

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

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

**RODRIGO RIBEIRO RESENDE**

**Estudo das Bases Mecanísticas da Diferenciação Neuronal  
Mediada pela Atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos Receptores  
Purinérgicos e Colinérgicos**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
09/04/2007

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

**Estudo das Bases Mecanísticas da Diferenciação Neuronal  
Mediada pela Atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos Receptores  
Purinérgicos e Colinérgicos**

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

*Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich*

São Paulo  
27/04/2007

**“Estudo das bases mecánísticas da diferenciação neuronal mediada pela atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos receptores purinérgicos e colinérgicos”**

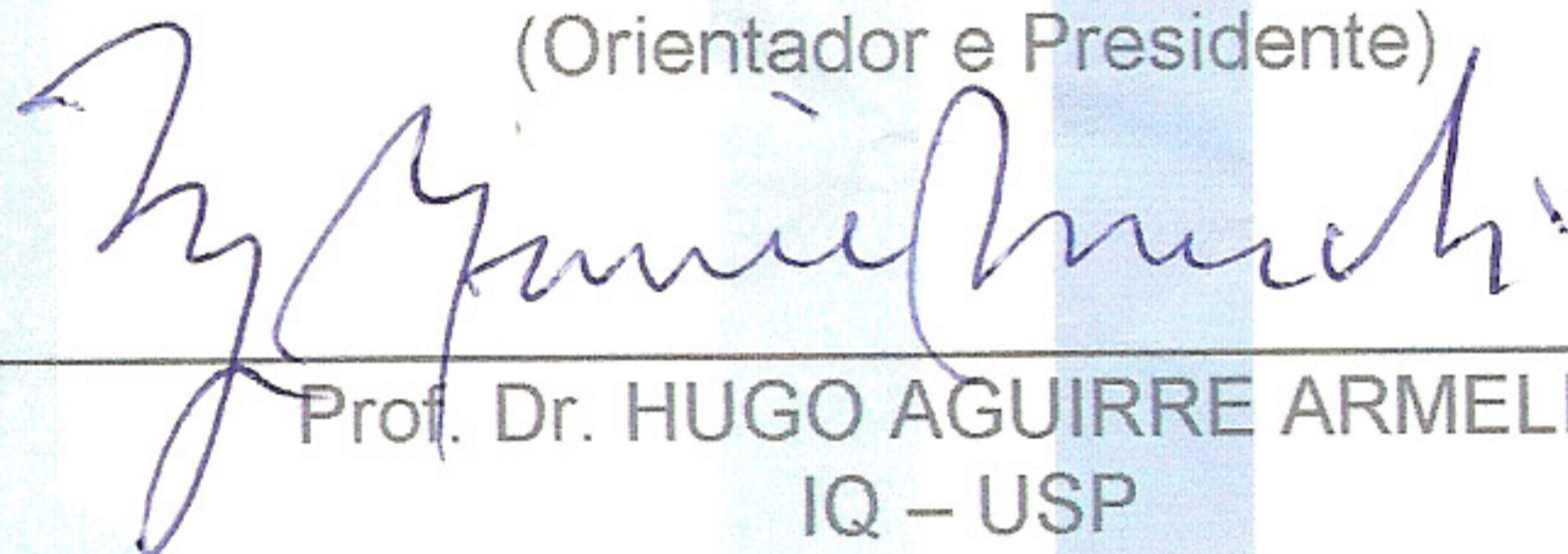
**RODRIGO RIBEIRO RESENDE**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

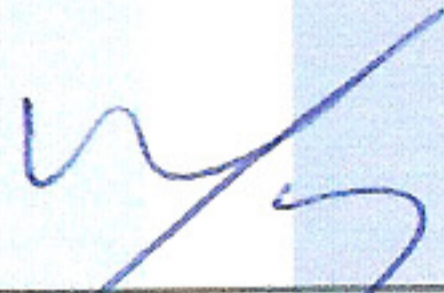
Aprovado(a) por:



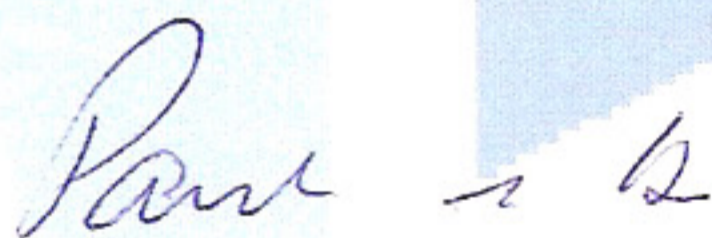
Prof. Dr. ALEXANDER HENNING ULRICH  
(Orientador e Presidente)



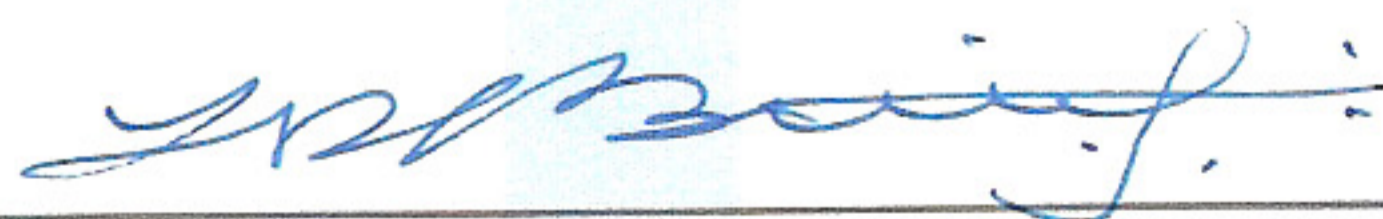
Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN  
IQ – USP



Prof. Dr. ROY EDWARD LARSON  
FMRP – USP



Prof. Dr. PAULO LEE HO  
Butantan



Prof. Dr. LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITTO  
ICB – USP

SÃO PAULO  
27 DE ABRIL 2007

### ***Dedicatórias***

Dedico esta Tese à fidelidade, à dignidade, à simplicidade, à maturidade, ao respeito, à felicidade, ao apoio incondicional, a cada dia de minha vida que aprendi essas virtudes com meus queridos pais, Neusa e José Maria, e com minha mulher amada, Katinha.

## **AGRADECIMENTOS**

**À DEUS, onipotente, oniciente e onipresente.**

**Aos meus pais, Neusa Ribeiro de Resende e José Maria de Resende, pelo carinho, cuidado, atenção.... Na verdade, todos os adjetivos do mundo não seriam suficientes para definir vocês.**

**À minha noiva Kátia Neves Gomes, sem você, eu não estaria aqui neste momento para escrever isto.**

**Ao amigo Dr. Alexander Henning Ulrich, por ter me aceito em seu laboratório.**

**Ao meu caro amigo Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti Britto, sem você esta tese não teria sido possível. Uma das poucas pessoas que considero como sendo um cientista.**

**À minha banca (em ordem de argüição), professores doutores, Luiz Roberto Giorgetti Britto, Roy Edward Larson, Paulo Lee Ho, Hugo Aguirre Armelin. Exemplo de honestidade, dedicação, sabedoria e inteligência, os senhores são dignos de serem chamados de cientistas.**

**Aos meus sogros, Maria das Neves Gomes e Antônio Gomes, os responsáveis pelo presente mais precioso que tenho.**

**À Tutuzinha, tios e tias, Binho, primos e *in memoriam* (Gabriel).**

**Aos meus amigos de República e consignatários, Igo Dutra (Loko), José Luiz da Costa (Zé Piraaaaanha), Ravanez Nicael Jonas, Delano, Arquimedes Scheffer, José Antônio Tavares (Perna), Márcios (Baianos), Paulo, Eduardo, Cristiano.**

**Aos meus amigos do IQ, Marcelo Padilha, Diorge, Fabiane Caçado, Avishek, Lúcio, Adriano e a todos os outros dos quais eu não me lembro o nome, mas que de alguma forma estão na minha memória.**

**Aos amigos da secretaria do IQ, Emiliano, Milton, Cibele, Viviane, Simone, Marcelo.**

**Aos meus amigos de laboratório, Paromita Majumder, Kátia Yuahasi, Cristiane Ribeiro, Hugo Torres, Adilson Alves da Silva, Erika Kinjo, Maria Fernanda, Rogério Lauria da Silva, Camila, Zilda e Cristielle.**

**Aos meus amigos, Reinaldo Barreto da Silva, Milton, Beto, Castrão, Everton, Ralph, que não posso dizer de onde são.... mas contribuíram para que eu pudesse morar em São Paulo.**

**Aos meus irmãos e grandes amigos, Ramon Pardini Júnior, Eduardo Batista (Bragança), Fábio de Medeiros Júnior (Fabinho bola oito), Luís Barreto (Luís doido), Juliano (Marião), Jaila Borges.**

**Aos meus amigos de Alfenas, são muuuuuuuitos, Gusmão, Clevinho, Broa, Júnior, Daniel, PF, Nanico, Tenê, Toninho, André, Pablo, Bruninho, Japonês, Feliciano, Azenilto, Samuel, Musgo, Samuca, Vandinho, Giba, Rodrigão E MUITOS OUTROS...**

**Aos amigos da Igreja Batista de Pinheiros, que ao contrário de outros, me receberam sem questionamentos.**

**Aos profs. Etelvino Bechara, Maria Teresa Miranda, Maurício Baptista, Paulo Lee Ho, Chuck Farah, Júlia Manso Alves, Walter Colli, Sandro Marana, Stevens Rehen, Soraya Smaili, Marcella Faria, Carol Elias, Luiz Eduardo Ribeiro do Valle.**

**Aos amigos, Prof. Dr. Pedro Vitoriano e Dr. Adrialdo, que me ajudaram sem prerrogativas, sabendo que, com nada, eu poderia lhes recompensar.**

**Aos contratempos da vida, muitos de vocês, sem saberem, me fortaleceram e encorajaram a seguir em frente sem parar. Talvez, a limitação de cada um seja a responsável pela falta de cumplicidade e o desejo inexorável de desfazer dos outros.**

**Aos meus Profs. e amigos de Alfenas, Glenan Singi, Masaharu, Eliane, Ruth, Tonhão, Maria Eliza, Doquinha (Lázaro), grande Doquinha, Leite, Marcelo Polo, Maísa, Maria de Fátima, Vinícius, Senhor (Sebastião Martins) pela competência e excelência no ensino.**

**Ao Prof. Oswaldo Ribeiro da UFV, pela inspiração.**

**Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento da minha bolsa.**

**Ao povo brasileiro, que verdadeiramente, é quem financia tudo isso.**

Devo contar uma historinha, de onde surgiu meu interesse pela ciência. Quando lá pelos meus 4, 5 anos de idade, meu pai levava-me ao laboratório da antiga "Sucan", onde fazia a identificação das larvas de mosquitos vetores da dengue. Isto já me incentivou a ir atrás de perguntas mais complexas e, por conseqüência, saber que teria que buscar as respostas por mim, para não chatear ninguém... é a idade dos porquês... Outra ocasião foi indo com a minha mãe para a faculdade, em outra cidade e à noite, vendo sua luta e persistência para melhorarmos de vida.

Grandes exemplos que me sustentam até hoje e que me ensinam a nunca desistir.

Seguida então da minha entrada no cursinho pré-vestibular, que na verdade, nós os alunos brincávamos que era um bando de pessoas que acharam alguns livros de um cursinho e aproveitaram para dar um golpe.... Bom, eles não tinham culpa, era o primeiro ano deles.... No entanto, um professor percebeu o esforço que vinha fazendo para aprender tudo o que não tinha aprendido antes... Não por não ter estudado, mas por ter feito colégio técnico em processamento de dados... e tudo era novidade, e como tal, não poderiam faltar dúvidas e perguntas.... e para variar, vamos aos livros....

Tudo o que precisamos é um pouco de reconhecimento e de inspiração, foi observando o professor Oswaldo Ribeiro que tive vontade de aprender mais e mais... a correr atrás das respostas para as minhas perguntas. Um grande homem, sabia de tudo a respeito do assunto em que pesquisava e das matérias básicas, que muitos nem na lembrança deixam, talvez por preguiça, talvez pelo limite de informação que cada um tem para guardar. Assim, tive mais alguém em quem me espelhar.

Veio então a faculdade... Melhor escolha do que Farmácia não tinha... Um curso que estuda todas as áreas do conhecimento... Lógico, basta você querer... por isso larguei medicina na UFMG. Solavancos, trancos e barrancos, passei por muita impaciência e incompreensão, vendo pessoas despreparadas querendo ser chamadas de professores, mas, como toda regra há exceção... vários nomes surgiram para me apoiar.

Entre eles estava um grande gênio. Aquele Professor realmente era um célebre dentre os seus. O Glenan foi este cara. Outro grande a quem me espelhar.

Veio então a pós-graduação. Como poderia eu querer uma chance melhor do que essa para responder às minhas perguntas?!...

Primeiro, um impacto. Será que consigo ao menos me igualar ao que apresentam ser?...

Que decepção... Pensei que iria encontrar outros célebres dentre os seus, infelizmente muitos não foram ou o são assim. Assédio, arrogância, desrespeito, prepotência, incompetência, entre outros... Não é nada agradável escrever isso...

E como toda história se repete, encontrei pessoas incríveis que faziam ciência e não a tentavam deglutir, regurgitando-a depois. Mais um nome em que eu deveria me espelhar e refletir sobre a ciência, Britto. Homens de ciência são assim, forma-se em um curso, sabem de todas as áreas equivalentes, ampliam seu saber para outras áreas que nada teria haver. Aceitam desculpas e as ofertam. Respeito mútuo, por que sabem que as perguntas mais simples são as mais interessantes, surgem de pessoas que, talvez, nada podiam esperar...

A idéia e o propósito deste trabalho surgiram quando das minhas aulas de Bioquímica, na graduação do curso de Farmácia, lá pelos meados de 1997. Uma pergunta que sempre me instigava era por que existiam tantos receptores diferentes na membrana celular, que poderiam formar canais iônicos ou estariam acoplados à proteína G, sendo que respondiam a um mesmo agonista. Foi quando percebi, após estudar, que havia até um paradoxo nesta pergunta, já que vários agonistas diferentes atuando em diferentes receptores poderiam levar a uma mesma resposta, já que estes receptores estavam acoplados a segundos mensageiros comuns entre eles. Foi então que percebi que a resposta da transdução do sinal extracelular para o intracelular levava à elevação na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , e que este íon poderia modular várias, se não todas as respostas fisiológicas. Depois de muito tempo fiquei sabendo, por um colega, que havia uma pessoa no Instituto de Química da USP que trabalhava com uma linhagem celular que poderia se diferenciar em células dos três folhetos germinativos. Então, pedi a alguns professores que me indicassem a ele para fazer pós-graduação em seu laboratório. Bom, este professor pretendia estudar a diferenciação neuronal e, como este tema já era um grande deleite para mim... Não pensei duas vezes e vim fazer a pós naquele laboratório. Foi quando, após ter escrito o projeto de doutorado, encontrei um artigo de Spitzer e cols. (2004) Trends Neurosci., em que ele descrevia o mesmo modelo que havia eu imaginado lá no meu segundo período de graduação... Imaginei, nasci dez anos atrasados.... Ao menos, o que havia proposto, um renomado cientista também o fez só que, 10 anos depois... rrsrs. Foi assim, que comecei a planejar, elaborar e a fazer meu experimento quietinho, caladinho, até chegar hoje. Espero que, o que será apresentado aqui, ajude a elucidar uma pequenina parcela dos inúmeros segredos que nos aguardam entre a Terra e o Céu.



## RESUMO

(Resende, R.R.) **Estudo das Bases Mecanísticas da Diferenciação Neuronal Mediada pela Atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos Receptores Purinérgicos e Colinérgicos**. 2007. 178p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Muitos subtipos de receptores são ativados pelo mesmo ligante, mas estão acoplados a diferentes mensageiros secundários podendo produzir sinalização divergente em uma célula, enquanto receptores ativados por diferentes ligantes, mas que compartilham o mesmo mensageiro secundário, podem produzir sinalização convergente. Para examinar as bases mecánísticas que influenciam a proliferação e a diferenciação celular determinamos as funções de liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e a excitabilidade celular mediada pelos receptores purinérgicos e colinérgicos utilizando imageamento de cálcio por microscopia confocal. Para tanto, caracterizamos a participação dos subtipos  $\text{P2X}_{1-7}$  e  $\text{P2Y}_{1,2,4,6}$  de receptores purinérgicos aos níveis dos transcritos de mRNA e de expressão protéica, assim como pela atividade de induzir os transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , aumento na concentração livre de cálcio intracelular, durante a diferenciação neuronal de células P19 de carcinoma embrionário, que foram utilizadas como modelo *in vitro* para o desenvolvimento neuronal precoce. Em células embriônicas os receptores  $\text{P2Y}_{1,2}$ ,  $\text{P2X}_4$  ou os heteromultímeros de  $\text{P2X}$  com farmacologia semelhante ao do receptor  $\text{P2X}_4$  foram os responsáveis pelos transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP e seus análogos. Ao término da diferenciação neuronal, os receptores  $\text{P2Y}_{2,6}$  e  $\text{P2X}_2$  foram os principais mediadores das respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Obtivemos evidências do envolvimento destes receptores na indução da proliferação tanto de células embriônicas como de progenitores neuronais, por ensaios de incorporação de BrdU, e da indução da diferenciação neuronal das células progenitoras, na presença de vários agonistas e antagonistas de receptores purinérgicos. Como resultado desses estudos, a regulação da proliferação e diferenciação celular foi principalmente devida aos subtipos de receptores  $\text{P2Y}_1$  e  $\text{P2Y}_2$ , já que estes efeitos foram eliminados após a depleção dos depósitos intracelulares de cálcio e pela demonstração de que estes eram os possíveis receptores funcionais.

Entre os receptores colinérgicos, fornecemos evidências para a expressão de receptores nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (mAChRs) funcionais durante a diferenciação de células P19. Detectamos a expressão e a atividade dos subtipos de nAChRs formados pelos subtipos  $\alpha_2$ - $\alpha_7$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_4$  e  $M_1$ - $M_3$  e  $M_5$  de mAChRs durante a diferenciação neuronal. As respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelos agonistas dos nAChRs foram observadas em células P19 embriônicas e neuronais. As respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos receptores muscarínicos, em níveis próximos aos basais em células embriônicas, aumentaram durante a diferenciação. As elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelos nAChRs em células indiferenciadas foram devidas ao influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular. Em células diferenciadas em neurônios, os aumentos de transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelos nAChRs foram parcialmente inibidos após o pré-tratamento das células com a rianodina, enquanto as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos mAChR não foram afetadas na presença deste composto, sugerindo uma contribuição da liberação de  $Ca^{2+}$  a partir dos depósitos de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina para as elevações mediadas pelos nAChRs. Demonstramos também, que a nicotina, agindo através dos nAChRs, inibiu a proliferação em células embriônicas, porém, a induziu em células progenitoras neuronais pela mobilização de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares. A muscarina induziu em células embriônicas o aumento na proliferação via mAChRs acoplados às proteínas  $G\alpha_{q/11}$ , e promoveu a diferenciação neuronal via  $M_2$  mAChRs em células precursoras neuronais. Estes dados sugeriram que a acetilcolina agindo via mAChR funciona como um mitógeno que ativa as proteínas quinases de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e que poderia estar envolvida na síntese de DNA durante os estágios iniciais da neurogênese.

Nós ainda provemos evidências que as oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  são características para cada estágio da diferenciação e são iniciadas pela liberação de  $Ca^{2+}$  mediada pelo  $IP_3$ . As análises da determinação do fenótipo neuronal na presença de vários inibidores da transdução do sinal induzido pelo cálcio residem na liberação de  $Ca^{2+}$  induzida pelo  $IP_3$  é necessária para o progresso da diferenciação neuronal. Assim, os sinais espontâneos de  $[Ca^{2+}]_i$  são propriedades intrínsecas das células em diferenciação. A modulação de sua frequência e amplitudes específica a aquisição de um fenótipo de célula neuronal.

**Palavras-chave:** Diferenciação neuronal, proliferação celular, receptores purinérgicos, receptores colinérgicos, sinalização de cálcio, eventos espontâneos de cálcio.

## ABSTRACT

(Resende, R.R.) **Study of Mechanistic Bases of Neuronal Differentiation Mediated by Ca<sup>2+</sup> Activity through Purinergic and Cholinergic Receptors.** 2007. 178p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Various receptors subtypes are activated by the same ligand although coupled to different second messengers. These receptors act either by inducing divergent signaling in one cell, whereas in another cell different receptors may stimulate the very same pathways producing convergent signaling. We have characterized intracellular Ca<sup>2+</sup>- release and -influx mediated by purinergic and cholinergic receptors using calcium imaging by confocal microscopy to evaluate the mechanistic bases which influence cell proliferation and differentiation. We have characterized the participation of purinergic subtypes P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>1,2,4,6</sub> receptor subtypes at mRNA transcription and protein expression levels as well as receptor-induced changes in free intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells as an *in vitro* model for early neuronal development. The participation of individual P2X and P2Y receptor subtypes in the differentiation process was studied by employing different available purinergic receptor agonists and antagonists. In embryonic cells, P2Y<sub>1,2</sub>, P2X<sub>4</sub> receptors, or P2X-heteromultimers with similar P2X<sub>4</sub> pharmacology were responsible for ATP and ATP-analog-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients. Following completion of neuronal differentiation, P2Y<sub>2,6</sub> receptors and P2X<sub>2</sub> subtypes were the major mediators of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-response. Regulation of cell proliferation and differentiation of P19 embryonic and progenitor cells was mostly due to P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptor activation, as these effects were abolished following depletion of intracellular calcium stores, and they are probably the unique functional P2Y receptors at these stages of differentiation.

We also provide evidence for expression of functional nicotinic (nAChRs) and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) during neuronal differentiation of P19 cells. We have detected expression and activity of nAChRs formed by the subunits  $\alpha_2$ - $\alpha_7$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_4$ , and M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub> and M<sub>5</sub> mAChR subtypes along the differentiation process. Receptor response in terms of nicotinic agonist-evoked Ca<sup>2+</sup> flux was observed in embryonic and neuronal-differentiated

cells. However, mAChRs-induced calcium responses, merely present in undifferentiated P19 cells, increased during neuronal differentiation. The nAChR-induced  $[Ca^{2+}]_i$  response in undifferentiated cells was due to  $Ca^{2+}$  influx. However, in differentiated P19 neurons the nAChR-induced  $[Ca^{2+}]_i$  response was partially inhibited following pretreatment of the cells with ryanodine, while the mAChR-induced response remained unaffected, suggesting the contribution of  $Ca^{2+}$  release from ryanodine-sensitive stores to nAChR- but not mAChR-mediated  $Ca^{2+}$  responses. The presence of functional nAChRs in embryonic cells suggests that these receptors are involved in triggering  $Ca^{2+}$  waves during initial neuronal differentiation. In the present study we have also shown that nicotine, acting via nAChRs, inhibited proliferation in embryonic cells, but induced cell division of progenitor cells by  $Ca^{2+}$  mobilization from internal stores. Stimulation of progenitor cells by muscarine led to an increase in DNA synthesis mainly resulting from activation of  $G_{\alpha_{q/11}}$ -coupled mAChRs. Muscarine as well promoted differentiation of neural precursor cells by activation of  $M_2$  mAChRs subtypes. These data suggest that acetylcholine, acting via mAChRs, functions as a mitogen during early neurogenesis.

We also provide evidence that oscillations of  $[Ca^{2+}]_i$  as characteristics for the respective stage of differentiation are initiated by triphosphate inositol ( $IP_3$ )-mediated  $Ca^{2+}$ -release. Neuronal cell fate determination analysis in the presence of various inhibitors of calcium-induced signal transduction underlined that  $IP_3$ -mediated  $Ca^{2+}$ -release is necessary for neuronal differentiation progress. Thus, spontaneous  $Ca^{2+}$ -signals are an intrinsic property of differentiating neural precursor cells. Modulation of their frequency and amplitude is believed to direct the acquisition of a defined neuronal phenotype.

**Keywords:** Neuronal differentiation, cell proliferation, purinergic receptors, cholinergic receptors, calcium signaling, spontaneous calcium events.

## LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

<b>Tabela I:</b> Iniciadores usados para a amplificação dos subtipos de receptores P2X e P2Y para as reações de RT-PCR e PCR em tempo real.....	28
<b>Tabela II:</b> Iniciadores usados para a amplificação das subunidades de receptores nAChRs e para os subtipos de receptores mAChRs para as reações de RT-PCR e PCR em tempo real....	29
<b>Tabela III:</b> Iniciadores usados para a amplificação dos marcadores de células progenitoras neuronais (nestin) e neuronais maduras (enolase neurônio-específico).....	30
<b>Tabela IV:</b> Expressão dos marcadores fenotípicos da diferenciação neuronal em células P19.....	44
<b>Tabela V:</b> Valores de EC <sub>50</sub> da ativação dos receptores purinérgicos em células P19 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios.....	54
<b>Tabela VI:</b> Valores de EC <sub>50</sub> da ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina em células P19 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios.....	91
<b>Tabela VII:</b> Valores das constantes de inibição (pK <sub>i</sub> ) de antagonistas dos receptores muscarínicos para as respostas de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> induzidas pela muscarina em células P19 neuronais.....	100
<b>Tabela VIII:</b> Variações nas respostas de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> induzidas pela nicotina após a pré-incubação das culturas celulares com CPA.....	102
<b>Tabela IX:</b> Média dos números totais de células que apresentaram os eventos local e global da atividade de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> durante a diferenciação neuronal de células P19.....	136
<b>Tabela X:</b> Médias das frequências de eventos globais e locais da atividade de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> por célula durante a diferenciação neuronal de células P19.....	136
<b>Tabela XI:</b> Médias das Δ[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> relativas máximas dos eventos globais e locais da atividade de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> durante a diferenciação neuronal de células P19.....	138

<b>Figura 1:</b> Detecção do fenótipo celular durante a diferenciação neuronal das células P19.....	45
<b>Figura 2:</b> Detecção do perfil da expressão gênica dos subtipos de receptores P2X e P2Y durante a diferenciação neuronal das células P19 por RT-PCR.....	47
<b>Figura 3:</b> Quantificação da transcrição do mRNA dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 através do PCR em tempo real.....	48
<b>Figura 4:</b> Detecção dos perfis de expressão dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 pela marcação imunocitoquímica e Western-blot.....	51
<b>Figura 5:</b> Elevação na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela ativação dos receptores P2X e P2Y em células P19 embriônicas e neuronais do oitavo dia da diferenciação.....	52
<b>Figura 6:</b> Curvas dose-resposta ( $EC_{50}$ ), em células P19 indiferenciadas e neuronais do oitavo dia da diferenciação, produzidas pela ativação dos receptores purinérgicos.....	55
<b>Figura 7:</b> Caracterização das elevações na $[Ca^{2+}]_i$ mediadas pelos receptores purinérgicos em células P19 embriônicas e neuronais.....	56
<b>Figura 8:</b> Respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediadas pelos receptores purinérgicos metabotrópicos em ambos os estágios da diferenciação, embrionário e neuronal maduro.....	59
<b>Figura 9:</b> Delineação das respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos receptores P2X e P2Y em células P19 embrionárias e neuronais.....	60
<b>Figura 10:</b> Participação dos receptores P2X e P2Y nas respostas de $[Ca^{2+}]_i$ em células P19 embriônicas.....	61
<b>Figura 11:</b> Receptores P2Y acoplados à proteína $G\alpha_{q/11}$ mediam respostas de $[Ca^{2+}]_i$ em células P19 embriônicas e neuronais.....	63
<b>Figura 12:</b> Participação dos receptores P2X e P2Y na indução das respostas de $[Ca^{2+}]_i$ em células P19 neuronais.....	65

<b>Figura 13:</b> Dupla marcação de receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 por imunofluorescência.....	68
<b>Figura 14:</b> Efeitos proliferativos induzidos por agonistas dos receptores purinérgicos foram avaliados pela incorporação de BrdU pelas células P19 embriônicas.....	70
<b>Figura 15:</b> Efeitos dos agonistas e antagonistas purinérgicos sobre a proliferação de células P19 embriônicas.....	72
<b>Figura 16:</b> Efeito do ATP na presença do inibidor da PLC e de quelantes de $Ca^{2+}$ na proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais.....	75
<b>Figura 17:</b> Detecção do perfil da expressão gênica dos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19 pela RT-PCR.....	88
<b>Figura 18:</b> Quantificação dos níveis de transcrição dos mRNAs dos receptores colinérgicos pela PCR em tempo real.....	89
<b>Figura 19:</b> Detecção do perfil de expressão dos receptores colinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 por marcações imunocitoquímicas.....	90
<b>Figura 20:</b> Respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina das células P19 embriônicas e neuronais do dia 8 da diferenciação.. ..	93
<b>Figura 21:</b> Respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas na presença ou ausência de $Ca^{2+}$ extracelular livre.....	96
<b>Figura 22:</b> Caracterização das elevações na $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) em neurônios P19.....	98
<b>Figura 23:</b> Efeito dos antagonistas dos receptores muscarínicos nas respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pela muscarina (300 $\mu$ M) em células P19 diferenciadas em neurônios.....	101



<b>Figura 24:</b> Dependência da ativação dos receptores nicotínicos nos depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis à rianodina em neurônios P19.....	103
<b>Figura 25:</b> A ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina em neurônios P19 resulta na liberação de $\text{Ca}^{2+}$ a partir dos depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ .....	104
<b>Figura 26:</b> Identificação dos subtipos de nAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19 por imunofluorescência.....	106
<b>Figura 27:</b> Efeitos proliferativos induzidos por agonistas dos receptores colinérgicos foram avaliados pela incorporação de BrdU pelas células P19 embriônicas.....	108
<b>Figura 28:</b> Efeitos da nicotina e seus bloqueadores da sinalização de cálcio na proliferação de células P19 embriônicas.....	111
<b>Figura 29:</b> Indução da proliferação e diferenciação neuronal pelos subtipos específicos de mAChRs.....	112
<b>Figura 30:</b> Vias de sinalização na indução da proliferação de células progenitoras neuronais pela nicotina.....	117
<b>Figura 31:</b> Exemplos de eventos espontâneos locais e globais de sinais de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em neurônios P19 do oitavo dia da diferenciação neuronal.....	135
<b>Figura 32:</b> Atividade de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ medida por microscopia confocal. A ocorrência de eventos espontâneos de alterações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no corpo e nos prolongamentos celulares.....	137
<b>Figura 33:</b> Detecção dos perfis de expressão de marcadores de células neuronais maduras durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem $\text{Ca}^{2+}$ livre extracelular por imunocitoquímica e Western blot.....	139
<b>Figura 34:</b> Detecção dos perfis de expressão dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem $\text{Ca}^{2+}$ livre extracelular pela marcação imunocitoquímica.....	140

<b>Figura 35:</b> Detecção dos perfis de expressão das subunidades dos receptores nicotínicos durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem $\text{Ca}^{2+}$ livre extracelular pela marcação imunocitoquímica.....	141
<b>Figura 36:</b> Análise da participação dos depósitos, extra e intracelulares, de $\text{Ca}^{2+}$ na produção dos eventos espontâneos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .....	143

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, *cytosolic-free calcium concentration*, concentração de cálcio citosólico livre

2-MeS-ATP, *2-methylthio adenosine triphosphate*; 2-metiltio adenosina trifosfato

4-Br-A23187, *4-bromo-calcium ionophore A23187*; ionóforo A23187 4-bromo-cálcio

4-DAMP, *4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide*; 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodato

ACh, *acetylcholine*; acetilcolina

ADPβS; *adenosine 5'-[β-thio]diphosphate trilithium salt*; sal de adenosina 5'-[β-tio]difosfato trilítio

AEC, *aminoethylcarbazole*; aminoetilcarbazol

AM, *amplitude modulation*; modulação da amplitude

AraC, *cytosin arabinoside*, citosina arabinosídeo

ATP, *Adenosine 5'-triphosphate*; Adenosina 5'-trifosfato

BAPTA-AM, *1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester*; 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético-acetoximetil éster

BrdU, *5-bromo-2-deoxyuridine*; 5-bromo-2-deoxiuridina

BSA, *bovine serum albumine*; albumina de soro bovino

Bz-ATP, *3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosine 5'-triphosphate*; 3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosina 5'-trifosfato

CaR, *calcium receptors*; receptores de cálcio

cDNA, *complementar DNA*; DNA complementares

CICR, *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*; liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida por Ca<sup>2+</sup>

CNS, *central nervous system*; sistema nervoso central

CPA, *cyclopiazonic acid*; ácido ciclopiazônico

CREB, *cAMP response element-binding*; elemento ligante responsivo ao cAMP

DAG, *1,2-diacylglycerol*; 1,2-diacilglicerol

DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*; meio de Eagle Dulbecco-modificado

DNA, *deoxyribonucleic acid*; ácido deoxiribonucléico

DO, densidade óptica

EB, *embryonic bodies*; corpos embriônicos

EGF, *epidermal growth factor*; fator de crescimento epidermal

EGTA, (*ethylene glycol-bis-(beta-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid*, etileno glicol-bis-(beta-amino-etil éter); (etileno glicol-bis-(beta-amino-etil éter) N,N,N',N'-ácido tetraacético, etileno glicol-bis-(beta-amino-etil éter)

EM, *extracellular medium*; meio extracelular

EPM, erro padrão da média

ERKs1/2, *extracellular-signal-regulated kinases 1/2*; quinases reguladas por sinais extracelulares 1/2

FBS, *fetal bovine serum*; soro fetal bovino

FGF-2, *fibroblast growth factor-2*; fator de crescimento de fibroblasto-2

Fluo 3-AM, 4-(6-Acetoxymethoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'-(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester; 4-éster de (6-Acetoximetoxi-2,7-dicloro-3-oxo-9-xantenil)-4'-metil-2,2'(etilenedioxi)dianilina-N,N,N',N'-ácido tetraacético tetraquiiis(acetoximetil)

FM, *frequency modulation*; modulação da frequência

$F_{\max}$ , *maximal fluorescence*; fluorescência máxima

$F_{\min}$ , *minimal fluorescence*; fluorescência mínima

GPCRs, *G protein-coupled receptors*; receptores acoplados à proteína-G

HEPES, *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*; ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

HOE-140, *D-Arg-L-Arg-L-Pro-L-Hyp-Gly-L-(2-thienyl)Ala-L-Ser-D-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarbonyl-L-(2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,7 $\alpha\beta$ )-octahydro-1H-indole-2-carbonyl-L-Arg*; D-Arg-L-Arg-L-Pro-L-Hyp-Gly-L-(2-tienil)Ala-L-Ser-D-1,2,3,4-tetrahidro-3-isoquinolinocarbonil-L-(2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,7 $\alpha\beta$ )-octahidro-1H-indol-2-carbonil-L-Arg

IP<sub>3</sub>, *inositol-1,4,5- trisphosphate*; inositol-1,4,5-trisfosfato

IP<sub>3</sub>R, *IP<sub>3</sub> receptor*; receptor de IP<sub>3</sub>

IPTG, *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*; isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactopiranosídeo

JNK, *kinase Jun-amine terminal*; Jun amino-terminal quinase

$K_d$ , constante de dissociação

$K_i$ , constante de inibição

LB, ágar Luria Bertani

LTP, *long-term potentiation*; potenciação de longa duração

mAChR, *muscarinic acetylcholine receptors*; receptores muscarínicos de acetilcolina

MEK1 e MEK2, *MAPK kinase 1 and 2*; MAPK quinase 1 e 2

mRNA, messenger RNA; RNA mensageiro

MT3, *green mamba Dendroaspis angusticeps toxin*; toxina de Mamba verde Dendroaspis angusticeps

nAChR, *nicotinic acetylcholine receptors*; receptores nicotínicos de acetilcolina

NEL, *neuron-specific enolase*; enolase neurônio-específica

NF- $\kappa$ B, *nuclear factor  $\kappa$ B*; fator nuclear  $\kappa$ B

NF, *neurofilament*; neurofilamento

NF-160, *medium-molecular weight neurofilaments*; neurofilamentos de médio peso molecular

NF-200, *high-molecular weight neurofilaments*; neurofilamentos de alto peso molecular

NF-AT, *nuclear factors of activated T-cells*; fatores nucleares de células T ativadas

NGF, *nerve growth factor*; fator de crescimento do nervo

NS, *nervous system*; sistema nervoso

NTPDase2, *ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2*; ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 2

OAP, *Oct/octamer-associated protein*; proteína associada ao Oct/octâmero;

P19 EC, *P19 murine embryonic carcinoma cells*; células embriônicas de camundongo P19

P2X, *purinergic ionotropic receptors*; receptores purinérgicos ionotrópicos

P2Y, *purinergic metabotropic receptors*; receptores purinérgicos metabotrópicos

PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*; gel de eletroforese em poliacrilamida

PB, *phosphate buffer*; tampão fosfato

PBS, *phosphate buffer saline*; tampão fosfato salino

PC12, *pheochromocytoma cell line*; linhagem celular de feocromocitoma

PCR real time, *polimerase chain reaction in real time*; reação da polimerase em cadeia em tempo real.

