Thus, the phenotypic fate determination during neural differentiation does not appear to be influenced by the B1BkR. It is noteworthy that mRNA transcription coding for B1BkR during neural differentiation could not be detected in real-time PCR analysis.

**Differentiated Neurospheres Derived from *B2BKR*<sup>-/-</sup> Mice Show a Reduction in Neural Migration**—Further confirmation of modulation of neurogenesis by Bk and its receptor was obtained in *B2BKR* knock-out mice. The use of *B2BKR*<sup>-/-</sup> mice to obtain neurospheres allowed further study of the process of cell differentiation and neural migration. To verify the homozygosity in knock-out mice, genomic DNA was extracted from small biopsies of the animals and amplified by PCR with specific primers for *B2BKR* and rate genes. *B2BKR*<sup>-/-</sup> mice-derived neurospheres revealed the same growth rates of wild-type neurospheres, without visible morphological changes. After plating and induction of neural differentiation of *B2BKR*<sup>-/-</sup> neurospheres, we observed the same radial pattern, although with decreased migration when compared with control neurospheres from wild-type animals (Fig. 9). The quantification of cell migration between the dotted lines is shown in Fig. 9A. In addition, immunocytochemical analysis revealed the same pattern characterized mainly by radial GFAP<sup>+</sup> cells and a low migration of  $\beta$ 3-tubulin<sup>+</sup> cells in *B2BKR*<sup>-/-</sup> mice neurospheres (Fig. 9B). The immunostaining also reveals less  $\beta$ 3-tubulin<sup>+</sup> cells (~72%) and a high content of GFAP<sup>+</sup> cells (47%) in *B2BKR*<sup>-/-</sup>.

**Developmental Expression of *B2BKR* and Its Effect on Neural Marker Expression during Brain Development**—The *B2BKR* is ubiquitously and constitutively expressed in adult healthy tissues. To assess whether it is also expressed in developing mice,

## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation



**FIGURE 8. Flow cytometry analysis of  $\beta 3$ -tubulin and GFAP expression in cortical primary culture and neurosphere differentiated in the presence of 1  $\mu$ M Lys-[des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin and R-715.** *A*, cortical cells of newborn rats were cultured in the absence or presence of 1  $\mu$ M bradykinin or 1  $\mu$ M HOE-140 for 7 days. Representative flow cytometry histograms comparing the expression of neural markers in differentiated neurospheres (black), treated with bradykinin (blue) or HOE-140 (red) ( $n = 4$ ). *B*, representative flow cytometry histograms comparing the expression of neural markers in differentiated neurospheres (black), treated with a B1BkR inhibitor, R-715 (blue), or a B1BkR agonist, Lys-[des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin (red) ( $n = 3$ ). The blank histogram represents data obtained in the absence of primary antibodies.