PCR, *polimerase chain reaction*; reação da polimerase em cadeia

PLC, *phosphoinositide-specific phospholipase C*; fosfolipase C fosfoinositídeo-específica

PLC- $\beta$ , *phospholipase C  $\beta$* ; fosfolipase C  $\beta$

PMSF, *phenylmethylsulfonyl fluoride*; fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPADS, *pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid*; ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

RA, *“all-trans” retinoic acid*; ácido “all-trans” retinóico

RE, *endoplasmatic reticulum*; retículo endoplasmático

RNA, *ribonucleic acid*; ácido ribonucléico

ROC, *receptor-operated channels*; canais operados por receptores

RT, *Reverse transcription*; transcrição reversa

RyR, *ryanodine receptors*; receptores de rianodina

SDS, *sodium dodecyl sulfate*; dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; dodecil sulfato de sódio em gel de eletroforese de poliacrilamida

SE, *sarcoplasmic reticulum*; retículo sarcoplasmático

SERCA, *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*; Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático

SOCs, *store-operated Ca<sup>2+</sup> channels*; canais de Ca<sup>2+</sup> operados pelo depósito

SSDNA, Serviço de Seqüenciamento de DNA

SSEA-1, *stage specific embryonic antigen*; antígeno embriônico estágio-específico

TBS, *Tris-Buffered Saline*; tampão tris-salino

TBS-T, *Tris-buffered saline with Tween*; tampão tris salino com Tween

TLCK, *Tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone Hydrochlorid*; hidrocloreto de N-alfa-tosil-L-lisina-clorometil cetona

TRP, *transient receptor potential channels*; canais de receptores de transientes potenciais

U-73122, *1-(6-([17β-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione*; 1-(6-([17β-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino)hexil)-1H-pirrole-2,5-diona

U-73343, *1-(6-((17b-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-2,5-pyrrolidine-dione*; 1-(6-((17b-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il)amino)hexil)-2,5-pirrolidina-dione

UTP, *uridine 5'-triphosphate*; uridina 5'-trifosfato

VOCC, *voltage-operated calcium channels*; canais de cálcio operados por voltagem



X-Gal *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*; 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidase

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. BASES TEÓRICAS .....	6
1.1.1. <i>Propriedades emergentes em sistemas complexos</i> .....	6
1.1.2. <i>Controles da diferenciação neuronal como sistema de estudo</i> .....	7
1.2. BASES EXPERIMENTAIS .....	9
1.2.1. <i>Sinalização por cálcio</i> .....	9
1.2.2. <i>Vias de ativação pelo cálcio</i> .....	11
1.2.3. <i>Diferenciação celular</i> .....	13
1.3. DESCRIÇÃO DOS ALVOS .....	14
1.3.1. <i>Receptores colinérgicos</i> .....	14
1.3.1.1. Receptores Nicotínicos .....	15
1.3.1.2. Receptores muscarínicos .....	16
1.3.2. <i>Receptores Purinérgicos</i> .....	18
1.3.3. <i>Células P19 como modelo da diferenciação neuronal</i> .....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Células e animais utilizados neste estudo.....	24
3.2. Anticorpos usados nos ensaios de Western-blot, imunocitoquímica e imunofluorescência.....	24
3.3. Reagentes químicos .....	25
3.4. Cultivo e diferenciação das células P19 de carcinoma embrionário em células neuronais.....	25
3.5. Extração do RNA total .....	26
3.6. Quantificação das amostras de RNA ou de cDNA.....	26
3.7. Transcrição Reversa .....	27
3.8. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	27
3.9. Purificação dos fragmentos de PCR .....	27
3.10. Clonagem do cDNA no vetor pGemT-easy e transformação das bactérias DH5 $\alpha$ ..	30
3.11. Preparação de células de bactérias competentes.....	30
3.12. Transformação das bactérias competentes .....	30
3.13. Mini preparação do DNA plasmidial das bactérias .....	31
3.14. Seqüenciamento.....	31
3.15. PCR em tempo real.....	31
3.16. Estudos de imunoperoxidase e de imunofluorescência .....	32
3.17. Ensaios de Western-blot .....	33
3.18. Ensaios de proliferação celular.....	34
3.19. Ensaio da hexoquinase.....	36
3.20. Imageamento de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> por microscopia confocal .....	37
3.21. Categorização da atividade transiente de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	39
3.22. Classificação celular .....	39
3.23. Determinação das concentrações dos íons Ca <sup>2+</sup> e K <sup>+</sup> nos meios celulares por absorção atômica e fluxo de chama, respectivamente.....	40
RESULTADOS: RECEPTORES PURINÉRGICOS.....	43
4. ESTUDO DAS BASES MECANÍSTICAS DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL MEDIADA PELA ATIVIDADE DE [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> PELOS RECEPTORES PURINÉRGICOS... 44	
4.1. RESULTADOS .....	44
4.1.1. <i>Caracterização da diferenciação neuronal nas células P19</i> .....	44

4.1.2. Caracterização da expressão gênica e protéica dos receptores purinérgicos....	46
4.1.2.1. Expressão dos receptores purinérgicos em células P19 durante a diferenciação neuronal.....	46
4.1.3. Caracterização da atividade de $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos receptores purinérgicos .....	50
4.1.3.1. Níveis da $[Ca^{2+}]_i$ em repouso das células P19 embrionárias e neuronais .....	50
4.1.3.2. Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ após a estimulação dos receptores purinérgicos.....	50
4.1.3.2.1. Respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelo ATP em células P19 indiferenciadas e neurônios diferenciados .....	50
4.1.3.2.2. Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ e a determinação dos perfis de agonistas em células P19 embrionárias e neuronais após a aplicação de análogos de ATP .....	53
4.1.3.2.3. Receptores P2Y mediam a principal resposta de $[Ca^{2+}]_i$ em células P19 neuronais.....	58
4.1.3.2.4. Discriminando as respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelos receptores P2Y em células P19 durante sua diferenciação neuronal .....	58
4.1.3.2.5. Respostas intracelulares de cálcio mediadas pela ativação dos receptores P2X diminuem durante a diferenciação neuronal.....	66
4.1.4. Caracterização dos subtipos de receptores purinérgicos expressos em uma mesma célula .....	67
4.1.4.1. Perfil de co-expressão dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos purinérgicos em células P19 .....	67
4.1.5. Caracterização do papel dos receptores purinérgicos na proliferação e diferenciação celular .....	69
4.1.5.1. Receptores purinérgicos e proliferação celular .....	69
4.1.5.2. Discriminando entre os receptores P2 que induzem a proliferação celular..	71
4.1.5.3. Envolvimento da PLC e dos depósitos intracelulares de $Ca^{2+}$ na proliferação celular .....	73
4.1.5.4. Envolvimento do $Ca^{2+}$ extra e intracelular na proliferação celular .....	73
4.1.5.5. Receptores purinérgicos e a diferenciação neuronal .....	73
DISCUSSÃO: RECEPTORES PURINÉRGICOS.....	76
4.2. DISCUSSÃO .....	77
4.2.1. Vários subtipos de receptores P2X e P2Y estão presentes em células P19 embrionárias e neuronais.....	77
4.2.2. Receptores P2X funcionais em células P19 embrionárias e diferenciadas em neurônios .....	78
4.2.3. Receptores P2Y funcionais em células P19 embrionárias e neuronais .....	80
4.2.4. Efeitos proliferativos e suas vias de sinalização mediadas pelos receptores P2X e P2Y em células P19 embrionárias e neuronais .....	81
4.2.5. A sinalização de $[Ca^{2+}]_i$ intracelular influencia a proliferação celular.....	82
CONCLUSÃO: RECEPTORES PURINÉRGICOS .....	84
4.3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	85
RESULTADOS: RECEPTORES COLINÉRGICOS.....	86
5. ESTUDO DAS BASES MECANÍSTICAS DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL MEDIADA PELA ATIVIDADE DE $[Ca^{2+}]_i$ PELOS RECEPTORES COLINÉRGICOS... 87	
5.1. RESULTADOS .....	87
5.1.1. Caracterização da expressão gênica e protéica dos receptores colinérgicos ....	87
5.1.1.1. Expressão dos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19.....	87

5.1.2. Caracterização dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ mediado pelos receptores colinérgicos .....	91
5.1.2.1. Atividade do receptor de acetilcolina em células P19 embrionárias e diferenciadas em neurônios .....	91
5.1.2.2. Fontes extra e intracelulares de $Ca^{2+}$ mobilizados pela ativação dos mAChRs e nAChRs em células P19 embrionárias e neuronais.....	92
5.1.2.3. A ativação dos nAChRs mobilizam $Ca^{2+}$ do meio extracelular e da liberação do $Ca^{2+}$ de seus depósitos intracelulares.....	100
5.1.3. Caracterização dos subtipos de receptores nicotínicos expressos em uma célula .....	105
5.1.3.1. Identificação dos subtipos de nAChRs e marcadores fenotípicos de células progenitoras e neuronais durante a diferenciação neuronal das células P19.....	105
5.1.4. Caracterização do papel receptores colinérgicos na proliferação e diferenciação celular.....	107
5.1.4.1. Participação dos receptores colinérgicos na proliferação celular.....	107
5.1.4.2. Envolvimento das fontes intra e extracelulares de $Ca^{2+}$ na proliferação de células P19 embrionárias .....	109
5.1.4.3. Envolvimento da PLC e dos depósitos internos de $Ca^{2+}$ na proliferação de células P19 embrionárias .....	110
5.1.4.4. Receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e suas funções específicas na proliferação de células progenitoras neuronais.....	110
5.1.4.5. A participação dos mAChRs e na diferenciação neuronal das células P19	113
5.1.4.6. nAChRs e diferenciação neuronal das células P19 .....	115
DISCUSSÃO: RECEPTORES COLINÉRGICOS .....	119
5.2. DISCUSSÃO .....	120
5.2.1. Vários subtipos de receptores nAChRs e mAChRs estão presentes em células P19 embrionárias e neuronais.....	120
5.2.2. Expressão dos subtipos de nAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19.....	121
5.2.3. Expressão dos nAChRs e mAChRs funcionais durante a diferenciação neuronal de células P19.....	121
5.2.4. Participação dos depósitos, intra e extracelulares, de $Ca^{2+}$ nas respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos nAChRs e mAChRs .....	122
5.2.5. Inibição da proliferação de células P19 embrionárias pela ativação dos nAChRs e dos depósitos intracelulares de $Ca^{2+}$ .....	125
5.2.6. Estimulação da proliferação de células progenitoras neuronais pela mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ através dos mAChRs acoplados à $G\alpha_{q/11}$ .....	126
5.2.7. Indução da diferenciação neuronal pelos mAChRs acoplados à $G\alpha_{i/o}$ .....	128
5.2.8. Indução da proliferação e diferenciação neuronal mediada pela mobilização de $Ca^{2+}$ intracelular através da ativação dos mAChRs e nAChRs .....	129
5.2.9. Vias de ativação das respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediadas pelos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal de células P19.....	130
CONCLUSÃO: RECEPTORES COLINÉRGICOS .....	131
5.3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	132
5.3.1. Indução da proliferação e diferenciação em células P19.....	132
RESULTADOS: EVENTOS ESPONTÂNEOS DE $[Ca^{2+}]_i$ .....	133
6. CONVERGÊNCIA DAS RESPOSTAS DE $[Ca^{2+}]_i$ ATRAVÉS DE RECEPTORES DE MEMBRANA CELULAR NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL .....	134
6.1. RESULTADOS .....	134

6.1.1. Determinação dos padrões oscilatórios da atividade de $[Ca^{2+}]_i$ durante a diferenciação neuronal das células P19 .....	134
6.1.2. A frequência dos sinais de $[Ca^{2+}]_i$ correlaciona-se com a aquisição do fenótipo de célula responsiva aos neurotransmissores .....	138
DISCUSSÃO: EVENTOS ESPONTÂNEOS DE $[Ca^{2+}]_i$ .....	144
6.2. DISCUSSÃO .....	145
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	146
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	147
7.1. Perfil de expressão .....	147
7.2. Modificações dos padrões oscilatórios da sinalização de $[Ca^{2+}]_i$ para o controle da proliferação e diferenciação celular .....	149
CONCLUSÕES FINAIS .....	151
8. CONCLUSÕES FINAIS .....	152
REFERÊNCIAS .....	153
9. REFERÊNCIAS .....	154
ANEXOS .....	178

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. BASES TEÓRICAS

#### 1.1.1. *Propriedades emergentes em sistemas complexos*

A redução de fenômenos complexos para entender suas causas (leis naturais, agentes, estrutura interna, energia, informação) é a essência da ciência. Reduccionismo é autoritativo, mas não é uma panacéia. A redução é adequada quando o fenômeno em questão pode ser reduzido às propriedades de uma unidade física subentendida, uma substância material, tal como uma partícula da matéria, uma entidade biológica como uma bactéria, uma molécula de proteína ou uma seqüência gênica. Redução é a substituição de uma aparência superficial ou uma profunda realidade causal. O fenômeno de interesse é demonstrado, com o propósito de experimentação, ser inerente ao caráter das subunidades que constituem o objeto de estudo. Uma redução de sucesso, em essência em escalas cruzadas, descobre entidades microscópicas ou processos cuja existência necessita do fenômeno macroscópico de interesse.

O processo de redução não completa a operação científica, no entanto, quando o objeto em questão não é uma entidade discreta, mas, de preferência, uma relação ou uma interação entre as subunidades do sistema. Aqui, o objeto é uma organização. As características individuais das subunidades do sistema podem não contar para o comportamento do sistema quando este é complexo. A inibição de um gene, conhecido em inibir a diferenciação celular, inibindo seu produto não necessariamente leva à inibição da diferenciação. O processo de diferenciação pode, aparentemente, aprender a organizar seu comportamento usando diferentes grupos de subunidades de moléculas. Um gene particular pode se tornar essencial somente após o sistema ter-se organizado em volta dele. Concebível, o sistema pode ter-se organizado ao redor de um gene diferente, tornando o gene alternativo essencial. O processo de aprendizado caracteriza sistemas de auto-organização em várias escalas. Isto inclui as relações entre as unidades constituintes de uma célula, as relações entre estas com elas mesmas para a formação de estruturas mais complexas como tecidos e órgãos. As relações moleculares essenciais também devem mostrar plasticidade funcional. O ponto é que, entidades organizacionais dependem das interações entre suas subunidades e não somente de características distintas de subunidades particulares. As subunidades individuais por elas mesmas não devem conter a essência da

entidade organizacional. A essência das entidades organizacionais emerge das interações de suas subunidades.

As propriedades emergentes podem ser definidas de formas diferentes de acordo com os interesses. Físicos devem olhar para as fases, sólida, fluída e gasosa da água como propriedades emergentes de agregados de moléculas de água em diferentes estados de energia. Aqui, pretendo focar em entidades complexas que emergem de interações de elementos heterogêneos. As próprias interações destes elementos geram propriedades que caracterizam o sistema como um todo.

O estudo da emergência em sistemas complexos não pode ser realizado adequadamente apenas pela redução. É igualmente verdade que a emergência não pode ser estudada sem redução. Para estar apto a entender e manipular um sistema emergente é preciso realizar uma apurada análise: primeiro deve-se quebrá-lo em cada parte que o constitui para visualizar do que é feito e do que o sistema emerge. Contudo, não se pode parar na análise redutiva, é preciso continuar e remontar o sistema. Conceitualmente, ou melhor, por um modelo quantitativo, pode-se reconectar as interações entre as subunidades constituintes. Assim, pode-se compreender como as propriedades de interesse emergem a partir de uma organização dinâmica. Somente pela combinação da análise com a síntese é possível adquirir conhecimento útil. Assim, como nos sistemas emergentes biológicos, primeiro deve-se analisá-los e reduzi-los causalmente à suas subunidades materiais (órgãos, tecidos, células, moléculas, átomos e interações) e depois conectar as subunidades para sintetizar um modelo dinâmico. Mais entendimento da composição da organização permite planejar a maneira mais adequada e efetiva para intervir e obter o resultado desejado.

### ***1.1.2. Controles da diferenciação neuronal como sistema de estudo***

Os princípios que governam a diferenciação celular permanecem entre os mais enigmáticos da biologia. Tentaremos explicar a geração espontânea de uma multiplicidade de tipos de células neuronais a partir de uma simples célula tronco, iremos deduzir uma tendência natural de um sistema tornar-se grandemente heterogêneo interrompendo a diferenciação celular.

Entre as características mais importantes da diferenciação celular estão: a iniciação da mudança; a estabilização da mudança após cessar o estímulo; a eficácia de várias



substâncias exógenas e endógenas como um estímulo indutivo; um limite de cinco ou seis células como um número de tipos celulares que podem diferenciar-se diretamente de qualquer tipo celular; a limitação progressiva no número das vias de desenvolvimento abertas para qualquer região pequena do embrião; períodos restritos durante os quais uma célula é competente em responder a um estímulo indutivo; a descrição dos tipos celulares, isto é, as diversas propriedades exclusivas mútuas pelas quais as células se diferem; a necessidade de uma massa celular mínima, e preferivelmente heterogênea, para iniciar a diferenciação em várias instâncias e, finalmente, que as mantenham em algumas, a ocorrência de metaplasia entre tipos celulares indiferenciados, ou de um tipo indiferenciado para um tipo especializado, mas a falta de metaplasia (o isolamento) entre tipos celulares especializados, e a interrupção da diferenciação (Grobstein, 1959).

Acreditamos que muitos aspectos da diferenciação possam ser deduzíveis do comportamento típico da construção de redes genéticas randômicas. Costuma-se pensar que as células diferem-se devido à sua expressão diferencial de genes, e não de sua mudança estrutural. A atividade diferencial dos genes leva ao menos a duas questões que nem sempre são cuidadosamente distinguidas: a capacidade de o genoma comportar-se em mais de um módulo, e os mecanismos que garantem as tarefas apropriadas destes módulos para a célula apropriada. A segunda questão presume a primeira. Redes de sistemas de receptores, sinalizadores intracelulares (aqui entram os fatores de transcrição entre outros, e principalmente a atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  que, por sua vez, leva à ativação de várias proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ ), enzimas que sintetizam estes sinalizadores e seus captadores, podem associar-se de uma maneira randômica, comportando-se em uma multiplicidade de módulos distintos. Diferentes períodos de módulos, incorporados em uma rede, são isolados um do outro para que nenhum módulo possa estar em dois períodos ao mesmo tempo. Assim, uma multiplicidade de períodos de módulo, cada um com uma seqüência temporal diferente de atividade gênica (esta induzida pelas atividades de  $\text{Ca}^{2+}$ ) é esperada em redes genéticas randomicamente construídas. Assim, parece razoável identificar um tipo celular com um período de um módulo. Para entender que este modelo binário, no qual a expressão do “gene” é potencialmente reversível em cada momento do relógio, é acurado, demonstra-se a ocorrência comum de múltiplos módulos de comportamento em um sistema genético diferencial para várias células diferentes. Se esta identificação é razoável, os números típicos de períodos em uma rede genética randômica devem ser da mesma ordem de magnitude

como o número de tipos celulares em organismos com o mesmo número de genes, considerando-se que é o padrão oscilatório na atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula a expressão gênica.

De interesse particular estão as relações entre as propriedades locais da rede e seu comportamento global. Vários parâmetros que especificam essas propriedades locais podem ser modulados fazendo com que a rede opere em vários regimes diferentes. Em um regime ordenado, o sistema comporta-se de uma maneira simples, com muitos de seus componentes sendo estáticos. Neste regime, a transferência de informação entre os componentes é impedida por contingentes de componentes estáticos. No regime caótico, o sistema comporta-se de maneira oposta, com a perturbação de um componente propagando-se para vários outros como em uma cascata de sinalização, com poucas regiões compreendendo componentes em estado estático. Assim, as redes em um regime caótico são muito sensíveis às condições iniciais e perturbações.

A fronteira entre ordem e caos é chamada de regime complexo ou fase crítica, com as redes passando por um tipo de transição de fase (Kadanoff, 2000). É neste regime que as redes são mais evoluídas. O Dr. Kauffman, um pioneiro nos debates sobre redes randômicas Booleanas (Kauffman, 1993) questiona que a vida deve existir no limite do caos, com as redes, representando as redes regulatórias genéticas reais, operando na ou próximo da fase crítica. Como Kauffman (1995) coloca: “um sistema vivo deve primeiro descobrir um acordo interno entre a maleabilidade e a estabilidade. Para sobreviver em um ambiente variável, deve-se ser estável para ser claro, mas não tão estável de forma que permaneça estático para sempre”.

## **1.2. BASES EXPERIMENTAIS**

### **1.2.1. Sinalização por cálcio**

O cálcio intracelular regula uma grande variedade de eventos celulares associados com função neuronal incluindo: excitabilidade, exocitose, plasticidade sináptica, expressão gênica e morte celular (Berridge, 1998). Apesar de muitos fatores de crescimento e neurotróficos poderem influenciar a diferenciação neuronal, muitas linhas de evidência sugerem que os neurotransmissores, ativando receptores de membrana, induzem variações nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , representando uma chave reguladora na diferenciação. Mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), resultantes de eventos

espontâneos ou regulados por sinais, demonstraram iniciar programas celulares específicos, importantes, por exemplo, na diferenciação de músculos esqueléticos e cardíacos. É estabelecido que o  $\text{Ca}^{2+}$  tem uma função reguladora na especificação celular no sistema nervoso em desenvolvimento. Por exemplo, em neurônios espinhais de embrião de *Xenopus*, dois tipos de eventos espontâneos têm sido caracterizados tanto *in vitro* como *in vivo*: aumentos globais e rápidos dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) com características de potencial de ação, e pequenos aumentos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominados ondas, gerados no cone de crescimento. Sendo que informações codificadas na frequência das elevações de  $\text{Ca}^{2+}$ , usualmente as globais, controlam a expressão de neurotransmissores e a maturação de canais de potássio, enquanto as ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , frequentemente as locais, regulam a extensão dos neuritos (Gu e Spitzer, 1995; Gomez e Spitzer, 1999). Muitos destes efeitos da atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  são mediados pela regulação da fosforilação de proteínas estruturais (Lautermilch e Spitzer, 2000), outras, como a aquisição do fenótipo de liberar neurotransmissores específicos, devem requerer a transcrição gênica (Spitzer et al., 2000).

O cálcio intracelular controla uma diversidade de processos celulares como a fertilização, a transcrição gênica, a contração muscular e até mesmo a morte celular. Mudanças nos níveis de cálcio podem ocorrer em microsegundos ou horas, podendo ser microscópicas ou propagadas através das células e tecidos (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001).

O aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ocorre pelo influxo de íons cálcio através da membrana plasmática ou pela sua liberação dos estoques intracelulares de cálcio, usualmente do retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*, ER) ou no músculo, do retículo sarcoplasmático (*sarcoplasmatic reticulum*, SR). A liberação de cálcio do ER/SR é ativada por uma variedade de mensageiros secundários, entre eles o inositol-1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ), que estimula ou modula a atividade dos canais liberadores nos estoques intracelulares ou, significativamente, pela própria  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Putney Jr et al., 2001; Berridge, 1997; Bootman et al., 2002). Quando um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  se abre, seja ele da membrana plasmática ou de estoques intracelulares, uma alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é formada nesta região, e tem-se um microdomínio nas redondezas do canal, que é rapidamente dissipado assim que o canal se fecha (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001). Estes eventos altamente localizados, referidos como *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  e *puffs* de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependendo da natureza e localização dos canais de onde são originados são os blocos de construção elementares da sinalização de

$\text{Ca}^{2+}$ . Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  elementares parecem ter duas funções, eles podem tanto ativar processos no microdomínio de  $\text{Ca}^{2+}$ , ao redor da vizinhança do canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , quanto ativar processos recrutando outros canais na célula e assim, promovendo um aumento global na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Para evitar a natureza tóxica do  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que aumentos prolongados na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podem ser letais, as células usam sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa amplitude ou, mais comumente, sinais transientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , conhecidos como oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$ . As células então podem usar a modulação da amplitude (*amplitude modulation*, AM) ou a modulação da frequência (*frequency modulation*, FM) para decodificar a informação dos sinais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Na sinalização pela AM, é a amplitude do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  que inicia os eventos posteriores na sinalização pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora este módulo de sinalização seja geralmente considerado menos confiável que a FM, levando a uma dificuldade de se detectar pequenas mudanças de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  acima do ruído, as células podem interpretar pequenas mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dolmetsch et al., 1997). Além do mais, é a FM que é mais comumente usada. Por exemplo, a frequência das oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  é usada para otimizar a expressão gênica que é dirigida pela transcrição de fatores nucleares das células T ativadas (*nuclear factors of activated T-cells*, NF-AT), da proteína associada ao Oct/octâmero (*Oct/octamer-associated protein*, OAP) e do fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (*nuclear factor  $\kappa\text{B}$* , NF- $\kappa\text{B}$ ) (Dolmetsch et al., 1998; Li et al., 1998).

Estes mecanismos de modulação da frequência e da amplitude dos sinais de cálcio são fatores convergentes da estimulação de fatores extracelulares, como os neurotransmissores ATP e acetilcolina. Seu desvendamento para a diferenciação de células da linhagem embriônica P19 em neurônios foi o alvo deste trabalho.

### ***1.2.2. Vias de ativação pelo cálcio***

Vários agonistas ligam-se aos receptores acoplados à proteína-G ou aos receptores de tirosina quinase, que ativam a fosfolipase C fosfoinositídeo-específica (*phosphoinositide-specific phospholipase C*, PLC), levando à formação do 1,2-diacilglicerol de membrana (*1,2-diacylglycerol*, DAG) e o  $\text{IP}_3$  solúvel a partir do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*,  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ). O  $\text{IP}_3$  difunde-se rapidamente no citosol e liga-se ao receptor de  $\text{IP}_3$  ( *$\text{IP}_3$  receptor*,  $\text{IP}_3\text{R}$ ), que, por sua vez, estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos depósitos intracelulares. Com a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , a queda na concentração dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  é percebida pela abertura de canais de

$\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos (*store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*, SOC) na membrana plasmática. Outros canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática são regulados pelo estiramento, pelo potencial de membrana (canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem, *voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*; VOCC) e por receptores (canais operados por receptores, *receptor-operated channels*; ROC).

A rede de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser dividida em quatro unidades funcionais. O estímulo inicia-se gerando sinais de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  que age em vários mecanismos de “ligação” para disparar um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os níveis aumentados de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulam vários processos sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  que disparam várias vias celulares. A resposta é finalizada pelos mecanismos de “desligamento”, os quais são compostos de bombas e trocadores, que removem  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma restaurando seus níveis de repouso (revisado em Berridge et al., 2000). Esta rede de sinalização é composta de vários componentes ( *$\text{Ca}^{2+}$  signalling toolkit*). Já que muitos dos componentes moleculares desta “caixa” possuem várias isoformas com propriedades subitamente diferentes, cada tipo específico de célula pode explorar este vasto repertório, construindo redes versáteis de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge et al., 2000).

Aumentos na  $[\text{Ca}^{2+}]$  extracelular ou a exposição a outros agonistas de receptores que promovem o influxo de cálcio (*calcium receptors*, CaR), comumente dispara sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares através de interações entre o CaR e a PLC, a qual é mediada pelas subunidades  $G\alpha_q$  ou  $G\alpha_{11}$  de proteínas heterotriméricas G (Kifor et al., 1997) Estas interações resultam na hidrólise do  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  pela PLC para formar  $\text{IP}_3$  e DAG. Assim, parece que a estimulação da fosfolipase  $A_2$  citosólica, a qual resulta na produção de ácido aracdônico e seus metabólitos, é uma outra consequência da ativação posterior da  $G\alpha_q/\text{PLC}$  através de CaR (Handlogten et al., 2001; Kifor et al., 2001). Em paralelo, o CaR também ativa a fosfatidilinositol 4-quinase (Huang et al., 2002), a qual é uma das enzimas na via biosintética que leva à reposição de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . Dados recentes demonstraram que estes intermediários do fosfatidilinositol possuem funções biológicas, por si próprios, que influenciam processos tais como apoptose e a atividade de canais iônicos.

O CaR interage diretamente não somente com a  $G\alpha_q$  e  $G\alpha_{11}$ , mas também com a  $G\alpha_i$ , que resulta na inibição da adenilato ciclase e em uma redução nos níveis celulares de AMP cíclico. Uma outra camada de complexidade surge porque isoformas específicas da

adenilato ciclase são inibidas por aumentos na  $[Ca^{2+}]$  citosólica, e tais isoformas podem estar presentes nas mesmas células que os CaRs (de Jesus Ferreira et al., 1998). O CaR também está ligado por muitas vias de sinalização a várias MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos, *mitogen-activated protein kinases*), tais como as quinases reguladas por sinais extracelulares (*extracellular-signal-regulated kinases*, ERKs) 1/2 (Kifor et al., 2001; McNeil et al., 1998; Corbetta et al., 2002) e a Jun amino-terminal quinase (*kinase Jun-amino terminal*, JNK) (Arthur et al., 2000), que devem ser responsáveis por muitas ações dos agonistas de CaR na proliferação celular, em alguns tipos celulares (Mailland et al., 1997; McNeil et al., 1998). Entretanto, como é o caso para muitos outros receptores de superfície celular, é pouco conhecido como a ativação de um simples tipo de receptor (CaR) possa produzir tantos efeitos biológicos variados, como, diferenciação, proliferação, secreção e apoptose, dependendo do contexto celular no qual o receptor é expresso. Uma delimitação dos mecanismos específicos de transdução de sinal, que permite que o CaR transduza essas diversas funções celulares, será indubitavelmente uma grande área para futuras investigações.

### **1.2.3. Diferenciação celular**

Durante estágios mais avançados no desenvolvimento, o  $Ca^{2+}$  intracelular está envolvido na indução da diferenciação de células individuais. Em contraste ao gradiente da resposta de  $Ca^{2+}$  para a especificação axial, os disparos de  $Ca^{2+}$  induzem a diferenciação celular, pelo menos em células musculares e neuronais (Buonanno e Fields, 1999). Em *Xenopus*, eventos espontâneos de  $Ca^{2+}$  produzidos pelos RYRs durante um breve período do desenvolvimento (Ferrari et al., 1998), direciona a diferenciação de miócitos em somitos. O desenvolvimento de neurônios também é regulado por estes eventos de  $Ca^{2+}$ , que controlam processos como: a expressão de canais e neurotransmissores específicos (Gu e Spitzer, 1995; Carey e Matsumoto, 1999), o comportamento dos cones de crescimento (Gomez e Spitzer, 1999) e o estabelecimento de conexões específicas do circuito neuronal (Wong, 1999).

A diferenciação culmina com a emergência de diferentes tipos celulares especializados para funções específicas. Um elemento chave no processo de diferenciação é instalar os componentes da caixa de sinalização de  $Ca^{2+}$  que cada célula especializada precisa para executar todas as suas funções particulares.

Os sítios de ligação ao cálcio encontram-se nas seqüências primárias tanto dos receptores de rianodina como de IP<sub>3</sub>. A CICR (*Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release channels*, canais liberadores de Ca<sup>2+</sup> induzidos por Ca<sup>2+</sup>) ocorre então via ligação direta do cálcio aos seus canais. Em adição à sua ligação direta, o cálcio exerce alguns efeitos através de proteínas acessórias, tais como a calmodulina. Os receptores IP<sub>3</sub> e os receptores de rianodina existem como complexos macromoleculares contendo proteínas, como quinases e fosfatases, que servem para regular a sensibilidade destes canais ao cálcio.

Exemplos de CICR em células não excitáveis incluem as oscilações e as ondas de cálcio induzidas pelo IP<sub>3</sub>, que ocorrem após a fertilização de ovos de mamíferos e o espalhamento das ondas de cálcio nas células pancreáticas acinares que levam à exocitose dos grânulos de zimogênio e à secreção de fluído.

### **1.3. DESCRIÇÃO DOS ALVOS**

#### **1.3.1. Receptores colinérgicos**

A acetilcolina (*acetylcholine*, ACh) representa uma molécula sinalizadora filogeneticamente muito antiga (Horiuchi et al., 2003), com uma distribuição ubíqua desde procariotas, passando pelas plantas e fungos até aos eucariotos (Grando, 1997; Wessler et al., 1999; Kawashima e Fujii, 2000). Embora tenha sido alvo central de atenção como uma molécula neurotransmissora, exerce funções autócrinas (Wessler et al., 2003b) em diversos tipos celulares, promovendo parte da organização do citoesqueleto, comunicação celular, proliferação, diferenciação celular, crescimento e apoptose (Grando, 1997; Wessler et al., 1999; Kawashima e Fujii, 2000; Tobin e Budd, 2003; Kawashima e Fujii, 2004), nos diversos períodos do desenvolvimento animal (Williams et al., 2004b; Grando, 1997). Termos clássicos, “acetilcolina não-neuronal” e “sistema colinérgico não-neuronal”, são usados para distinguir suas funções neurotransmissoras daquelas filogeneticamente mais distantes (Wessler et al., 1999). Muitos dos aspectos biológicos da acetilcolina foram descritos em sistemas não-colinérgicos (com células transfectadas) (Grando, 1997; Wessler et al., 1999; Kawashima e Fujii, 2000), porém, suas funções durante o desenvolvimento na diferenciação neuronal celular ainda faltam ser determinadas. No presente trabalho, discutiremos o papel patofisiológico da acetilcolina e suas vias de indução durante a determinação do fenótipo de células neuronais partindo de células embriônicas totipotentes.

O desenvolvimento do sistema nervoso é dependente da cooperação entre diversos eventos de determinação celular e da ação conjunta de diversos fatores epigenéticos (Calof, 1995). Os neurotransmissores vêm confirmando-se como moléculas morfogênicas, moduladores da diferenciação neuronal em fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Levitt et al., 1997; Bignami, et al., 1997). Uma linhagem celular de neuroblastoma, conhecida em não sintetizar qualquer tipo de neurotransmissor, foi usada como sistema de transfecção para uma construção plasmídica contendo a enzima colina acetiltransferase. A ativação dessa enzima é seguida pela produção da acetilcolina e pela expressão de marcadores neuronais específicos (Buznikov et al., 1996). Estas células expressaram receptores muscarínicos, conferindo uma possível resposta autócrina, podendo ser responsável pelo estágio avançado da diferenciação neuronal observada. A presença de receptores colinérgicos em estágios de células embrionárias e durante o processo do desenvolvimento neuronal sugerem um papel que relaciona a acetilcolina às interações entre células neuronais e não neuronais, modulando a determinação de seu fenótipo final (Buznikov et al., 1996).

### **1.3.1.1. Receptores Nicotínicos**

A ACh é o neurotransmissor sintetizado, armazenado e liberado pelos neurônios colinérgicos. As moléculas que transduzem os sinais da ACh são os receptores de acetilcolina: nicotínicos neuronais (nAChRs), os quais formam canais iônicos e os muscarínicos (mAChRs), que são acoplados à proteína G.

Os nAChRs são amplamente expressos no sistema nervoso (*nervous system*, NS), onde eles transduzem a transmissão colinérgica nas sinapses dos gânglios e em várias áreas do cérebro. No sistema nervoso central (*central nervous system*, CNS), a inervação colinérgica, agindo através dos nAChRs, podem regular processos tais como: a liberação do neurotransmissor, excitabilidade celular e integração neuronal, as quais são essenciais para as operações da rede neuronal e podem influenciar as funções fisiológicas como estado de alerta, sono, fadiga, ansiedade, o processamento central da dor, fome e várias funções cognitivas, possivelmente em associação com outros sistemas neurotransmissores. Além do mais, está tornando-se evidente que a perturbação da neurotransmissão colinérgica nicotínica pode levar a várias doenças envolvendo a disfunção do sistema colinérgico durante o desenvolvimento, como vício, epilepsia, esquizofrenia, mal de Alzheimer,



miastenia, entre outras (Changeux e Edelstein, 2001; Gotti et al., 1997; Hogg et al., 2003; Lindstrom, 1997).

Os nAChRs são uma família de canais catiônicos (ionotrópicos) que consistem de diferentes subtipos e são ativados por ligantes (dos quais os AChRs musculares são o protótipo). Os vinte genes que já foram clonados são divididos em duas subfamílias de nove subunidades  $\alpha$  neuronais ( $\alpha_2$ – $\alpha_{10}$ ), sendo o  $\alpha_8$  expresso somente em aves, e três subunidades  $\beta$  ( $\beta_2$ – $\beta_4$ ) (Le Novere e Changeux, 1995; Lindstrom, In: Clementi et al., 2000). Ambas as subunidades contribuem para a especificidade farmacológica dos subtipos de nAChRs.

Com base em suas diferenças filogenéticas e propriedades farmacológicas e funcionais, a heterogênea família dos subtipos de nAChR é ainda dividida em duas classes principais: os  $\alpha$ Bgtx-nAChRs, que podem ser homoméricos (constituídos de homopentâmeros das subunidades  $\alpha_7$ – $\alpha_9$ ) ou heteroméricos (constituídos de heteropentâmeros das subunidades  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  ou  $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$ ), e os nAChRs, os quais contêm as subunidades  $\alpha_2$ – $\alpha_6$  e as subunidades  $\beta_2$ – $\beta_4$ , que somente formam receptores heteroméricos que se ligam aos agonistas com alta afinidade (Lindstrom, In: Clementi et al., 2000).

### **1.3.1.2. Receptores muscarínicos**

Assim como os nAChRs, os mAChRs estão presentes em neurônios no CNS e nos gânglios. No sistema periférico, entre outros efeitos, os receptores muscarínicos mediam a contração dos músculos lisos, a secreção glandular e a modulação crono e ionotrópica dos músculos cardíacos. No CNS há evidências que os mAChRs estão envolvidos no controle motor e na regulação da temperatura, do sistema cardiovascular e da memória. Interesse na classificação destes receptores que estão envolvidos em funções e situados em diferentes locais tem aumentado pelo potencial uso terapêutico de agentes seletivos que atuam sobre doenças neurodegenerativas (Matsui et al., 2004).

Dos cinco subtipos clonados dos receptores muscarínicos, os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  estão acoplados via subunidade  $\alpha$  da família  $G\alpha_{q/11}$ , enquanto os membros  $M_2$  e  $M_4$  estão principalmente acoplados via subunidade  $\alpha$  de  $G\alpha_i$  e  $G\alpha_o$ . O acoplamento seletivo ao nível da proteína G é refletido geralmente, mas não exclusivamente, na diminuição das vias dos segundos mensageiros ativados pelos dois grupos de receptores muscarínicos. A PLC- $\beta$  é

ativada pelo primeiro grupo, enquanto a adenilato ciclase é inibida pelo segundo grupo de subunidades (Matsui et al. 2004; Caulfield, In: Eglen, 1997).

Respostas funcionais mediadas por estas principais vias acopladoras incluem: a contração de muitos músculos lisos, a estimulação da secreção glandular (pelos receptores  $M_3$ ) e a inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes no coração (pelos receptores  $M_2$ ), este último é o resultado da inibição da adenilato ciclase (Matsui et al., 2004). Há também muitas respostas muscarínicas que não envolvem estas duas vias, como a ativação de canais de  $K^+$  retificadores em células cardíacas pelos receptores  $M_2$ , que resultam de uma ativação direta das subunidades  $G\beta\gamma$  nestes canais (Matsui et al., 2004).

Há também relatos de que os mAChRs estimulam a atividade da adenilato ciclase. Esta resposta é bloqueada pela toxina Pertussis em membranas de neurônios do bulbo olfatório e é acreditado envolver uma interação indireta, porém sinérgica com  $G\alpha_s$  e uma modulação diferencial de diferentes isoformas de adenilato ciclase (Caulfield, In: Eglen, 1997). Mais incomum, contudo é que os receptores  $M_5$ , nas células A2058, inibem a produção de cAMP (adenosina monofosfato cíclico, *cyclic adenosine monofosphate*) induzida pela forskolina, mas estimula a produção do  $IP_3$  (Caulfield, In: Eglen, 1997). A resposta do cAMP não é sensível ao pré-tratamento com a toxina Pertussis mas depende do influxo de cálcio.

O papel da acetilcolina sobre os efeitos mitogênicos pode ser relevante nos processos neoplásticos, de fato, foi evidenciado por muitos estudos, entre eles os efeitos proliferativos mediados pela ativação dos receptores colinérgicos em células derivadas de tumores, como o carcinoma de próstata (Rayford et al., 1997), astrocitoma (Guizzetti et al., 1996), ou carcinoma de cólon (Frucht et al., 1999). Além do mais, os mAChRs estão implicados na plasticidade neuronal incluindo na potenciação de longa duração (*long-term potentiation*, LTP) (revisado em Calabresi et al., 2000) pela fosforilação da CREB (elemento ligante responsivo ao cAMP, *cAMP response element-binding*), ativação da MAPK e Erk1/2 (Greenwood e Dragunow, 2002; Hamilton e Nathanson, 2001; Rosenblum et al., 2000).

Recentemente, alguns estudos demonstraram o papel dos fatores tróficos na proliferação de células progenitoras neurais *in vitro* (Taupin et al., 2000; Bartlett et al., 1998; Koblar et al., 1998) e *in vivo* (Kuhn et al., 1997; Gritti et al., 1999), e alguns estudos

tentaram relacionar a ativação dos mAChRs e seus mecanismos de transdução de sinais envolvidos na regulação da proliferação de células progenitoras neurais (Li et al., 2001; Ma et al., 2000). Entre eles, estão as cascatas de sinalização da MAPK e Erk1/2 e as vias do PI-3K (Crespo et al., 1994; Larocca e Almazan, 1997; Lopez-Ilasaca et al., 1997). Entretanto, as funções individuais dos subtipos muscarínicos nos estágios iniciais do desenvolvimento não foram amplamente estudados (reviewd in Ma et al., 2004), e foram parte dos objetos de estudo deste trabalho.

### ***1.3.2. Receptores Purinérgicos***

Em 1978, O Professor Burnstock, forneceu uma base farmacológica para distinguir dois tipos majoritários de receptores purinérgicos: nomeados P1 purinoceptores, os quais são seletivos para adenosina, agem através da adenilato ciclase e são antagonizados por baixas concentrações de metilxantinas que produzem inibição da fosfodiesterase; e P2 purinoceptores, que são seletivos por nucleotídeos (Burnstock, 1997).

Adenosina 5-trifosfato (ATP) é uma potente molécula sinalizante que está amplamente presente no CNS. Ela desempenha uma grande variedade de efeitos fisiológicos e é assumida como o fator epigenético filogeneticamente mais antigo desempenhando funções biológicas cruciais em muitos tecidos diferentes, incluindo a neurotransmissão, fertilização e desenvolvimento embriônico. O ATP é liberado para o espaço extracelular por exocitose ou pela destruição de células injuriadas. Também é co-liberado com outros neurotransmissores e pode interagir com fatores de crescimento tanto em nível de receptor quanto em de transdutor de sinal (Volonte et al., 2003).

O ATP exerce seus efeitos via ativação dos receptores purinérgicos P2, estes podem ser divididos em duas grandes classes baseados na similaridade funcional e estrutural. Os P2Y são receptores de nucleotídeos de purina e pirimidina, com sete subunidades transmembrânicas acoplados à proteína G (King e Townsend-Nicholson, 2000), que agem principalmente ativando a PLC, levando à formação de IP<sub>3</sub> e a mobilização de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Assim, a ativação dos receptores P2Y pode provocar ações de longa duração e efeitos tróficos na atividade celular (Neary et al., 1996). Os receptores P2X, receptores ionotrópicos, constituem canais iônicos dependentes de ligantes, sua ativação induz uma condutância rápida de cálcio e outros cátions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) (Dubyak e El-Moatassim, 1993; North, 1996).

No sistema nervoso, estes receptores são amplamente expressos em neurônios e em células da glia e podem mediar efeitos controversos: efeitos de curta duração, como os de neurotransmissão e de longa duração, como os de ações tróficas. Em resumo, o ATP desempenha um papel muito complexo não somente no reparo, na remodelação e na sobrevivência de células do sistema nervoso, como também na morte celular que pode ocorrer tanto após condições normais do desenvolvimento, como depois de injúrias ou doenças crônicas e agudas (Volonte et al., 2003).

Os receptores P2X têm demonstrado serem responsáveis por mediar respostas excitatórias rápidas em neurônios centrais e periféricos (Edwards et al., 1992; Evans et al., 1992). Sete subunidades homoméricas de P2X de mamíferos (P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>7</sub>) foram clonados, e P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>6</sub> são considerados os receptores P2X predominantes no CNS de mamíferos (Nörenberg e Illes, 2000). Onze receptores heteroméricos foram confirmados por combinação pareada de subunidades P2X (Torres et al., 1999).

Em diferentes sinapses os receptores P2X demonstraram aumentar a liberação de neurotransmissores induzindo o disparo do potencial de ação por despolarização, ativação dos VOCCs e entrada de Ca<sup>2+</sup> pelos próprios canais de P2X.

A expressão durante o desenvolvimento em cérebros de ratos dos subtipos dos receptores P2X foi demonstrada por Cheung e colaboradores (Cheung et al., 2005). Apesar de demonstrarem a expressão transiente de muitos deles e especularem possíveis papéis no processo de desenvolvimento, tais como a expansão de neurito (envolvendo os receptores P2X<sub>3</sub>), neurogênese pós-natal (P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>5</sub>) e na morte celular (possivelmente os receptores P2X<sub>7</sub>), estas informações ainda não foram comprovadas (Cheung et al., 2005).

### ***1.3.3. Células P19 como modelo da diferenciação neuronal***

As células P19 são uma linhagem de células de carcinoma embrionário de camundongo (*P19 murine embryonic carcinoma cells*; P19 EC), com capacidade de se diferenciar em células dos três tipos de tecidos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). Estas células podem ser moduladas para diferenciarem-se pelas condições da cultura celular, ocorrendo espontaneamente ou por meio de indução química. Quando manipuladas na presença de DMSO, as células P19 se diferenciam em tipos celulares do endoderma e mesoderma, tais como células musculares cardíacas, esqueléticas e células

epiteliais (Edwards et al., 1983; McBurney et al., 1982). Quando tratadas com ácido retinóico em concentrações de 1  $\mu$ M, as células P19 se diferenciam em neurônios e células da glia (Jones-Villeneuve et al., 1982). Dois dias após o tratamento com ácido retinóico, em superfície não aderente, as células P19 em diferenciação são transferidas para frascos de cultura aderentes, onde se unem em aglomerados conhecidos como corpos embriônicos. Após quatro ou cinco dias do início do processo de diferenciação, essas células expressam marcadores neuronais e formam sinapses, liberando neurotransmissores em resposta a potenciais de ação recebidos. Os marcadores de astrócitos não aparecem antes de 9-10 dias em culturas *in vitro*, a partir da mesma dosagem de ácido retinóico que dá origem às células neuronais, o que sugere a possibilidade de ambas serem originárias de um mesmo tipo de célula progenitora (Edwards et al., 1983). A diferenciação desta linhagem celular simula os eventos moleculares e morfológicos que ocorrem durante a fase inicial do desenvolvimento embriônico (McBurney et al., 1982; Bayer e Altman, 1995).

# ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

Caracterizar a diferenciação neuronal das células P19 utilizando condições externas controladas;

Determinar a expressão dos receptores purinérgicos e colinérgicos durante o processo de diferenciação neuronal das células P19;

Determinar a atividade dos receptores purinérgicos e colinérgicos em induzir os transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  em células embriônicas e neuronais;

Identificar os padrões oscilatórios da atividade espontânea de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a diferenciação neuronal das células P19;

Determinar a função dos receptores purinérgicos e colinérgicos na proliferação e diferenciação neuronal;

Verificar a participação dos depósitos, extra e intracelulares, para os eventos espontâneos de  $[Ca^{2+}]_i$  e seus papéis na regulação da proliferação e diferenciação neuronal.

***MATERIAL E  
MÉTODOS***



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Células e animais utilizados neste estudo

As células de carcinoma embrionário murino P19 (Jones-Villeneuve et al., 1982) foram doadas pela Dra. H. Chica Schaller, Center for Molecular Neurobiology, Hamburgo, Alemanha.

Os camundongos (*Mus musculus*, Balbi-C strain) foram obtidos do Biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados em acordo com os princípios éticos sobre experimentação animal elaborado pelo COBFA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

A cepa de *Escherichia coli*, utilizada na amplificação dos plasmídeos, foi a DH5 $\alpha$ : F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+),  $\lambda$ -.

#### 3.2. Anticorpos usados nos ensaios de Western-blot, imunocitoquímica e imunofluorescência

Os anticorpos utilizados na detecção dos receptores nicotínicos de acetilcolina foram: anti- $\alpha_2$ , - $\alpha_6$  e - $\beta_4$  foram doados pelo Dr. Jon Lindstrom (Department of Neuroscience, University of Pennsylvania and Philadelphia, PA). Os anticorpos primários monoclonais foram comprados da Covance (Covance Research Products, Denver, PA). Anticorpos anti- $\alpha_3$  de rato (MRT-611R), anti- $\alpha_4$  de rato (MRT-613R), anti- $\alpha_5$  de rato (MRT-623R), anti- $\alpha_7$  de camundongo (MMS-627R), anti- $\beta_2$  (MRT-639R) e os anticorpos secundários apropriados, conjugados à biotina (usados em na diluição de 1:200), foram produzidos pela Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemanha), os anticorpos secundários conjugados ao isotiocianato de fluoresceína, anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de rato, foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA).

Na investigação dos receptores purinérgicos foram usados os anticorpos primários: anti-P2X<sub>1</sub> (PC378) e anti-P2X<sub>3</sub> (PC411) da Oncogene Research Products (Cambridge, MA). Os anticorpos, anti-P2X<sub>4</sub> (sc-15187), -P2X<sub>6</sub> (sc-15197), -P2Y<sub>1</sub> (sc-15203), -P2Y<sub>4</sub> (sc-17634) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Alemanha). Anticorpos

específicos para o receptor P2X<sub>7</sub> (506107) e anti- $\beta$ -actina (Ab-1) de camundongo (JLA20) foram obtidos da Calbiochem (San Diego, CA). Anticorpos anti-P2X<sub>2</sub> (ab5244), anti-P2X<sub>5</sub> (ab9226), anti-P2Y<sub>2</sub> (ab5931 e ab5816) e -P2Y<sub>6</sub> (ab5715) foram adquiridos da Chemicon International (Temecula, CA). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG-Cy5 de cabra (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), anti-IgG-isotiocianato de fluoresceína de cabra (Abcam, Cambridge, MA) ou estes anticorpos secundários conjugados à biotina, da Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), para a detecção dos receptores de P2Xs ou P2Ys.

### **3.3. Reagentes químicos**

Se não indicado, todos os reagentes utilizados foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os iniciadores para as reações da RT-PCR e PCR em tempo real foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

### **3.4. Cultivo e diferenciação das células P19 de carcinoma embrionário em células neuronais**

As células P19 foram cultivadas e diferenciadas em neurônios como descrito previamente por Tárnok e Ulrich, 2001 e Martins et al., 2005. O cultivo das células P19 foi realizado com meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (*Fetal bovine serum*, FBS, Cultilab, Campinas, Brazil), 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 2 mM de piruvato de sódio a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> (estufa para cultura celular; Shell Lab, Cornelius, USA) Para a indução da diferenciação neuronal, 5 x 10<sup>5</sup> de células P19 embriônicas/ml em meio definido (meio DMEM suplementado com 2 mM de glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 2,4 mg/ml de bicarbonato de sódio, 5  $\mu$ g/ml de insulina, 30  $\mu$ g/ml de apo-transferrina humana, 20  $\mu$ M de etanolamina, 30 nM de selenato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina e 10 mM de HEPES, pH 7,4) (Pyle et al., 2001; Ulrich et al., 1996), foram tratadas com 1  $\mu$ M de ácido retinóico “all-trans” (“*all-trans*” *retinoic acid*, RA) e cultivadas em placas de Petri, previamente revestidas com 0,5 % de agarose em 15 ml de tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*, PBS), para evitar a adesão das células na superfície plástica. Após 48 horas de

tratamento com RA e em suspensão, as células P19 formaram corpos embriônicos. Os corpos embriônicos foram coletados da cultura celular em suspensão por centrifugação a 500 g por 5 minutos e plaqueados em garrafas aderentes de cultura (75 cm<sup>2</sup> Nunclon, Switzerland) em meio DMEM suplementado com 10 % de FBS. Após 2 dias de cultura, o meio DMEM suplementado com FBS foi substituído pelo meio definido. Nos dias subsequentes, as células foram mantidas em meio definido e, este, sendo trocado a cada 48 horas. A diferenciação foi completada no oitavo dia de cultivo, como demonstrado pela expressão de proteínas neurônio-específico (neurofilamento-200 e  $\beta$ 3-tubulina). Para evitar o aumento na população de células gliais, tratamos a cultura celular, do 6º dia da diferenciação, com 50  $\mu$ g/ml de citosina arabinosídeo, permitindo a sobrevivência apenas de neurônios pós-mitóticos.

### ***3.5. Extração do RNA total***

A extração dos RNAs totais dos cérebros de camundongos e das células P19 embriônicas (Ind) e em processo de diferenciação (dias 2-8), foi realizada utilizando o reagente TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Contaminações por DNA foram eliminadas pelo tratamento da amostra com DNase I (Ambion Inc., Austin, TX, USA) na concentração de 1 U/ $\mu$ g de RNA por 15 min a 25 °C. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1 % corado com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo.

### ***3.6. Quantificação das amostras de RNA ou de cDNA***

A quantificação do RNA foi realizada através da leitura no espectrofotômetro a 260 e 280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). O fator de conversão DO 1 corresponde à concentração de 40  $\mu$ g/ml para soluções de RNA e 50  $\mu$ g/ml para amostras de DNA. As razões entre as leituras de absorbância, 260/280 nm, foram estimadas para verificar a pureza do RNA ou do DNA. A amostra foi considerada pura quando os valores estavam entre 1,8 e 2,0.

### **3.7. Transcrição Reversa**

Três µg de RNAs totais foram utilizados como moldes para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores randômicos (*random primers*), 200 U de M-MLV RT (RevertAid™ H *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 200 U µl Rnase Out (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 X de tampão da M-MLV RT em um volume final de 20 µl. O ciclo usado na reação foi de: 10 min a 20°C, 45 min a 42°C, 5 min a 95°C e 10 min a 4°C (Termociclador Master Cycler gradiente, Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

### **3.8. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)**

Cinco µl da reação de transcrição reversa, contendo as seqüências de DNA complementares (cDNA), foram utilizados como moldes para a amplificação das seqüências dos genes em estudo. A seqüência dos iniciadores utilizados e os tamanhos esperados estão demonstrados nas tabelas: I (para os receptores purinérgicos), II (para os receptores colinérgicos) e III (para os genes marcadores da diferenciação). As concentrações dos iniciadores, do cloreto de magnésio e as condições de amplificação foram específicas para cada seqüência de cDNA amplificada (tabela IV). Todos os produtos das PCRs foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 2 %, a banda correspondente à seqüência gênica foi purificada e clonada no vetor PGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Após as reações de seqüenciamento, verificamos se os fragmentos amplificados e clonados eram idênticos àquelas seqüências de cDNAs de camundongo depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Variações nas concentrações de cDNA foram normalizadas utilizando os níveis de transcritos de β-actina como controle interno da PCR.

### **3.9. Purificação dos fragmentos de PCR**

O produto da PCR, submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 2%, foi purificado utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation, Madison, USA).

**Tabela I:** Iniciadores usados para a amplificação dos subtipos de receptores P2X e P2Y para as reações de RT-PCR e PCR em tempo real (qRT-PCR). FWD = iniciador senso; REV = iniciador reverse; pb = pares de base.

Gene	Número de acesso	Iniciador	Seqüências (5' - 3')	Tamanho (pb)
<b>qRT-PCR</b>				
$\beta$ -actina	NM_007393	FWD REV	CTG GCC TCA CTG TCC ACC TT CGG ACT CAT CGT ACT CCT CTT	76
P2X1	AF250121, X84896, NM_012997	FWD REV	GAG AGT CGG GCC AGG ACT TC GCG AAT CCC AAA CAC CTT CA	233
P2X2	NM_153400, NM_053656	FWD REV	TCC CTC CCC CAC CTA GTC AC CAC CAC CTG CTC AGT CAG AGC	149
P2X3	NM_145526, NM_031075	FWD REV	CTT CCT AAC CTCACCGACAAG AAT GCC CAG AAC TCC ACC C	150
P2X4	NM_011026, NM_031594	FWD REV	CCC ACT GCC TGC CCA GAT AT ACA CTC ACC AAG GCA TAT GG	145
P2X5	NM_033321, NM_080780	FWD REV	GGA AGA TAA TGT TGA GGTTGA TCC TGA TGA ACC CTC TCC AGT	81
P2X6	X92070, NM_012721	FWD REV	CCC AGA GCA TCC TTC TGT TCC GGC ACC AGC TCC AGA TCT CA	152
P2X7	NM_011027	FWD REV	GCA CGA ATT ATG GCA CCG TC CCC CAC CCT CTG TGA CAT TCT	171
P2Y1	XM003033, NM_008772	FWD REV	CGT GCT GGT GTG GCT CAT T GGA CCC CGG TAC CTG AGT AGA	67
P2Y2	XM002564, BC012104.1, AY136753.1	FWD REV	TTC CTG CCA TTC CAC GTC A TTG AGG GTG TGG CAG CTG A	73
P2Y4	X91852, NM_020621	FWD REV	TGT CCT TTT CCT CAC CTG CAT TGC CCG AAG TGG GYG G	63
P2Y6	X97058, AF298899	FWD REV	CCT GCC CAC AGC CAT CTT GGC TGA GGTCATAGCAGACAG TG	67
<b>RT-PCR</b>				
P2X1	AF250121, X84896, NM_012997	FWD REV	AGG ATA CCA GAC CTC AAG TG GGA GAC AGG TTC TTC TCC C	701
P2X2	NM_153400, NM_053656	FWD REV	CAA AGT GTG GGA CGT GGA G CAT AGG CTT TGA TGA GAG TTC	700
P2X3	NM_145526, NM_031075	FWD REV	GGC CGC TGC GTG AAC TAC CTG GCT TTG TAG TGA TCA GC	665
P2X4	NM_011026, NM_031594	FWD REV	CTG TTC GAG TAC GAC ACG C CCA AAC ACG ATG ATG TCA AAG	860
P2X5	NM_033321, NM_080780	FWD REV	CTG ATA AAG AAG AGT TATCAG G GAG GTA GAT AAG TAC CAG GTC	936
P2X6	X92070, NM_012721	FWD REV	CGA TTC ACT CTC CAG TCC G GGT CCT CCA GTA GAA ACC G	427
P2X7	NM_011027	FWD REV	GGT ATC GAG ATC TAT TGG GA TTG AAG CCA CTG TAC TGC CC	1019
P2Y1	XM003033, NM_008772	FWD REV	CCA GAA ATG TGT GAT TTC AAC G CAC ACA CTG GTC TTT TGG	365
P2Y2	XM002564, BC012104.1 AY136753.1	FWD REV	ACC CGC ACC CTC TAC TAC T GCT TGG CAT CTC GGG CAA A	175
P2Y4	X91852, NM_020621	FWD REV	GTC CCT GGA CTG GAC TAA G GG ACA CTG CAG TAG AGG TTC	391
P2Y6	X97058, AF298899	FWD REV	CTT CCA TCT TGC ATG AGA C GGC ATA GAA GAG GAA GCG	379
$\beta$ -Actina	NM_007393	FWD REV	AGG AAG AGG ATG CGG CAG TGG CGA GGC CCA GAG CAA GAG AG	535

**Tabela II:** Iniciadores usados para a amplificação das subunidades de receptores nAChRs e para os subtipos de receptores mAChRs para as reações de RT-PCR e PCR em tempo real (qRT-PCR). FWD = iniciador senso; REV = iniciador reverso; pb = pares de base.

Gene	Número de acesso	Iniciador	Seqüências (5' – 3')	Tamanho (pb)
<b>qRT-PCR</b>				
mAChR1 REAL	NM_007698	FWD REV	TTG GCA CTT TCT CCA TGAAC GGC CAG TGT GCC CAG AGC	71
mAChR2 REAL	AF264049	FWD REV	GCT GCG TGG GTT CTT TCC T CCC CTA CGA TGA ACT GCC AG	66
mAChR3 REAL	AF264050	FWD VER	CCA TCT GGC AAG TGG TCT TC TGC CAC AAT GAC AAG GAT GTT G	86
Alfa 3	NM_145129	FWD VER	GTG ACC TAC TTCCCG TTT GAC CCA GGT CGA TCT TTG CCT TGT	82
Alfa 5	NM_176844	FWD VER	ATC AAA CGG CTG CCT CTC TTC TCA GAA ACG AGA GCC CGA TGC	67
Alfa 7	NM_007390	FWD VER	TCA TGC CAG CAA CAT CTG ATT C TGA GAG GCC CAC GAT GAT CAT	77
Beta 2	NM_009602	FWD VER	CAT GCA AGA TTG AGG TGA AGC A AGC GGA ACT TCA TGG TGC AGT	63
$\beta$ -actina	NM007393	FWD VER	CTG GCC TCA CTG TCC ACC TT CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T	63
<b>RT-PCR</b>				
mAChR1	NM_007698	FWD VER	CAG TCC CAA CAT CAC CGT CTT GAG AAC GAA GGA AAC CAA CCA C	441
mAChR2	AF264049	FWD VER	TGT CTC CCA GTC TAG TGC AAG G CAT TCT GAC CTG ACG ATC CAA C	369
mAChR3	AF264050	FWD VER	GTA CAA CCT CGC CTT TGT TTC C GAC AAG GAT GTT GCC GAT GAT G	245
Alfa 2	NM_144803	FWD VER	TTT GGA GGC TAC AAT CGC TG GTC CAG GAG CCA AAC TTC ATC	416
Alfa 3	NM_145129	FWD VER	CCT GTG GCT GAA GCA AAT CTG GGT GAT CAC CAG GAG AAA GAC	622
Alfa 4	NM_015730	FWD VER	CAA ATG CAC ATG CAA GGA A ACG TAT TTC CAG TCC TCC	192
Alfa 5	NM_176844	FWD VER	CAG GTA CAA CGG CAC TGT CAC CCA ATC TTC AAC AAC CTC GCG	802
Alfa 6	NM_021369	FWD VER	CCA AAC TTC TAA AGG AAT GC CCA AGC AGT GGC TGC AG	301
Alfa 7	NM_007390	FWD VER	CTG TAC AAG GAG CTG GTC AAG GAG CTC TTG AAT ATG CCT GGA G	362
Beta 2	NM_009602	FWD VER	CTC TGA GCT GGT GAC TGT ACA CGT ACA TGC CGT CAG CAT TGT	227
Beta 3	NM_027454	FWD VER	GTC TCT CTG AAG CAG ACG TCA GTT GCC CTT CAT CCC CTT TGC	629
Beta 4	NM_148944	FWD VER	CAG GAA TGG ACT GAC TAC CGC CAC ACA CAG TGG TGA CGA TGG	700

**Tabela III:** Iniciadores usados para a amplificação dos marcadores de células progenitoras neuronais (nestin) e neuronais maduras (enolase neurônio-específico). FWD = iniciador senso; REV = iniciador reverso; pb = pares de base.

Gene	Número de acesso	Iniciador	Seqüências (5' – 3')	Tamanho (pb)
<b>qRT-PCR</b>				
NEL	M11931	FWD REV	TAC GAG GTC TGC AAT GAA CG TTG GAG CTG GTG AAG GAA GCC	361
Nestin	NM_016701	FWD REV	GAG AGT CGC TTA GAG GTG CA CCA CTT CCA GAC TCC GGG AC	241

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

O fragmento de DNA, amplificado e purificado, foi clonado utilizando o Kit pGem-T Easy Vector System I (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.11. Preparação de células de bactérias competentes

A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , estocada à -80°C, foi crescida em ágar Luria Bertani (LB) (triptona 1 %; extrato de levedura 1 %; cloreto de sódio 0,5 %; pH 7,5; ágar bacteriológico 1,5 %) a 37°C durante 16 horas. Uma colônia dessa cultura foi inoculada em 3 ml de meio LB e incubada sob agitação de 200 rpm nas mesmas condições descritas acima. Após este período, utilizou-se uma alíquota de 1 ml dessa cultura para inocular 100 ml de meio LB, mantido a 37°C e sob agitação de 200 rpm, até atingir a DO (densidade óptica) de aproximadamente 600 nm no comprimento de onda de luz visível. Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 1 000 g, 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 resuspensas em 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M. As células competentes foram alíquotadas e usadas imediatamente ou estocadas a -80°C em presença de glicerol, em uma concentração final de 25 %.

### 3.12. Transformação das bactérias competentes

Cerca de 10 ng de mistura de ligação foi adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 50  $\mu$ 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 ml de meio LB, a 37°C, por 50 minutos. Após centrifugação a 5000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 100 µl de LB, plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 20 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase, *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*), 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo, *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), 1 µg/ml de ampicilina e crescidas a 37°C por 16 horas. As colônias brancas, contendo o inserto do DNA desejado, foram isoladas, inoculadas em 5 ml de meio LB ampicilina (1 µg/ml) e crescidas a 37°C por 16 horas.

### ***3.13. Mini preparação do DNA plasmidial das bactérias***

Obtivemos o DNA plasmidial das bactérias selecionadas no item anterior, utilizando o Kit Wizard SV Gel and Clean-UP System (Promega Corporation, Madison, USA), conforme as instruções do fabricante.

### ***3.14. Seqüenciamento***

As reações de seqüenciamentos foram realizadas utilizando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas pelo Serviço de Seqüenciamento de DNA (SSDNA), do Departamento de Bioquímica – IQUSP e pelo Centro de Toxinologia Aplicada, CAT-CEPID, do Instituto Butantan. O equipamento utilizado é um seqüenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

### ***3.15. PCR em tempo real***

O PCR em tempo real foi realizado para quantificar os níveis dos transcritos dos mRNAs dos receptores purinérgicos P2X, P2Y e dos receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina. Setecentos e cinquenta ng de RNA total, previamente tratado com DNase, foram submetidos a uma reação de transcrição reversa. O produto gerado foi amplificado por PCR em tempo real no sistema 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o método Sybr-green (Ueno et al., 2002; Lekanne-Deprez et al., 2002). As condições do ciclo térmico foram: 95°C por 10 minutos seguidos de



50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada ponto. As expressões relativas dos genes foram normalizadas com a expressão de um gene constitutivo, a  $\beta$ -actina. As análises das taxas dos transcritos dos mRNAs foram realizadas como já descrito por outros pesquisadores (Ueno et al., 2002; Lekanne-Deprez et al., 2002). Os iniciadores utilizados para a PCR em tempo real estão especificados nas tabelas I (para os receptores purinérgicos) e II (para os receptores colinérgicos).

### **3.16. Estudos de imunoperoxidase e de imunofluorescência**

Para os estudos de imunoperoxidase, células P19 indiferenciadas ou nos dias 6 e 8 da diferenciação ( $5 \times 10^5$ /ml) foram cultivadas em placas aderentes contendo seis poços (Lab-Tek®, Naperville, IL, USA). As células foram fixadas com paraformaldeído 2 % diluído em PBS (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,3) e desidratadas em uma plataforma pré-aquecida a 37 °C. Para bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos, os poços foram lavados com uma solução contendo 2 % de leite desnatado, 0,01 % de saponina e 2 % de soro de coelho. Após estes procedimentos, as células foram incubadas por 12 horas com o anticorpo primário específico na diluição recomendada pelo fabricante em solução de PBS com 0,3 % de Triton X-100 e 5 % de soro de cabra ou coelho. Foram usados anticorpos específicos para cada subtipo de receptor purinérgico (1:150), produzidos ou em cabra ou em coelho, anticorpos de camundongo anti-NF-160 (1:500) e anti-NF-200 (1:500) e anticorpos específicos para os receptores nicotínicos de acetilcolina de rato ou camundongo. Decorrido o tempo de incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários biotinilados na diluição de 1:200 durante 1 hora. Após lavagem com PBS, para remover ligações inespecíficas dos anticorpos secundários, as células foram expostas ao complexo avidina-biotina por uma hora. A atividade da peroxidase foi detectada na presença de diaminobenzidina e de peróxido de hidrogênio (Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Os controles negativos foram realizados pela repetição do procedimento anterior na ausência do anticorpo primário. As imagens foram coletadas usando a câmera digital Nikon DXM1200F (Surrey, UK, USA) acoplada ao microscópio Axiovert 200 (Zeiss, Jena, Alemanha). A análise dos dados foi realizada com o *software* Nikon ACT-1 version 2.62 *software* (Surrey, UK) como descrito por Adhikari et al. (2006).

Para os ensaios de imunofluorescência, foram usados os anticorpos primários específicos para os receptores purinérgicos e nicotínicos de acetilcolina citados acima, e anticorpos anti-*stage specific embryonic antigen* (anti-SSEA-1), anti-nestina ou anti-*neuron specific enolase* (anti-NEL) na diluição de 1:50 em PB com 0.3 % Triton X-100 e 5 % de soro de cabra. A imunofluorescência foi detectada com os anticorpos secundários anti-coelho IgG-Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para identificar a expressão da NEL, anti-coelho IgG-Cy3 (Abcam, Cambridge, MA) para nestina, anti-cabra IgG-Cy5 (Zymed Technologies, Invitrogen) para SSEA-1, anti-cabra IgG-Cy5 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) ou anti-cabra IgG-isotiocianato de fluoresceína (Abcam, Cambridge, MA) para detecção dos receptores para P2Xs ou P2Ys e anti-camundongo ou anti-rato IgG-isotiocianato de fluoresceína (Abcam, Cambridge, MA) para a identificação dos receptores nicotínicos de acetilcolina. Os anticorpos secundários foram usados nas diluições recomendadas pelos fabricantes. Após finalizar todos os procedimentos, as imagens foram coletadas com a câmera digital Nikon DXM1200F Digital Camera (Surrey, UK) acoplada ao microscópio Axiovert 200 microscope (Zeiss, Jena, Alemanha) e analisadas utilizando o programa MetaMorph version 6.3r0.

### **3.17. Ensaios de Western-blot**

As membranas celulares parcialmente purificadas das células P19 indiferenciadas ou nos dias 4, 6 e 8 da diferenciação foram preparadas por pipetagem até a fragmentação de mais de 98 % das células e centrifugação diferencial. Um milhão de células, coletadas de garrafas de cultura, foram lavadas três vezes com PBS, ressuspensas em solução de PBS contendo 2,8 µg/ml de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride hydrochloride*, PMSF), 1 mM de hidrocloreto de N-alfa-tosil-L-lisina-clorometil cetona (*Tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone Hydrochlorid*, TLCK) e 0,5 µg/ml leupeptina e estouradas por pipetagem (3 X 10 pulsos de 30 % com intervalos de 1 minuto entre os ciclos) até se obter no mínimo 95 % das células lisadas. O extrato celular foi centrifugado a 600 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 8 000 g por 20 min a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 100 000 g por 1 hora a 4 °C. Os microssomas foram lavados duas vezes com PBS contendo os inibidores de proteases e ressuspensas em 1 ml de PBS estéril. A concentração de proteína foi dosada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) tendo a albumina bovina como padrão.

Para os ensaios de Western-blot, 40 µg de proteínas microsossomais e marcadores de massa molecular foram desnaturados em água fervente por 5 minutos e, então, adição de tampão de amostra, separados em condições redutoras por corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% (dodecil sulfato de sódio em gel de eletroforese de poliacrilamida, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, 1970). Após separação, as proteínas foram eletroforéticamente transferidas (400 mA por 80 minutos) para uma membrana de nitrocelulose (Transblot, 0,45 µm, Bio-Rad). A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana de nitrocelulose com uma solução de Ponceau 0,1 %. Em seguida, a membrana foi descorada e bloqueada por 2 horas com solução de tampão tris-salino *tween* (*Tris-Buffered Saline*, TBS, *tween*, T) (tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6, Tween-20 0,03 %) contendo 3% de leite desnatado. Os anticorpos policlonais anti-P2X<sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>, anti-P2Y<sub>1,2,4,6</sub>, diluídos na concentração recomendada pelo fabricante em TBS-T com 3 % de leite desnatado, foram incubados com a membrana por 14 horas a 4°C. Decorrido este período, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T, bloqueada com TBS-T/3 % de leite desnatado por 30 minutos e, então, incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário específico na diluição de 1:1000. As proteínas marcadas pelos anticorpos foram detectadas usando o kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.18. Ensaios de proliferação celular**

A taxa de síntese do DNA foi determinada pelo ensaio de incorporação do 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU; Sigma, St. Louis, MO, USA), um análogo da uridina. Vinte quatro horas antes da adição das drogas as células embriônicas foram mantidas em meio definido. Posteriormente, as células P19 indiferenciadas foram incubadas, por 8 horas, em meio de cultura na presença de uma das drogas: ATP, ADP, UTP, 2-MeS-ATP, Bz-ATP ou ADPβS (para a avaliação dos receptores purinérgicos) e nicotina e muscarina (para a avaliação dos receptores colinérgicos). Após uma posterior incubação de 1 hora com 15 µM de BrdU, as células foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com tampão fosfato (*phosphate buffer*, PB), fixadas com metanol 10 % (v/v) durante 10 minutos a 4 °C, incubadas com 1 N de HCl por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas e mantidas em 0,1 M de tetraborato de sódio pH 8,5 por 15 minutos, novamente lavadas com PB e incubadas, por 12 horas a 4 °C, com

anticorpo monoclonal anti-BrdU (Roche) diluído em 2 % BSA-PBS (albumina de soro bovino, *bovine serum albumine*, BSA). Decorrido este período, as células foram mantidas em anticorpo de coelho IgG anti-mouse e, após 2 horas, elas foram incubadas com o complexo avidina-biotina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; 1:200). Aminoetilcarbazol (*aminoethylcarbazole*, AEC) foi usado como cromógeno. O ensaio foi analisado no microscópio Axiovert 200 (Zeiss, Jena, Alemanha). Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  E.P.M da porcentagem de células BrdU positivas sobre o número total de células do campo. No mínimo 10 campos de visão por lâmina foram considerados.

Também se realizou experimentos em que as células P19 embriônicas e diferenciadas em neurônios foram pré-incubadas com 10  $\mu$ M de ácido piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (*Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate*, PPADS), 10  $\mu$ M suramina, 10  $\mu$ M ácido ciclopiazônico (CPA, um inibidor da bomba de  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático) (Suzuki et al., 1992; Demaurex et al., 1992), 5  $\mu$ M de U-73122 (inibidor da PLC- $\beta$ ) (Yule e Williams, 1992), 5  $\mu$ M U-73343 (análogo estrutural não efetivo do inibidor U-73122), 10  $\mu$ M 1,2-bis (*o*-aminofenoxi)etano-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético tetra (acetoximetil) éster (*1,2-bis (o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester*, BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular), 1mM EGTA (*ethylene glycol-bis-(beta-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid*, etileno glicol-bis-(beta-amino-etil éter) por 30 minutos antes da adição do ATP (suramina e U-73343 não foram usados para células diferenciadas em neurônio). Também foram realizadas pré-incubações com 10  $\mu$ M de CPA, 5  $\mu$ M de U-73122, 5  $\mu$ M U-73343, 10  $\mu$ M BAPTA-AM, 1 mM EGTA, 10  $\mu$ M rianodina (Regula os níveis de cálcio intracelular via canais liberadores de  $Ca^{2+}$  ligados ao receptor. Os estoques de cálcio intracelulares sensíveis à rianodina são ativados em baixas concentrações, 10-100 nM, e bloqueado em altas concentrações, 10  $\mu$ M, de rianodina) (Alcazar et al., 1997), 100  $\mu$ M  $CdCl_2$  (Taylor e Peers, 1999) e 5  $\mu$ M nifedipina (bloqueadores de VOOC) (Gafni et al., 1997), 40 nM  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -Bgt, um antagonista do receptor nicotínico  $\alpha_7$ ) (Sharma e Vijayaraghavan, 2001), 1  $\mu$ M atropina (inibidor inespecífico dos receptores muscarínicos de acetilcolina) (Walch et al., 2000), 3  $\mu$ M mecamilamina (inibidor inespecífico dos receptores nicotínicos de acetilcolina) (Fieber e Adams, 1991), 0,1  $\mu$ M pirenzepina (nesta concentração é um inibidor do receptor muscarínico  $M_1$ ) (Buckley et al., 1989; Caulfield e Birdsall, 1998), 0,1  $\mu$ M 4-difenilacetoxi-

*N*-metilpiperidina metiodato (*4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide*, 4-DAMP), um antagonista muscarínico com alta especificidade para M<sub>3</sub> em relação aos demais receptores), 10 µM galamina (antagonista do subtipo M<sub>2</sub>), 1 µM de toxina da cobra Mamba Verde *Dendroaspis angusticeps* (MT3, antagonista do subtipo M<sub>4</sub>) (Caulfield e Birdsall, 1998; Michel et al., 1990; Doelman et al., 1991; Jolkkonen et al., 1994; Olanas et al., 1996), 100 ng/ml da toxina Pertussis (*Pertussis toxin*, PTX, exerce sua atividade tóxica em células eucarióticas pela *ADP ribosilation*, a subunidade α das proteínas G regulatórios triméricas (G<sub>i/o</sub>) (Katada e Ui, 1982) ou 1 µM YM-254890 (inibidor específico da proteína Gα<sub>q/11</sub>) (Takasaki et al., 2004) por 30 minutos antes da adição de nicotina ou muscarina.

Para os experimentos de dupla marcação de Brdu com SSEA ou com NEL, as células embrionárias e neurônios P19 foram incubados com anticorpo de cabra anti-SSEA-1 e anticorpo de cabra anti-NEL (1: 100, Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA), respectivamente, por 1 hora a temperatura ambiente. Após uma posterior incubação, por 1 hora à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários anti-IgG-Cy3 de cabra (Abcam, Cambridge, MA) ou anti-IgG-Alexa-Fluor 488 de cabra (Molecular Probes, Eugene, OR), as células sofreram sucessivas lavagens como citado anteriormente e foram, em seguida, expostas ao anticorpo primário anti-BrdU por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo secundário utilizado para a detecção de BrdU foi o anti-BrdU de mouse conjugado com Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Eugene, OR). Após finalizar a incubação de 1 hora com este anticorpo secundário, as células submetidas à dupla marcação BrdU/SSEA-1 ou BrdU/NEL foram lavadas com PBS e analisadas ao microscópio Axiovert 200 microscope (Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando o programa MetaMorph version 6.3r0.

### **3.19. Ensaio da hexoquinase**

A caracterização farmacológica exata dos ligantes específicos dos receptores de nucleotídeos é dificultada pelas impurezas frequentemente presente nas amostras dos nucleotídeos e pelo potencial das ectonucleases de catalisar a interconversão de trifosfonucleotídeos em difosfonucleotídeos e vice-versa. Para contornar estes problemas, nós avaliamos a atividade enzimática da hexoquinase, a qual transfere o γ-fosfato do ATP para a glicose, formando ADP e glicose-6-fosfato. Para o ensaio da hexoquinase, 1 mM de ADP foi incubado a 37°C em meio extracelular (*Extracellular medium*, EM; 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES, 10 de mM glicose, pH 7,4)

contendo 25 mM de glicose e 1 U/ml de hexoquinase por 30 minutos (Lazarowski et al., 1997).

### 3.20. Imageamento de $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia confocal

Células P19 indiferenciadas e no dia 8 do processo de diferenciação (250 000 células) foram transferidas, 48 horas antes dos ensaios, para placas de cultura de 35 mm (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA). Antes de iniciar as medidas, as células foram incubadas, a 37°C por 30 minutos, com 5  $\mu$ M de Fluo-3 AM, 0,5 % Me<sub>2</sub>SO e 0,1 % do surfactante plurônico F-127 em meio extracelular (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES, 10 de mM glicose, pH 7,4). A osmolaridade de todas as soluções variou entre 303 e 308 mosmol/l, não sendo diferente das condições normais (300 mosmol/l). Após serem coradas com Fluo-3 AM, as células foram lavadas e mantidas em meio EM por 20 min para garantir uma completa desesterificação do corante. A captação das imagens de  $[Ca^{2+}]_i$ , ou imageamento de  $[Ca^{2+}]_i$ , foram realizadas no microcópico confocal LSM 510 (Zeiss, Jena, Alemanha), usando imagens do tamanho de 256  $\times$  256 pixels e taxa de aquisição de 1 imagem por segundo. A fluorescência do Fluo-3 foi excitado com um feixe de laser de íon argônio no comprimento de onda de 488 nm, a luz emitida a 515 nm foi detectada usando um filtro de *long-pass* acima de 510 nm. No final de cada experimento, adicionou-se às células 5  $\mu$ M de ionóforo de Ca<sup>2+</sup> (4-Br-A23187) para a determinação da fluorescência máxima ( $F_{max}$ ), seguida de 10 mM de EGTA para determinar os valores da fluorescência mínima ( $F_{min}$ ). A concentração de cálcio intracelular livre,  $[Ca^{2+}]_i$ , foi calculada pela equação  $[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)}$  (Hallett et al., In: Siddle e Hutton, 1990), onde  $K_d$  é a constante de dissociação do fluoróforo de cálcio; que no caso do Fluo 3AM é de 450 nM (Hallett et al., 1990); F é a fluorescência da célula estimulada durante um determinado período de tempo,  $F_{min}$  é a fluorescência mínima obtida após adição de 10 mM de EGTA, e  $F_{max}$  é a fluorescência máxima obtida após aplicação de 5  $\mu$ M de ionóforo (4-Br-A23187). Os dados de imageamento de  $[Ca^{2+}]_i$  deste estudo foram obtidos a 20-22°C. As variações de  $[Ca^{2+}]_i$  foram calculadas a partir do valor médio de no mínimo 10 células em pelo menos sete experimentos independentes. Para as medidas realizadas em meio extracelular sem Ca<sup>2+</sup> livre, as células foram pré-tratadas com EM suplementado com 1 mM de EGTA, durante 5 minutos antes do início da estimulação das células. A razão média  $F/F_0$  ( $F_0$ , é a fluorescência da célula não estimulada) foi de  $0,20 \pm 0,03$  (média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 34$ ) e

$0,24 \pm 0,03$  (média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 38$ ) para medidas de curta e longa duração, respectivamente; estes valores são consistentes com os relatados para este corante em outros sistemas (Minta et al., 1989; Sharma e Vijayaraghavan, 2001). A média da fluorescência de base foi normalizada para a fluorescência de  $F_{\min}$   $0,21 \pm 0,02$  ( $n = 42$ ). Os dados foram calculados como uma porcentagem de  $F/F_0$  (para os receptores colinérgicos) e da variação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ , para os receptores purinérgicos. Efeitos não significativos no nível basal da fluorescência foram observados após a incubação das células com qualquer um dos bloqueadores e antagonistas usados, com exceção do  $\text{CdCl}_2$ . Incubações com  $\text{CdCl}_2$  produziram um leve, mas sustentado, aumento na fluorescência basal, impedindo seu uso em mediadas de longa duração.

A atropina e a mecamilamina foram aplicadas como inibidores inespecíficos dos receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina, respectivamente (Walch et al., 2000; Fieber e Adams, 1991). A pirenzepina ( $0,1 \mu\text{M}$ ), nesta concentração é um inibidor específico do receptor muscarínico  $M_1$ , ou o 4-DAMP, um antagonista dos receptores muscarínicos altamente seletivo para o subtipo  $M_3$  (Buckley et al., 1989; Caulfield e Birdsall, 1998), foram aplicados juntamente com  $3 \mu\text{M}$  de muscarina para esclarecer se os subtipos de receptores muscarínicos  $M_1$  e  $M_3$  são funcionais em células P19 diferenciadas em neurônios. A participação dos subtipos  $M_2$  e  $M_4$  no aumento dos níveis de cálcio intracelular,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , promovido pela muscarina, foi estudada na presença de seus respectivos inibidores,  $10 \mu\text{M}$  de galamina e  $1 \mu\text{M}$  de MT3 (Caulfield e Birdsall, 1998; Michel et al., 1990; Doelman et al., 1991; Jolkkonen et al., 1994; Olanas et al., 1996). Para caracterizar a via de transdução de sinal, mediada pelos receptores muscarínicos, que desencadeia a mobilização de cálcio intracelular,  $5 \mu\text{M}$  do inibidor da PLC, U-73122 (Yule e Williams, 1992), foi pré-incubado por 5 minutos com células P19 indiferenciadas antes das medidas do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Também se realizou mediadas das elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  com  $100 \mu\text{M}$  de nicotina em neurônios pré-incubados durante 14 minutos com  $10 \mu\text{M}$  de CPA, um inibidor da bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) do retículo endoplasmático (Suzuki et al., 1992; Demaurex et al., 1992). Bloqueadores de canais VOOC, tais como  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (Taylor e Peers, 1999) e  $5 \mu\text{M}$  de nifedipina (Gafni et al., 1997) foram usados para avaliar a participação destes canais na elevação dos níveis de cálcio desencadeada pela nicotina. Os bloqueadores de VOOC foram pré-incubados com as células por 15 minutos à temperatura ambiente e em ambiente escuro, antes da aplicação da nicotina. Para avaliar a participação do receptor

nicotínico  $\alpha_7$  nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$ , uma solução contendo 40 nM de  $\alpha$ -Bgt foi mantida com as células por 30 minutos antes das medidas de  $[Ca^{2+}]_i$ .

### ***3.21. Categorização da atividade transiente de $[Ca^{2+}]_i$***

As atividades transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  foram classificadas como eventos globais quando o aumento da fluorescência ocorreu em todo o corpo celular, enquanto, as atividades transientes locais de  $[Ca^{2+}]_i$  referem-se aos aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  espacialmente restritos, com amplitudes três vezes maiores que as do ruído de fundo. Através deste estudo, os eventos locais de  $[Ca^{2+}]_i$  foram analisados somente nas células com morfologia neuronal.

### ***3.22. Classificação celular***

As células P19 foram classificadas como neurônios ou glias com base em suas características morfológicas. Células em fase clara, com corpos celulares ovais e pequenos e possuindo um ou dois prolongamentos, não muito ramificadas (tipicamente não muito maiores que duas ou três vezes o diâmetro celular) foram consideradas como neurônios. A acuracidade em que estes critérios permitem a identificação de neurônios foi verificada com testes duplo-cegos nos quais, células nos dias 4 a 8 da diferenciação neuronal foram fixadas e imunomarcadas com anticorpos NEL como descrito acima. Para cada campo, foram tiradas fotografias com iluminação tanto com luz fluorescente como de transmissão. As células foram primeiramente categorizadas como neurônios ou glias de acordo com o critério mencionado acima; a identidade exata das células foi então associada com as fotografias de imunofluorescência correspondentes. No dia 4, somente uma pequena porcentagem (~1 %) das células classificadas como neurônios foram imunopositivas para GFAP. A maioria das células (~60 %) classificadas como neurônios foram positivas para NEL; ~30-40 % foram positivas para nestina e assim, foram consideradas como precursoras neuronais imaturos (desde que não fossem positivas para NEL). No dia 8, >90 % das células classificadas como neurônios coraram-se para NEL, consistente com a expressão deste marcador como célula madura. Um exemplo de medida da atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  de células neuronais e gliais é mostrada na figura 31.



### ***3.23. Determinação das concentrações dos íons $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{K}^+$ nos meios celulares por absorção atômica e fluxo de chama, respectivamente***

As concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$  foram determinadas por espectrometria de absorção atômica no laboratório do Prof. Dr. Pedro Vitoriano do Departamento de Química, do Instituto de Química, USP.

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico; água destilada-deionizada (Milli-Q) foi usada em todos os experimentos. Solução estoque de 1000 mg/ml foi preparada a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  (Aldrich Chem. Co., USA): 1 000 g de cálcio metálico padrão foi dissolvido em HCl 1:1 v/v sob agitação, e a solução obtida foi diluída em água. Os experimentos foram conduzidos com soluções de referência contendo de 2 a 6 mg/l de  $\text{Ca}^{2+}$  em meio 1,0 % v/v de  $\text{HNO}_3$ .

As determinações das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite GTA 100 (Varian, modelo 800), equipado com corretor Zeeman para correção de fundo, amostrador automático, sistema de aquisição de dados OS2, lâmpada de catodo oco de  $\text{Ca}^{2+}$ , operando a 7 mA no comprimento de onda de 357,9 nm (fenda de 0,2 nm).

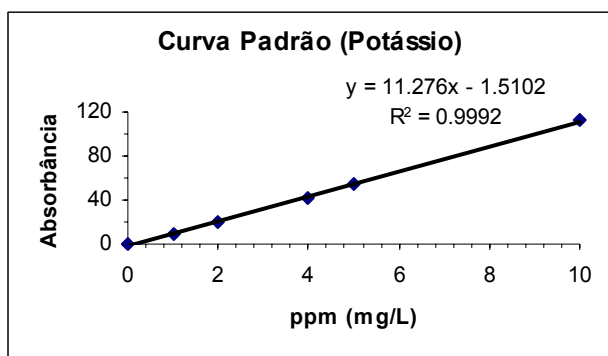
Foram empregados tubos de grafite recobertos piroliticamente (Part number 63-100011-00) e Ar 4.8 (White Martins) como gás de purga. Utilizou-se integração dos sinais para eliminar erros na leitura de sinais causados por efeitos cinéticos que possam ocorrer durante o ciclo de aquecimento. Os volumes injetados no forno de grafite foram de 30  $\mu\text{L}$  para as suspensões de meios definido e suplementado com SFB.

Para averiguar efeitos de matriz, dois procedimentos de quantificação foram utilizados: o primeiro envolveu soluções de referência preparadas em 1% v/v  $\text{HNO}_3$  e o outro adotando o método das adições de padrão.