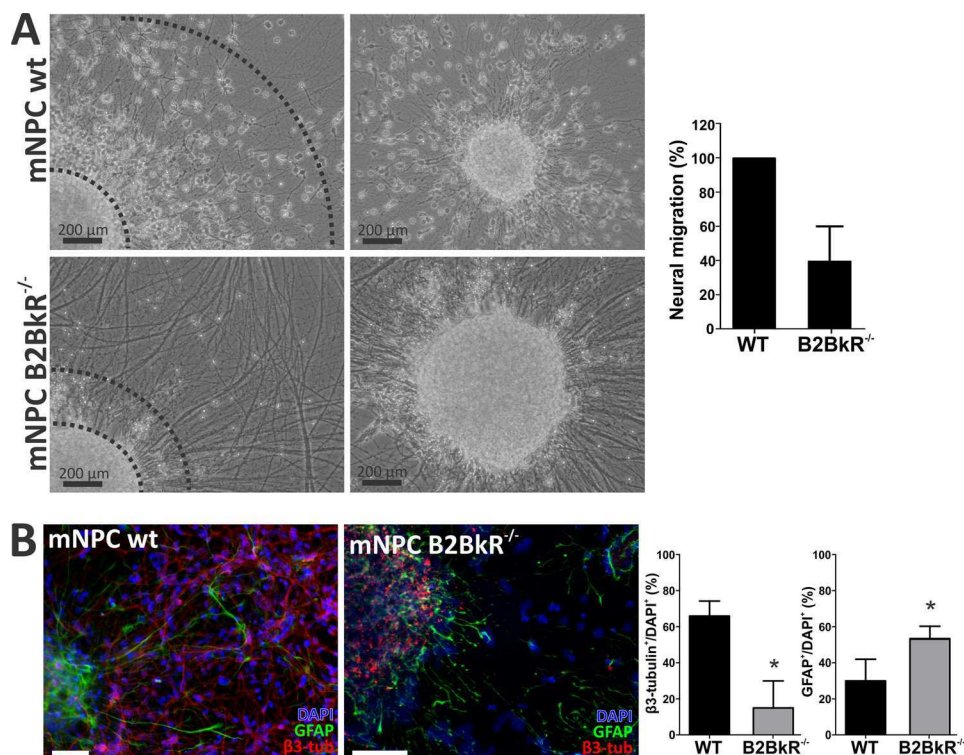
expression of *B2BkR* was determined in embryos removed from pregnant dams at various neurogenic developmental time points (E9.5–E12.5) by whole mount *in situ* hybridization with antisense RNA probes (Fig. 10). Mouse *B2BkR* transcripts were detected in neural cells at day E9.5, starting in the optic vesicle (Fig. 10A), then increasing their expression pattern to the whole nervous system at days E11.5 (Fig. 10B) and E12.5 (Fig. 10C). Negative controls with *B2BkR* sense probes did not reveal any specific labeling (Fig. 10D). Here, we show for the first time that *B2BkR* is strongly expressed in the developing mouse brain, including telencephalon, diencephalon, and ventral region of midbrain and hindbrain as well as in the spinal cord. For further analysis of the role of B2BkR in developing brains, we verified the expression of  $\beta 3$ -Tubulin in the telencephalon and cortex at several time points during WT and *B2BkR*<sup>-/-</sup> mice development (E9.5–adult) (Fig. 10E). The developing knock-out mice brains showed significantly less expression of  $\beta 3$ -Tubulin from E11.5 until adulthood (\*,  $p < 0.05$ ; adult,  $p = 0.0334$ ; E9.5,  $p = 0.0861$ ; E11.5,  $p = 0.4349$ ; E14.5,  $p = 0.0004$ ; E17.5,  $p = 0.0008$ ;

$p = 0.0001$ ). Adult *B2BkR*<sup>-/-</sup> brain express more glial markers, such as *GFAP* (\*,  $p < 0.05$ ; adult,  $p = 0.0083$ ) and *S100 $\beta$*  (\*,  $p < 0.05$ ; adult,  $p = 0.0001$ ) (Fig. 10F). These data indicate that the *B2BkR*<sup>-/-</sup> brain expresses less neuronal marker and higher levels of glial markers, indicating that Bk-induced actions occur not only during *in vitro* neural differentiation, but are also important for *in vivo* neurogenesis.

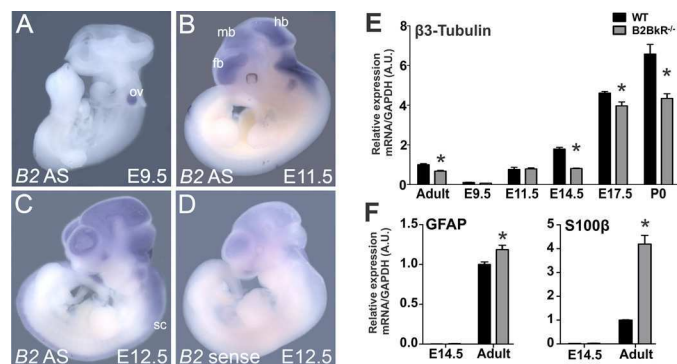
### DISCUSSION

Bk actions in neurogenesis are suggested based on its participation in determining the cholinergic phenotype of differentiating cells (19), induction of calcium waves (34, 35), neurite formation (36–38), and cell migration. Moreover, Bertram *et al.* (39) demonstrated increased migration of human monocytes induced by Bk. In glioma cells, Lu *et al.* (40) reported augmented migration in the presence of Bk, but this effect was reproduced by B1BkR agonists. In another study, increased migration of chondrosarcoma cells was related to the Bk-activated signaling cascade (41). In summary, Bk or