A dosagem dos íons  $\text{K}^+$  foi determinada por espectrometria de chama, nos laboratórios de ensino do departamento, com a autorização do Prof. Dr. Pedro Vitoriano. As curvas e gráficos obtidos seguem abaixo:

## Íons K<sup>+</sup>

<i>Amostra</i>	<i>Absorbância</i>	<i>ppm</i>	<i>Fator de Diluição</i>	<i>ppm x FD</i>	<i>Concentração (mM)</i>
<b>Meio definido</b>	62	5,63	40	225,29	5,76
<b>Meio suplementado com soro</b>	66	5,99	40	239,48	6,12



## Íons Ca<sup>2+</sup>

Os cálculos para determinar a quantidade de EGTA que deveria ser adicionada para indisponibilizar os íons Ca<sup>2+</sup> para as células foram feitos considerando os pHs 7,2, 7,3 e 7,4. As equações estão demonstradas:

<b>Equação</b>	<b>Log K</b>	<b>Concentração Equilíbrio (M)</b>
$\text{HEGTA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{EGTA}$	9,53	$6,745 \cdot 10^{-4}$
$\text{CaEGTA} \rightleftharpoons \text{Ca}^{+2} + \text{EGTA}$	10,89	$7,122 \cdot 10^{-5}$
$\text{CaHEGTA} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{H}^+ + \text{EGTA}$	14,83	$2,470 \cdot 10^{-8}$

## Meio definido

<b>Componentes</b>	<b>Concentração inicial (M)</b>	<b>Concentração Equilíbrio (M)</b>
H <sup>+</sup>	pH 7,3	$3,981 \cdot 10^{-8}$
Ca <sup>2+</sup>	$3,5625 \cdot 10^{-4}$	$1,835 \cdot 10^{-9}$
EGTA	$9,25 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$

**Meio com soro fetal bovino**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração inicial (M)</b>	<b>Concentração Equilíbrio (M)</b>
H <sup>+</sup>	pH 7,3	$3,981.10^{-8}$
Ca <sup>2+</sup>	$4,575.10^{-4}$	$2,36.10^{-9}$
EGTA	$9,46.10^{-4}$	$5,00.10^{-6}$

***RESULTADOS:  
RECEPTORES  
PURINÉRGICOS***

## 4. ESTUDO DAS BASES MECANÍSTICAS DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL MEDIADA PELA ATIVIDADE DE $[Ca^{2+}]_i$ PELOS RECEPTORES PURINÉRGICOS

### 4.1. RESULTADOS

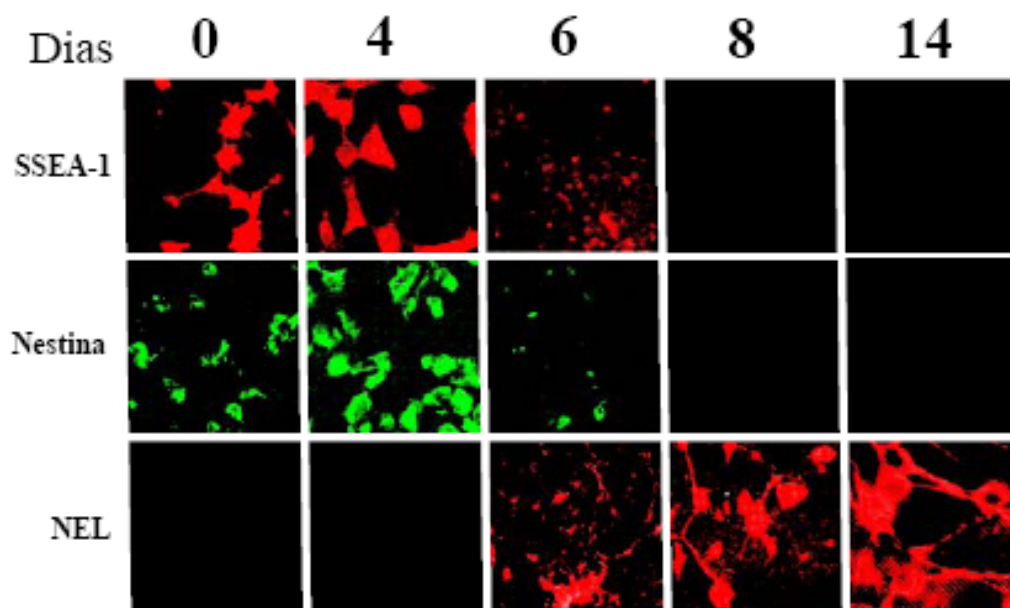
#### 4.1.1. Caracterização da diferenciação neuronal nas células P19

As células P19 foram induzidas a se diferenciarem em neurônios pela adição de ácido retinóico e mantendo-as em suspensão na cultura. Como modificamos o protocolo de diferenciação originalmente publicado (Jones-Villeneuve et al., 1982; Jonk et al., 1988; Berg and McBurney, 1990), as células foram diferenciadas em meio de composição definida na tentativa de limitar a proliferação de células gliais e fibroblastos. Para se caracterizar as fases iniciais da diferenciação no meio definido, procedemos com estudos de imunofluorescência usando anticorpos contra proteínas que são específicas respectivamente, para as células indiferenciadas, progenitoras neuronais e neurônios maduros (Figura 1). No dia 6 após a indução da diferenciação, mais do que 95 % das células em cultura não expressaram o SSEA-1, como o marcador de células indiferenciadas (Wu e Chow, 2005). A expressão de nestina, como um marcador para progenitores neuronais (Ho e Liem, 1996), teve sua maior expressão observada no dia 4 da diferenciação, marcando mais da metade de todas as células presentes. A expressão de nestina, como marcador de células progenitores nos dias 3-5, foi reduzida quando as células P19 seguiram para os estágios finais da diferenciação, nos dias 6 a 8. Neste estágio, a maioria das células expressaram a NEL (Figura 1), neurofilamentos de médio peso molecular (NF-160, dados não mostrados) e neurofilamentos de alto peso molecular (NF-200). A tabela IV resume os dados obtidos.

**Tabela IV:** Expressão dos marcadores fenotípicos da diferenciação neuronal em células P19

Marcadores Fenotípicos	Dias da Diferenciação				
	Ind	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 14
SSEA-1	++++	++	+	ND	ND
Nestin	++	++++	+	ND	ND
NEL	ND	+	++	++++	++++
NF200	ND	+	++	++++	++++
NF160	ND	+	++	++++	++++

Sinais de + indicam a quantidade de células positivas em relação ao total. P19 Ind – células P19 indiferenciadas. ND – não detectado



**Figura 1: Detecção do fenótipo celular durante a diferenciação neuronal das células P19.** A expressão do antígeno embriônico estágio específico (*stage-specific embryonic antigen*, SSEA-1), da nestina e da enolase neurônio-específica (*neuron-specific enolase*, NEL) em células P19 indiferenciadas e tratadas com RA nos dias 4, 6 e 8 da diferenciação foi determinada por experimentos de imunofluorescência, como detalhado na seção **Métodos**.

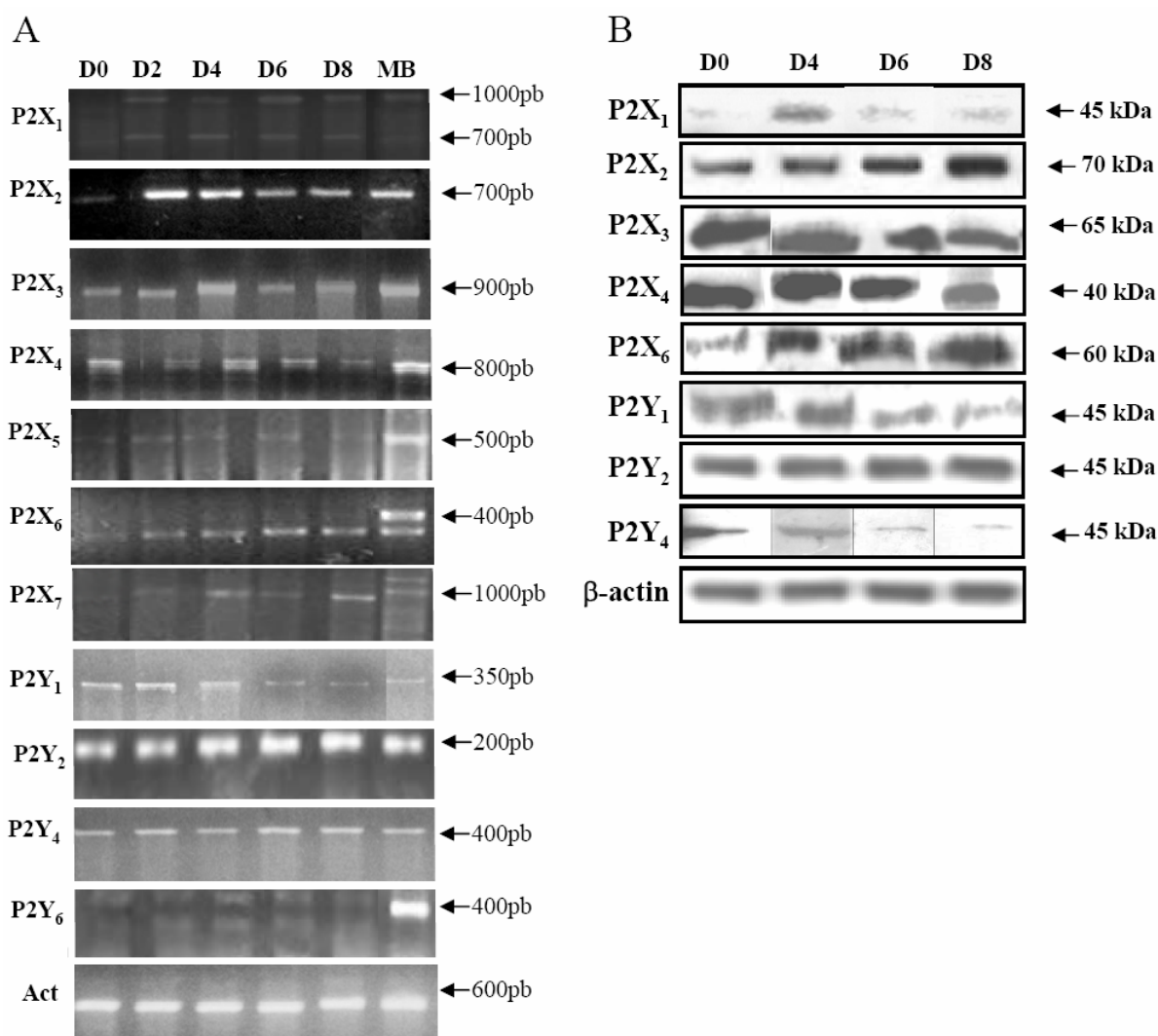
Em seguida, à caracterização das alterações fenotípicas das células P19 em diferenciação, estudamos os perfis de expressão e atividades de  $[Ca^{2+}]_i$  dos receptores purinérgicos e colinérgicos, que, possivelmente, participam na geração dos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  necessários para o progresso da diferenciação.

#### ***4.1.2. Caracterização da expressão gênica e protéica dos receptores purinérgicos***

##### **4.1.2.1. Expressão dos receptores purinérgicos em células P19 durante a diferenciação neuronal**

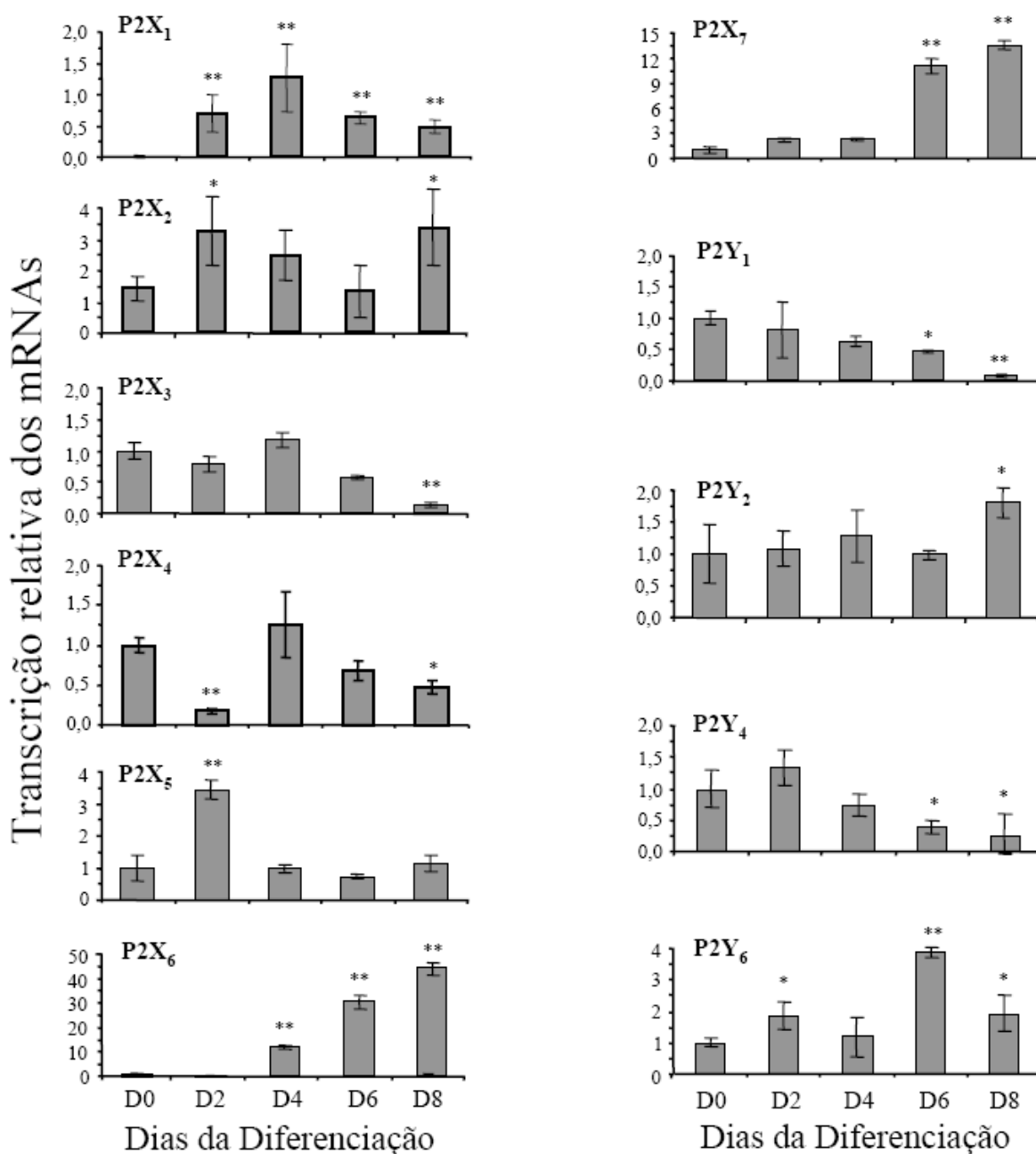
Nós estudamos a indução da expressão gênica e protéica dos subtipos dos receptores P2X e P2Y durante os estágios de células P19 indiferenciadas até a diferenciação em células progenitoras neuronais seguidas pela maturação de neurônios funcionais. Os cDNAs que foram transcritos reversamente a partir dos RNAs totais das células, que foram coletados nos dias 0 – 8 da diferenciação foram amplificados por PCR na presença de iniciadores específicos para os subtipos de P2X ou P2Y. O sequenciamento do DNA confirmou a homologia de cada cDNA amplificado com as seqüências de cDNA dos receptores purinérgicos de camundongo (dados não mostrados). Estes foram avaliados pela ferramenta disponível no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A transcrição relativa dos mRNAs dos subtipos dos receptores purinérgicos foi quantificada usando a metodologia do PCR em tempo real.

A expressão gênica dos subtipos de receptores P2X e P2Y demonstrou-se ser regulada durante o curso da diferenciação. A expressão dos genes dos subtipos P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>6</sub> e P2X<sub>7</sub> (Figuras 2A e 3) (Sendo que a figura 3 é referente aos dados de quantificação por PCR em tempo real e é independente da figura 2A) aumentaram quando as células diferenciaram-se em progenitoras e neurônios. A expressão gênica dos receptores P2X<sub>3</sub> e P2X<sub>4</sub>, que é regulada positivamente em células embriônicas, ou indiferenciadas, decresceram quando as células tornaram-se neurônios funcionais. A expressão dos genes dos receptores P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>5</sub> não pode ser detectada em células embriônicas e somente foi presente em níveis basais após a indução da diferenciação com RA. A concentração em equilíbrio dos mRNAs codificantes para os receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> foi alta nos estágios iniciais, decrescendo durante o processo de diferenciação. A expressão gênica dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> já era presente em células embriônicas, aumentando durante a diferenciação.



**Figura 2: Detecção do perfil da expressão gênica dos subtipos de receptores P2X e P2Y durante a diferenciação neuronal das células P19 por RT-PCR.** (A) A expressão gênica dos receptores P2X e P2Y foi detectada através de RT-PCR usando RNA total extraído de vários dias da diferenciação. A RT-PCR como detalhada na seção Métodos foi realizada na presença de iniciadores para os subtipos P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub> e os subtipos P2Y<sub>1,2,4,6</sub>. Os fragmentos de DNA amplificados foram confirmados pelo sequenciamento do DNA, sendo complementares aos cDNAs dos subtipos de receptores purinérgicos. Os RNAs totais extraídos dos cérebros de camundongos (*mouse brain*, MB) foram usados como controles positivos para os procedimentos de RT-PCR. As reações de RT-PCR com o mRNA de β-actina (Act) foram empregadas para averiguar a integridade dos respectivos RNAs totais extraídos. A amplificação dos cDNAs de vários tamanhos resulta do processamento alternativo do pré-mRNA codificante para os subtipos de receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>. (B) A detecção da expressão dos receptores P2X e P2Y nos dias 0 -8 da diferenciação foi realizada pela análise de Western blot como descrito na seção de Métodos. A expressão de β-actina foi detectada como controle interno para avaliar a integridade dos extratos de proteínas.





**Figura 3: Quantificação da transcrição do mRNA dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 através do PCR em tempo real.** Os níveis de expressão relativa foram corrigidos com o controle interno de  $\beta$ -actina. Os gráficos apresentam os níveis de transcrição de mRNA dos receptores P2X e P2Y das células em diferenciação comparada àquelas no estágio de indiferenciadas, que foram normalizadas para um. As células do dia 8 da diferenciação foram pré-tratadas no dia 6 com citosina arabinosídeo, para se evitar a contaminação das culturas celulares com o aumento na população de células gliais em proliferação. As barras de erro indicam os valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*  $p < 0,05$  comparado aos dados controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos dados controles.

A detecção protéica dos receptores P2X e P2Y foi realizada através de imunocitoquímica, sendo realizada com células indiferenciadas, células do estágio de progenitor neuronal (dia 4, D4), durante a fase final da diferenciação (dia 6, D6) e com neurônios diferenciados (dia 8, D8) (Figura 4). A expressão protéica dos subtipos dos receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>6</sub> estavam em acordo com a transcrição dos níveis dos mRNAs, como determinado pela quantificação pelo PCR em tempo real. Entretanto, as proteínas dos receptores P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> não foram detectadas em quaisquer estágios da diferenciação. Estes resultados foram confirmados pela análise de Western-blot. A expressão das proteínas de P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> decresceu quando as células seguiam durante o processo de diferenciação, enquanto os níveis de expressão das proteínas dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> permaneceram estáveis durante o período da diferenciação ou desenvolvimento neuronal.

A imunoreatividade dos receptores P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>4</sub> foi presente somente em uma pequena população celular. A marcação por imunocitoquímica do subtipo P2X<sub>4</sub> em células embrionárias foi mais forte quando comparada àquela de outros subtipos de receptores P2X e P2Y. No quarto dia da diferenciação, as células no estágio de progenitor apresentaram uma alta imunomarcação para os receptores ionotrópicos P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>6</sub> e para os metabotrópicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>. Neste estágio, ocorreu uma redução na expressão do receptor P2X<sub>4</sub>, e uma baixa imunomarcação para o receptor P2X<sub>1</sub> foi detectada. Entretanto, no sexto dia da diferenciação a expressão do subtipo P2X<sub>4</sub> aumentou novamente. Uma expressão aumentada também foi observada para o receptor P2X<sub>6</sub>. Ao mesmo tempo, uma forte redução na expressão dos receptores P2X<sub>3</sub> e P2Y<sub>4</sub> foi notada. Os níveis de expressão dos outros receptores purinérgicos mantiveram-se quando as células embrionárias tornaram-se progenitoras neuronais. O fato de a expressão de alguns receptores iniciar, como o subtipo P2X<sub>1</sub>, e a de outros caírem abaixo do limite de detecção, tais como os receptores P2X<sub>3</sub>, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub>, pode ser explicado pelas modificações fenotípicas que ocorrem durante o progresso da diferenciação. Em neurônios diferenciados, não houve imunomarcação detectável contra os receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub>.

Através da análise de Western-blot, comparamos a expressão protéica dos receptores P2X e P2Y em células embrionárias (Indiferenciadas, Ind) e neurônios diferenciados do oitavo dia do desenvolvimento (Dia 8, D8). As proteínas dos receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>6</sub> estavam presentes em células embrionárias. Células D8 mostraram um aumento na expressão dos subtipos, P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>6</sub>, enquanto os níveis do P2X<sub>4</sub> decresceram levemente.

Em acordo com os dados de imunocitoquímica, não foi detectado nenhuma expressão protéica do receptor P2X<sub>3</sub> no dia 8 (Figura 2B). Os receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> não foram identificados nem em células embriônicas ou em neurônios maduros (Figura 2B). No entanto, os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> foram identificados em ambos os estágios. Os níveis protéicos para o P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> apresentaram um aumento no estágio neuronal maduro. Os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> estavam presentes somente em células indiferenciadas (Figura 2B). Os níveis protéicos para o dia 8, relativos aos níveis protéicos das células embriônicas, foram: P2X<sub>2</sub> (250 %), P2X<sub>6</sub> (340 %), P2Y<sub>2</sub> (200 %) e P2Y<sub>6</sub> (300 %), medida pela densidade óptica gerada pela aquisição das imagens de Western-blot. Em contraste, os níveis de expressão dos subtipos de receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> foram maiores em células embriônicas, decaindo para aproximadamente 2 % e 0,5 % em células neuronais maduras, respectivamente. O nível de expressão do receptor P2X<sub>4</sub> foi reduzido para 29 % em células neuronais em relação ao das células embriônicas.

#### ***4.1.3. Caracterização da atividade de $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos receptores purinérgicos***

Os nucleotídeos liberados pelas células induzem elevações nas  $[Ca^{2+}]_i$  através da ativação dos receptores purinérgicos. Sendo assim, a análise funcional destes receptores foi estudada pelas  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos purinoceptores através de microscopia confocal usando o indicador fluorescente de  $[Ca^{2+}]_i$ , Fluo 3AM.

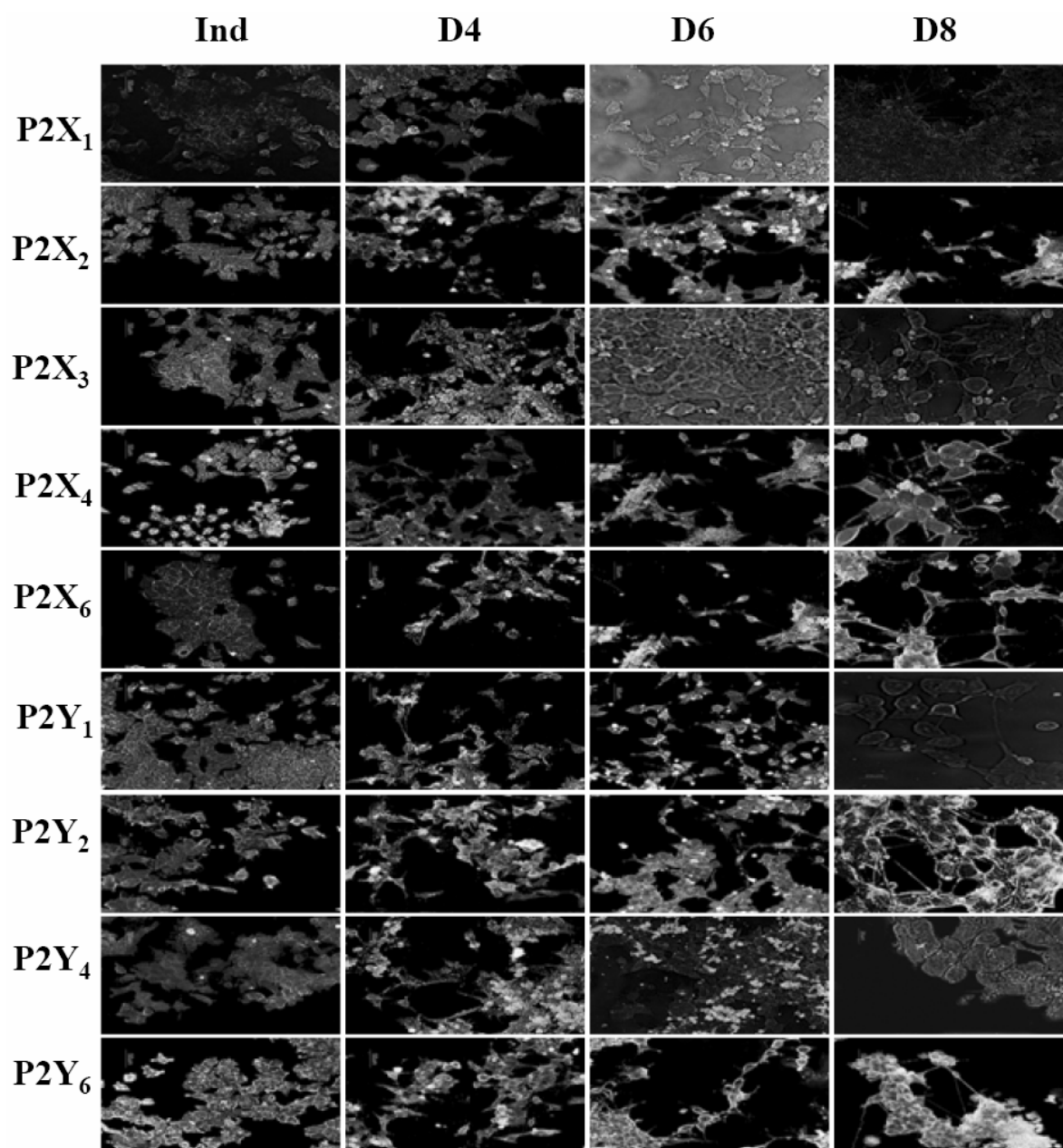
##### ***4.1.3.1. Níveis da $[Ca^{2+}]_i$ em repouso das células P19 embriônicas e neuronais***

Os níveis basais calculadas da  $[Ca^{2+}]_i$  foram de  $25 \pm 10$  nM em células embriônicas ( $n = 134$ ) e de  $70 \pm 14$  nM em neurônios maduros ( $n = 142$ ).

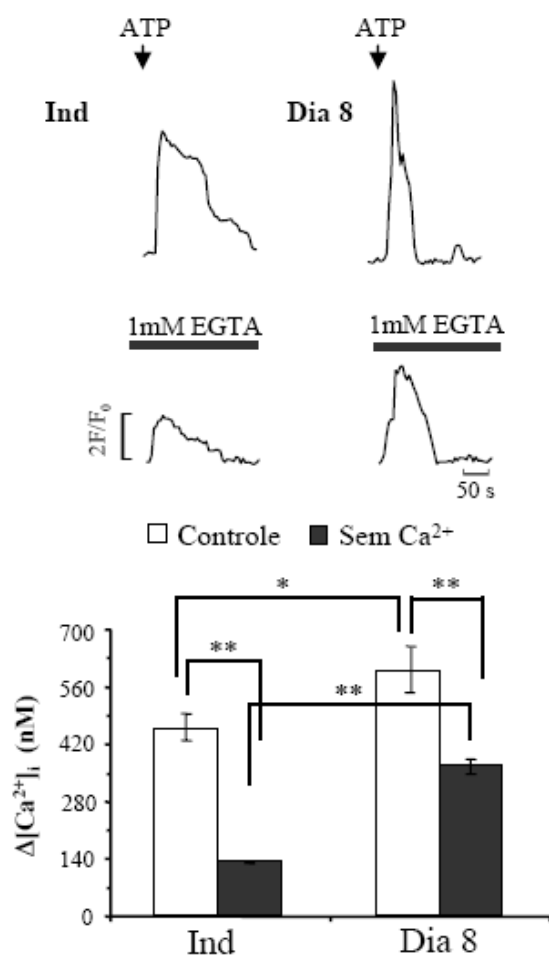
##### ***4.1.3.2. Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ após a estimulação dos receptores purinérgicos***

###### ***4.1.3.2.1. Respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelo ATP em células P19 indiferenciadas e neurônios diferenciados***

A figura 5 apresenta traçados típicos e individuais de células embriônicas e neuronais (Figura 5) estimuladas com ATP. Os resultados apresentam que este agonista produz um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  típica de pico e platô, seguida pela sua redução por inativação do receptor (Wood et al., 1975). Na figura 5, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  na ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular (EGTA 1 mM foi adicionado ao meio extracelular) também são apresentados.



**Figura 4: Detecção dos perfis de expressão dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 pela marcação imunocitoquímica e Western-blot.** Após fixação, as células foram incubadas com anticorpos primários subtipos específicos seguida pela adição de um anticorpo secundário biotilado. A reação foi revelada pela coloração por imunoperoxidase. A expressão dos subtipos de receptores purinérgicos foi verificada em células indiferenciadas (painéis à esquerda) e células P19 dos dias, 4 e 6 (painéis centrais) e 8 (painéis à direita) seguidas pela indução com RA para a diferenciação neuronal.



**Figura 5: Elevação na  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pela ativação dos receptores P2X e P2Y em células P19 embriônicas e neuronais do oitavo dia da diferenciação.** As células foram carregadas com o indicador sensível à  $Ca^{2+}$ , Fluo-3 AM. A concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  livre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) foi monitorada usando imageamento de  $[Ca^{2+}]_i$  em células únicas por microscopia confocal. Após a estimulação com 100  $\mu$ M de ATP e registros subsequentes nas variações da  $[Ca^{2+}]_i$ , as células foram lavadas com meio extracelular, e um intervalo de pelo menos 5 min foi mantido entre as medidas permitindo a resensibilização dos receptores. As setas indicam o momento da aplicação dos agonistas. A aplicação de 100  $\mu$ M de ATP suposta em resultar na máxima ativação dos receptores purinérgicos, promoveu um aumento rápido e transiente na  $[Ca^{2+}]_i$  em células indiferenciadas e células diferenciadas do dia 8. Painéis superiores: Células P19 embriônicas e diferenciadas em neurônios foram estimuladas tanto por ATP sozinho quanto por ATP (100  $\mu$ M) na presença de 1 mM de EGTA. Painéis inferiores indicam os valores dos aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos na presença de ATP ou ATP e EGTA. Os dados mostrados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 7 experimentos independentes, consistindo de aproximadamente 8 células para cada experimento, resultando em um total de 70-72 células. \*\*  $p < 0,0001$  comparado aos valores dos controles.

Embora uma eliminação completa dos aumentos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  seja observada quando as células são estimuladas com uma solução de KCl 50 mM (dados não mostrados), uma resposta residual ao ATP é mantida. Em adição, nenhuma fase sustentada foi detectada. Isto é consistente com respostas típicas de  $[Ca^{2+}]_i$  dos receptores GPCRs, que consistem em uma fase com um aumento transiente inicial, devido principalmente à mobilização de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares, seguido por uma fase sustentada, devida à entrada de  $Ca^{2+}$  a partir dos compartimentos extracelulares (An et al., 1999). Tanto os níveis basais de  $[Ca^{2+}]_i$  quanto os aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos por ATP foram menores em células indiferenciadas quando comparado com as células neuronais. Os níveis basais de  $[Ca^{2+}]_i$  calculados a partir da variação na concentração de  $Ca^{2+}$  livre citosólico ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) foram de  $25 \pm 10$  nM em células embriônicas ( $n = 134$ ) e  $70 \pm 14$  nM em neurônios maduros P19 ( $n = 142$ ). A elevação na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular apresentaram um grande aumento em células neuronais maduras ( $\Delta F = 86 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 609 \pm 53$  nM,  $n = 8$ ) quando comparadas às células embriônicas ( $\Delta F = 67 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 469 \pm 32$  nM,  $n = 8$ ) (Figura 5). Quando utilizamos meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre (meio EM com 1 mM EGTA) ocorreu um decréscimo na  $\Delta F$  em células P19 de ambos os estágios do desenvolvimento neuronal. Em células indiferenciadas esta variação caiu para  $31 \% \pm 1$  ( $\Delta F = 20 \pm 0,4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 135 \pm 2$  nM,  $n = 8$ ) em relação ao controle. Células do oitavo dia da diferenciação apresentaram um aumento que corresponde a  $61 \% \pm 5$  ( $\Delta F = 53 \pm 4$  and  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 371 \pm 18$  nM,  $n = 8$ ) do controle (Figura 5). Para se avaliar se canais de cálcio operados por voltagem (*voltage-operated calcium channels*, VOCC) desempenham alguma função no influxo intracelular de  $Ca^{2+}$  induzido pelo ATP, testamos o efeito de  $5 \mu M$  nifedipina diidropiridina (um bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$  tipo L sensíveis à voltagem) (Gafni et al., 1997) em células indiferenciadas. Nenhuma alteração na resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  mediada por ATP foi notada (dados não mostrados).

#### **4.1.3.2.2. Medidas de $[Ca^{2+}]_i$ e a determinação dos perfis de agonistas em células P19 embriônicas e neuronais após a aplicação de análogos de ATP**

Utilizamos os valores máximos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por uma grande variedade de nucleotídeos para obter dados de células embriônicas e neurônios maduros. Os dados são apresentados como curvas de dose-resposta (Figura 6; Tabela V). Os efeitos do ATP na  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  foram dose-dependentes e foram mais altos, em ambos os estágios da diferenciação (embriônico e neuronal diferenciado), quando comparados aos demais

agonistas purinérgicos. A concentração de ATP necessária para a ativação de 50 por cento da atividade máxima do receptor ( $EC_{50}$ ) foi de 39,2 (1,0-4190,0)  $\mu\text{M}$  (valores médios e intervalo de confiança de 95 %) para células embriônicas e de 3,1 (1,0-11,3)  $\mu\text{M}$  (valores médios e intervalo de confiança de 95 %) para as células D8 (Figura 6A).

**Tabela V:** Valores de  $EC_{50}$  da ativação dos receptores purinérgicos em células P19 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios.

Agonista	Células P19 Indiferenciadas	Neurônios P19
ATP ( $\mu\text{M}$ )	39,2 (1,0-4190,0) ( $n = 87$ )	3,1 (1,0-11,3) ( $n = 63$ )
UTP ( $\mu\text{M}$ )	22,4 (2,0 – 253,3) ( $n = 59$ )	76,0 (48,2 – 120,0) ( $n = 76$ )
2-MeS-ATP ( $\mu\text{M}$ )	47,1 (34,2 – 64,8) ( $n = 68$ )	21,9 (10,8 – 44,5) ( $n = 71$ )

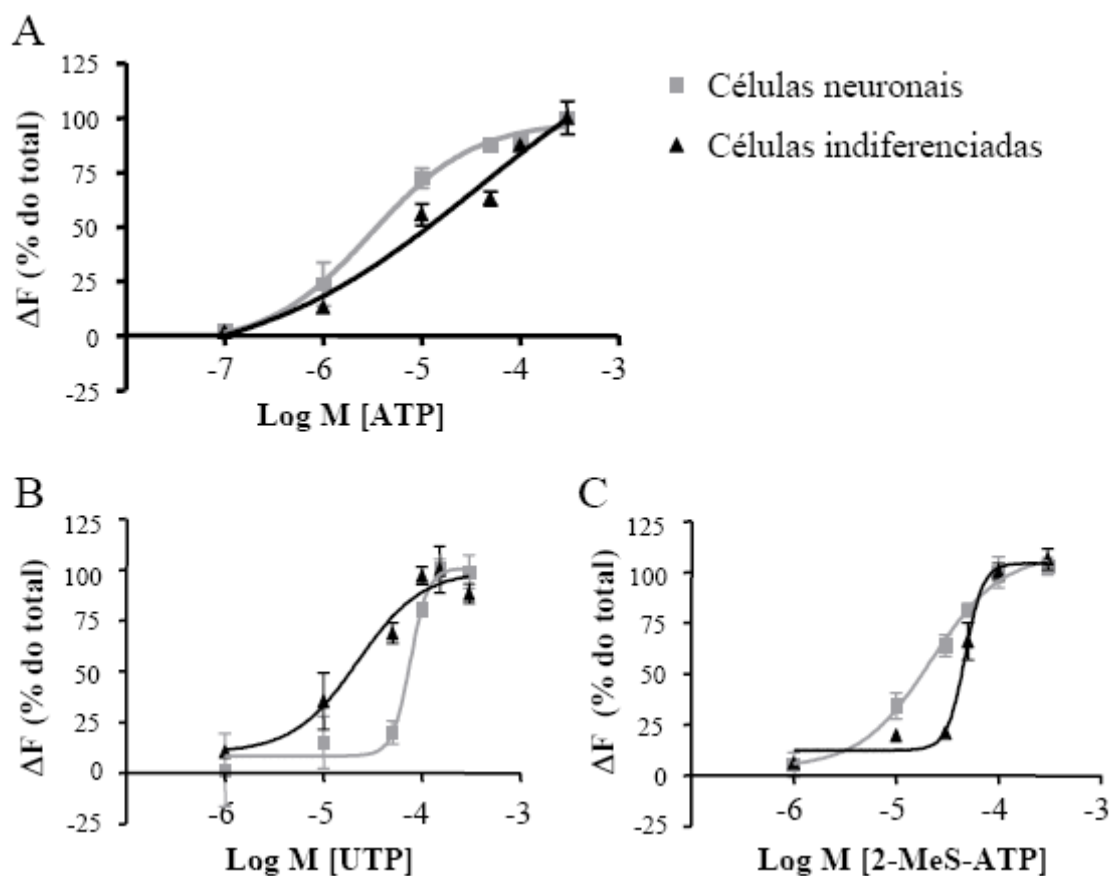
$n$  = número de células testadas.

Valores de  $EC_{50}$  foram expressos como valores médios e intervalo de confiança de 95 %.

Com o objetivo de determinar quais subtipos de receptor P2 estão envolvidos nas respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas por ATP, testamos vários análogos de ATP, conhecidos em ativarem somente alguns subtipos de receptores P2. Inicialmente testamos o dinucleotídeo ADP, um agonista menos potente que o ATP para os subtipos P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> (Collo et al., 1996; Ralevic e Burnstock, 1998; Hardy et al., 2005). O ADP (100  $\mu\text{M}$ ) promoveu um aumento na  $\Delta F$  de  $26 \pm 2$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 170 \pm 12$  nM,  $n = 8$ ) e de  $15 \pm 1$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 107 \pm 9$  nM,  $n = 8$ ) em células indiferenciadas e neuronais, respectivamente (Figura 7). Outro nucleotídeo conhecido em ativar alguns subtipos P2X é o UTP. Este composto é ativo sobre os receptores P2X<sub>1</sub> (McLaren et al., 1998) e P2X<sub>3</sub> (Chen et al., 1995). Entretanto, o subtipo P2X<sub>1</sub> não foi encontrado, pelas análises com Western blot, nem em células embriônicas e nem em neurônios maduros. O UTP também induz um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998; von Kugelgen e Wetter, 2000). Sendo assim, o UTP promoveu um aumento na  $\Delta F$  de  $17 \pm 1$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 107 \pm 34$  nM,  $n = 5$ ) e apresentou um valor de  $EC_{50}$  de 22,4 (2,0 – 253,3)  $\mu\text{M}$  em células indiferenciadas (Figuras 6B e 7). Os valores da  $\Delta F$  foram maiores em células do oitavo dia da diferenciação ( $\Delta F = 59 \pm 4$  e  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 397 \pm 12$  nM,  $n = 5$ ). O valor de  $EC_{50}$  nestas células foi de 76,0 (48,2 – 120,0)  $\mu\text{M}$  (Figura 6B).

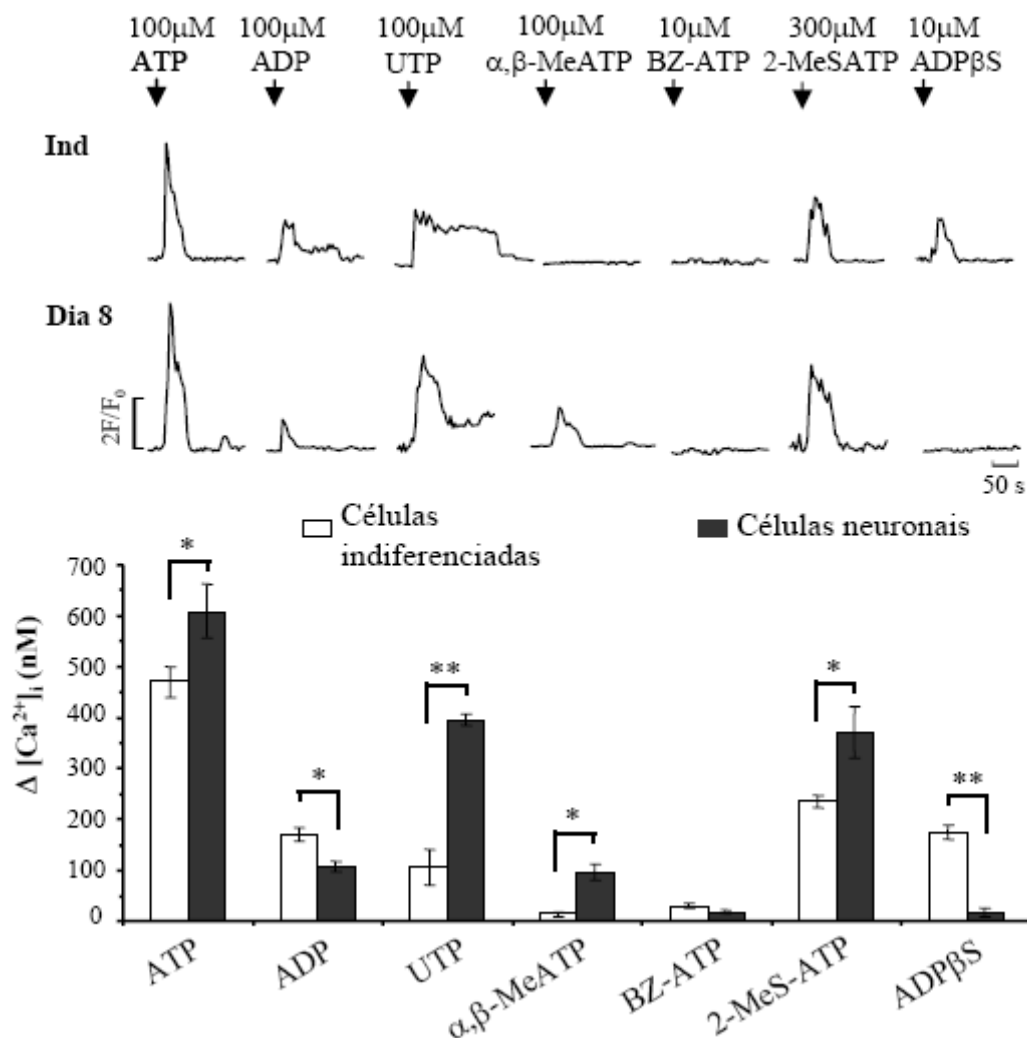
As respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP em células embriônicas ( $\Delta F = 16 \pm 1$  e  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 111 \pm 7$  nM,  $n = 5$ ) e neuronais maduras ( $\Delta F = 55 \pm 3$  e  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 376 \pm 21$  nM,  $n = 5$ ) não foram eliminadas e nem reduzidas usando meio extracelular sem  $\text{Ca}^{2+}$  livre (EM

com 1 mM de EGTA) como apresentado nas figuras 8A e B, respectivamente.



**Figura 6: Curvas dose-resposta ( $EC_{50}$ ), em células P19 indiferenciadas e neuronais do oitavo dia da diferenciação, produzidas pela ativação dos receptores purinérgicos.** As células foram estimuladas com (A) ATP, (B) UTP e (C) 2-MeS-ATP. Células carregadas com o indicador de  $[Ca^{2+}]_i$ , Fluo-3 AM, foram monitoradas para a  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  em células únicas com o uso de microscopia confocal e imageamento de cálcio. Curvas dose-resposta ( $EC_{50}$ ) da variação no fluxo de  $[Ca^{2+}]_i$  mediada pela ativação dos receptores purinérgicos pelo ATP, UTP ou 2-MeS-ATP, em células indiferenciadas e neuronais. As respostas máximas nas elevações da  $[Ca^{2+}]_i$  foram calculadas e plotadas como valores percentuais da resposta máxima média. Os valores são as médias  $\pm$  E.P.M. de cinco a 8 experimentos independentes. As curves foram calculadas por uma função logística. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.





**Figura 7: Caracterização das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos receptores purinérgicos em células P19 embrionárias e neuronais.** O painel superior apresenta traçados típicos das alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  em células embrionárias (Ind) e neuronais do oitavo dia da diferenciação neuronal (Dia 8) após a estimulação com 100  $\mu$ M de ATP ( $n = 8$ ), 100  $\mu$ M de ADP ( $n = 8$ ), 100  $\mu$ M de UTP ( $n = 8$ ), 100  $\mu$ M de  $\alpha,\beta$ -Me-ATP ( $n = 8$ ), 10  $\mu$ M de BZ-ATP ( $n = 8$ ), 300  $\mu$ M de 2-MeS-ATP ( $n = 8$ ) e 10  $\mu$ M de ATP $\beta$ S ( $n = 8$ ), que têm uma afinidade característica para cada subtipo de receptor purinérgico. Painel inferior: Valores médios das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos pela aplicação de cada droga e plotado como sendo a  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . O número total de células analisadas em cada experimento foi de 60-68. Os dados estão presentes como valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*  $p < 0,05$  comparado com os valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado com os valores controles.

Deste modo, as respostas na elevação de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP devem-se unicamente à ativação de receptores P2Y. Para se confirmar se os receptores P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>3</sub> não são expressos ou o são em níveis não detectados e quando o receptor P2X<sub>2</sub> era funcional, testamos o efeito do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (He et al., 2002). Este composto também foi inefetivo em células indiferenciadas ( $\Delta F = 2 \pm 0,3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 14 \pm 4$  nM,  $n = 8$ ), mas induziram uma resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  pequena em células neuronais do oitavo dia da diferenciação ( $\Delta F = 12 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 95 \pm 16$  nM,  $n = 8$ ) (Figura 7). Já que a expressão e ativação dos receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub> foram nulas, o Bz-ATP, um análogo do ATP que ativa, além destes receptores, também ativa o P2X<sub>7</sub> (He et al., 2002; Ralevic e Burnstock, 1998; Bianchi et al., 1999; von Kugelgen e Wetter, 2000) foi utilizado para avaliar a resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  deste último. Nenhum aumento transiente na  $[Ca^{2+}]_i$  foi observado em ambos os estágios ( $\Delta F = 4 \pm 0,2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 29 \pm 4$  nM,  $n = 8$  para células indiferenciadas e  $\Delta F = 3 \pm 0,5$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 18 \pm 5$  nM,  $n = 8$  para diferenciadas) (Figura 7). O 2-MeS-ATP é um análogo do ATP, cuja atividade como agonista, abrange vários subtipos P2X com diferentes potências. O 2-MeS-ATP é mais potente sobre o subtipo P2Y<sub>1</sub> do que sobre os subtipos P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub> (He et al., 2002; von Kugelgen e Wetter, 2000; Lambrecht, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998). Nós obtivemos respostas ao 2-MeS-ATP em ambas as células P19, embriônicas ( $\Delta F$ ,  $34 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 236 \pm 11$  nM,  $n = 6$ ) e neuronal madura ( $\Delta F$ ,  $53 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 371 \pm 50$  nM,  $n = 3$ ) (Figura 7). Uma larga faixa de concentração deste composto foi usada para produzir as curvas de dose-resposta, de onde obtivemos os valores de EC<sub>50</sub>. O valor de EC<sub>50</sub> das células embriônicas foi de 47,1 (34,2 – 64,8)  $\mu$ M e das neuronais foi de 21,9 (10,8 – 44,5)  $\mu$ M (Figura 6C e Tabela V). Em meio extracelular sem Ca<sup>+2</sup> livre, a resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelo 2-MeS-ATP foi menor em células do estágio Ind ( $\Delta F = 19 \pm 3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 138 \pm 19$  nM,  $n = 6$ ) quando comparadas ao controle ( $\Delta F$ ,  $34 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 236 \pm 11$  nM,  $n = 6$ ) e nulas para as células D8 ( $\Delta F = 3 \pm 0,6$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 25 \pm 3$  nM,  $n = 3$ ), como demonstrado na figura 9.

Assim, a ordem de potência de ativação destes compostos parece ser: ATP > 2-MeS-ATP > ADP > UTP em células indiferenciadas e ATP >> UTP > 2-MeS-ATP em células neuronais.

#### **4.1.3.2.3. Receptores P2Y mediam a principal resposta de $[Ca^{2+}]_i$ em células P19 neuronais**

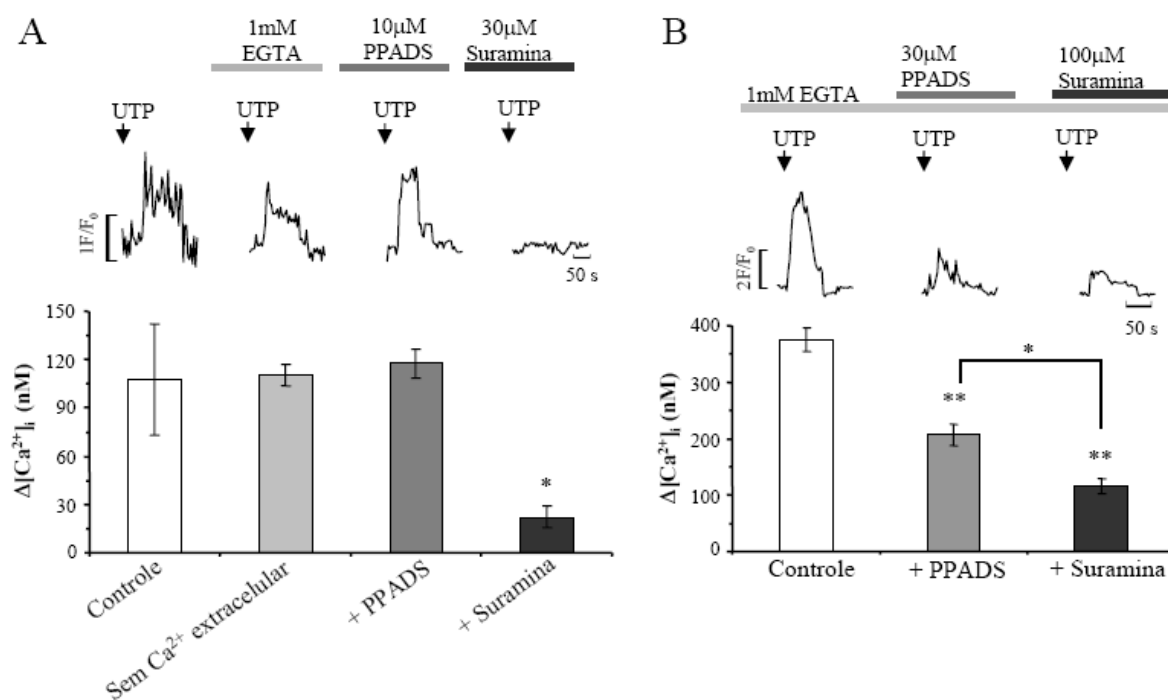
Para avaliar a participação dos receptores P2Y nas oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelos nucleotídeos, 1 mM de EGTA foi adicionado ao meio extracelular e estudamos a atividade de vários análogos de ATP. Como demonstramos acima, o ATP promoveu um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em células do dia 8 da diferenciação neuronal (Figura 6) tanto em meio extracelular que continha  $Ca^{2+}$  livre e em meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre. As oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP apresentaram a mesma intensidade em ambas as condições, com ou sem  $Ca^{2+}$  livre no meio extracelular, tanto em células embriônicas ( $\Delta F$ ,  $16 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $111 \pm 7$  nM,  $n = 5$ , Figura 8A) quanto em neurônios maduros ( $\Delta F$ ,  $56 \pm 3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $376 \pm 21$  nM,  $n = 5$ , Figura 8B). É possível que estas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  tenham sido mediadas pelos subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub>, descartando qualquer ação sobre os receptores P2X<sub>1</sub> ou P2X<sub>3</sub>, além destes não serem expressos.

O 2-MeS-ATP apresentou uma resposta que foi  $56 \% \pm 9$  ( $n = 6$ ) menor em células embriônicas em meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre ( $\Delta F$ ,  $19 \pm 3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $138 \pm 19$  nM) do que nas células em condições controle ( $\Delta F$ ,  $34 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $235 \pm 11$  nM), e perdeu toda sua atividade sobre os receptores das células neuronais ( $\Delta F$ ,  $3 \pm 0,6$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $25 \pm 3$  nM,  $n = 3$ ) comparadas à situação em que havia  $Ca^{2+}$  no meio extracelular ( $\Delta F$ ,  $53 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $371 \pm 50$  nM,  $n = 3$ ) (Figura 9).

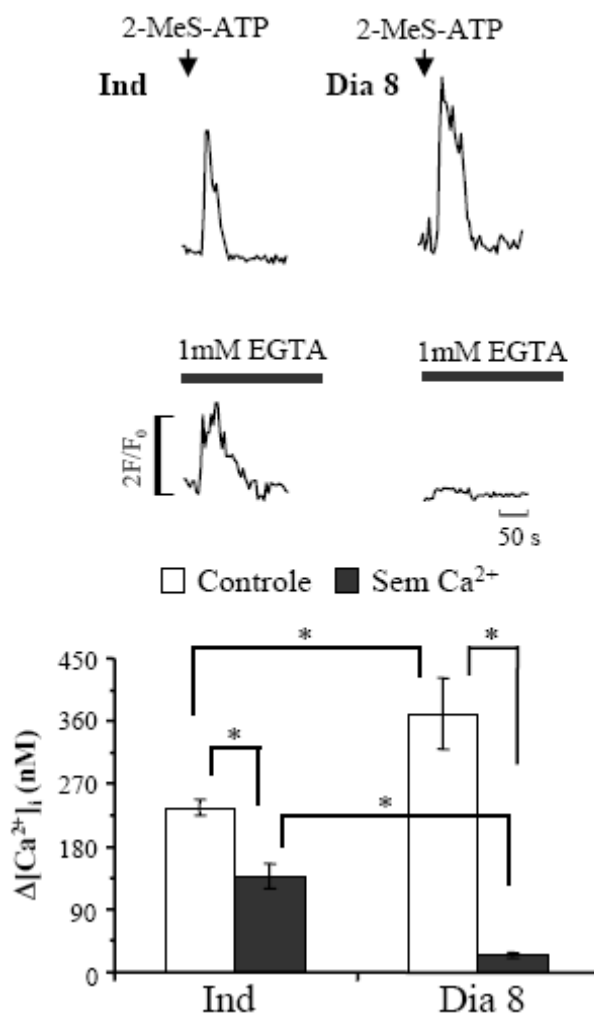
#### **4.1.3.2.4. Discriminando as respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelos receptores P2Y em células P19 durante sua diferenciação neuronal**

Com o intuito de verificar quando quaisquer outros subtipos de P2Y, que não o P2Y<sub>1</sub>, desempenhavam um papel nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$ , conduzimos dois experimentos separados em que as células foram incubadas com dois antagonistas conhecidos em inibirem os receptores purinérgicos, suramina e PPADS (von Kugelgen e Wetter, 2000; Lambrecht, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998). Quando testamos 10  $\mu$ M de PPADS em meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP reduziram para  $66 \% \pm 6$  ( $\Delta F$ ,  $13 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $97 \pm 12$  nM,  $n = 7$ ) em relação ao controle ( $\Delta F$ ,  $20 \pm 0,4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $134 \pm 2$  nM) (Figura 10A). Nesta concentração, o PPADS inibe somente os receptores P2Y<sub>1</sub> (von

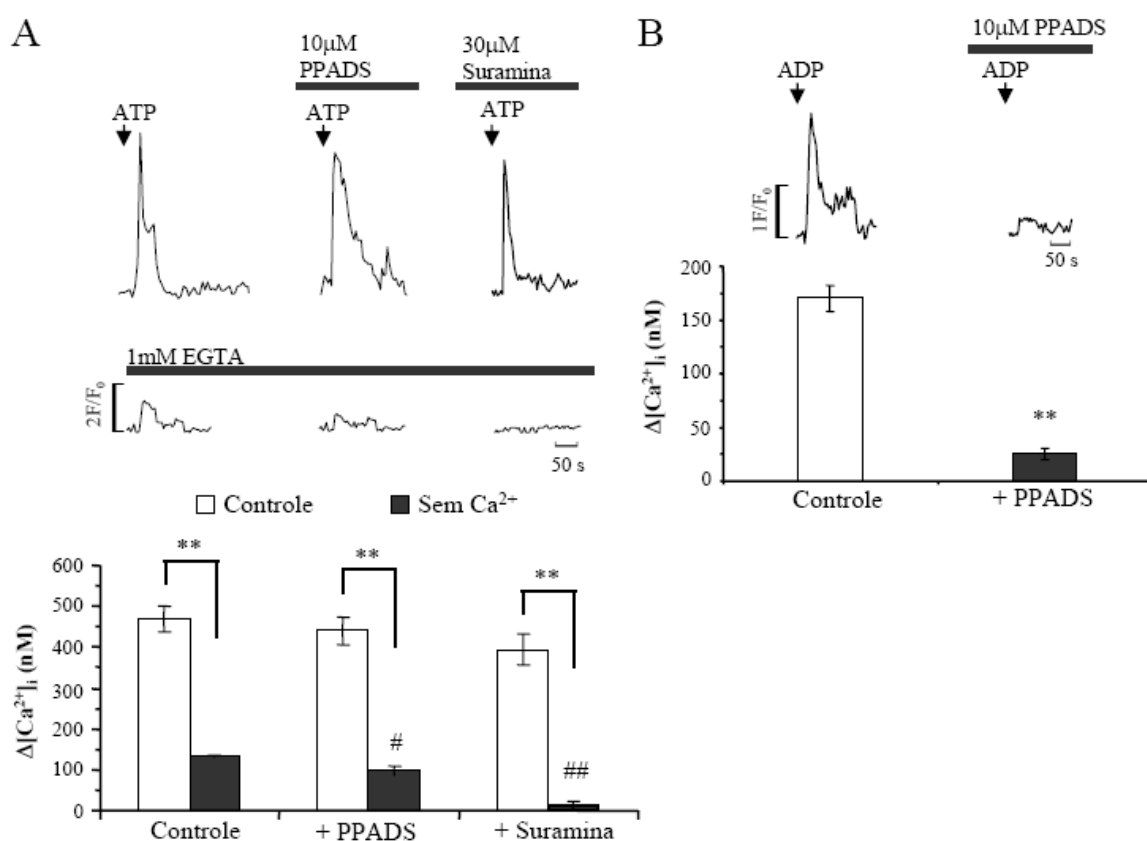
Kugelgen e Wetter, 2000); assim, a resposta residual deve-se a outro subtipo P2Y.



**Figura 8: Respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos receptores purinérgicos metabotrópicos em ambos os estágios da diferenciação, embrionário e neuronal maduro.** (A) Células embrionárias: Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP (100  $\mu$ M) ou UTP (100  $\mu$ M) na ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular livre (EGTA 1 mM), UTP (100  $\mu$ M) na presença de PPADS (10  $\mu$ M), e UTP (100  $\mu$ M) na presença de suramina (30  $\mu$ M). (B) Células neuronais: As variações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP, em células P19 neuronais do oitavo dia da diferenciação, pela mobilização de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares foi verificada pela pré-incubação das células durante 5 min com 1 mM de EGTA. Os painéis superiores apresentam os traçados típicos da ativação dos receptores P2Y pelo UTP (100  $\mu$ M) sozinho (controle) e UTP (100  $\mu$ M) na presença de 30  $\mu$ M de PPADS ou 100  $\mu$ M de suramina. Os painéis inferiores apresentam os valores da  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . Para a aplicação de cada droga, uma nova preparação celular, foi utilizada. Os dados apresentados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 5-8 experimentos independentes. O número de células estudadas estava entre 40 e 64 para cada experimento. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.



**Figura 9: Delineação das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediada pelos receptores P2X e P2Y em células P19 embrionárias e neuronais.** Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo 2-MeS-ATP (300  $\mu$ M) na ausência e na presença de  $Ca^{2+}$  extracelular livre, foram demonstrados para células indiferenciadas e neuronais. A participação do influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular para as mudanças na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo 2-MeS-ATP em células indiferenciadas (Ind) e neuronais do dia 8 da diferenciação (Dia 8) foi verificada após a pré-incubação das células durante 5 min com 1 mM de EGTA. Os painéis inferiores apresentam os valores da  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . Para a aplicação de cada droga na nova preparação de células foi usada. São mostrados os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 4-8 experimentos independentes. O número de células estudadas estava entre 32 e 70 para cada experimento. \*  $p < 0,05$  comparada aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada aos valores controles.



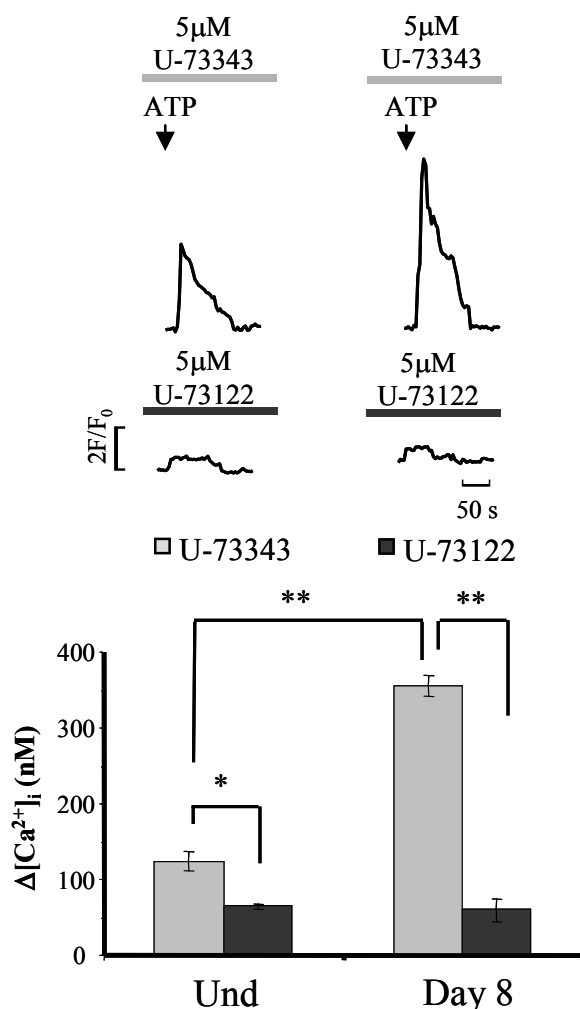
**Figura 10: Participação dos receptores P2X e P2Y nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 embriônicas.** (A) Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP (100  $\mu$ M), na presença e ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular livre, foram apresentadas para as células indiferenciadas. A participação do influxo de  $Ca^{2+}$ , a partir do meio extracelular, induzido pelo ATP, e suas variações na  $[Ca^{2+}]_i$  de células embriônicas foi verificada após a pré-incubação das células durante 5 min com 1 mM de EGTA. Os painéis superiores apresentam os traçados típicos da ativação dos receptores purinérgicos por 100  $\mu$ M de ATP sozinho (controle) e 100  $\mu$ M de ATP na presença de 10  $\mu$ M de PPADS ou 30  $\mu$ M de suramina. ATP (100  $\mu$ M) também foi aplicado em células indiferenciadas após a pré-incubação destas durante 5 min com 1 mM de EGTA, na presença de 10  $\mu$ M de PPADS ou 30  $\mu$ M de suramina. Os painéis inferiores apresentam os valores da  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . (B) O painel superior apresenta os traçados dos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos após a estimulação com ADP (100  $\mu$ M) sozinho (controle) ou com ADP (100  $\mu$ M) na presença de 10  $\mu$ M de PPADS. Nos painéis inferiores, são apresentados os valores obtidos das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  na presença de ADP e ADP com PPADS. Para a aplicação de cada droga, uma nova preparação celular foi utilizada. O número de células estudadas estava entre 48 e 72 para cada experimento. Os dados são apresentados como os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 6-9 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

Para confirmar se outros receptores têm uma participação nestas elevações de  $[Ca^{2+}]_i$ , usamos 30  $\mu M$  suramina, a qual é suficiente para inibir os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>11</sub>, promovendo uma inibição total da atividade do ATP ( $\Delta F$ ,  $2 \pm 0,3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $15 \pm 8$  nM,  $n = 4$ , Figura 10A).

O ADP tem a capacidade de ativar os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> (von Kugelgen e Wetter, 2000; Hardy et al., 2005). Usando 10  $\mu M$  de PPADS obtivemos uma inibição total da atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  promovida pelo ADP ( $\Delta F$ ,  $4 \pm 0,3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $25 \pm 5$  nM,  $n = 4$ , contra as condições controle  $\Delta F$ ,  $26 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $170 \pm 12$  nM,  $n = 8$ ) (Figura 10B). Confirmando assim que as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  eram principalmente produzidas pelo receptor P2Y<sub>1</sub>. Um outro nucleotídeo que poderia agir é o UTP. Este pode ativar os receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998; von Kugelgen e Wetter, 2000). As respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP podem ser confirmadas pela sua inibição com 30  $\mu M$  de suramina. Nesta concentração, ele pode inibir seletivamente o subtipo P2Y<sub>2</sub>. A inibição total das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  foi promovida em células indiferenciadas ( $\Delta F$ ,  $3 \pm 0,5$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $22 \pm 7$  nM  $n = 4$ , Figura 8A). Estes resultados levaram-nos a conclusão de que os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> são os subtipos ativos em células embriônicas. Nós testamos também o análogo ADP $\beta$ S, um agonista parcialmente seletivo para o receptor P2Y<sub>1</sub> (Ling et al., 2004). Este promoveu uma variação de fluorescência ( $\Delta F$ ,  $25 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $175 \pm 15$  nM,  $n = 5$ , Figura 7) que foi proporcional àquela obtida com o ADP ( $26 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $170 \pm 12$  nM,  $n = 8$ , Figura 7).

Foi demonstrado que o ATP e o UTP promovem a produção de IP<sub>3</sub> pela ativação dos GPCRs P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>, os quais ativam a PLC- $\beta$  (*phospholipase C  $\beta$* , PLC- $\beta$ ) (Burnstock, 2006a; Burnstock, 2006b). Para verificar se as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 embriônicas em meios extracelulares contendo  $Ca^{2+}$  eram mediadas pelos subtipos P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>, utilizamos o inibidor da PLC, o U-73122. Cinco micromolar (5  $\mu M$ ) de U-73122 inibiu reversivelmente os aumentos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos por 100  $\mu M$  de ATP ( $\Delta F$ ,  $10 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $64 \pm 4$  nM,  $n = 4$ , Figura 11), enquanto seu análogo estrutural inativo, o U-73343 (5  $\mu M$ ), não produziu uma redução significativa nas respostas da  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  ( $93 \% \pm 12$ ,

$n = 7$ ), o que está em acordo com os dados acima. Assim, podemos concluir que os aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP e pelo UTP em células P19 indiferenciadas são devidos aos



**Figura 11: Receptores P2Y acoplados à proteína  $G\alpha_{q/11}$  mediam respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 embriônicas e neuronais.** O painel superior apresenta os traçados dos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos após a estimulação com ATP sozinho ou com ATP na presença de 5  $\mu$ M do inibidor da PLC, U-73122, e seu análogo biologicamente inativo, U-73343. Nos painéis inferiores, os valores obtidos das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$ , na presença de ATP e U-73122 ( $n = 6$ ) ou U-73343 ( $n = 8$ ), foram plotados como  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . O número total de células analisadas em cada experimento foi de 48-64. Os dados estão apresentados como valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

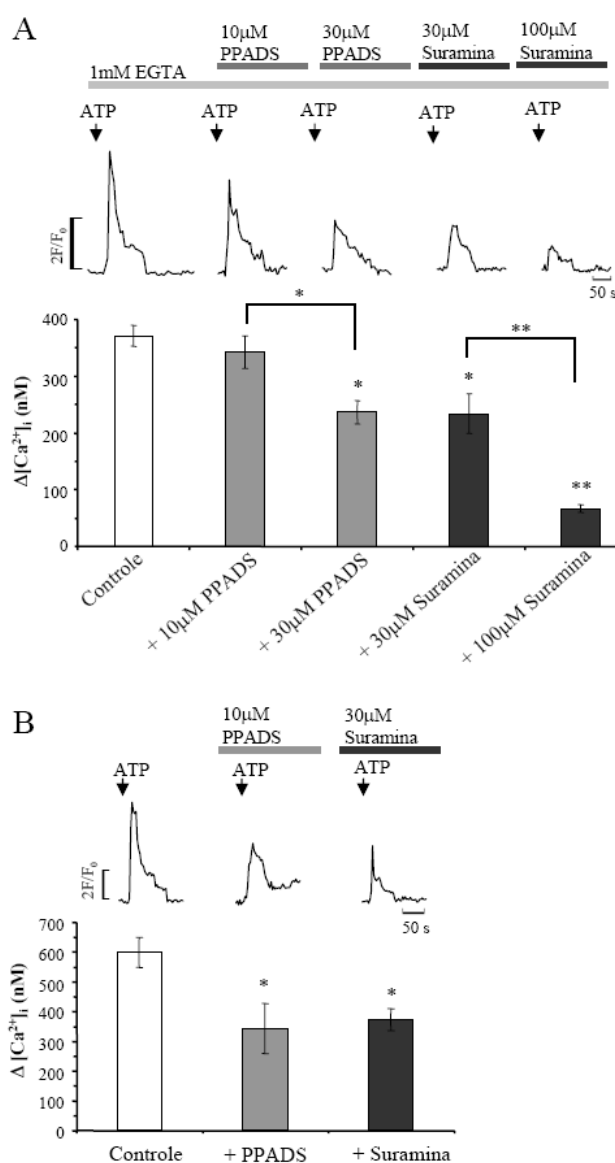


receptores ionotrópicos P2X<sub>4</sub> e possivelmente P2X<sub>6</sub> (possivelmente junto com outros subtipos), e aos receptores metabotrópicos P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>.

Em células P19 neuronais do oitavo dia de diferenciação, realizamos experimentos similares em meios extracelulares sem Ca<sup>2+</sup> livre. Primeiramente, nenhuma resposta ao análogo ADPβS foi observada ( $\Delta F$ ,  $2 \pm 0,4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ,  $17 \pm 8$  nM,  $n = 4$ , Figura 7), o que está em acordo com a falta de detecção da expressão do receptor P2Y<sub>1</sub> neste estágio da diferenciação.

Diferentemente das células embriônicas, o 2-MeS-ATP não induziu elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  em células neuronais diferenciadas em meio extracelular sem Ca<sup>2+</sup> livre ( $\Delta F$ ,  $3 \pm 0,6$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 25 \pm 3$  nM,  $n = 3$ ). O 2-MeS-ATP age sobre os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>11</sub>. Como para o ADPβS, nenhuma resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  foi obtida com o 2-MeS-ATP, assim como suas proteínas também não foram encontradas em neurônios do dia 8. Para determinar qual ou quais subtipos de receptores metabotrópicos eram responsáveis pelas oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas tanto pelo ATP e pelo UTP, usamos novamente os antagonistas, PPADS e suramina.

Ainda em meio extracelular sem Ca<sup>2+</sup> livre, ATP (100 μM) e PPADS (10 μM), - uma concentração que inibiria somente o subtipo P2Y<sub>1</sub> - foram co-aplicados, e nenhuma redução significativa na  $\Delta F$  foi obtida ( $97 \% \pm 7$ ) ( $\Delta F$ ,  $51 \pm 4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 343 \pm 29$  nM, comparada ao controle,  $\Delta F$ ,  $53 \pm 4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 371 \pm 18$  nM,  $n = 8$ ). Em contrário, PPADS (30 μM) reduziu as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  para  $63 \% \pm 5$  ( $\Delta F$ ,  $33 \pm 3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 237 \pm 21$  nM) em relação ao controle ( $n = 7$ ). Esta inibição pode ser devida ao bloqueio do subtipo P2Y<sub>2</sub>, já que nesta concentração o PPADS inibe especificamente o P2Y<sub>2</sub> (von Kugelgen e Wetter, 2000), enquanto o subtipo P2Y<sub>1</sub> não é expresso. Suramina (30 μM) inibiu suficientemente o subtipo P2Y<sub>2</sub> ( $\Delta F$ ,  $33 \pm 3$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 234 \pm 35$  nM) e apresentou a mesma amplitude de inibição que o PPADS (30 μM) ( $62 \% \pm 6$  em relação ao controle,  $n = 7$ ). Estes dados indicam que um receptor P2Y adicional, outro que não o P2Y<sub>2</sub>, também é responsável pelos aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP (possivelmente o subtipo P2Y<sub>6</sub>, já que o receptor P2Y<sub>4</sub> não foi detectado pelos experimentos de Western-blot). Com micromolar de suramina inibiu todos os subtipos P2Y ( $\Delta F$ ,  $11 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 67 \pm 7$  nM,  $n = 5$ , Figura 12A).



**Figura 12: Participação dos receptores P2X e P2Y na indução das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 neuronais.** (A) Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP (100  $\mu$ M) na ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular livre foram demonstradas para células neuronais. A participação no influxo de  $Ca^{2+}$ , a partir do meio extracelular, nas elevações de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP foi verificada após a pré-incubação das células durante 5 min com 1 mM de EGTA. Os painéis superiores apresentam traçados representativos da ativação dos receptores purinérgicos por 100  $\mu$ M de ATP sozinho (controle) e 100  $\mu$ M de ATP na presença de 10  $\mu$ M de PPADS, ou 30  $\mu$ M de PPADS, ou 30  $\mu$ M de suramina, ou 100  $\mu$ M de suramina. Os painéis inferiores apresentam os valores da  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ . (B) O painel superior apresenta os traçados das elevações transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  das células neuronais obtidas após a estimulação com ATP (100  $\mu$ M) sozinho (controle) ou com ATP (100  $\mu$ M) na presença de 10  $\mu$ M de PPADS, ou 30  $\mu$ M de suramina. Nos painéis inferiores, os valores das  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  estão representados. O número de células estava entre 56 e 64 para cada experimento. Para a aplicação de cada droga, uma nova preparação celular foi usada. Os dados apresentados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 7-8 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparada com os valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada com os valores controles.

O próximo passo foi verificar quais receptores purinérgicos metabotrópicos estavam envolvidos nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo UTP. Assim como para o ATP, 30  $\mu$ M de PPADS inibiu as elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo UTP ( $\Delta F$ ,  $30 \pm 2$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 206 \pm 19$  nM) na mesma proporção ( $55 \% \pm 3$  em relação às condições controle,  $n = 7$ ) (Figura 8B para o UTP e Figura 12 para o ATP). Assim, podemos identificar o receptor P2Y<sub>2</sub> e possivelmente o receptor P2Y<sub>6</sub>. Na falta de um inibidor específico, usamos 100  $\mu$ M de suramina. Nesta concentração, a suramina inibiu aproximadamente 67 % da amplitude das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo UTP (von Kugelgen e Wetter, 2000). Uma inibição total não foi obtida ( $\Delta F$ ,  $18 \pm 1$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 115 \pm 13$  nM,  $n = 6$ , Figura 8A). Como os experimentos acima, testamos o efeito da inibição da PLC quando este é ativado pelos receptores purinérgicos em meios extracelulares contendo  $Ca^{2+}$  (Burnstock, 2006a; Burnstock, 2006b). Se os subtipos P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> são os receptores purinérgicos metabotrópicos que mediam os aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP e pelo UTP em neurônios diferenciados, uma inibição total seria esperada com o uso de 5  $\mu$ M de U-73122 no meio extracelular. Sendo assim, quando usamos 100  $\mu$ M de ATP co-aplicado com 5  $\mu$ M de U-73122, uma  $\Delta F$  de  $8 \pm 0,5$  ( $n = 3$ ) foi obtida ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 60 \pm 15$  nM). Nenhuma variação na resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  foi obtida com o análogo inativo, U-73343 ( $\Delta F = 83 \pm 6$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 576 \pm 31$  nM,  $n = 8$ ), confirmando esta hipótese e concordando com os dados mostrados acima (Figura 11).

#### ***4.1.3.2.5. Respostas intracelulares de cálcio mediadas pela ativação dos receptores P2X diminuem durante a diferenciação neuronal***

Comparativamente, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo ATP através dos receptores purinérgicos ionotrópicos em células P19 embrionárias corresponderam a 70 % da resposta total de  $[Ca^{2+}]_i$  promovida pelo ATP (Figura 6), e em neurônios P19 do oitavo dia da diferenciação, estas respostas reduziram-se para 39 % (Figura 6). Assim, em condições controle usando meio extracelular contendo  $Ca^{2+}$  observamos uma redução nos aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP, este agindo sobre os receptores P2X, durante a diferenciação. Elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  mediada pelos componentes P2X em células P19 neuronais pareceram ser inibidas pelo tratamento com 10  $\mu$ M PPADS ( $\Delta F$ ,  $50 \pm 5$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 343 \pm 86$  nM,  $n = 7$ , Figura 12B). Estes valores foram similares àqueles quando usamos meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre ( $\Delta F$ ,  $51 \pm 4$  e  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 343 \pm 29$  nM, Figura 12A). Trinta micromolar de suramina são suficientes para inibir os receptores P2X<sub>2</sub> (Michel et al., 1996). Respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por 100  $\mu$ M de ATP foram inibidas com 30  $\mu$ M de suramina ( $\Delta F$ ,  $52 \pm 1$  e

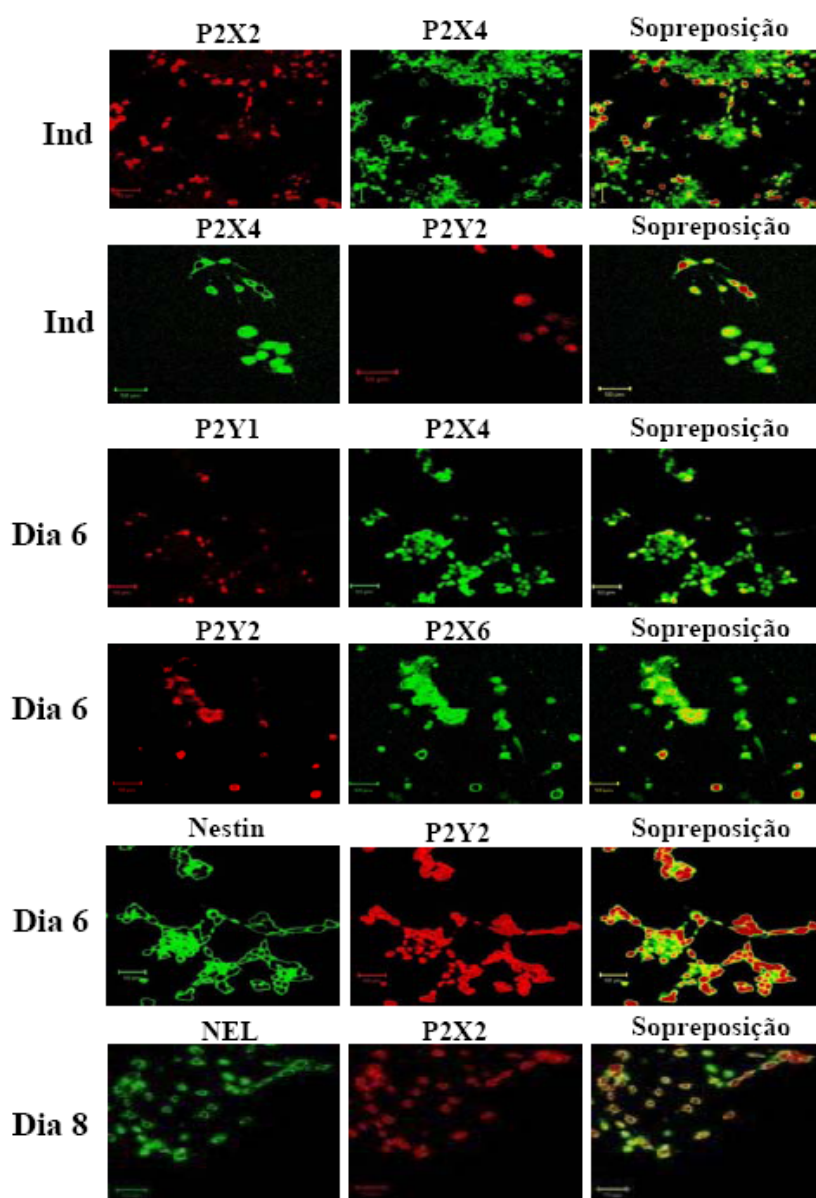
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,  $374 \pm 15$  nM,  $n = 4$ , Figura 12B) e esta inibição foi proporcional à inibição mediada com 10  $\mu\text{M}$  PPADS. Desta forma, é possível que os receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>6</sub> estejam envolvidos nas respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pelo ATP em células P19 diferenciadas em neurônios.

#### **4.1.4. Caracterização dos subtipos de receptores purinérgicos expressos em uma mesma célula**

##### **4.1.4.1. Perfil de co-expressão dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos purinérgicos em células P19**

Como as células P19 embriônicas expressam simultaneamente vários subtipos de receptores purinérgicos, determinamos quando estas mesmas células expressam estes receptores. Para fazermos isto, conduzimos experimentos de imunocitoquímica usando anticorpos marcados com indicadores fluorescentes em células indiferenciadas e do sexto dia da diferenciação neuronal. Este período foi escolhido com base nos primeiros experimentos de determinação fenotípica de células indiferenciadas à neurônios maduros (vide seção 4.1.1. **Caracterização da diferenciação neuronal nas células P19**), no qual a maioria das células do quarto dia da diferenciação perdem a expressão do antígeno embriônico estágio-específico (*stage-specific embryonic antigen*, SSEA-1) e expressam o antígeno de progenitor neuronal, nestina. A partir do quarto dia da diferenciação, os números de células que expressam nestina começam a reduzir, e aumentam o número de células que expressam o antígeno de célula neuronal madura, enolase neurônio-específico. Além do mais, baseado no fato de que estas células foram tratadas com 5  $\mu\text{M}$  de AraC, que elimina as células gliais, permanecendo somente as células progenitoras neuronais, que se diferenciam em neurônios pós-mitóticos. Além do mais, mais subtipos diferentes de receptores purinérgicos estão presentes no sexto dia da diferenciação neuronal do que no seu oitavo dia.

Imunomarcações duplas para os receptores P2X<sub>4</sub> e P2Y<sub>1</sub>, P2X<sub>6</sub> e P2Y<sub>2</sub>, e P2X<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> foram realizadas para avaliar se ambas as classes de receptores purinérgicos, ionotrópicos e metabotrópicos, eram expressos em uma mesma célula. 28 % das células progenitoras neuronais co-expressaram os receptores P2X<sub>4</sub> e P2Y<sub>1</sub>. Outros 53 % das células imunomarcadas apresentaram co-localização dos subtipos P2X<sub>6</sub> e P2Y<sub>2</sub>. A minoria das células imunomarcadas (12 %) do sexto dia da diferenciação expressaram os subtipos, P2X<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub>. Nós ainda detectamos a co-expressão de dois receptores ionotrópicos, P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>4</sub> (51 % de co-localização) e de dois receptores metabotrópicos, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> (94 % de co-



**Figura 13: Dupla marcação de receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 por imunofluorescência.** Após fixação, as células foram incubadas com o anticorpo primário subunidade-específico seguido da adição de um anticorpo secundário marcado com fluoresceína ou rodamina. A expressão do subtipo de receptor purinérgico foi verificada em células indiferenciadas (Ind), células do sexto dia (Dia 6) e do oitavo dia (Dia 8) após a indução da diferenciação. Nestina é um marcador para células progenitoras neuronais. Enolase neurônio-específica (NEL) é um marcador para neurônio maduro.

expressão) (Figura 13).