**FIGURE 9. Neural migration and differentiation of neurospheres obtained from  $B2BkR^{-/-}$  mice.** Differentiation of neurospheres obtained from embryonic telencephalon (E12.5) of wild type (*mNPC wt*) and *B2BkR* knock-out mice (*B2BkR<sup>-/-</sup> mNPC*). **A**, phase-contrast images of radial migration pattern after 7 days of neural differentiation. The region enclosed between the dotted lines comprises ~95% of cells that migrated. Scale, 200  $\mu$ m ( $n = 2$ ). **B**, immunofluorescence staining of dissociated *B2BkR<sup>-/-</sup>* mNPC against  $\beta$ 3-tubulin and GFAP protein revealed an increase in the number of glial cells compared with wild type mNPC. Scale, 20  $\mu$ m ( $n = 2$ ) (\*,  $p < 0.05$ ).



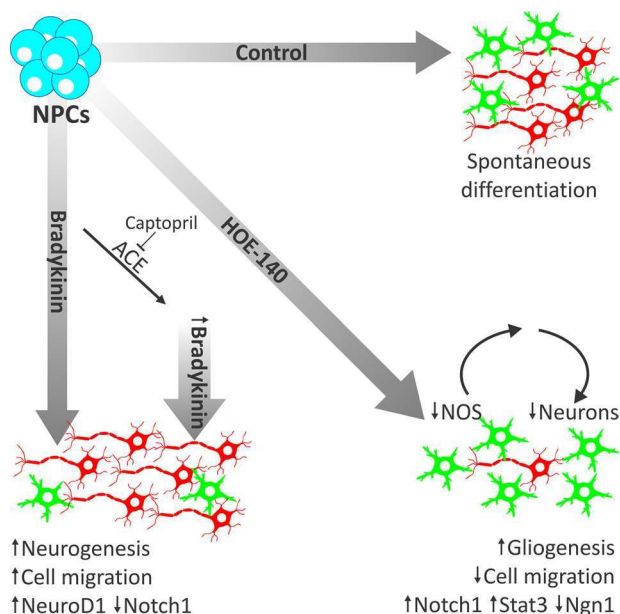
**FIGURE 10. Expression pattern of  $B2BkR$  during mouse embryo development and neural marker expression in telecephalons from  $B2BkR$  knock-out and wild-type mice.** Whole mount *in situ* hybridization of mouse embryos with *B2BkR* antisense probe (A–C) and *B2BkR* sense probe (used as a control, D). At stage E9.5, *B2BkR* expression is restricted to the optic vesicle (A), strong *B2BkR* expression was observed in the developing nervous system (B and C), *fb*, forebrain; *hb*, hindbrain; *mb*, midbrain; *ov*, optic vesicle; *sc*, spinal cord. **E**,  $\beta$ 3-tubulin neuronal marker gene expression during WT and *B2BkR<sup>-/-</sup>* mouse brain development. The *B2BkR<sup>-/-</sup>* embryos express less of the marker during several time points of brain development ( $n = 6$ ) (\*,  $p < 0.05$  by two-way analysis of variance with Bonferroni post-test compared with WT. *Adult*,  $p = 0.0334$ ; *E9.5*,  $p = 0.0861$ ; *E11.5*,  $p = 0.4349$ ; *E14.5*,  $p = 0.0004$ ; *E17.5*,  $p = 0.0008$ ; *P0*,  $p = 0.0001$ ). **F**, *GFAP* and *S100beta* glial marker gene expression of WT and *B2BkR<sup>-/-</sup>* mice brain. *Adult B2BkR<sup>-/-</sup>* brain reveal more gene expression of glial proteins, such as *GFAP* (\*,  $p < 0.05$  by two-way analysis of variance, *Adult*,  $p = 0.0083$ ) and *S100beta* (\*,  $p < 0.05$  by two-way analysis of variance, *Adult*,  $p = 0.0001$ ).

its degradation products participate via B1BkR or B2BkR activation in processes similar to those occurring during neurogenesis, such as neurite outgrowth, cell migration, and maturation.

In this context, several other factors can participate in early cell fate determination induced by Bk, including hormones (42) and amyloid- $\beta$  precursor protein (43). Gallego and co-workers (42) demonstrated that inhibiting hormone signaling prevented the differentiation of embryonic stem cells aggregates into neuroectodermal cells. Porayette and co-workers (43) showed that the inhibition of amyloid- $\beta$  precursor protein formation significantly suppressed human embryonic stem cell proliferation and promoted NPC formation. Interestingly, there is evidence that sex steroids alter B2BkR expression, and that Bk affects amyloid- $\beta$  precursor protein processing (44, 45) and increases its secretion. Moreover, due to possible regulation of production and secretion of hormones, growth factors and other substances by Bk, both, direct and indirect effects evoked by this peptide in neural fate determination are possible. In this regard, further investigation of the changes in muscarinic and cholinergic receptor expression and activity in conditions of chronic B2BkR inhibition will provide clues on these mechanisms.

Here we have defined novel functions for Bk and its receptor using rat embryonic telencephalon neurospheres as an *in vitro* model for early cortex neurogenesis and gliogenesis (Fig. 11). Besides intracellular calcium signaling, Bk promotes NO production, essential for the progress of neurogenesis. In agreement with a recently published study of our group, any interference with the production of arginine, the substrate for NO production, or with NOS activity interferes with the differentiation process (30). Subsequently, deficient B2BkR signaling in the presence of HOE-140, resulting in impaired neurogenesis,

## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation



**FIGURE 11. Bradykinin promotes neurogenesis via B2BkR activation.** Following plating, neural stem cells spontaneously differentiate into neurons (red) and glial cells (green). However, when B2BkR activity is blocked by HOE-140, the progress of neurogenesis is inhibited. The addition of Bk to NPC cultures decreases proliferation and promotes migration and neural differentiation following activation of *NeuroD1* and down-regulation of *Notch1* expression, whereas specific inhibition of the B2BkR reduces neurogenesis and augments gliogenesis following up-regulation of *Notch1* and *Stat3* and down-regulation of *Ngn1* (*neurogenin 1*) expression. The increase in neurogenesis of NPCs by Bk is yet enhanced in the presence of captopril, an inhibitor ACE, augmenting the half-time of this peptide in the culture medium. Neurogenic actions exerted by Bk also involved NO production, because expression of key enzymes of the NO-citrulline cycle was down-regulated as result of B2BkR inhibition (30).

is also reflected by down-regulated expression of NOS and the step-limiting enzyme ASS.

B2BkR expression was evident throughout differentiation of neurospheres into neurons and glial cells accompanied by reduction of expression of the neural progenitor marker nestin and an increase in expression of neuronal  $\beta 3$ -tubulin and NSE as well as of GFAP and S100 $\beta$ , identifying glial cells. Bk was released into the culture medium during phenotypic transition of undifferentiated cells into specialized neural cells (24). Further evidence for a functional kallikrein-kinin system is given by the expression of ACE, limiting Bk half-life in the extracellular fluid; however, the B1BkR could not be detected, both on expression and activity levels.

These data agree with previous work of our laboratory suggesting the presence of an autocrine loop system of Bk secretion and receptor activation during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells, in which the blockade of receptor activation suppressed Bk liberation into the medium and led to inhibition of *M1–M3 muscarinic receptor* expression in neuronal-differentiated P19 cells (19). Based on these observations during differentiation of an embryonic cell model, we questioned now whether these B2BkR functions are also present in an *in vitro* model closely reflecting conditions occurring during embryonic cortex development in a network of migrating cells.

As found during *in vitro* neurogenesis of P19 cells, gene expression of *M1–M4 receptors* and muscarine-induced [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> transients were reduced following inhibition of B2BkR

activity during neurosphere differentiation. Phenotypic changes observed in neurospheres differentiated in the presence of HOE-140 included alterations in purinergic receptor expression and activities. Suppression of *P2X5* and *P2X6* receptor subunit expression, known to be regulated during neuronal development (46), is consistent with an inhibitory effect of B2BkR blockade on the progress of neurogenesis. Scemes *et al.* (47) reported a reduction in neural outgrowth by blocking P2Y1 receptor activity during neurosphere differentiation, whereas the relative population of neurons and glial cells remained unchanged (48). These results are in agreement with the down-regulation of P2Y1 receptor expression due to HOE-140 treatment and subsequent decreased neural migration, agreeing with important roles of this receptor in neural proliferation and migration (49).