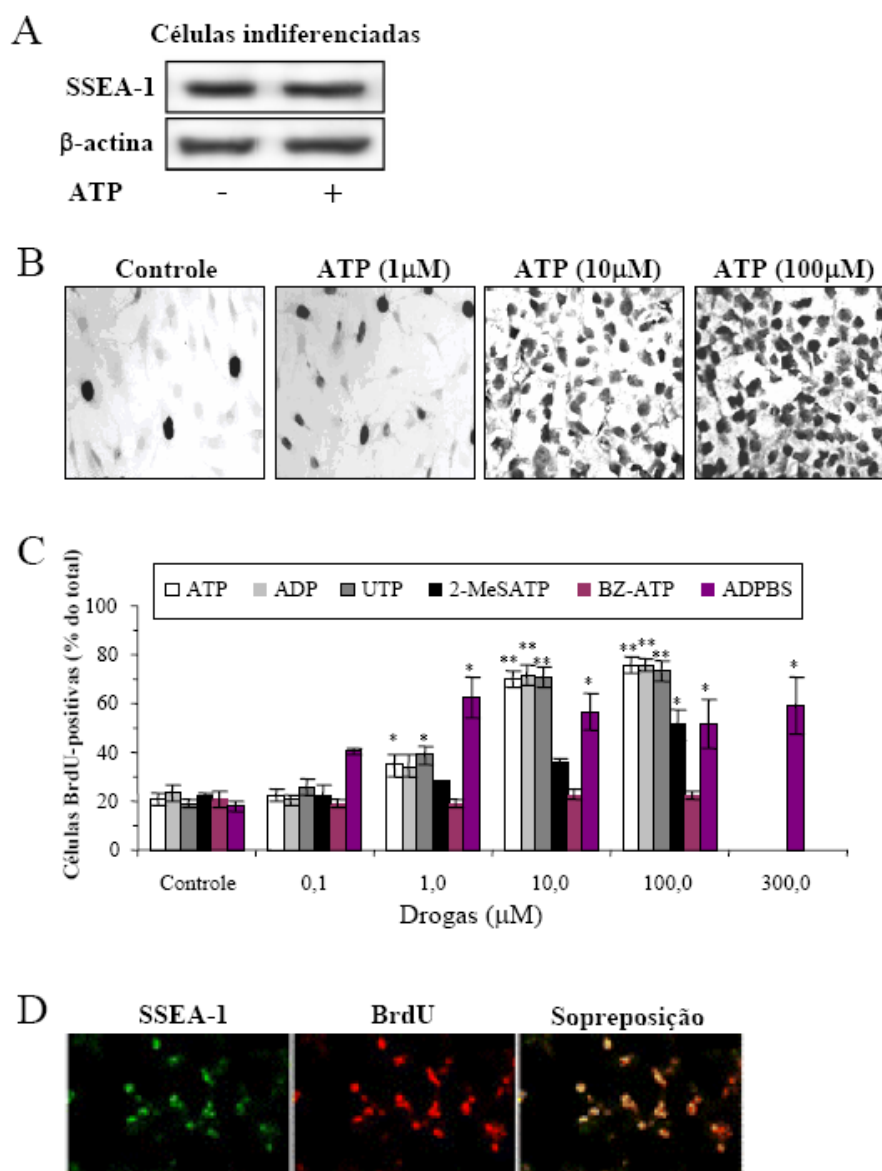
#### ***4.1.5. Caracterização do papel dos receptores purinérgicos na proliferação e diferenciação celular***

##### **4.1.5.1. Receptores purinérgicos e proliferação celular**

Com o objetivo de verificar se há efeitos proliferativos mediados pelos receptores purinérgicos no estágio de células embriônicas, examinamos a expressão do marcador de célula embriônica, o SSEA-1, e a incorporação de BrdU no DNA. As células embriônicas foram investigadas na presença e na ausência de vários agonistas purinérgicos, entre eles: o ATP, o qual é um agonista para todos os receptores P2; o ADP, um agonista para os receptores P2X<sub>6</sub> (Collo et al., 1996) e P2Y<sub>1</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998; Hardy et al., 2005); o UTP, o qual é ativo sobre os subtipos P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998; von Kugelgen e Wetter, 2000); o 2-MeS-ATP, cuja atividade atinge vários subtipos P2X, e os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>6</sub> (He et al., 2002; von Kugelgen e Wetter, 2000; Lambrecht, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998); e o ADPβS, um agonista parcialmente seletivo para o subtipo P2Y<sub>1</sub> (Ling et al., 2004). Nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão da proteína do SSEA-1 foi identificada nas células embriônicas tratadas e não tratadas com o ATP (Figura 14A).

Análises de contagem demonstraram que aproximadamente 93 % ( $n = 3$ ) das células indiferenciadas na presença do ATP expressaram o marcador SSEA-1, este número não sendo diferente dos experimentos controle (91 %,  $n = 3$ ). Estes resultados demonstraram que as células embriônicas P19 permaneceram no estágio de células indiferenciadas na presença do ATP.

Os efeitos dos agonistas purinérgicos na proliferação celular foram avaliados usando-se de uma larga faixa de concentrações (0,1-300 μM) dos mesmos, e tratando as células embriônicas durante um período de 8 hr. Como mostrado na figura 14B e C, o número de células embriônicas P19 marcadas com BrdU foi registrado na presença de ATP (100 μM, 76 % ± 3 do total de células), ADP (100 μM, 76 % ± 2), UTP (100 μM, 73 % ± 4 TC), 2-MeS-ATP (300 μM, 59 % ± 12) e ADPβS (1 μM, 63 % ± 12). Bz-ATP, mesmo em alta concentração (100 μM), não apresentou qualquer diferença significativa em relação ao controle. Para avaliar se este efeito de proliferação causado pelos agonistas purinérgicos em



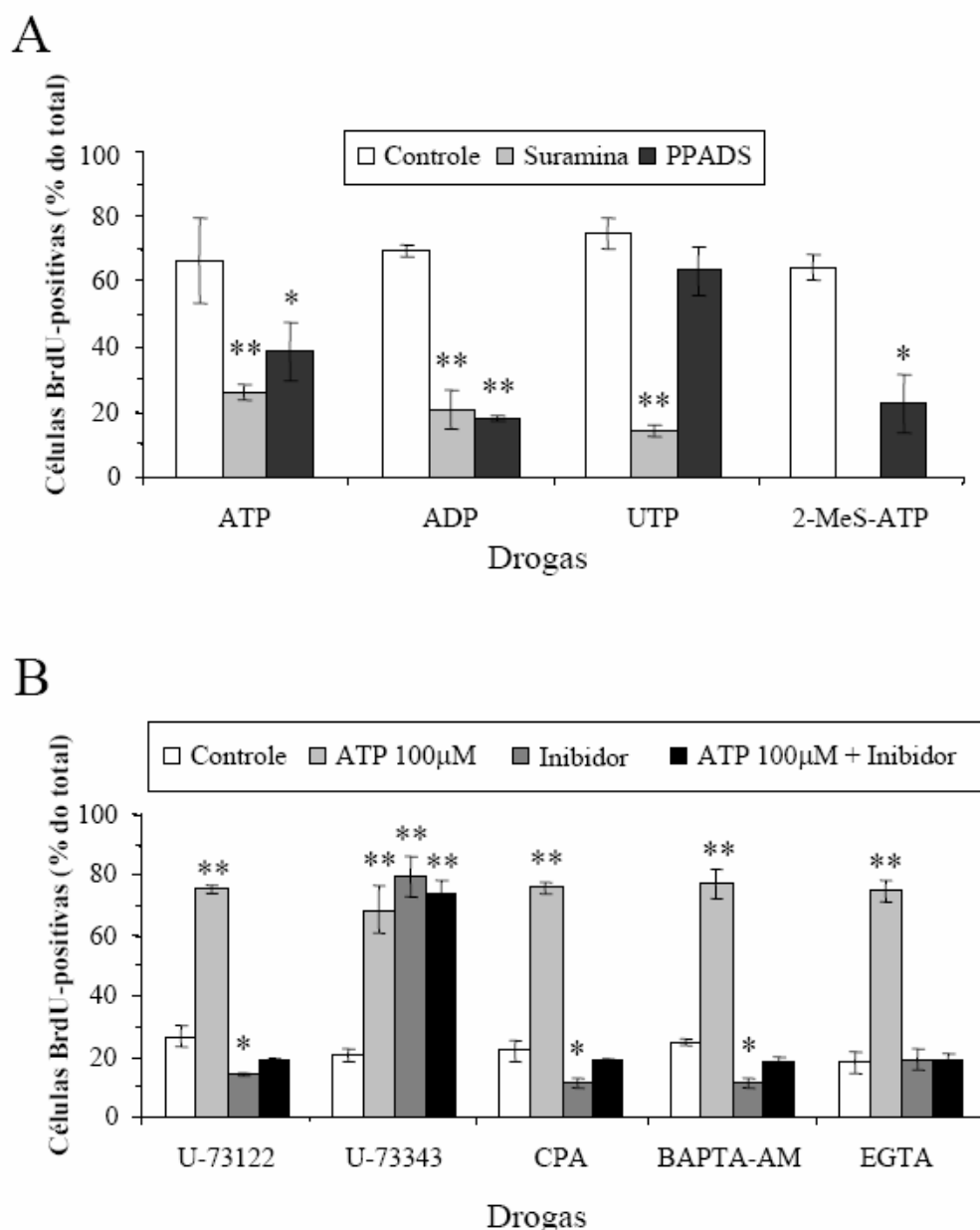
**Figura 14. Efeitos proliferativos induzidos por agonistas dos receptores purinérgicos foram avaliados pela incorporação de BrdU pelas células P19 embriônicas.** (A) As células indiferenciadas foram incubadas na presença de ATP (100 μM) sob condições de cultivo em meio definido. Foram realizados experimentos de Western-blots, a partir de extratos de membrana de células tratadas com ATP e não-tratadas (controle), para marcador de células embriônicas (SSEA-1) (B) As células embriônicas foram incubadas com várias concentrações de ATP (1-100 μM) durante 8 h. (C) Células BrdU-positivas em resposta às diferentes concentrações de ATP, ADP, UTP, 2-MeS-ATP, BZ-ATP e ADPβS (0-100 μM, exceto para o 2-MeS-ATP, 0-300 μM) durante 8 h. O número porcentual médio ± E.P.M. de células BrdU-positivas para cada campo de visão (800 μm<sup>2</sup>) foi determinado. Ao menos, 10 campos de visão por lamina foram contados. (D) As células indiferenciadas foram incubadas com ATP (100 μM) durante 8 h e duplamente imunomarcadas com anticorpos para NEL e BrdU. As barras de escala representam 20 μm. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

células embriônicas é real, procedemos à uma dupla marcação para a expressão do SSEA-1 e para a incorporação do BrdU. Mais de 93 % ( $n = 3$ ) das células embriônicas foram positivas para SSEA-1, como identificado pela análise de imunofluorescência. Isto demonstrou que os receptores purinérgicos apresentam uma função proliferativa nas células P19 embriônicas, e não nas células espontaneamente diferenciadas (Figura 14D).

#### 4.1.5.2. Discriminando entre os receptores P2 que induzem a proliferação celular

Para a determinação de quais receptores purinérgicos P2 mediavam o efeito de aumentar a proliferação induzida pelo ATP, as células P19 embriônicas foram tratadas com os mesmos agonistas seletivos, mencionados na seção anterior, ou com os antagonistas, suramina e PPADS. Como mostrado na figura 15A, 30  $\mu\text{M}$  de suramina (concentração suficiente para inibir os subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>11</sub>) e 10  $\mu\text{M}$  PPADS (que, nesta concentração inibe somente os receptores P2Y<sub>1</sub>) (von Kugelgen e Wette, 2000; Lambrecht, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998), inibiram o aumento da incorporação de BrdU pelas células indiferenciadas induzido por 100  $\mu\text{M}$  de ATP, respectivamente 26,0 %  $\pm$  2,4 e 38,7 %  $\pm$  8,6, em relação aos níveis controles (66,8 %  $\pm$  13,1 do total de células) (Figura 15A). Além disso, a proliferação induzida por 100  $\mu\text{M}$  de ADP também foi inibida por ambos os antagonistas, suramina 30  $\mu\text{M}$  (20,6 %  $\pm$  5,9) e PPADS 10  $\mu\text{M}$  (17,9 %  $\pm$  0,8) quando comparadas ao controle (69,6 %  $\pm$  8,9) (note que o ADP ativa somente os receptores P2X<sub>6</sub> e P2Y<sub>1</sub>). A incorporação de BrdU por estas células induzida por 300  $\mu\text{M}$  de 2-MeS-ATP também foi inibida pelo PPADS 10  $\mu\text{M}$  (22,9 %  $\pm$  8,9) em relação ao controle (64,4 %  $\pm$  3,8), sendo assim, os receptores de subtipo P2Y<sub>1</sub> devem colaborar para o efeito proliferativo. Quando 100  $\mu\text{M}$  de UTP (concentração em que ativa os subtipos P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>) (Ralevic e Burnstock, 1998; von Kugelgen e Wetter, 2000) foi usado como o fator de proliferação, somente suramina 30  $\mu\text{M}$  inibiu significativamente a incorporação de BrdU pelas células (14,3 %  $\pm$  1,8 comparado ao controle 74,8 %  $\pm$  4,7 do total das células). Assim, isto poderia ter sido promovido pela ativação dos receptores P2Y<sub>2,4</sub> ou P2Y<sub>6</sub>. Contudo, como demonstrado anteriormente pelos experimentos que discriminam os receptores P2Y funcionais (vide seção 4.1.3.2.4. **Discriminando as respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pelos receptores P2Y em células P19 durante sua diferenciação neuronal**), somente o subtipo P2Y<sub>2</sub> foi funcional. Deste modo e neste caso, o receptor P2Y<sub>2</sub> deve ser o único, dentre esses três receptores, que contribui com o efeito proliferativo.





**Figura 15. Efeitos dos agonistas e antagonistas purinérgicos sobre a proliferação de células P19 embriônicas.** (A) As células embriônicas foram tratadas com 100  $\mu$ M de cada droga, ATP, ADP, UTP e 2-MeS-ATP na presença e ausência de 10  $\mu$ M de PPADS ou 30  $\mu$ M de suramina durante 8 h. (B) As células foram pré-tratadas com 100  $\mu$ M de ATP ou com cada um dos respectivos inibidores, U73122 (5  $\mu$ M, inibidor da fosfolipase C $\beta$ ), U73144 (5  $\mu$ M, análogo inativo da U73122), CPA (10  $\mu$ M, ácido ciclopiazônico, inibidor da bomba de Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático), BAPTA-AM (10  $\mu$ M, quelante de Ca<sup>2+</sup> intracelular), EGTA (1 mM, quelante de Ca<sup>2+</sup> extracelular) ou, a combinação do tratamento de 100  $\mu$ M de ATP com cada um destes inibidores separadamente. Os inibidores foram adicionados 30 min antes do tratamento com ATP e mantidos durante 8 h de exposição com as células. Os valores são representados como médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes em duplicata. \*  $p < 0,05$  comparada aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada aos valores controles.

#### **4.1.5.3. Envolvimento da PLC e dos depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ na proliferação celular**

Para estudar a via de sinalização em que os receptores  $\text{P2Y}_1$  e  $\text{P2Y}_2$  induzem a proliferação celular, usamos o U-73122 (um inibidor da PLC, 5  $\mu\text{M}$ ), e o CPA (um inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático, 10  $\mu\text{M}$ ) (Suzuki et al., 1992; Demaurex et al., 1992). Ambos os inibidores bloquearam o aumento na incorporação de BrdU pelas células induzidas pelo ATP (Figura 15B). Uma redução significativa na proliferação normal das células embriônicas foi observada pelo seu tratamento com U-73122 e CPA, respectivamente 14,1 %  $\pm$  0,5 e 11,4 %  $\pm$  1,5 em relação aos seus respectivos controles (26,9 %  $\pm$  3,4 e 22,1 %  $\pm$  3,7 do total de células,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ). O análogo estrutural do U-73122 que não apresenta quaisquer efeitos biológicos sobre a atividade da PLC, U-73343, foi usado como controle negativo, e nenhum efeito de bloqueio na incorporação de BrdU pelas células indiferenciadas foi obtido, confirmando o envolvimento da PLC e a liberação dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  na via de sinalização.

#### **4.1.5.4. Envolvimento do $\text{Ca}^{2+}$ extra e intracelular na proliferação celular**

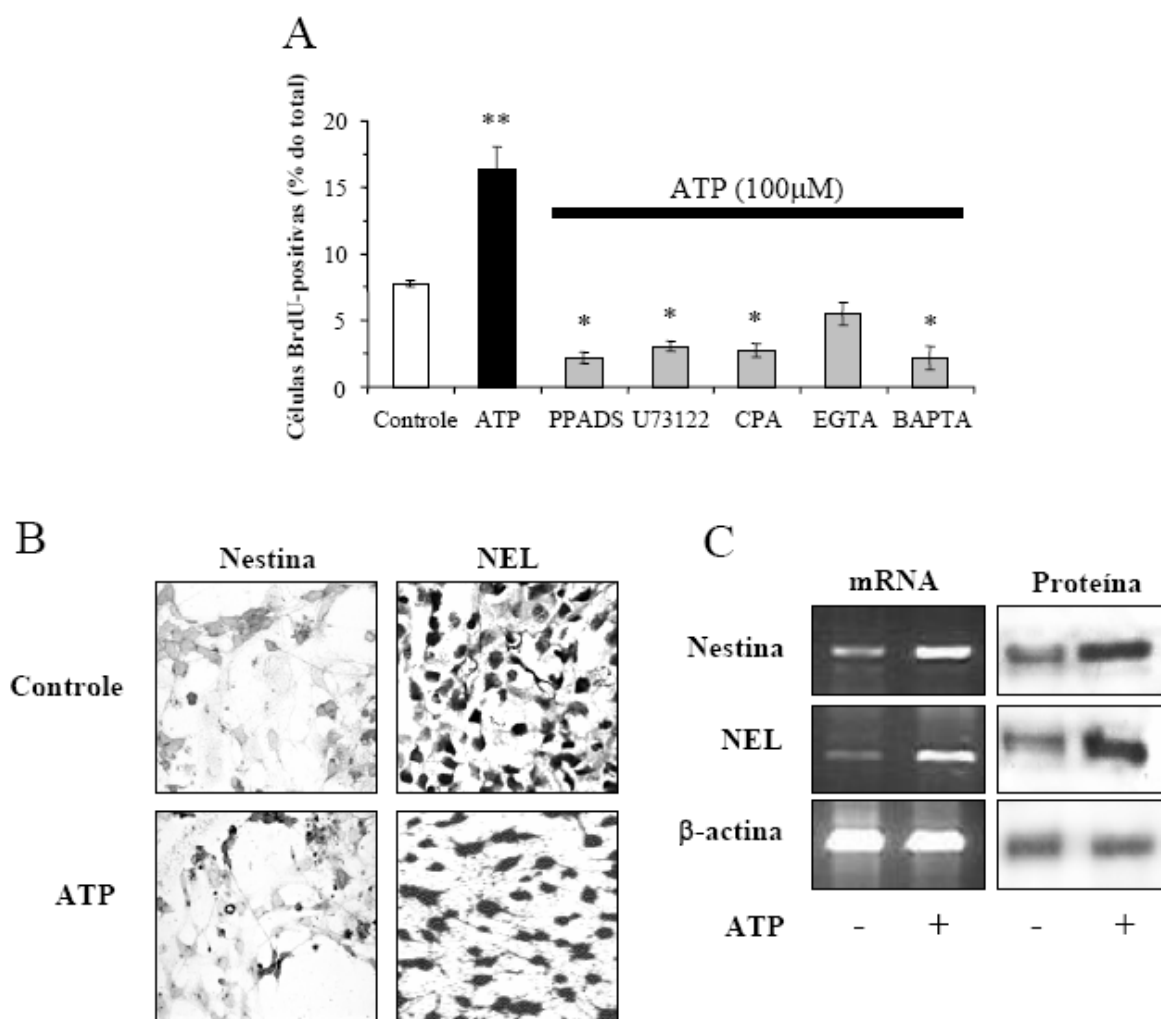
Para verificar se os subtipos  $\text{P2X}$ , em adição aos  $\text{P2Y}$ , também apresentam um efeito proliferativo e de que estas fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  são mobilizadas para promover um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , usamos BAPTA-AM (um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, 10  $\mu\text{M}$ ) ou EGTA (um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, 1 mM) sozinhos ou na presença de 100  $\mu\text{M}$  de ATP (Figura 15B). O tratamento com EGTA sozinho (19,1 %  $\pm$  3,5 do total de células) e na presença de ATP (19,2 %  $\pm$  1,9 do total de células) bloquearam a incorporação de BrdU pelas células embriônicas, os dados foram semelhantes aos níveis controles (18,3 %  $\pm$  3,7 do total de células). O tratamento com BAPTA-AM sozinho (11,5 %  $\pm$  1,7,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ) inibiu significativamente a incorporação de BrdU pelas células, estes valores foram menores que os dos níveis controles (24,9 %  $\pm$  1,1) (Figura 15B). Assim sendo nós podemos concluir que somente os depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$  estão envolvidos na via de sinalização purinérgica.

#### **4.1.5.5. Receptores purinérgicos e a diferenciação neuronal**

As células P19 do quarto dia da diferenciação neuronal foram tratadas com ATP (100  $\mu\text{M}$ ), PPADS (100  $\mu\text{M}$ ), U-73122 (5  $\mu\text{M}$ ), CPA (10  $\mu\text{M}$ ), EGTA (1 mM), BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$ ). A figura 16A apresenta um aumento de aproximadamente duas vezes na proliferação

destas células quando tratadas com ATP (100  $\mu$ M, 16,2 %  $\pm$  1,8 do total de células) comparada às condições controle (7,8 %  $\pm$  0,2 do total de células). Uma redução significativa na proliferação destas células é observada quando as mesmas foram tratadas com CPA (2,7 %  $\pm$  0,5,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ), BAPTA-AM (2,2 %  $\pm$  0,9,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ), e U-73122 (3,1 %  $\pm$  0,3,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Com o intuito de avaliar se o ATP induz a proliferação e/ou aumenta a diferenciação neuronal conduzimos experimentos de imunomarcção usando anticorpos anti-nestina ou anti-NEL. As células em diferenciação foram investigadas na presença e ausência de 100  $\mu$ M de ATP. O número de células nestina-positiva e NEL-positiva, respectivamente, aumentaram (43 %  $\pm$  2,9 do total de células, comparada aos níveis controles 31 %  $\pm$  2,3) e (78 %  $\pm$  2,9 do total de células, comparadas aos valores controles 62 %  $\pm$  4,0) determinado pela contagem das células. Isto demonstrou que os receptores purinérgicos apresentam uma função de indutor da proliferação e diferenciação neuronal nas células P19 em diferenciação (Figura 16B). Nós também avaliamos os níveis de expressão protéica e do mRNA da nestina e da NEL nas células controles e tratadas com ATP (Figura 16C). Estes experimentos revelaram os mesmos aspectos que os experimentos de imunomarcção apresentaram, confirmando nossos resultados.



**Figura 16. Efeito do ATP na presença do inibidor da PLC e de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  na proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais.** (A) As células progenitoras neuronais do quarto dia da diferenciação foram pré-tratadas com PPADS (10  $\mu\text{M}$ ), U73122 (5  $\mu\text{M}$ , inibidor da fosfolipase  $\text{C}\beta$ , PLC), CPA (10  $\mu\text{M}$ , ácido ciclopiazônico, inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático), EGTA (1 mM, quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular), BAPTA-AM (5  $\mu\text{M}$ , quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) durante 30 min antes do co-tratamento com ATP (100  $\mu\text{M}$ ), por um período de 8 h. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles. (B) As células do dia 4 da diferenciação foram incubadas com ATP (100  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h e imunomarcadas com nestina (marcador de progenitor neuronal) e enolase neurônio-específico (NEL, marcador de neurônio maduro). Cada exemplo apresentado é representativo de 3 experimentos independentes. (C) As células do quarto dia da diferenciação foram incubadas com 100  $\mu\text{M}$  de ATP durante 48 h e então, nestina, NEL e  $\beta$ -actina foram detectadas por ensaios de Western blot e RT-PCR, como descrito na seção Métodos. +, células tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de ATP. -, células controles (não tratadas). Cada exemplo apresentado é representativo de 3 experimentos independentes.

***DISCUSSÃO:  
RECEPTORES  
PURINÉRGICOS***

## 4.2. DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi estudar as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos nucleotídeos extracelulares durante a diferenciação neuronal das células de carcinoma embrionário P19 e verificar se havia mudanças na expressão e funcionalidade dos receptores purinérgicos durante o processo de desenvolvimento neuronal. Os efeitos sobre a proliferação celular mediados pelo ATP e seus análogos também foram avaliados. Verificamos que durante a diferenciação neuronal das células P19, foram obtidas respostas, qualitativas e quantitativas, distintas aos nucleotídeos ATP e UTP. Elevações nas  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por estes nucleotídeos em células embriônicas foram menores e apresentaram uma menor dependência do  $Ca^{2+}$  extracelular do que em células diferenciadas em neurônios. Além do mais, durante o processo de desenvolvimento, as células demonstraram uma mudança na expressão e atividade dos subtipos de receptores purinérgicos. Demonstramos que os receptores P2X e P2Y eram co-expressos em uma mesma célula. Além disso, mais de um subtipo de cada classe, P2X e P2Y, estavam presentes em células neuronais. Assim, concluímos que, durante a diferenciação neuronal das células P19, o repertório dos receptores P2 foi modificado em células P19 individuais.

### 4.2.1. *Vários subtipos de receptores P2X e P2Y estão presentes em células P19 embriônicas e neuronais*

Culturas primárias de astrócitos (Fumagalli et al., 2003), oligodendrócitos (Agresti et al., 2005), assim como de linhagens celulares como as células de feocromocitoma de rato, PC12, (Arslan et al., 2000) foram previamente utilizadas para estudar a expressão dos receptores purinérgicos. Um perfil similar de expressão dos transcritos de mRNA para estes receptores foi encontrado para as células PC12 (Arslan et al., 2000). Entretanto, esta linhagem celular não é de células embriônicas, além de não apresentarem a capacidade para se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos como as células P19 apresentam (McBurney et al., 1982; Tischler, 2000; Tischler et al., 2004). Células progenitoras neuronais, assim como astrócitos e oligodendrócitos, demonstraram expressar enzimas envolvidas na hidrólise de nucleosídeos tri- e difosfatos tais como, a ecto-nucleosidase trifosfato difosfohidrolase 2 (*ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2*, NTPDase2), e a ecto-ATPase (Shukla et al., 2005), além de expressar altas quantidades de receptores purinérgicos (Fumagalli et al., 2003; Agresti et al., 2005), sugerindo a participação do sistema purinérgico na diferenciação neural.

As células P19 apresentam um modelo adequado para estudar a expressão e atividade dos receptores purinérgicos, já que elas expressam endogenamente quase todos os subtipos de receptores purinérgicos. Além disso, estas células passando por todos os estágios do desenvolvimento neural, desde células embriônicas até neurônios maduros, expressam marcadores protéicos idênticos àqueles do desenvolvimento neuronal *in vivo* (Bayer e Altman, 1995). Somado a isto, está a facilidade de expansão de sua cultura celular, apresentando vantagens sobre o uso de cultura primária para ensaios em larga escala. Neste contexto, usando a linhagem de células P19 como modelo *in vitro* para a diferenciação neuronal, identificamos que há um aumento na expressão gênica e protéica dos subtipos de receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> durante o curso da diferenciação, enquanto a expressão dos receptores P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> decaem ao mesmo tempo. A expressão dos receptores P2X foi mais alta em células indiferenciadas, decrescendo quando estas células diferenciaram-se para progenitoras neuronais e, aumentando novamente, durante a fase final de maturação neuronal. Em cérebros em desenvolvimento, um perfil similar de expressão gênica foi relatada, entretanto, o tipo celular não foi identificado, tornando dúbio se este perfil realmente aplica-se às células neuronais (Cheung et al., 2005; Xiang e Burnstock, 2005).

#### ***4.2.2. Receptores P2X funcionais em células P19 embriônicas e diferenciadas em neurônios***

Como não há agonistas ou antagonistas específicos disponíveis para os receptores P2X (von Kugelgen e Wetter, 2000; Lambrecht, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998), quaisquer definições farmacológicas para as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por estes receptores são difíceis de se fazerem. Assim, estudamos as ações de um amplo grupo de agonistas e antagonistas e consideramos seus valores de EC<sub>50</sub> para apoiar a determinação dos subtipos P2X envolvidos na ativação pelo ATP (Arslan et al., 2000; Ralevic e Burnstock, 1998; Le et al., 1998; Stoop et al. 1997; Bo et al., 1995). Primeiramente testamos vários análogos de ATP para caracterizar os subtipos de receptores que mediavam as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  pelo ATP.

Em acordo com os resultados de Western-blot (Figura 6), os análogos de ATP,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP e Bz-ATP, não induziram respostas de  $[Ca^{2+}]_i$ , confirmando que os subtipos P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>7</sub> não são expressos nem em células embriônicas e nem em neuronais. Embora o receptor P2X<sub>3</sub> tenha sido detectado em células indiferenciadas, a ausência de resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por 100  $\mu$ M de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP nestas células, levou-nos a deduzir que

este subtipo não era funcional.

Em neurônios do oitavo dia da diferenciação, não obtivemos respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo subtipo P2X<sub>2</sub>. Entretanto, o subtipo P2X<sub>4</sub> foi ativado por 300  $\mu$ M de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (Le et al., 1998; Stoop et al. 1997; Bo et al., 1995). O ADP, após sua descontaminação com o ATP, ativa os receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, e P2Y<sub>1</sub>. Em células embriônicas o ADP ativou somente os subtipos P2X<sub>6</sub> e P2Y<sub>1</sub>, já que tanto os subtipos P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>5</sub> não eram presentes, como revelado pelos experimentos de Western-blot (Figura 2B). Em células neuronais, as concentrações usadas de ADP foram 1,5-3 vezes menores que os valores de EC<sub>50</sub> encontrados em outros sistemas celulares. Assim, qualquer medida das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  deveria ser mediada somente pelo subtipo P2X<sub>6</sub>. Deste modo podemos concluir que os receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> não participaram nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo ATP e ainda temos que considerar que os receptores P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>2b</sub> e P2X<sub>4</sub> (ou possivelmente algum outro heteromultímero com propriedades farmacológicas similares) deveriam promover os efeitos de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP em células P19 indiferenciadas, e mais ainda, os receptores P2X<sub>6</sub> em células neuronais.

Para identificar se algum destes três receptores (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>2b</sub>, ou P2X<sub>4</sub>) apresentavam um papel predominante, utilizamos do antagonista PPADS concomitantemente com o agonista 2-MeS-ATP, demonstrando que estes receptores tinham importâncias relativas diferentes em células embriônicas e neuronais. O 2-MeS-ATP é um agonista mais potente sobre o receptor P2X<sub>2</sub> do que sobre o P2X<sub>4</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998), e encontramos que o P2X<sub>4</sub> foi quase duas vezes mais potente em células neuronais diferenciadas do que em células embriônicas. Em células neuronais, a potência de ativação dos receptores purinérgicos pelo 2-MeS-ATP foi similar aos valores de EC<sub>50</sub> relatos para o subtipo P2X<sub>2</sub> em células PC12 diferenciadas (Arslan et al., 2000). Diferentemente, a menor potência do 2-MeS-ATP em células embriônicas indicava que os receptores P2X<sub>4</sub> deveriam ter o papel principal, entre os P2X, nos aumentos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  nestas células. Como demonstrado em outros trabalhos (Ralevic e Burnstock, 1998), o PPADS é ativo como inibidor somente sobre o receptor P2X<sub>2</sub>, mas não sobre o P2X<sub>4</sub>, e sua ação inibitória envolve a redução dos sinais transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP. Ele inibiu apenas parcialmente as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP nas células indiferenciadas. Como o PPADS não bloqueou por completo as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelo ATP e a fraca potência do 2-MeS-ATP em induzir os transientes de  $[Ca^{2+}]_i$ , fortemente sugeriram que o



subtipo P2X<sub>4</sub> é o principal responsável pelos efeitos dos nucleotídeos em células P19 embrionárias. Contudo, em células P19 diferenciadas em neurônios, os receptores P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>2b</sub> apresentaram o papel principal. Os transientes de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidos pelo receptor P2X<sub>6</sub> não podem ser excluídos das células embrionárias, mas eles possuem importância significativa em células neuronais.

Ainda é possível que haja outros receptores purinérgicos que possam associar-se em heteroligômeros, causando diferenças nas análises farmacológicas das análises estruturais. Uma variedade de co-expressão entre eles foi demonstrada através de co-imunolocalizações (Figura 13), confirmando esta idéia. Além do mais, há evidências funcionais de que haja associações entre os subtipos P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub>, produzindo canais heteroméricos (Lewis et al., 1995; Cook et al., 1997). Ainda é possível que associações aconteçam entre os receptores purinérgicos quando estes são co-transfectados, para todas as combinações possíveis (Torres et al., 1999), exceto para os subtipos P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>7</sub>. Apesar de tudo, o fenótipo predominante é a subunidade homomérica (Torres et al., 1999). Se forem possíveis que estes heteromultímeros estejam presentes em predominância nas células embrionárias, isto poderia explicar a discrepância entre os experimentos farmacológicos e de detecção protéica (imunocitoquímica e Western-blot).

#### **4.2.3. Receptores P2Y funcionais em células P19 embrionárias e neuronais**

Em células embrionárias foi encontrada a expressão dos receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>. As elevações na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediada pelos nucleotídeos ATP e UTP usando meio extracelular sem Ca<sup>2+</sup> livre poderia estar relacionada aos subtipos P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>. De fato, respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> foram obtidas quando fizemos uso de co-aplicações de, 100 μM de ATP e de 30 μM de suramina. Enquanto, 10 μM de PPADS promoveu uma inibição da ativação de 100 μM de ADP, e 30 μM de suramina induziu uma inibição do efeito de 100 μM de UTP.

Em células neuronais, as respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pelos receptores P2Y poderiam ser produzidas pelos subtipos P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub>, já que a expressão dos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>4</sub> não foram identificadas nestas células. Além do mais, o agonista para o P2Y<sub>1</sub>, ADPβS, foi ativo somente em células indiferenciadas e o ADP e o 2-MeS-ATP não apresentaram nenhum efeito nos neurônios diferenciados. Uma inibição parcial das respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pelo ATP foi obtida somente com 30 μM de PPADS, mas não com 10

$\mu\text{M}$  deste composto. Esta inibição parcial ocorreu somente no subtipo purinérgico P2Y<sub>2</sub> (von Kugelgen e Wetter, 2000; Ralevic e Burnstock, 1998). Quando usamos 30  $\mu\text{M}$  de suramina, também obtivemos uma inibição parcial da resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediada pelo ATP, sendo que o subtipo P2Y<sub>6</sub>, era o único receptor alvo possível, já que, os receptores P2Y<sub>4</sub> não foram identificados pelas análises com Western-blot. O UTP é um agonista para os receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>, e sua ação foi apenas parcialmente bloqueada por 100  $\mu\text{M}$  de suramina. A resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  remanescente poderia ser devido à ativação do P2Y<sub>6</sub>, já que a suramina nesta concentração bloqueou por volta de 20 % as elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas por este receptor (von Kugelgen e Wetter, 2000).

#### ***4.2.4. Efeitos proliferativos e suas vias de sinalização mediadas pelos receptores P2X e P2Y em células P19 embriônicas e neuronais***

Também foi estudado o papel do ATP e dos subtipos de receptores purinérgicos ativados que estavam envolvidos com a proliferação de células embriônicas e de progenitoras neuronais. Estes estudos foram realizados usando uma larga faixa de concentração de ATP (Tu et al., 2000; Mishra et al., 2006; Xia et al., 2004). ATP, ADP, UTP, Bz-ATP e ADP $\beta$ S foram utilizados nas concentrações de 0,1-100  $\mu\text{M}$  e 2-MeS-ATP na faixa de concentração de 0,1-300  $\mu\text{M}$ . Aumentos significativos no nível de incorporação de BrdU pelas células embriônicas foram promovidos pelo ATP, ADP e UTP, em concentrações maiores que 10  $\mu\text{M}$ , de uma maneira dose-dependente e durante um período de 8 hr de incubação. O mesmo ocorreu para o 2-MeS-ATP quando usado somente em concentrações de 100-300  $\mu\text{M}$ . No entanto, o Bz-ATP não apresentou nenhuma evidência de aumento na proliferação celular, enquanto o ADP $\beta$ S em concentrações iguais ou superiores de 1  $\mu\text{M}$  induziu aumentos significativos na proliferação celular.

Em células embriônicas, somente o receptor P2X<sub>4</sub> e, possivelmente o P2X<sub>6</sub>, ou seus heterômeros, são os subtipos P2X ativos (vide seção 4.1.3.2.5. **Respostas intracelulares de cálcio à ativação dos receptores P2X diminuem durante a diferenciação neuronal**). Entre os subtipos de receptores P2Y, apenas o P2Y<sub>1</sub> e o P2Y<sub>2</sub> foram funcionais.

Como demonstrado em outros trabalhos (Meyer et al., 1999), o receptor P2Y<sub>1</sub> está presente em células mesenquimais indiferenciadas e desaparece durante o desenvolvimento, sugerindo um papel importante para este receptor em células embriônicas durante o processo de diferenciação. Em células hematopoiéticas fontes de humanos, somente os receptores de

subtipo P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> são expressos (Lemoli et al., 2004). Scemes e colaboradores (Scemes et al., 2004) demonstraram um papel para os receptores P2Y<sub>1</sub> na migração de células progenitoras neuronais, enquanto Arthur e co-autores (Arthur et al., 2005) demonstraram que o receptor P2Y<sub>2</sub> está envolvido no aumento do número de células neuronais diferenciadas, corroborando com nossos dados.

Em células P19 do quarto ao sexto dia da diferenciação neuronal, os subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>4</sub> ainda estavam presentes e poderiam ser funcionais (vide seção 4.1.2.1. **Expressão dos receptores purinérgicos em células P19 durante a diferenciação neuronal**), o que nos levou a concluir que estes mesmos receptores purinérgicos mediam os efeitos de proliferação e diferenciação neuronal.

#### **4.2.5. A sinalização de $[Ca^{2+}]_i$ intracelular influencia a proliferação celular**

O envolvimento do influxo de  $Ca^{2+}$  induzido pelo ATP na regulação da proliferação celular e diferenciação neuronal foi observado em células progenitoras neuronais de camundongos adultos da zona progenitora subventricular e em células progenitoras do giro dentado do hipocampo de rato (Mishra et al., 2006; Hogg et al., 2004). Além do mais, Mishra e colaboradores (Mishra et al., 2006) demonstraram que nucleotídeos também participam na indução da proliferação celular mediada por fatores de crescimento. A liberação constitutiva de ATP e a ativação, principalmente do receptor P2Y<sub>1</sub>, é sugerida aumentar a proliferação celular de neuroesferas induzida por EGF e FGF-2. Em neuroesferas, os receptores P2Y<sub>1</sub> têm o mais alto impacto na sinalização de  $Ca^{2+}$ , enquanto os receptores P2Y<sub>2</sub> apresentam uma forte participação. A presença de um inibidor específico para o subtipo P2Y<sub>1</sub> ou a regulação negativa da expressão de seu gene em neuroesfera resultou na redução, tanto nos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP como na proliferação celular. Estes dados indicaram uma função crucial para o receptor P2Y<sub>1</sub> em células progenitoras neuronais.

É sabido que o  $Ca^{2+}$  é um importante mensageiro intracelular e que a  $[Ca^{2+}]_i$  é aumentada pela ativação de canais de  $Ca^{2+}$  operados pelos depósitos (*store-operated  $Ca^{2+}$  channels*, SOCs) e pela liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático (RE) induzida pelo IP<sub>3</sub> (Yanagida et al., 2004). Como demonstrado acima, as repostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo ATP foram devidas à ativação dos receptores P2X e P2Y, os quais levam a um aumento na atividade mitogênica em células embriônicas e em diferenciação. Isto foi confirmado pelas observações de que, usando meio extracelular sem  $Ca^{2+}$  livre ou meio extracelular contendo

BAPTA-AM (um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular), a incorporação de BrdU é reduzida em células embriônicas e em células progenitoras neuronais. O mesmo efeito também foi confirmado em células de glioma C6 (Tu et al., 2000).

***CONCLUSÃO:  
RECEPTORES  
PURINÉRGICOS***

### **4.3. CONCLUSÃO PARCIAL**

Nossos dados sugeriram que os principais receptores purinérgicos que são responsáveis pelos aumentos transientes na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP nas células embrionárias P19 são os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2X<sub>4</sub>, ou os heteromultímeros de P2X que possuam uma farmacologia semelhante à do subtipo P2X<sub>4</sub>. Após a diferenciação neuronal das células de carcinoma embrionário P19, os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> e os subtipos P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>2b</sub> foram os principais mediadores das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$ . É interessante notar que, em uma mesma célula neuronal diferenciada, dois ou mais subtipos de receptores purinérgicos podem ser ativados por um mesmo ligante. Entretanto, os receptores ionotrópicos P2X promovem um sinal de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  curto, enquanto a ativação dos receptores metabotrópicos P2Y apresentam efeitos mais duradouros (vide as seções que descrevem a atividade funcional dos receptores P2X e P2Y). Estes dados estão relacionados com os resultados obtidos com o uso de antagonistas dos receptores purinérgicos, com o inibidor da PLC e com os quelantes de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intra e extracelulares. Isto nos levou a concluir que o receptor P2Y<sub>1</sub> é o principal subtipo purinérgico que regula a proliferação e a diferenciação neuronal, seguido pelo receptor P2Y<sub>2</sub>, e que, provavelmente, o subtipo P2X<sub>4</sub> tenha menor participação na proliferação celular.

***RESULTADOS:  
RECEPTORES  
COLINÉRGICOS***

## 5. ESTUDO DAS BASES MECANÍSTICAS DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL MEDIADA PELA ATIVIDADE DE $[Ca^{2+}]_i$ PELOS RECEPTORES COLINÉRGICOS

### 5.1. RESULTADOS

Estudamos também a expressão e a funcionalidade dos receptores colinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19. Como estes receptores são expressos em fase precoce do desenvolvimento seria de se supor serem fundamentais, para todo o processo de maturação em direção a um neurônio funcional (revisto por Ma et al., 2004).