There are growing evidence that points at regulatory functions of NO in the development of the CNS, including cell proliferation and fate determination (50–52). The mechanism of regulating proliferation/differentiation depends on the NOS isoform involved in NO production (29). In this context, expression of enzymes of the citrulline-NO cycle including eNOS, nNOS, and argininosuccinate synthetase was also down-regulated in the presence of HOE-140. As a possible mechanism, B2BkR activity controls key events including expression of the machinery necessary for NO formation, which is essential for cell fate determination and guidance of maturation into neurons expressing specific neurotransmitter receptors (50).

Effects of B2BkR inhibition on final neural phenotype determination did not result in increased cell death rate or in the permanence of differentiating cells in the progenitor stage. Moreover, neurogenesis, measured by an increase in the number of  $\beta 3$ -tubulin<sup>+</sup> cells, augmented with the distance of migration from undifferentiated neurosphere cell aggregates, whereas cells that migrated less showed higher labeling for nestin and GFAP. Therefore, migration is linked directly to neuronal differentiation, and gliogenesis yet occurs due to proliferation of GFAP<sup>+</sup> cells. A direct participation of B2BkR in cell migration was confirmed with neurospheres isolated from *B2BkR* knock-out mice, where just as in the presence of HOE-140 migrated distances were reduced. On the other hand, changes in the percentages of  $\beta 3$ -tubulin<sup>+</sup> and GFAP<sup>+</sup> cells induced by chronic treatment with HOE-140 were not observed in primary cultures of postnatal cortex neurons indicating that effects only occur during neural development and not when final neural fate determination and differentiation have already happened.

A possible molecular mechanism for Bk-induced neural fate determination can be delineated by the expression of neural markers and transcription factors related to neurogenesis/gliogenesis switches *in vivo*. Wnt activation in proliferating neural progenitors followed by up-regulation of *Ngn1* expression promotes the expression of genes related to neurogenesis such as *NeuroD1* (53). At the same time, gliogenesis controlled by *Ngn1* is induced by activation of *Stat3* and expression of GFAP (54). Actually, the cooperation between Smad, Stat, and p300 protein is particularly effective for promoting gliogenesis in NPCs (55, 56). Associated to this molecular machinery, notch 1 regu-



lates interactions between physically adjacent cells and its activation leads to a potent inhibition of neurogenesis, whereas committing the cells to an astrocyte phenotype (57, 58). In this context, activation and inhibition of B2BkR can interfere with the expression and activity of some of these transcription factors, thereby changing cell fate. However, the cause-consequence relationship between B2BkR downstream signaling and the expression of neurogenic genes is not well understood.

Neurogenesis was even more enhanced when Bk was added to the culture medium together with captopril, increasing Bk half-life. In fact, this observation reveals new strategies for strengthening neurogenesis, even in the adult organism following insults like stroke and in neurodegenerative diseases. In view of that, stable B2BkR agonists and ACE inhibitors may gain therapeutic applications for cellular therapy. It is expected that these compounds will also induce endogenous neurogenesis and provide adequate niches for transplanted stem cells to survive.

Less  $\beta$ 3-tubulin expression during development of *B2BkR* knock-out animals points to crucial participation of B2BkR during *in vivo* neurogenesis, being in line with previous results showing that neurogenic activities of exogenously added kallikrein or kallikrein gene transfer in an animal model depends on B2BkR activity (59–61). Xia *et al.* (61) suggested that the insertion of tissue kallikrein genes by viral infection in newborn mice promotes ischemic neuroprotection by stimulating glial migration, neurogenesis, and inhibition of apoptosis in the injured area, mainly related to increased levels of phospho-Akt, Bcl-2, and NO, in addition to decreased activation of caspase-3. The observed effects can be explained by the increased availability of Bk and subsequent activation of B2BkR, because they were reversed by pretreatment with HOE-140. Such neuroprotective features were recently described for an *in vitro* model of hippocampal neurons where Bk reversed apoptosis induced by NMDA-mediated excitotoxicity (62).

Bk-induced changes in neural fate determination do not involve alterations in populations of excitatory glutamatergic and inhibitory GABAergic neurons nor of dopaminergic neurons as judged by comparison of global expression levels of neurotransmitters. These results agree with those of calcium imaging assays showing no interference with glutamate receptor activity following chronic treatment with HOE-140 along differentiation. On the other hand, purinergic and muscarinic acetylcholine-receptor expression and activity were affected by the presence of HOE-140. These results are again in line with the suggestion for neurogenic actions of Bk, having in mind that both receptor systems contribute to the progress of neuronal differentiation (63, 64).

França *et al.* (65) showed that expression of B2BkR increases during early rat organogenesis (E8) and stabilizes during fetal growth (E15). Most importantly, besides being strongly expressed in the whole nervous system during the neurogenic stage of embryo development, B2BkR-induced neurogenesis and inhibition of gliogenesis were conserved throughout different models of neurogenesis, even in iPS cells reprogrammed to pluripotency from adult somatic cells. Our work provides new tools for directing differentiating cells into homogeneous populations of neurons *in vitro* for posterior transplantation. In this

regard the results obtained with human iPS cells are extremely valuable. In summary, neurogenic properties of Bk described herein may open novel avenues for therapy of neurodevelopmental and neurodegenerative diseases.

## REFERENCES

- Rakic, P. (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**, 170–176
- Bayer, S. A., and Altman, J. (1991) *Neocortical Development*, First Ed., Raven Press, New York
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* **7**, 136–144
- Pearson, B. J., and Doe, C. Q. (2004) Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 619–647
- Campbell, K. (2005) Cortical neuron specification. It has its time and place. *Neuron* **46**, 373–376
- Muotri, A. R., and Gage, F. H. (2006) Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* **441**, 1087–1093
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., and Kessler, J. A. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**, 595–606
- Cameron, H. A., Hazel, T. G., and McKay, R. D. (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* **36**, 287–306
- Buznikov, G. A., Shmukler, Y. B., and Lauder, J. M. (1996) From oocyte to neuron. Do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell Mol. Neurobiol.* **16**, 537–559
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins. Kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 1–80
- Madeddu, P., Emanuelli, C., and El-Dahr, S. (2007) Mechanisms of disease. The tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **3**, 208–221
- Sainz, I. M., Pixley, R. A., and Colman, R. W. (2007) Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system. From protein structure and function to cell biology and *in vivo* pathophysiology. *Thromb. Haemost.* **98**, 77–83
- Walker, K., Perkins, M., and Dray, A. (1995) Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem. Int.* **26**, 1–16; discussion 17–26
- Raidoo, D. M., and Bhoola, K. D. (1998) Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol. Ther.* **79**, 105–127
- Calixto, J. B., Cabrini, D. A., Ferreira, J., and Campos, M. M. (2000) Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**, 1–5
- Kansui, Y., Fujii, K., Goto, K., and Abe, I. (2002) Bradykinin enhances sympathetic neurotransmission in rat blood vessels. *Hypertension* **39**, 29–34
- Eurin, J., Barthélemy, C., Masson, F., Soualmia, H., Sarfati, E., and Carayon, A. (2002) Bradykinin-induced neuropeptide Y release by human pheochromocytoma tissue. *Neuropeptides* **36**, 257–262
- Wang, H., Kohno, T., Amaya, F., Brenner, G. J., Ito, N., Allchorne, A., Ji, R. R., and Woolf, C. J. (2005) Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J. Neurosci.* **25**, 7986–7992
- Martins, A. H., Resende, R. R., Majumder, P., Faria, M., Casarini, D. E., Tárnok, A., Colli, W., Pesquero, J. B., and Ulrich, H. (2005) Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *J. Biol. Chem.* **280**, 19576–19586
- Borkowski, J. A., Ransom, R. W., Seabrook, G. R., Trumbauer, M., Chen, H., Hill, R. G., Strader, C. D., and Hess, J. F. (1995) Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J. Biol. Chem.* **270**, 13706–13710
- Negraes, P. D., Schwindt, T. T., Trujillo, C. A., and Ulrich, H. (2011) Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres, cell morphology, proliferation, viability and functionality. *Curr. Protoc. Stem. Cell Biol.* **2**, 2D.9
- Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y.,