#### 5.1.1. Caracterização da expressão gênica e protéica dos receptores colinérgicos

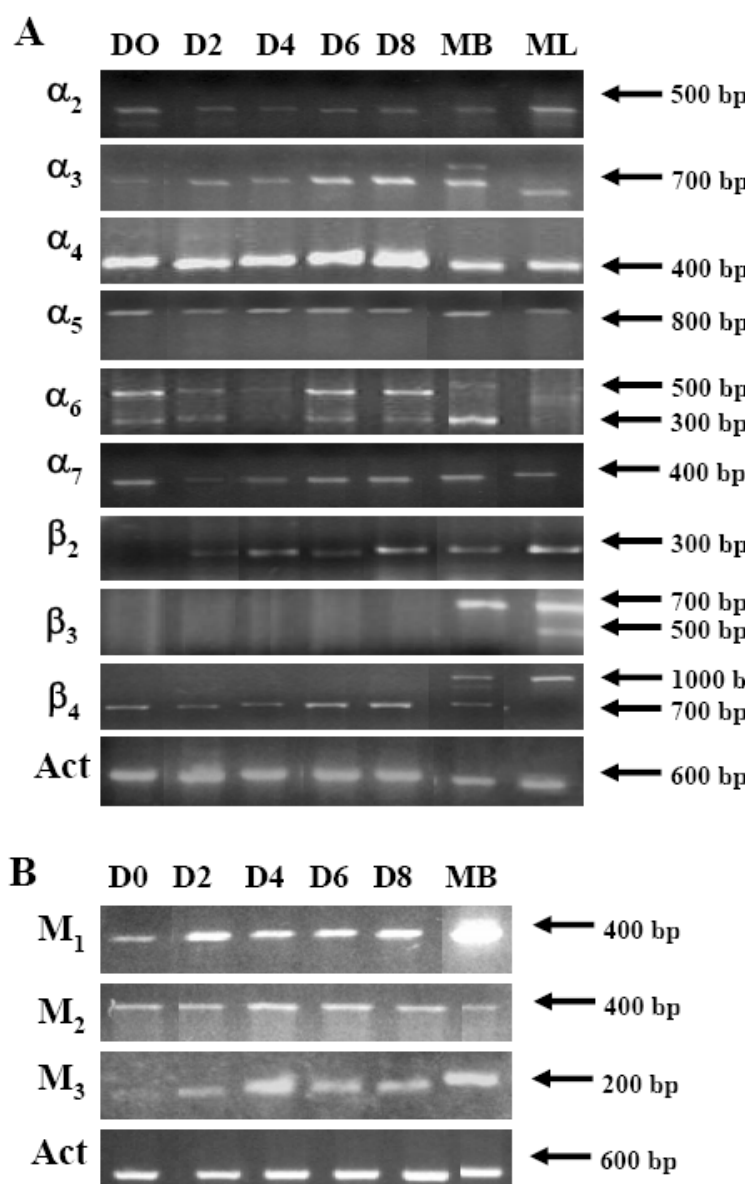
##### 5.1.1.1. Expressão dos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19

Foram detectados os mRNAs transcritos das subunidades  $\alpha_2$ - $\alpha_7$  e  $\beta_2$  e  $\beta_4$  dos nAChR e dos subtipos  $M_1$ - $M_3$  dos mAChRs ao longo da diferenciação das células P19 através da metodologia da RT-PCR (Figura 17). O mRNA transcrito da subunidade  $\beta_3$  de nicotínico estava abaixo do limite de detecção do método, enquanto os mRNAs das subunidades  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  foram transcritos somente após a indução da diferenciação neuronal pela adição do RA. A expressão gênica dos subtipos de receptores muscarínicos estudados,  $M_1$  e  $M_2$ , foi detectada através do período de diferenciação (Figura 17). O mRNA do subtipo  $M_3$  de mAChR estava no limite de detecção pela RT-PCR no estágio de células indiferenciadas. Entretanto, sua expressão gênica teve subsequentemente um aumento durante o processo de diferenciação.

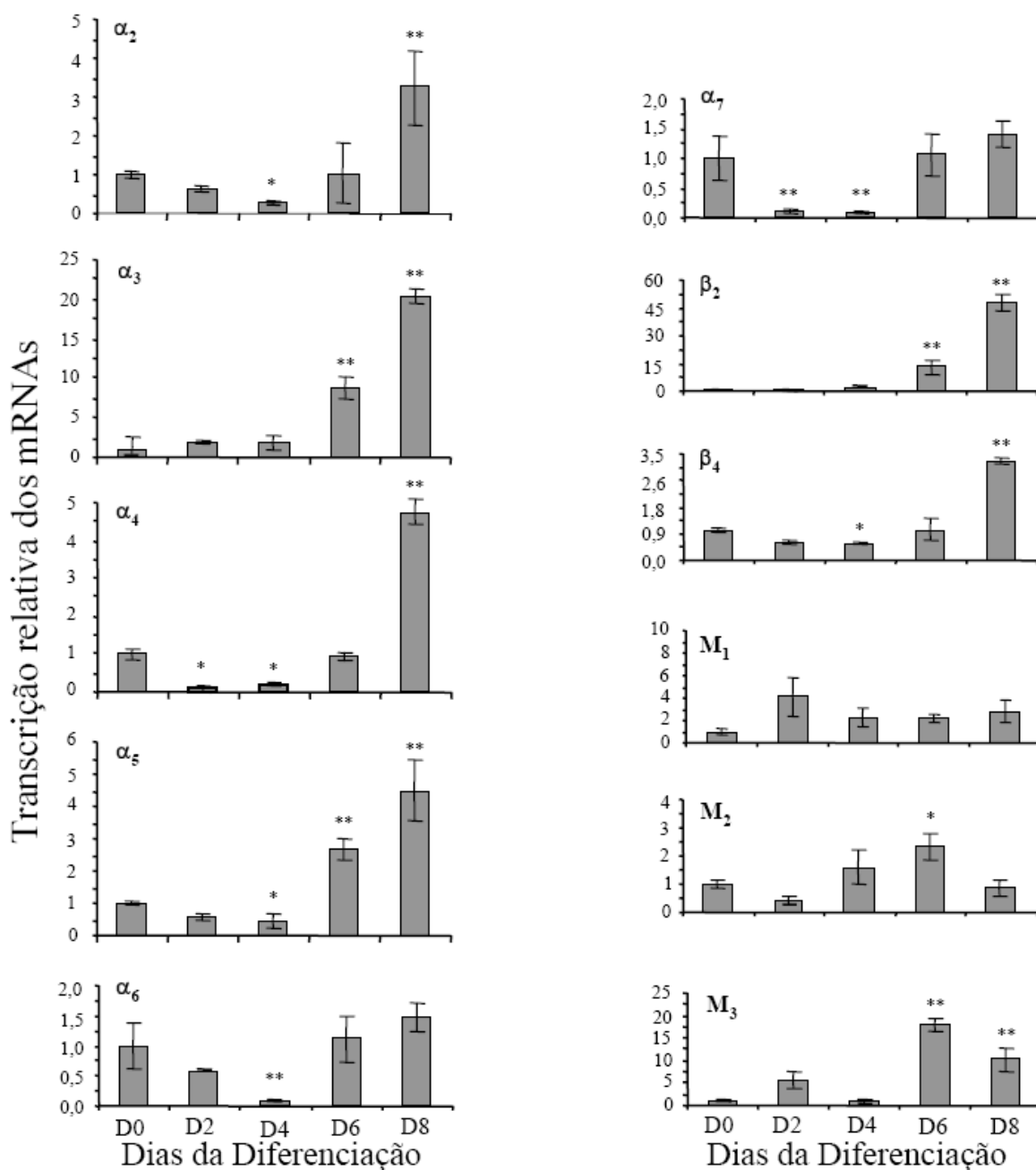
A metodologia da PCR em tempo real revelou que a expressão gênica das subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_4$  dos nAChRs já estava presente em células embriônicas, permanecendo em baixos níveis durante os estágios iniciais e intermediários da diferenciação e aumentando significativamente quando as células tornaram-se neurônios pós-mitóticos e prosseguiram para o estágio final de maturação nos dias 6 ao 8. Os transcritos para os receptores muscarínicos ( $M_1$ - $M_3$ ) apresentaram um aumento em sua quantidade durante a diferenciação neuronal (Figura 18).

A presença de proteínas dos nAChRs em células embriônicas, progenitoras neuronais do dia 4 e das células diferenciadas em neurônios do dia 8 foi demonstrada por coloração pela imunoperoxidase usando anticorpos específicos para cada subtipo. A expressão protéica

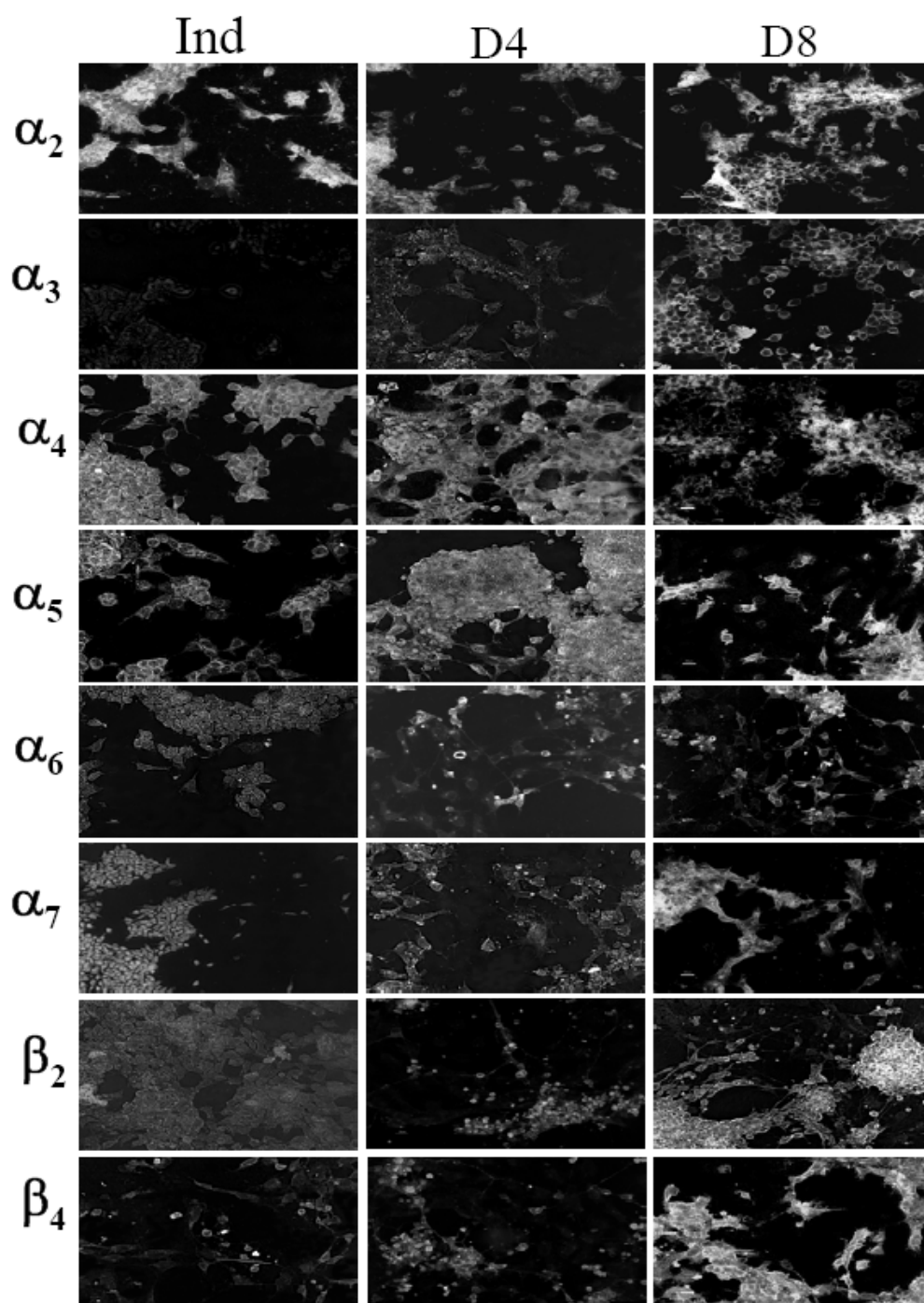




**Figura 17: Detecção do perfil da expressão gênica dos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19 pela RT-PCR.** A expressão dos genes dos nAChR e mAChR foi detectada por RT-PCR usando RNA total extraído de vários dias da diferenciação (D0-D8). A RT-PCR, como detalhada na seção Métodos foi realizada na presença de iniciadores que codificam para as sequências de DNA das subunidades  $\alpha_2$ - $\alpha_7$ ,  $\beta_2$ - $\beta_4$  dos nAChRs (A) e dos subtipos  $M_1$ - $M_3$  dos mAChRs (B). As identidades dos fragmentos de DNA amplificados foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA, sendo complementares aos cDNAs das subunidades de receptores colinérgicos. RNAs totais isolados de cérebros de camundongos (*mouse brain*, MB) e fígado de camundongo (*mouse liver*, ML) foram usados como controle para os procedimentos da RT-PCR. As reações da RT-PCR com o mRNA da  $\beta$ -actina (Act) foram amplificadas para verificar a integridade dos respectivos RNAs totais extraídos. A amplificação dos cDNAs de vários tamanhos resultou do processamento alternativo dos pré-mRNAs codificantes para as subunidades dos receptores nicotínicos  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$ .



**Figura 18: Quantificação dos níveis de transcrição dos mRNAs dos receptores colinérgicos pela PCR em tempo real.** Os níveis de expressão gênica relativa dos subtipos de receptores colinérgicos foram corrigidos com o controle interno de  $\beta$ -actina. Os gráficos apresentam os níveis de mRNAs transcritos dos nAChR e mAChR em células em diferenciação comparados àqueles em células indiferenciadas, os quais foram normalizados para um. As células no dia 8 da diferenciação foram pré-tratadas no dia 6 com citosina arabinosídeo, para evitar a contaminação das células em cultura com populações crescentes de células gliais em proliferação. Os dados mostrados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 5 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado com os dados controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado com os dados controles.



**Figura 19: Detecção do perfil de expressão dos receptores colinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 por marcações imunocitoquímicas.** Após a fixação, as células foram incubadas com o anticorpo primário subunidade-específico seguida da adição de um anticorpo secundário biotilado. A reação foi revelada pela coloração por imunoperoxidase. A expressão das subunidades dos nAChRs foi verificada em células indiferenciadas (Ind, painéis à esquerda) e células dos dias 4 (D4, painéis centrais) e 8 (D8, painéis à direita) após a indução da diferenciação neuronal.

de todas as subunidades dos nAChRs neuronais, exceto a da  $\beta_3$ , foi detectada (Figura 19).

### 5.1.2. Caracterização dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ mediado pelos receptores colinérgicos

#### 5.1.2.1. Atividade do receptor de acetilcolina em células P19 embriônicas e diferenciadas em neurônios

Os valores máximos nas elevações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$ , em culturas de células embriônicas e neuronais maduras, foram obtidas na presença de uma larga faixa de concentração de nicotina e muscarina, e posteriormente apresentadas como curvas de dose-resposta (Figuras 20D e 20E; Tabela VI). Os efeitos nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  da nicotina e da muscarina foram dose-dependentes e tiveram seus valores máximos no estágio de célula neuronal diferenciada. A muscarina não apresentou um efeito significativo em células embriônicas P19. A concentração de nicotina necessária para a ativação de 50 por cento da atividade máxima do receptor ( $EC_{50}$ ) foi determinada como sendo 33,4 (9,7-115,2)  $\mu M$  (valores médios e intervalo de confiança de 95 %) para as células embriônicas e 52,4 (5,9-465,5)  $\mu M$  para as células do dia 8 da diferenciação (Figura 20D). O valor de  $EC_{50}$  para a ativação do receptor muscarínico em neurônios diferenciados foi de 24,3 (5,0-117,2)  $\mu M$  (valores médios e intervalo de confiança de 95 %).

**Tabela VI:** Valores de  $EC_{50}$  da ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina em células P19 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios.

Agonista	Células P19 Indiferenciadas	Neurônios P19
Nicotina ( $\mu M$ )	33,4 (9,7-115,2) ( $n = 62$ )	52,4 (5,9 - 465,5) ( $n = 65$ )
Muscarina ( $\mu M$ )	-	24,3 (5,0-117,2) ( $n = 49$ )

$n$  = número de células testadas.

Valores de  $EC_{50}$  foram expressos como valores médios e intervalo de confiança de 95 %.

- = Receptor ativo não presente

As medidas das alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ACh proveram um ensaio para a análise funcional independente dos receptores colinérgicos em células neuronais. Sendo assim, medimos as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  após a aplicação de agonistas e antagonistas seletivos para cada classe dos receptores colinérgicos em células embriônicas e neuronais.

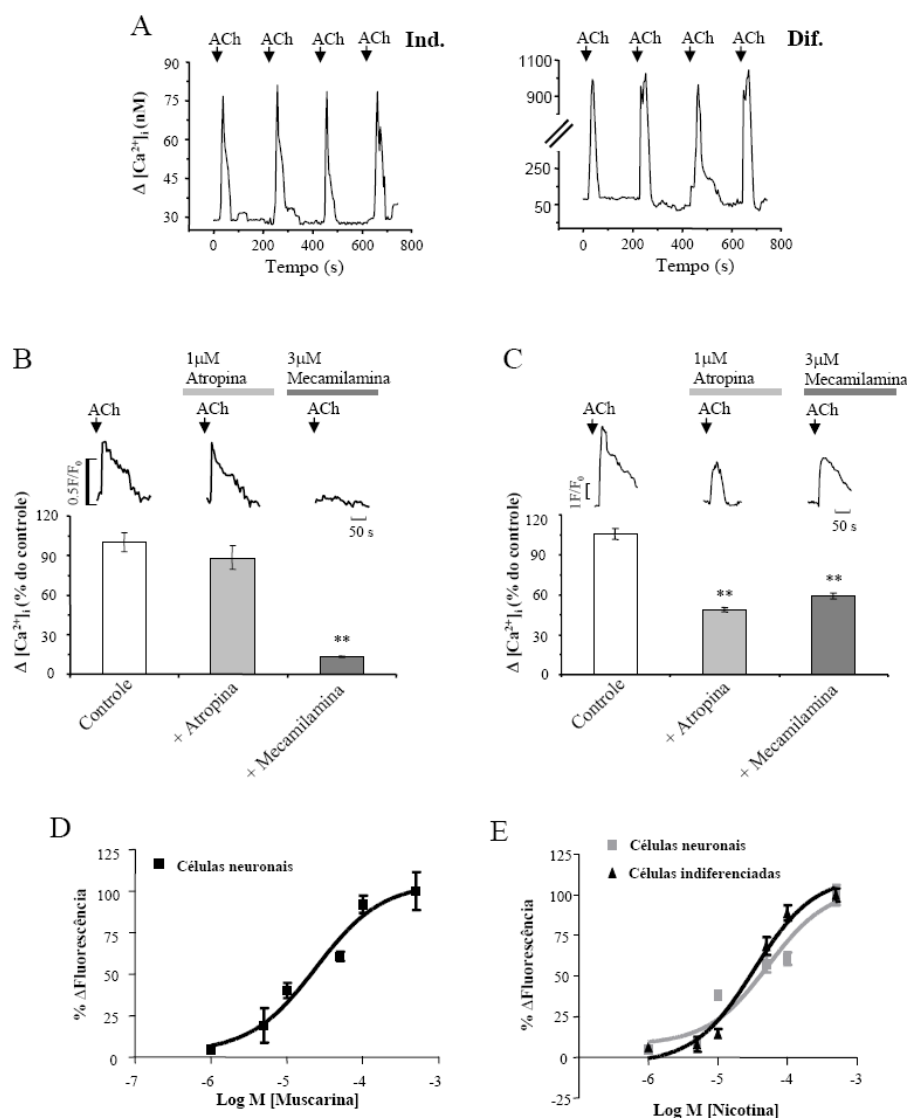
A aplicação de 300  $\mu M$  de ACh promoveu um aumento rápido e transiente na  $[Ca^{2+}]_i$  em células indiferenciadas e diferenciadas do dia 8. Os valores máximos da  $[Ca^{2+}]_i$  em

células embriônicas aumentaram na presença de 300  $\mu\text{M}$  de ACh, de seu valor inicial  $32 \pm 1$  nM à  $78 \pm 6$  nM ( $n = 51$ ). A estimulação das células P19 do dia 8 da diferenciação com 300  $\mu\text{M}$  de ACh resultou em aumentos na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $63 \pm 1$  para  $989 \pm 39$  nM ( $n = 62$ ) (Figura 20A).

As contribuições relativas dos mAChRs e nAChRs para as respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela ACh em células embriônicas e diferenciadas foram reveladas pelas elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na presença de antagonistas específicos dos receptores nicotínicos e muscarínicos. A co-aplicação de mecamilamina (3  $\mu\text{M}$ ), um antagonista dos nAChRs que inibe todas as respostas dos receptores nicotínicos nessa concentração (Fieber e Adams, 1991), em combinação com 300  $\mu\text{M}$  de ACh inibiu a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em células embriônicas em  $87 \pm 10$  % ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 10 \pm 0,3$  nM) comparado aos valores controles com ACh ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 78 \pm 6$  nM). Uma inibição de  $12 \pm 1$  %, que não foi significativa, do aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido pela ACh ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 69 \pm 7$  nM), foi medida na presença do antagonista específico para os mAChRs, a atropina, que inibe todas as respostas dos receptores muscarínicos nessa concentração (Walch et al., 2000). Indicando assim que, as respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela ACh em células indiferenciadas são principalmente devidas à ativação dos nAChRs (Figura 20B). Aumentos na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pela ACh em células neuronais foram inibidos em  $41 \pm 2$  % ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 586 \pm 23$  nM) ou  $54 \pm 2$  % ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 456 \pm 24$  nM) na presença de 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina ou de 1  $\mu\text{M}$  de atropina, respectivamente, em comparação aos valores controles ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 993 \pm 70$  nM). A co-aplicação de 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina e 1  $\mu\text{M}$  de atropina junto com a acetilcolina (300  $\mu\text{M}$ ) resultou em uma completa inibição na  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 20C). Nossos dados indicam que as repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela ACh naqueles neurônios foram devidas à ativação dos nAChRs e mAChRs.

#### **5.1.2.2. Fontes extra e intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ mobilizados pela ativação dos mAChRs e nAChRs em células P19 embriônicas e neuronais**

As contribuições relativas dos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , extracelular e intracelular, para as repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pela ACh foram estudadas em neurônios diferenciados. A pré-incubação dos neurônios em meio extracelular sem  $\text{Ca}^{2+}$  livre, contendo 1 mM de EGTA, durante 1 min antes da aplicação da ACh, resultou na inibição da resposta da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em  $44 \pm 4$  % ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 493 \pm 34$  nM) comparado aos experimentos controles ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 887 \pm 39$  nM) realizados na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Figura 21A), indicando o envolvimento de



**Figura 20: Respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina das células P19 embrionárias e neuronais do dia 8 da diferenciação.** Células carregadas com o indicador de  $[Ca^{2+}]_i$ , Fluo-3 AM, foram monitoradas para a  $[Ca^{2+}]_i$  em células únicas através de microscopia confocal de imageamento de cálcio. Após a estimulação com 300  $\mu$ M de ACh durante 60 s, as células foram então lavadas com meio extracelular a cada 5 min, permitindo a ressensibilização dos receptores. (A) A aplicação de ACh induziu elevações transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 indiferenciadas (Ind.) e diferenciadas em neurônios (Dif.). (B) Painéis superiores: Células embrionárias foram estimuladas, tanto por ACh sozinha quanto por ACh na presença de 1  $\mu$ M de atropina, ou 3  $\mu$ M de mecamilamina, ou 1  $\mu$ M de atropina e 3  $\mu$ M de mecamilamina. Painéis inferiores indicam os valores percentuais dos aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos na presença de atropine, mecamilamina, ou atropina e mecamilamina comparada aos experimentos controles na ausência dos inibidores. Os dados mostrados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 8 experimentos independentes ( $n = 8$ ). Os números totais de células

analisadas em cada experimento foram de 56-81. (C) Painéis superiores: Células neuronais do dia 8 da diferenciação foram estimuladas com 300  $\mu\text{M}$  de ACh na ausência e presença dos inibidores dos receptores de ACh, como indicado acima. Os painéis inferiores apresentam os valores médios  $\pm$  E.P.M. de 8 experimentos independentes. Os valores das respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na presença dos inibidores são plotados como valores percentuais dos controles não inibidos. (D) Curvas de dose-resposta ( $\text{EC}_{50}$ ) das elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediada pela ativação dos mAChR pela muscarina em células neuronais. Os valores picos dos transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foram calculados e plotados como valores percentuais da resposta máxima média. Os dados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de seis a 14 experimentos independentes. (E) Curvas de dose-resposta ( $\text{EC}_{50}$ ) dos aumentos na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela ativação dos nAChR pela nicotina, em células indiferenciadas e neuronais. Os dados são os valores médios  $\pm$  E.P.M. de seis à 10 experimentos independentes. As curvas em (D) e (E) foram calculadas de acordo com uma função logística. \*  $p < 0,05$  comparada com os valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada com os valores controles.

ambos os depósitos, extracelular e intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , nas repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pela ACh. A inibição das respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nas células neuronais mediadas pela ACh na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular foi revertida após a reintrodução do  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 955 \pm 35 \text{ nM}$ ).

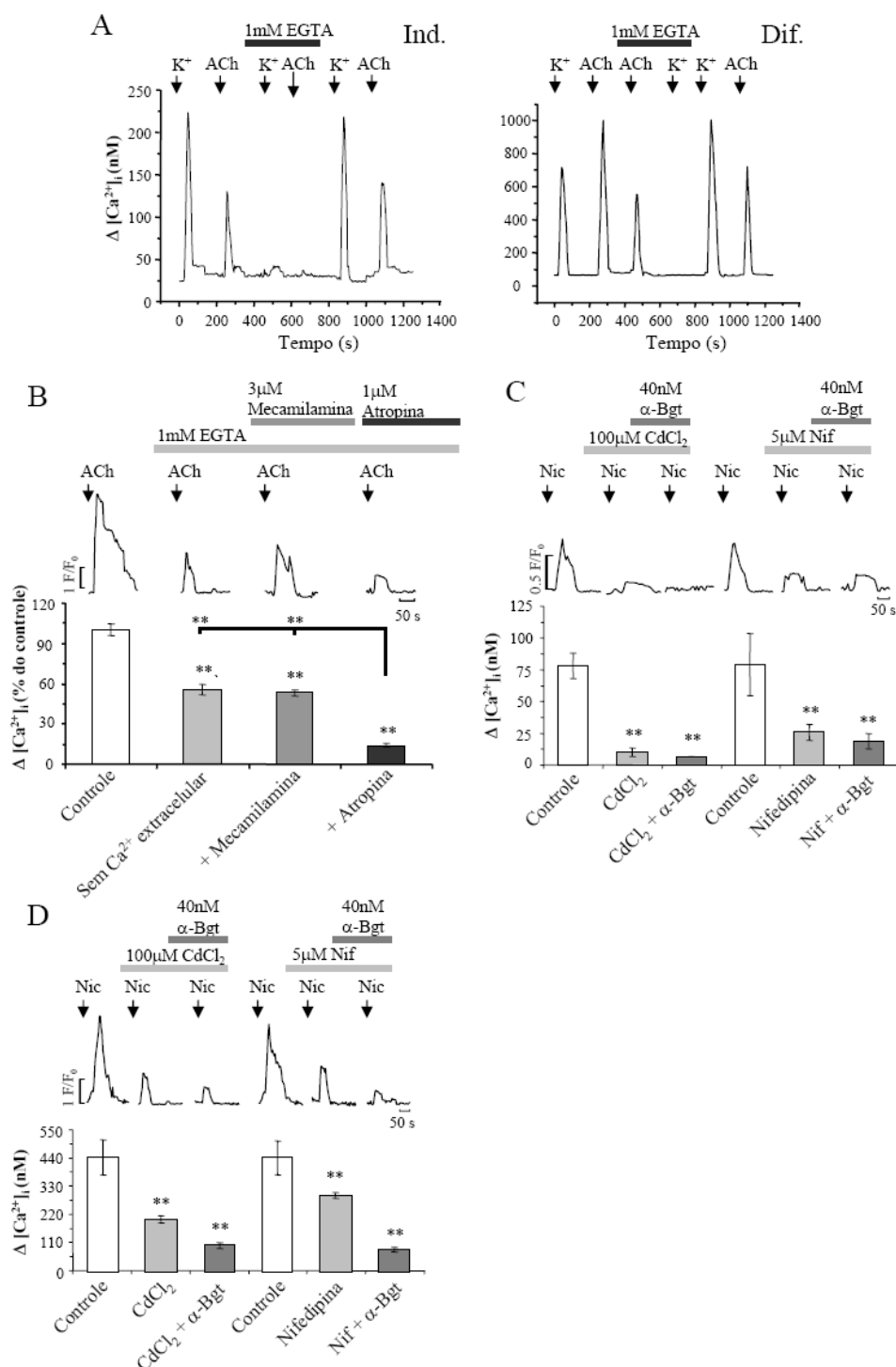
As elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pelos receptores muscarínicos na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 492 \pm 34 \text{ nM}$ ), na presença de 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina e 1 mM EGTA ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 471 \pm 18 \text{ nM}$ ), não diferiram daquelas obtidas pela ACh sozinha em meio extracelular sem  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Este resultado indicou que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do meio extracelular não contribuiu para as respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pelos mAChRs. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida pela ACh foi fortemente inibida pela atropina ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 123 \pm 11 \text{ nM}$ ), sugerindo que houve um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos depósitos internos. Como era esperado, o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular participou nas elevações de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChRs. Uma perfusão local das células com KCl (75 mM durante 60 s) produziu um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inicial de  $29 \pm 3 \text{ nM}$  para  $215 \pm 33 \text{ nM}$  ( $n = 6$ ) em células indiferenciadas e de  $68 \pm 8 \text{ nM}$  para  $715 \pm 77 \text{ nM}$  ( $n = 8$ ) em células diferenciadas em neurônios. Resultados idênticos foram obtidos com a estimulação por KCl após a lavagem das células por 5 min (Figura 21A). Os efeitos da mecamilamina e da atropina na inibição da atividade dos receptores colinérgicos foram revertidos após suas lavagens do meio extracelular ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 942 \pm 33$ ) (Figura 21B).

Para avaliar a participação dos VOOCs nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por nicotina em células embriônicas e diferenciadas em neurônios, usamos  $CdCl_2$  (100  $\mu M$ ) (Taylor e Peers, 1999) no meio extracelular contendo 2,5 mM  $Ca^{2+}$ . Na presença de  $CdCl_2$ , os aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  mediados pela nicotina, foram inibidos em  $87 \pm 20\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 10 \pm 3$  nM) e  $54 \pm 3\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 209 \pm 14$  nM), respectivamente, nas células indiferenciadas ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 78 \pm 10$  nM) e diferenciadas em neurônios ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 456 \pm 70$  nM) (Figura 21C e 21D), indicando que os VOOCs mediavam a maior parte das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células indiferenciadas e por volta de 50 % em células neuronais. Os aumentos residuais, induzidos pela nicotina, no aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  na presença de  $CdCl_2$ , foram significativamente reduzidos, para  $91 \pm 6\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 7 \pm 0.1$  nM) e  $77 \pm 10\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 19 \pm 6$  nM) seguida da co-aplicação de 40 nM de  $\alpha$ -Bgt e 100  $\mu M$  de  $CdCl_2$  em células embriônicas e neuronais, respectivamente (Figuras 21C e 21D).

O bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem tipo L, nifedipina (5  $\mu M$ ) (Gafni et al., 1997), inibiu  $68 \pm 7\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 26 \pm 6$  nM) e  $38 \pm 5\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 151 \pm 13$  nM) do aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pela nicotina em células indiferenciadas ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 79 \pm 25$  nM) e neuronais ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 456 \pm 68$  nM), respectivamente. Na presença de nifedipina,  $\alpha$ -Bgt produziu uma inibição significativa de  $77 \pm 9\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 19 \pm 6$  nM) e  $81 \pm 3\%$  ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 88 \pm 9$  nM) da resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pela nicotina em células indiferenciadas e neuronais, respectivamente (Figuras 21C e 21D). Estes dados sugeriram que os receptores nAChR  $\alpha_7$  são os principais mediadores do aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  independente dos VOOCs, já que a  $\alpha$ -Bgt naquela concentração inibe somente o subtipo  $\alpha_7$  de nAChR (Sharma e Vijayaraghavan, 2001), além de que os valores dos aumentos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  não foram significativamente diferentes em células embriônicas quando aplicadas nifedipina sozinha e nifedipina com  $\alpha$ -Bgt. Além do mais, em células neuronais diferenciadas, por volta de 40 % das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina são mediadas pelos VOOCs e as respostas remanescentes são devidas à mobilização dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  e pelos próprios canais formados pelos nAChRs.

Pirenzepina (0,1  $\mu M$ ), galamina (10  $\mu M$ ), 4-DAMP (0,1  $\mu M$ ) e MT3 (1  $\mu M$ ), que nestas concentrações são antagonistas específicos dos subtipos  $M_1$  (Caulfield e Birdsall, 1998),  $M_2$  (Michel et al., 1990; Doelman et al., 1991)  $M_3$ , (Caulfield e Birdsall, 1998) e  $M_4$  (Jolkkonen et al., 1994, Olanas et al., 1996) dos mAChRs, respectivamente, foram co-



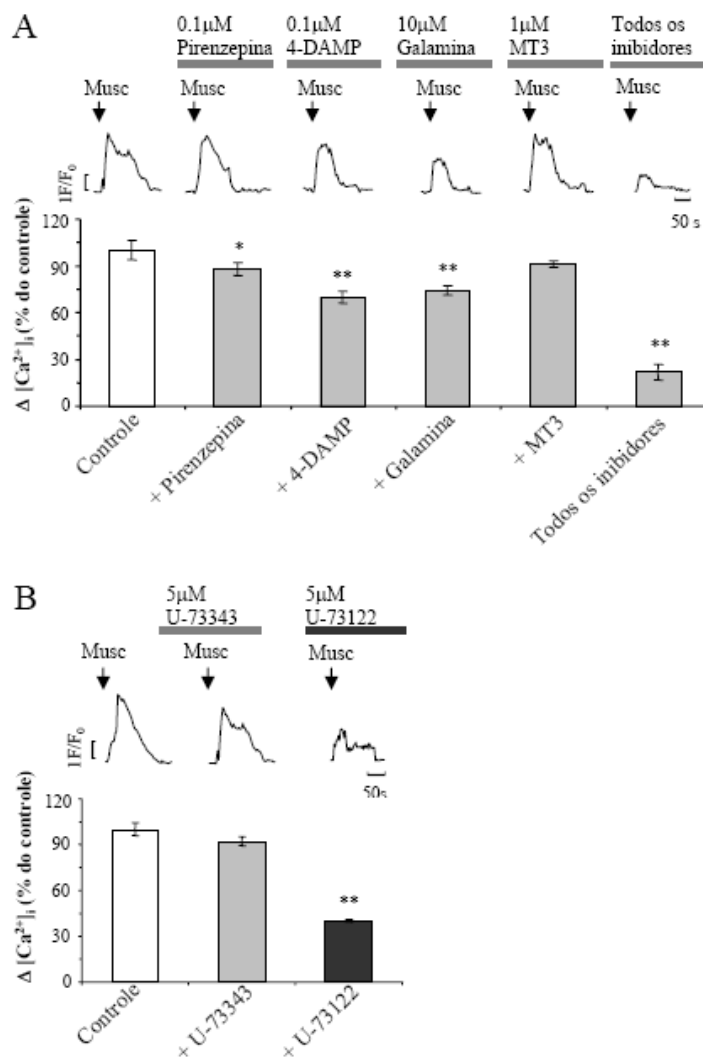


**Figura 21: Respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas na presença ou ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular livre.** Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo K<sup>+</sup> (75 mM) ou ACh (300  $\mu$ M) na (A) ausência de  $Ca^{2+}$  externo foram demonstradas em células indiferenciadas e neuronais. (B) A participação do influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular em resposta à indução pela ACh apresentou variações na  $[Ca^{2+}]_i$  de células neuronais do dia 8 da diferenciação. Estas variações foram verificadas pela pré-incubação das células durante 5 min com 1 mM de EGTA. Os painéis superiores apresentam traçados representativos da ativação dos receptores de ACh pela, ACh sozinha (controle) e ACh após a pré-incubação das células

durante 5 min com 1 mM de EGTA, na ausência ou presença de 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina ou 1  $\mu\text{M}$  de atropina. Os painéis inferiores apresentam as  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  como valores percentuais dos valores obtidos nos experimentos controles. As diferenças nos valores da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  obtidas na presença de EGTA sozinho, EGTA + atropina, ou EGTA + mecamilamina foram estatisticamente diferentes dos valores controles ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). O número de células estudadas estava entre 56 e 74 para cada experimento. (C e D) Efeito de bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  VOOC nas repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina: Traçados representativos das repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à 100  $\mu\text{M}$  de nicotina (Nic) na presença de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ; 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  e 40 nM  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -Bgt) ou 5  $\mu\text{M}$  de nifedipina (Nif); 5  $\mu\text{M}$  Nif e 40 nM  $\alpha$ -Bgt em células indiferenciadas (C) e neuronais (D). Para a aplicação de cada droga uma nova preparação foi utilizada. Os valores dos dados são as médias  $\pm$  E.P.M. de 5-7 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

aplicados juntos com 300  $\mu\text{M}$  de muscarina, com o objetivo de elucidar a contribuição de cada subtipo para a resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  muscarínica em células diferenciadas. 4-DAMP é um antagonista menos seletivo, com um perfil de inibição dos subtipos  $\text{M}_3 > \text{M}_1 >> \text{M}_5$  (Caulfield e Birdsall, 1998; Michel et al., 1990).

O tratamento de neurônios com a pirenzepina resultou em uma inibição da resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induzida pela muscarina, de  $12 \pm 1 \%$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 492 \pm 22$  nM) em relação aos experimentos controles ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 560 \pm 23$  nM), na ausência do inibidor. Uma alta inibição da resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida pela muscarina,  $26 \pm 2 \%$ , foi observada na presença de 4-DAMP ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 415 \pm 12$  nM), que em concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$  inibe preferencialmente o subtipo  $\text{M}_3$  (Caulfield e Birdsall, 1998). A presença de galamina como um antagonista específico para o subtipo  $\text{M}_2$  também levou a uma inibição da resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida pela muscarina de  $30 \pm 1 \%$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 390 \pm 17$  nM). O inibidor específico do subtipo  $\text{M}_4$ , MT3, causou a menor inibição naquela resposta ( $9 \pm 1 \%$ ) em células neuronais diferenciadas, porém, as elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  não foram estatisticamente diferente das do controle ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 511 \pm 28$  nM). A co-aplicação de todos os inibidores resultou em uma inibição de  $78 \pm 4 \%$  ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 122 \pm 6$  nM) nas repostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina (Figura 22A). A resposta remanescente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na presença dos quatro inibidores poderia ser devida à atividade do subtipo  $\text{M}_5$ . A inibição total observada na presença de todos os quatro inibidores deveria ser a soma dos efeitos de inibição observada de cada inibidor sozinho. A inibição da resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mediada pelos receptores



**Figura 22: Caracterização das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  mediada pelos receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) em neurônios P19.** (A) O painel superior apresenta traçados típicos das alterações de  $[Ca^{2+}]_i$ , em células do dia 8 da diferenciação neuronal, seguida da estimulação com 300  $\mu$ M de muscarina (Musc) sozinha ou junto com: 0,1  $\mu$ M de pirenzepina ( $n = 8$ ), 0,1  $\mu$ M de 4-DAMP ( $n = 8$ ), 10  $\mu$ M de galamina ( $n = 8$ ), ou 1  $\mu$ M de MT3 ( $n = 8$ ), que são os inibidores específicos para os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_2$  e  $M_4$  dos mAChRs, respectivamente. As alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  remanescente, após a estimulação com a muscarina na presença de todos os quatro inibidores, é acredita ser devida ao subtipo  $M_5$  ( $n = 4$ ). Nenhum dos inibidores nas concentrações usadas são antagonistas da atividade do mAChR  $M_5$ . Painéis inferiores: Valores médios da  $[Ca^{2+}]_i$  na presença dos respectivos inibidores foram plotados como valores percentuais das medidas controles, realizadas na ausência dos inibidores. (B) O painel superior apresenta traçados de transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos após a estimulação com muscarina sozinha ou com muscarina na presença de 5  $\mu$ M do inibidor da PLC, o U-73122, e seu análogo biologicamente inativo, o U-73343. Nos painéis inferiores, os valores de  $[Ca^{2+}]_i$  obtidos na presença de muscarina e U-73122 ( $n = 4$ ) ou U-73343 ( $n = 8$ ) foram plotados como porcentagem dos valores das medidas controles, na ausência dos inibidores ( $n = 8$ ). O número total de células analisadas em cada experimento foi de 56-76. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

muscarínicos, na presença conjunta dos inibidores pirenzepina, galamina, 4-DAMP e MT3, foi reversível, já que as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  foram recuperadas após a retirada dos inibidores do meio extracelular ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 571 \pm 35$  nM).

Este estudo indicou que por volta de 60 % das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  dos receptores muscarínicos deveriam ser devido aos subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$ , que podem simultaneamente ativar vários fatores de sinalização (Felder et al., 1995). Estes subtipos, que são acoplados à proteína  $G\alpha_{q/11}$ , exercem a transdução de seu sinal pela ativação da PLC. A pré-incubação das células neuronais com 5  $\mu$ M de U-73122, um inibidor específico da PLC, resultou em uma inibição significativa,  $60 \pm 2$  % ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 224 \pm 5$  nM), das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 561 \pm 21$  nM), confirmando a participação da PLC na mobilização da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelos mAChR (Figura 22B). A porcentagem da inibição na elevação da  $[Ca^{2+}]_i$ , induzida pela muscarina, na presença do inibidor da atividade da PLC, foi similar à soma dos respectivos valores de inibição dos subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  ( $60 \pm 6$  %) (Figura 22A). Experimentos controles foram realizados pela pré-incubação dos neurônios com o análogo estrutural e sem efeitos biológicos, U-73343, do inibidor U-73122. Como era esperado, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina não foram diferentes das respostas da muscarina sozinha ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 515 \pm 16$  nM). Quando da troca da solução extracelular, para uma sem o inibidor U-73122, a resposta à muscarina foi similar ao controle ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 517 \pm 26$  nM). Estes resultados indicaram que os mAChRs,  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$ , em células P19 diferenciadas em neurônios, estão acoplados à ativação da PLC, estimulando a produção de  $IP_3$  e, subsequentemente, induzindo a liberação do  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares.