## Kinin-B2 Receptors Modulate Neural Differentiation

- Chen, G., Gage, F. H., and Muotri, A. R. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* **143**, 527–539
23. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872
24. Martins, A. H., Alves, J. M., Trujillo, C. A., Schwindt, T. T., Barnabé, G. F., Motta, F. L., Guimaraes, A. O., Casarini, D. E., Mello, L. E., Pesquero, J. B., and Ulrich, H. (2008) Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry A* **73**, 361–368
25. Schwindt, T. T., Trujillo, C. A., Negraes, P. D., Lameu, C., and Ulrich, H. (2011) Directed differentiation of neural progenitors into neurons is accompanied by altered expression of P2X purinergic receptors. *J. Mol. Neurosci.* **44**, 141–146
26. McLaren, F. H., Svendsen, C. N., Van der Meide, P., and Joly, E. (2001) Analysis of neural stem cells by flow cytometry, cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. *J. Neuroimmunol.* **112**, 35–46
27. Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowitz, D. (1995) Expression of a  $\delta$  homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787–790
28. Estrada, C., and Murillo-Carretero, M. (2005) Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* **11**, 294–307
29. Cárdenas, A., Moro, M. A., Hurtado, O., Leza, J. C., and Lizasoain, I. (2005) Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* **50**, 1–6
30. Lameu, C., Trujillo, C. A., Schwindt, T. T., Negraes, P. D., Pillat, M. M., Morais, K. L., Lebrun, L., and Ulrich, H. (2012) Interactions between the NO-citrulline cycle and BDNF in differentiation of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 29690–29701
31. Hagg, T. (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis, an integrated view. *Trends. Neurosci.* **28**, 589–595
32. Ma, D. K., Ming, G. L., and Song, H. (2005) Glial influences on neural stem cell development, cellular niches for adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 514–520
33. Ghashghaei, H. T., Lai, C., and Anton, E. S. (2007) Neuronal migration in the adult brain. Are we there yet? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 141–151
34. Purkiss, J., Murrin, R. A., Owen, P. J., and Boarder, M. R. (1991) Lack of phospholipase D activity in chromaffin cells, bradykinin-stimulated phosphatidic acid formation involves phospholipase C in chromaffin cells but phospholipase D in PC12 cells. *J. Neurochem.* **57**, 1084–1087
35. Bush, A. B., Borden, L. A., Greene, L. A., and Maxfield, F. R. (1991) Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *J. Neurochem.* **57**, 562–574
36. Kozlowski, M. R., Rosser, M. P., Hall, E., and Longden, A. (1989) Effects of bradykinin on PC-12 cell differentiation. *Peptides* **10**, 1121–1216
37. Reber, B. F., and Schindelhof, B. (1996) Detection of a trigger zone of bradykinin-induced fast calcium waves in PC12 neurites. *Pflugers. Arch.* **432**, 893–903
38. Lorenzon, P., Zacchetti, D., Codazzi, F., Fumagalli, G., Meldolesi, J., and Grohovaz, F. (1995)  $Ca^{2+}$  waves in PC12 neurites. A bidirectional, receptor-oriented form of  $Ca^{2+}$  signaling. *J. Cell Biol.* **129**, 797–804
39. Bertram, C. M., Baltic, S., Misso, N. L., Bhoola, K. D., Foster, P. S., Thompson, P. J., and Fogel-Petrovic, M. (2007) Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular  $Ca^{2+}$  and cell migration. *J. Leukocyte Biol.* **81**, 1445–1454
40. Lu, D. Y., Leung, Y. M., Huang, S. M., and Wong, K. L. (2010) Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J. Cell Biochem.* **110**, 141–150
41. Yang, W. H., Chang, J. T., Hsu, S. F., Li, T. M., Cho, D. Y., Huang, C. Y., Fong, Y. C., and Tang, C. H. (2010) Bradykinin enhances cell migration in human chondrosarcoma cells through Bk receptor signaling pathways. *J. Cell Biochem.* **109**, 82–92
42. Gallego, M. J., Porayette, P., Kaltcheva, M. M., Meethal, S. V., and Atwood, C. S. (2009) Opioid and progesterone signaling is obligatory for early human embryogenesis. *Stem Cells Dev.* **18**, 737–740
43. Porayette, P., Gallego, M. J., Kaltcheva, M. M., Bowen, R. L., Vadakkadath Meethal, S., and Atwood, C. S. (2009) Differential processing of amyloid- $\beta$  precursor protein directs human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuronal precursor cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 23806–23817
44. Nitsch, R. M., Kim, C., and Growdon, J. H. (1998) Vasopressin and bradykinin regulate secretory processing of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **23**, 807–814
45. Racchi, M., Ianna, P., Binetti, G., Trabucchi, M., and Govoni, S. (1998) Bradykinin-induced amyloid precursor protein secretion. A protein kinase C-independent mechanism that is not altered in fibroblasts from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem. J.* **330**, 1271–1275
46. Burnstock, G., and Ulrich, H. (2011) Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol. Life. Sci.* **68**, 1369–1394
47. Scemes, E., Duval, N., and Meda, P. (2003) Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J. Neurosci.* **23**, 11444–11452
48. Lin, J. H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A., and Nedergaard, M. (2007) Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.* **302**, 356–366
49. Ulrich, H., Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (2012) Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells, implications for CNS development and repair. *Stem Cell Rev.* **8**, 755–767
50. Packer, M. A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., Goldman, S. A., and Enkolopov, G. (2003) Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9566–9571
51. Gibbs, S. M. (2003) Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol. Neurobiol.* **27**, 107–120
52. Covacu, R., Danilov, A. I., Rasmussen, B. S., Hallén, K., Moe, M. C., Lobell, A., Johansson, C. B., Svensson, M. A., Olsson, T., and Brundin, L. (2006) Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astroglialogenesis. *Stem Cells* **24**, 2792–2800
53. Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D. J. (1999) Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* **13**, 1717–1728
54. Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365–376
55. Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hintsatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999) Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* **19**, 5429–5434
56. Foshay, K. M., and Gallicano, G. I. (2008) Regulation of Sox2 by STAT3 initiates commitment to the neural precursor cell fate. *Stem Cells Dev.* **17**, 269–278
57. Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D. J. (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**, 499–510
58. Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H., and Honjo, T. (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**, 45–55
59. Ling, L., Hou, Q., Xing, S., Yu, J., Pei, Z., and Zeng, J. (2008) Exogenous kallikrein enhances neurogenesis and angiogenesis in the subventricular zone and the peri-infarction region and improves neurological function after focal cortical infarction in hypertensive rats. *Brain Res.* **1206**, 89–97
60. Xia, C. F., Yin, H., Borlongan, C. V., Chao, L., and Chao, J. (2004) Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension* **43**, 452–459
61. Xia, C. F., Yin, H., Yao, Y. Y., Borlongan, C. V., Chao, L., and Chao, J. (2006) Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Hum. Gene Ther.* **17**, 206–219
62. Martins, A. H., Alves, J. M., Perez, D., Carrasco, M., Torres-Rivera, W., Eterović, V. A., Ferchmin, P. A., and Ulrich, H. (2012) Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the

- presence of kinin-B1 receptor agonists. *PLoS One* **7**, e30755
63. Resende, R. R., Alves, A. S., Britto, L. R., and Ulrich, H. (2008) Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 1429–1443
64. Resende, R. R., Britto, L. R., and Ulrich, H. (2008) Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 763–777
65. França, C. E., Vicari, C. F., Piza, A. M., Geroldo, E. A., Beçak, M. L., Beçak, W., Stocco, R. C., and Lindsey, C. J. (2010) The kinin B(2) receptor gene structure, product processing and expression in adult and fetal rats. Evidence for gene evolution. *Genet. Mol. Res.* **9**, 215–230
66. Ueno, S., Yamada, H., Moriyama, T., Honda, K., Takano, Y., Kamiya, H. O., and Katsuragi, T. (2002) Measurement of dorsal root ganglion P2X mRNA by SYBR Green fluorescence. *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* **10**, 95–101
67. Lugo-Garcia, L., Filhol, R., Lajoix, A. D., Gross, R., Petit, P., and Vignon, J. (2007) Expression of purinergic P2Y receptor subtypes by INS-1 insulinoma beta-cells. A molecular and binding characterization. *Eur. J. Pharmacol.* **568**, 54–60
68. Bortone, F., Santos, H. A., Albertini, R., Pesquero, J. B., Costa, M. S., and Silva, J. A., Jr. (2008) Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 206–210
69. Wang, L., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Jiao, Z. X., Wang, Y., Pourabdollah-Nejad, D., LeTourneau, Y., Gregg, S. R., and Chopp, M. (2006) Neurogenin 1 mediates erythropoietin enhanced differentiation of adult neural progenitor cells. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **26**, 556–564
70. Zheng, H., Zeng, Y., Chu, J., Kam, A. Y., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2010) Modulations of NeuroD activity contribute to the differential effects of morphine and fentanyl on dendritic spine stability. *J. Neurosci.* **30**, 8102–8110
71. Lakner, A. M., Moore, C. C., Gulledge, A. A., Schrum, L. W. (2010) Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J. Gastroenterol.* **16**, 5047–5056