Também determinamos as concentrações em que os antagonistas subtipo-seletivos dos receptores muscarínicos inibiam 50 por cento das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina ( $IC_{50}$ ). O efeito de 300  $\mu$ M de muscarina na indução das elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  em células neuronais foi bloqueado de maneira dose-dependente pela pirenzepina (um antagonista parcialmente seletivo para o receptor  $M_1$ ), galamina (seletivo para o subtipo  $M_2$ ), e 4-DAMP (parcialmente seletivo para os subtipos  $M_1$  e  $M_3$ ). Os resultados estão resumidos na tabela VII As curvas dose-respostas correspondentes estão ilustradas na figura 23 (A) (pirenzepina), (B) (galamina) e (C) (4-DAMP). As potências dos antagonistas foram:

4-DAMP [pK<sub>i</sub> 5,56 (7,3-3,8)], galamina [pK<sub>i</sub> 6,46 (8,7-4,3)] e pirenzepina [pK<sub>i</sub> 6,03 (6,66-5,41)]. Estes resultados dos valores de IC<sub>50</sub>, indicaram que o efeito da muscarina na indução dos transientes da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, foi predominantemente mediado pelo subtipo de receptor muscarínico M<sub>3</sub>. Estes antagonistas em concentrações mais altas que as usadas, deveriam inibir inespecificamente outros subtipos muscarínicos.

**Tabela VII:** Valores das constantes de inibição (pK<sub>i</sub>) de antagonistas dos receptores muscarínicos para as respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pela muscarina em células P19 neuronais.

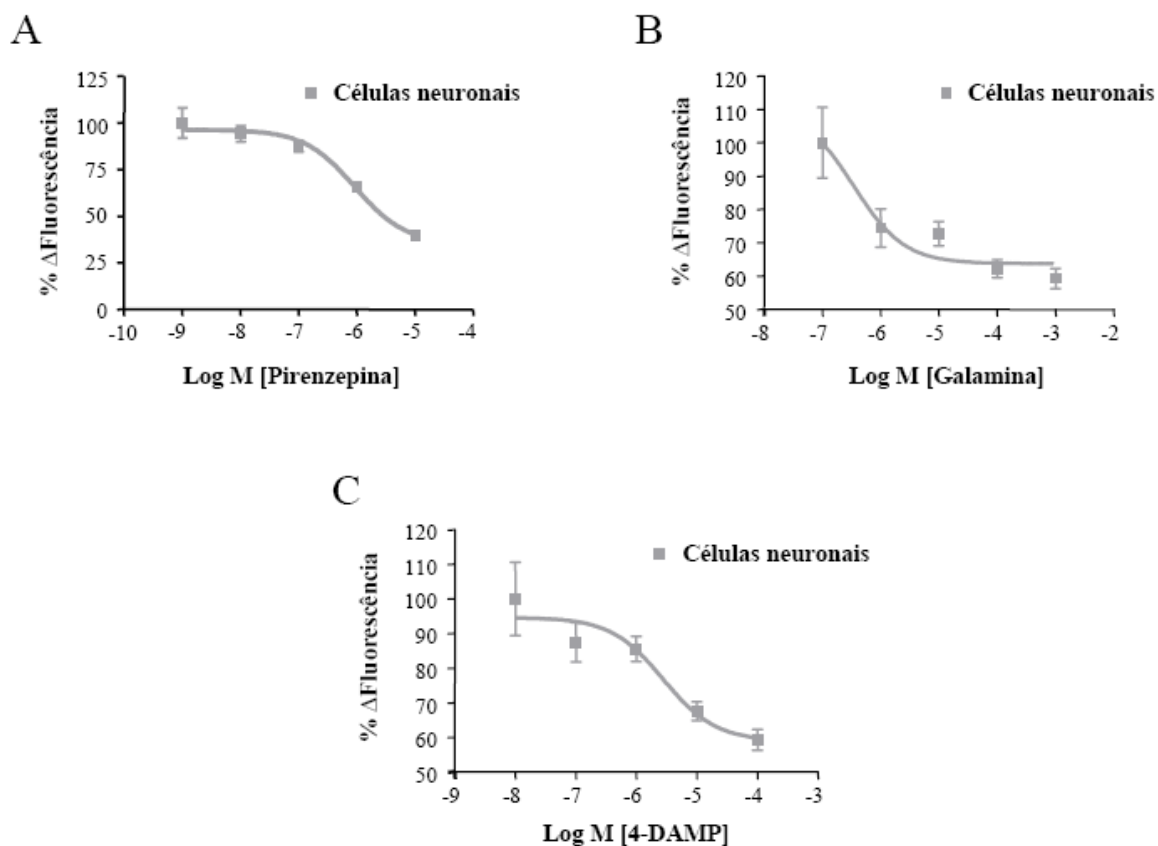
<b>Antagonista</b>	<b>pK<sub>i</sub></b>
<b>Pirenzepina</b>	6,0 ± 0,15 (n = 42)
<b>Galamina</b>	6,46 ± 0,51 (n = 48)
<b>4-DAMP</b>	5,56 ± 0,40 (n = 37)

n = número de células avaliadas.

Os valores de pK<sub>i</sub> foram expressos em média ± E.P.M.

### 5.1.2.3. A ativação dos nAChRs mobilizam Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular e da liberação do Ca<sup>2+</sup> de seus depósitos intracelulares

A cafeína, em concentrações milimolares, age como um inibidor dos receptores de IP<sub>3</sub> intracelulares, assim como é um ativador dos receptores de rianodina (Beck et al., 2004), e sua presença contínua no meio extracelular leva à depleção dos depósitos de Ca<sup>2+</sup> intracelulares sensíveis à rianodina (Meldolesi, 2001). Em contraste, concentrações micromolares do alcalóide rianodina, inibem a liberação de Ca<sup>2+</sup> de seus depósitos intracelulares induzidas pela cafeína. A mobilização de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzida pela cafeína (10 mM) ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 1012 ± 41 nM) em neurônios P19 foi bloqueada por 10 μM de rianodina ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 136 ± 38 nM), indicando a presença de depósitos de Ca<sup>2+</sup> intracelulares sensíveis à rianodina (Figura 24A). Estes depósitos de Ca<sup>2+</sup> são responsáveis pelos CICR, que já são conhecidos em participarem nas elevações de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pelos nAChRs. Nossos dados provêm evidências complementares para a participação dos depósitos de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à rianodina nas respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediadas pelos nAChRs (Figura 24B). A co-aplicação de 300 μM de ACh, 1 μM de atropina e 10 μM de rianodina às células diferenciadas resultou em uma maior inibição, 72 ± 2 % ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 249 ± 25 nM), do que àquela obtida na presença de ACh e atropina, 45 ± 5 % ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 489 ± 35 nM), quando comparada ao controle ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 887 ± 39 nM). Nenhuma inibição adicional foi observada quando 300 μM de ACh, 3 μM de mecamilamina e 10 μM de rianodina foram co-aplicadas às células neuronais ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = 440 ± 13 nM), em comparação às respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pela



**Figura 23: Efeito dos antagonistas dos receptores muscarínicos nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina ( $300 \mu M$ ) em células P19 diferenciadas em neurônios.** Curvas dose-reposta dos antagonistas (A) pirenzepina, (B) galamina e (C) 4-DAMP nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina (determinado como os valores percentuais das respostas máximas de  $[Ca^{2+}]_i$ ). O número de células estudadas em cada experimento estava entre 37 e 48.

ACh na presença de 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 474 \pm 27 \text{ nM}$ ). Estes dados indicaram que os fluxos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pelos nAChR envolviam CICR, mediado pelos receptores de rianodina. Em contraste, CICR mediada pelos receptores de rianodina não participaram nos aumentos da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida pelos mAChRs (Figura 24B). O efeito inibitório causado pela rianodina foi reversível após excessiva lavagem das células. Os valores máximos nas respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela aplicação de 300  $\mu\text{M}$  de ACh na presença ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 465 \pm 41 \text{ nM}$ ) ou ausência ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 878 \pm 45 \text{ nM}$ ) de atropina e na presença ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 467 \pm 21 \text{ nM}$ ) ou ausência de mecamilamina ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 894 \pm 39 \text{ nM}$ ) foram recuperados na ausência de rianodina (dados não mostrados).

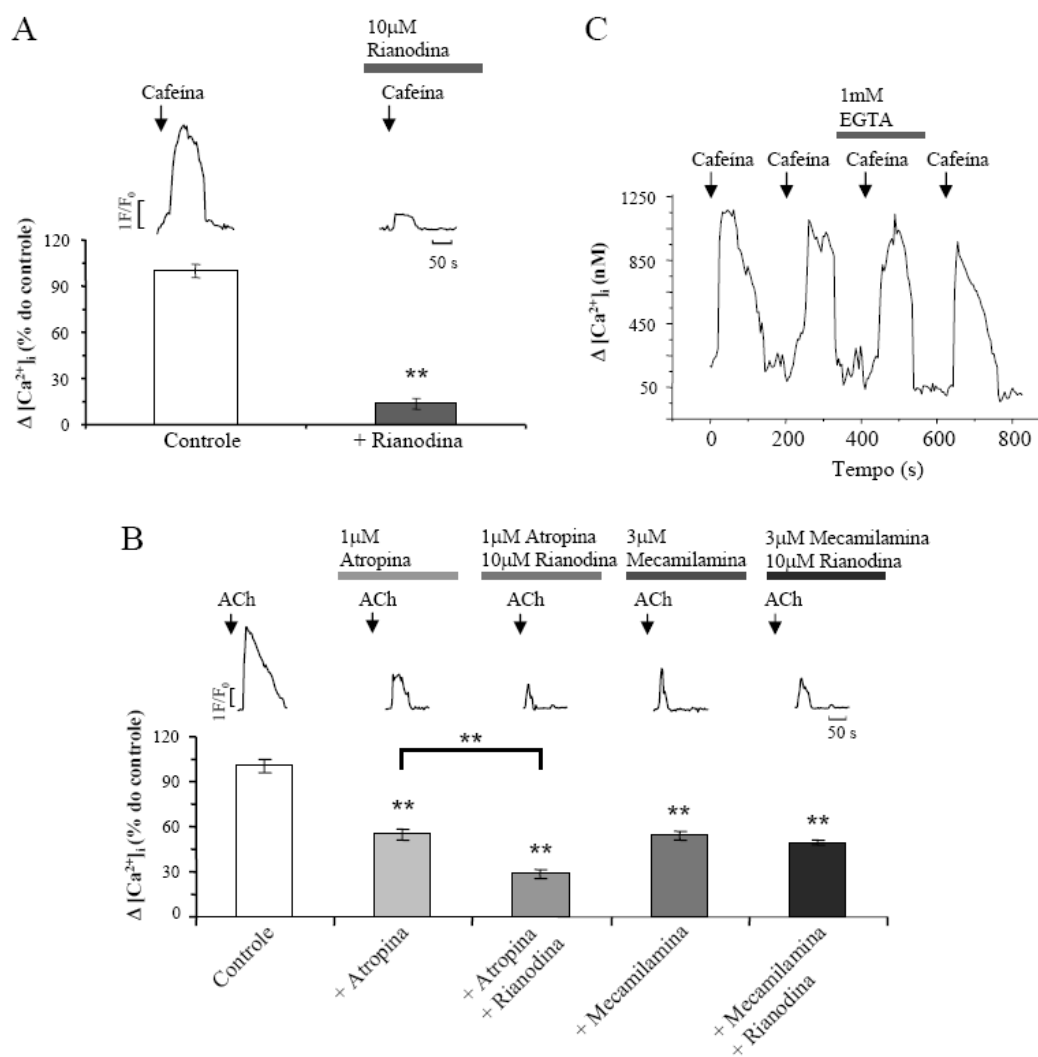
Após a pré-incubação dos neurônios durante 12 min com 10  $\mu\text{M}$  de CPA, um inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático e sarcoplasmático que depleta os depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à rianodina e  $\text{IP}_3$  (Beck et al., 2004; Dayanithi et al., 2006), os fluxos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pelos nAChRs foram monitorados após a aplicação de 100  $\mu\text{M}$  de nicotina. O pré-tratamento dos neurônios com CPA causou um decréscimo dos fluxos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pela nicotina de uma maneira que foi tempo-dependente após o tempo de 13,8 minutos ( $50 \pm 2 \%$ ), o que não foi observado nas células neuronais controles não tratadas (Figura 25A). O decréscimo contínuo nas amplitudes das respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina, indicou uma lenta depleção dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  devido à sua liberação repetida, como uma consequência da ativação dos receptores nAChR. A tabela VIII apresenta os valores da  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  relativas induzidas pela nicotina em vários momentos, na ausência ou presença da pré-incubação com CPA.

**Tabela VIII:** Variações nas respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina após a pré-incubação das culturas celulares com CPA.

Tempo (min)	$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)		$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ relativa	
	Controle	CPA (10 $\mu\text{M}$ )	Controle	CPA (10 $\mu\text{M}$ )
0	467 $\pm$ 15	466 $\pm$ 16	1,00 $\pm$ 0,032	1,00 $\pm$ 0,034
7,5	498 $\pm$ 15	503 $\pm$ 21	1,06 $\pm$ 0,033	1,08 $\pm$ 0,044
10,5	457 $\pm$ 14	403 $\pm$ 24	0,98 $\pm$ 0,029	0,86 $\pm$ 0,051
13,8	450 $\pm$ 13	338 $\pm$ 24	0,96 $\pm$ 0,028	0,72 $\pm$ 0,050
16,8	440 $\pm$ 15	311 $\pm$ 18	0,94 $\pm$ 0,033	0,66 $\pm$ 0,038
19,5	410 $\pm$ 25	234 $\pm$ 11	0,88 $\pm$ 0,054	0,50 $\pm$ 0,023

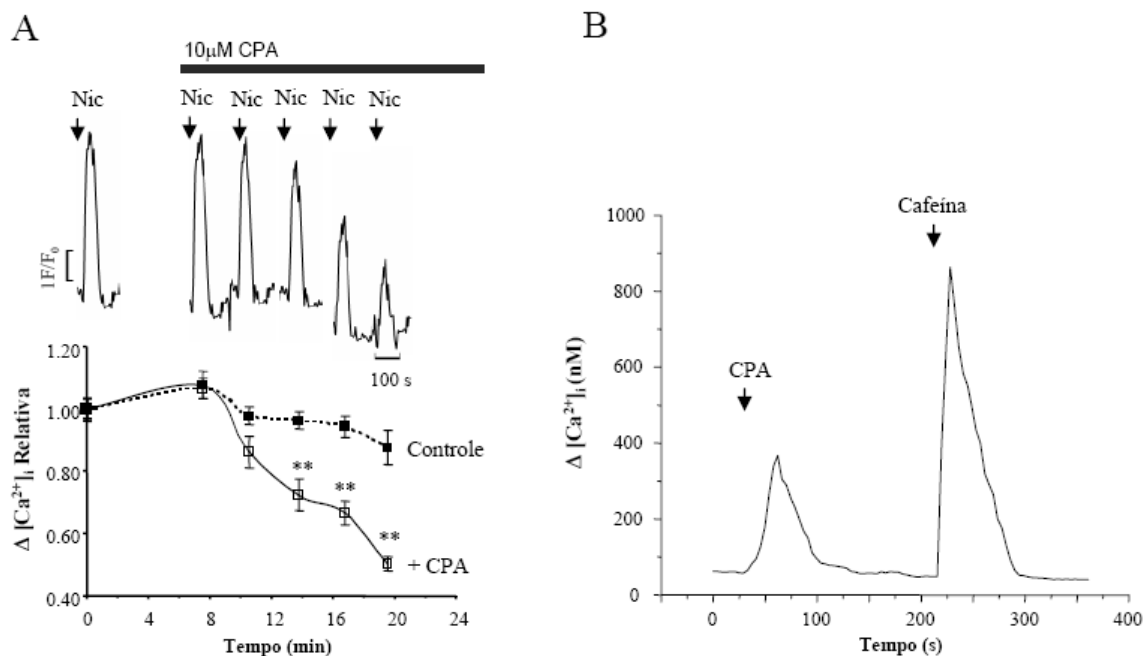
$\Delta F$  = variação da fluorescência.

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$  relativa = variação relativa das respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela nicotinas.



**Figura 24: Dependência da ativação dos receptores nicotínicos nos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina em neurônios P19.** Painel superior: (A) Alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  em neurônios P19 do dia 8 da diferenciação após a aplicação de 10 mM de cafeína (durante 60 segundos de aplicação) com ou sem a preincubação das células durante 30 min com 10  $\mu$ M de rianodina. (B) Traçados representativos das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  após a aplicação de 300  $\mu$ M de ACh na ausência ou presença de 1  $\mu$ M de atropina, ou após a co-aplicação de 300  $\mu$ M ACh com 1  $\mu$ M de atropina ou 3  $\mu$ M de mecamilamina após a pré-incubação das células durante 30 min com 10  $\mu$ M de rianodina. Painéis inferiores: Os valores percentuais médios  $\pm$  E.P.M. representam os valores nas elevações da  $[Ca^{2+}]_i$  obtidas na presença de inibidores. Os dados mostrados foram obtidos de 4 (A) e 8 (B) experimentos independentes, respectivamente. Um número de 28-64 células foi usado em cada experimento. (C) Resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pela cafeína em células diferenciadas em neurônios. As células neuronais foram estimuladas com cafeína (10 mM) na presença ou ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular (EGTA 1 mM). Os traçados típicos na  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  foram de quatro experimentos diferentes. Um número de 32-41 células foi usado em cada experimento. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.





**Figura 25: A ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina em neurônios P19 resulta na liberação de  $Ca^{2+}$  a partir dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ .** (A) Os traçados apresentam a inibição, tempo-dependente, por 10  $\mu$ M de ácido ciclopiazônico (CPA), nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por sucessivas aplicações de nicotina (100  $\mu$ M, Nic), registradas durante 14 min (painel superior). Os dados obtidos na presença de CPA foram comparados às respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por aplicações sucessivas de nicotina sem a adição do CPA nestas células. Painel inferior: As alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina na presença de CPA foram normalizadas para àquelas obtidas em experimentos controles no momento inicial. Para cada momento de estimulação com a nicotina na presença de CPA ( $n = 6$ ) (quadrados brancos), medidas controles ( $n = 6$ ) foram realizadas na ausência do CPA (quadrados pretos). Com exceção do primeiro e do segundo ponto de aplicação da nicotina, obtidos nos momentos de 8 min e 10,5 min de pré-incubação das células com CPA, todos os pontos seguintes foram demonstrados inibirem significativamente as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina na presença de CPA ( $p < 0,001$ , teste  $t$  de Student). Os dados apresentados são os valores médios  $\pm$  E.P.M.; \*\*  $p < 0,001$  comparado com os valores controles. (B) Amplitudes das respostas  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pelo CPA e pela cafeína em células neuronais. As células neuronais foram estimuladas sequencialmente com CPA (10  $\mu$ M) e cafeína (10 mM). Os traçados apresentados da  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  são representativos de 5 experimentos independentes. Um número de 40-45 células foi usado para as análises experimentais.

A aplicação de 10 mM de cafeína na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular resultou em uma pequena redução da fluorescência relativa emitida pelo Fluo-3, utilizado como um indicador sensível ao cálcio, nas células neuronais. Estas células, em adição à aparente queda na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , responderam à cafeína com um aumento transiente na fluorescência do Fluo-3 (Figura 24C).

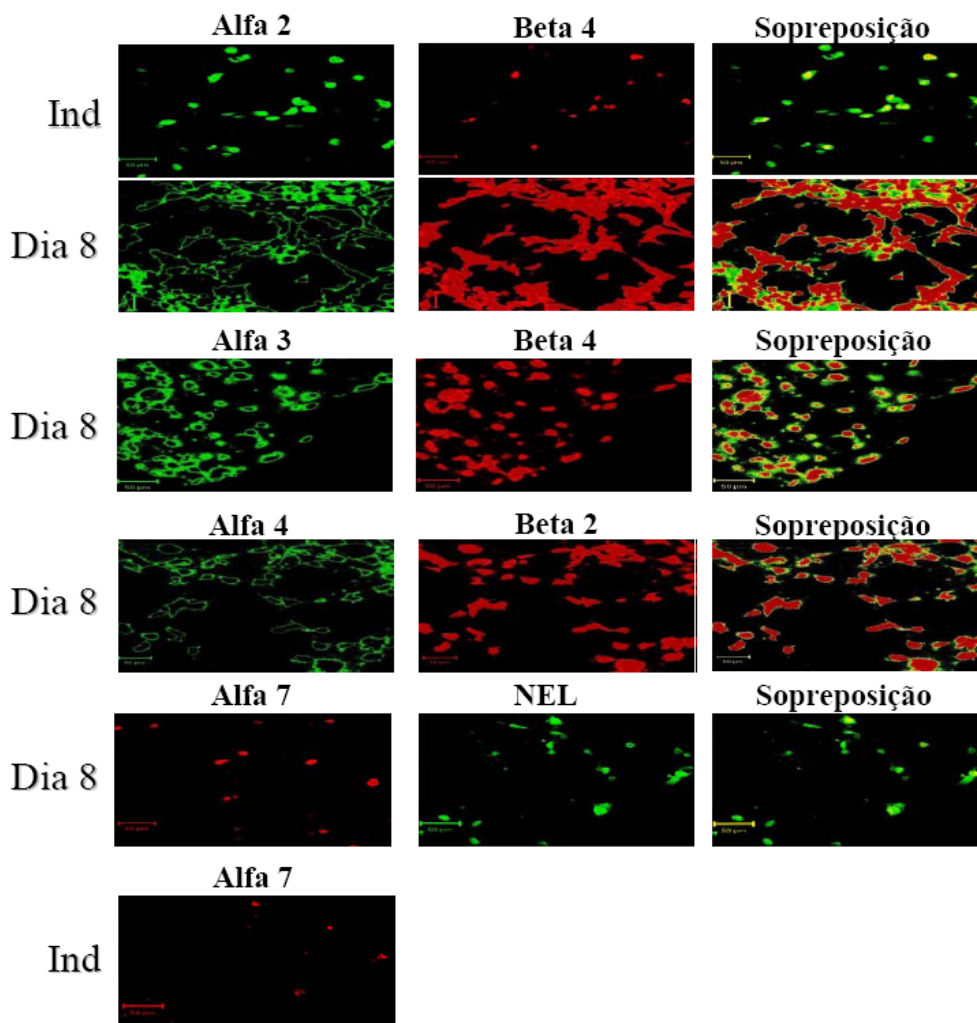
A ativação dos receptores  $\text{IP}_3$  em neurônios leva à mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dayanithi et al., 2006). A resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida por 10  $\mu\text{M}$  de CPA, durante 60 segundos de aplicação em células diferenciadas em neurônios, foi determinada para avaliar o envolvimento dos depósitos internos, sensíveis ao  $\text{IP}_3$ , na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . A aplicação de CPA promoveu uma elevação transiente na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $298 \pm 32$  nM ( $n = 41$ ) (Figura 25B). A aplicação de CPA, por duas ou mais vezes, não revelou quaisquer mudanças significativas nas induções das elevações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , quando as células foram lavadas por, no mínimo, 10 min entre as aplicações de CPA.

Em resumo, a CICR via depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à rianodina, assim como, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do meio extracelular, contribuíram para as elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela ACh em células P19 diferenciadas em neurônios.

### ***5.1.3. Caracterização dos subtipos de receptores nicotínicos expressos em uma célula***

#### **5.1.3.1. Identificação dos subtipos de nAChRs e marcadores fenotípicos de células progenitoras e neuronais durante a diferenciação neuronal das células P19**

Como muitas células P19, embriônicas e diferenciadas, induziram respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pelos nAChRs, caracterizamos por imunomarcção a presença e a identidade dos possíveis subtipos de nAChRs durante o processo de diferenciação. A figura 26 mostra que os subtipos  $\alpha_2$  e  $\beta_4$  estavam co-localizados em células embriônicas, e que o subtipo  $\alpha_7$  também estava presente neste estágio do desenvolvimento. Em células do dia 6 da diferenciação neuronal demonstramos que as subunidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_7$ , respectivamente, foram co-localizadas com nestina (dados não mostrados). As células do oitavo dia da diferenciação foram duplamente imunomarcadas para as subunidades  $\alpha_2$  e  $\beta_4$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_4$ ,  $\alpha_4$  e  $\beta_2$ , e  $\alpha_7$  nAChRs, possibilitando a formação de seus respectivos subtipos de receptores. A porcentagem de células indiferenciadas imunomarcadas para a subunidade  $\alpha_3$  nAChR foi de 5 % ( $n = 203$ ), este número aumentando para 91 % no oitavo dia da diferenciação ( $n = 251$ ). Para a subunidade  $\alpha_2$ , aproximadamente 30 % das células embriônicas ( $n = 121$ ) foram imunomarcadas, sendo



**Figura 26: Identificação dos subtipos de nAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19 por imunofluorescência.** Após fixação, as células foram incubadas com o anticorpo primário subunidade-específico seguido da adição de um anticorpo secundário marcado com fluoresceína ou rodamina. A expressão da subunidade de receptor nicotínico de acetilcolina foi verificada em células indiferenciadas (Ind) e do oitavo dia (Dia 8) após a indução da diferenciação. Enolase neurônio-específica (NEL) é um marcador para neurônio maduro.

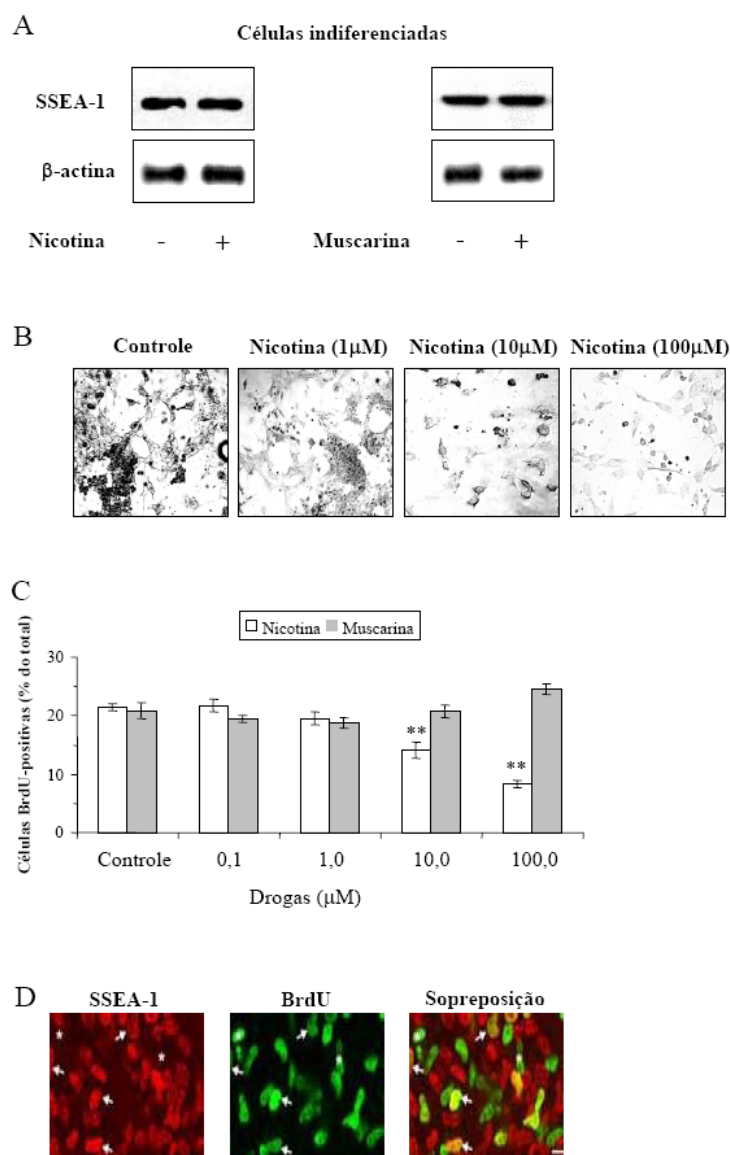
que esta proporção foi aumentada para 89 % em células neuronais ( $n = 110$ ). Nós ainda fizemos imunomarcações para as subunidades  $\alpha_4$  e  $\alpha_7$ . De um total de 113 células embriônicas contadas, 37 % expressaram o subtipo  $\alpha_4$ , enquanto 82 % de 137 células neuronais testadas expressaram para este subtipo. O subtipo  $\alpha_7$  estava presente em, aproximadamente, 97 % de um total de 139 células indiferenciadas, este número reduzindo para 68 % de 118 células neuronais avaliadas. Embora o número total de células imunomarcadas para  $\alpha_7$  no dia 8 da diferenciação tenha sido menor do que em indiferenciadas, a intensidade da imunofluorescência das células neuronais foi maior do que em células embriônicas. As subunidades  $\beta_2$  e  $\beta_4$  foram expressas em 2 % e 10 % de um número total de 108 e 98 células indiferenciadas, respectivamente. Estas porcentagens de células imunomarcadas aumentaram para 95 % ( $n = 114$ ) e 87 % ( $n = 102$ ) para  $\beta_2$  e  $\beta_4$ , respectivamente, no final da diferenciação neuronal.

#### ***5.1.4. Caracterização do papel receptores colinérgicos na proliferação e diferenciação celular***

##### **5.1.4.1. Participação dos receptores colinérgicos na proliferação celular**

A expressão do SSEA-1, um marcador de células embriônicas, e a incorporação de BrdU no DNA das células foram usados para avaliar os efeitos proliferativos causados pelos AChRs no estágio de desenvolvimento embriônico das células P19. Estas células foram testadas na presença e na ausência de agonistas dos AChRs: nicotina, a qual é um agonista para os nAChRs; e muscarina, que é ativa sobre os mAChRs (Caulfield et al., 1998). Os níveis de expressão protéica do SSEA-1 não apresentaram diferença significativa entre as células tratadas e não tratadas com os agonistas colinérgicos (Figura 27A). Por volta de 94 % e 93 % das células embriônicas na presença de 100  $\mu\text{M}$  de nicotina e 100  $\mu\text{M}$  de muscarina, respectivamente, expressaram o marcador SSEA-1, o que não foi diferente dos experimentos controles (92 %). Estes resultados demonstraram que as células embriônicas P19 permaneciam no estágio de indiferenciadas na presença dos agonistas colinérgicos.

Usamos uma larga faixa de concentrações (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) de agonistas colinérgicos por um período de 8 hr para avaliar seus efeitos proliferativos em células embriônicas. A porcentagem destas células que foram positivas para BrdU foi determinada na presença de nicotina (100  $\mu\text{M}$ , 8 %  $\pm$  1 do total de células, Figura 27B) e muscarina (100  $\mu\text{M}$ , 25 %  $\pm$  1 do total de células, Figura 27C). Estes dados indicaram que a muscarina não tem efeitos



**Figura 27. Efeitos proliferativos induzidos por agonistas dos receptores colinérgicos foram avaliados pela incorporação de BrdU pelas células P19 embriônicas.** (A) As células indiferenciadas foram incubadas na presença de nicotina (100 μM) ou muscarina (100 μM) sob condições de cultivo sem soro. Foram realizados experimentos de Western-blots, a partir de extratos de membrana de células tratadas com nicotina, muscarina e não-tratadas (controle), para marcador de células embriônicas (SSEA-1) (B) As células embriônicas foram incubadas com várias concentrações de nicotina (1-100 μM) durante 8 h. (C) Células BrdU-positivas em resposta às diferentes concentrações de nicotina e muscarina (0-100 μM) durante 8 h. O número porcentual médio ± E.P.M. de células BrdU-positivas para cada campo de visão (800 μm<sup>2</sup>) foi determinado. Ao menos, 10 campos de visão por lamina foram contados. (D) As células indiferenciadas foram incubadas com nicotina (100 μM) durante 8 h e duplamente imunomarcadas com anticorpos para NEL (enolase neurônio-específica) e BrdU. As barras de escala representam 20 μM. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles.

proliferativos, mesmo em concentrações de 100  $\mu\text{M}$ , e que a nicotina reduziu em quase 60 % a síntese de DNA em células indiferenciadas. Para avaliar se esta inibição da proliferação mediada pelos nAChRs em células embriônicas era factível, dupla marcações para a expressão de SSEA-1 e a incorporação de BrdU foram realizadas. Mais de 94 % das células embriônicas foram imunomarcadas para o SSEA-1. Assim, os nAChRs inibiram a proliferação das células P19 indiferenciadas, e nenhum efeito em células espontaneamente diferenciadas (Figura 27D).

#### **5.1.4.2. Envolvimento das fontes intra e extracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ na proliferação de células P19 embriônicas**

Estudamos a inibição mediada pelos nAChRs na proliferação celular avaliando quais fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  eram mobilizadas e suas funções na proliferação. Usamos EGTA (um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, 1 mM) ou BAPTA-AM (um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, 10  $\mu\text{M}$ ) sozinhos ou na presença de 100  $\mu\text{M}$  de nicotina (Figura 28). EGTA sozinho (17,3 %  $\pm$  2,7 do total de células) e na presença de nicotina (20,0 %  $\pm$  1,3 do total de células) inibiram a incorporação de BrdU aos níveis comparados às condições controles (22,5 %  $\pm$  2,6 do total de células). BAPTA-AM sozinho (12,7 %  $\pm$  0,7 do total de células) bloqueou a incorporação de BrdU, mais do os níveis controles (20,7 %  $\pm$  2,2 do total de células) (Figura 28). Além do mais, a nicotina na presença de BAPTA-AM teve um aumento significativo na inibição da proliferação celular (5,9 %  $\pm$  0,9 do total de células). Para verificar se a ativação dos nAChRs seria responsável pela inibição da proliferação, tratamos as células com 3  $\mu\text{M}$  de mecamilamina (MLA) sozinha e na presença de 100  $\mu\text{M}$  de nicotina. Nenhuma inibição adicional foi observada em ambos os tratamentos, MLA sozinho (22,0 %  $\pm$  0,9 do total de células) e MLA na presença de nicotina (22,5 %  $\pm$  1,5 do total de células), comparados aos níveis controles (20,6 %  $\pm$  1,3 do total de células) (Figura 28). Como demonstrado anteriormente (vide seção 5.1.2.2. **Fontes extra e intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizados pela ativação dos mAChRs e nAChRs em células P19 embriônicas e neuronais**), as respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]$  mediadas pelos nAChRs ocorrem via depósitos extracelulares em células embriônicas. Deste modo, concluímos que o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular seria o responsável pela inibição da proliferação mediada pelos nAChRs em células embriônicas e, outras vias de sinalização que não as mediadas por estes receptores, envolveriam os depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$  na função proliferativa.

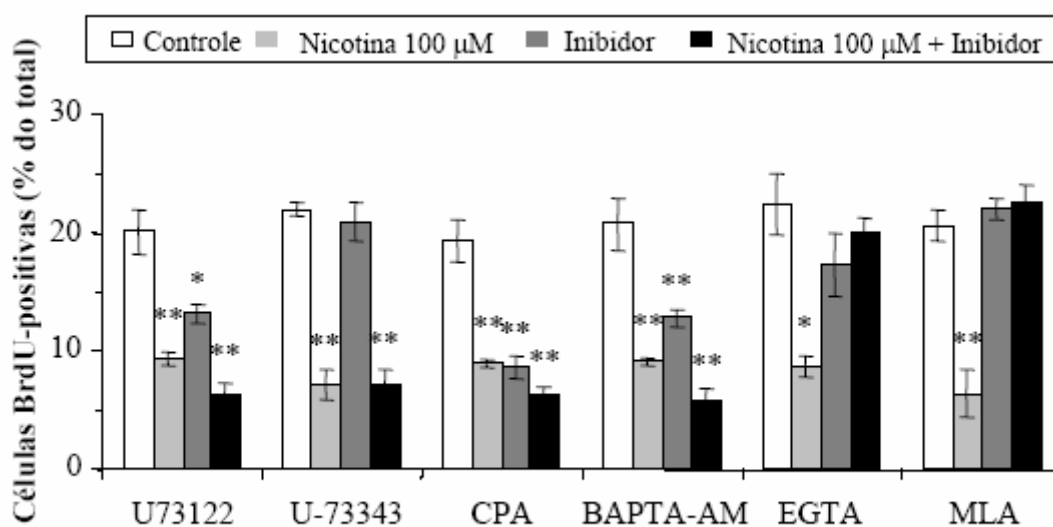
#### 5.1.4.3. Envolvimento da PLC e dos depósitos internos de $\text{Ca}^{2+}$ na proliferação de células P19 embrionárias

Para confirmar que os depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  estavam envolvidos na inibição da proliferação celular, usamos U-73122 (um inibidor da PLC, 5  $\mu\text{M}$ ), e CPA (um inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático, 10  $\mu\text{M}$ ). Ambos os inibidores sozinhos apresentaram uma redução na incorporação de BrdU pelas células embrionárias, respectivamente 13,1 %  $\pm$  0,8 e 8,6 %  $\pm$  1,0 ( $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ) comparada aos valores de seus próprios controles (20,0 %  $\pm$  1,9 para U-73122 e 19,3 %  $\pm$  1,7 para CPA) (Figura 28). Uma redução adicional significativa na proliferação celular foi observada quando U-73122 era co-aplicado com a nicotina (100  $\mu\text{M}$ , 6,3 %  $\pm$  1,0,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ). O análogo estrutural do U-73122 que não apresenta efeitos biológicos, U-73343, foi usado como controle e nenhum efeito de inibição da proliferação foi observado, confirmando o envolvimento da PLC e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de seus depósitos internos na via de sinalização, independentes dos nAChRs.

#### 5.1.4.4. Receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e suas funções específicas na proliferação de células progenitoras neuronais

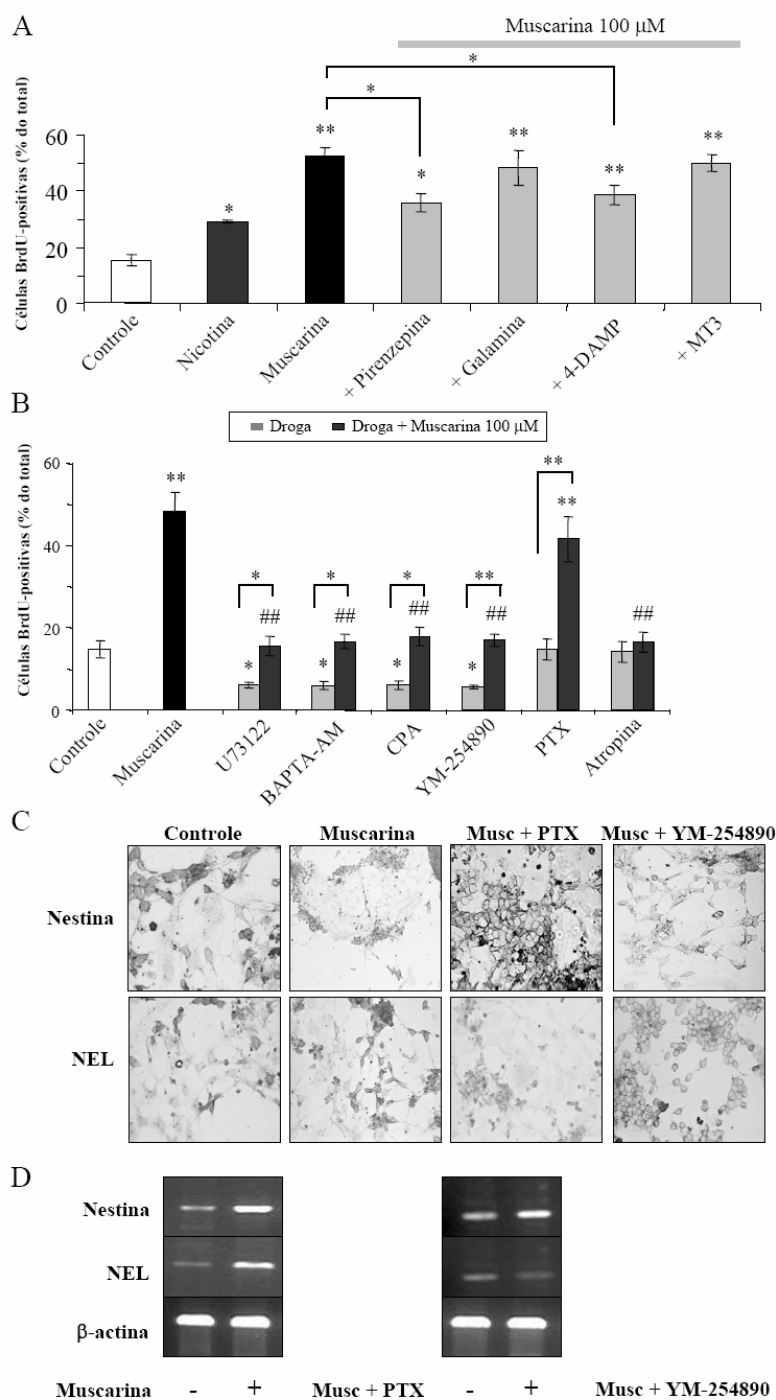
As células P19, durante a diferenciação neuronal, apresentam diferentes fenótipos de acordo com o estágio de maturação alcançado *in vitro*. Como demonstrado anteriormente (vide seção 4.1.1. **Caracterização da diferenciação neuronal nas células P19**), o dia 4, após a indução da diferenciação, é o dia em que houve o maior número de células imunomarcadas para o antígeno de progenitora neural. E que, a partir deste dia, houve uma regulação negativa na expressão do mesmo antígeno e um aumento na expressão do marcador de célula neuronal diferenciada, NEL. Sendo assim, tratamos as células P19 do quarto dia da diferenciação com nicotina (100  $\mu\text{M}$ ) e muscarina (100  $\mu\text{M}$ ). A figura 29A mostra que as células do dia 4 tratadas com nicotina ou muscarina por um período de 48 horas aumentou, aproximadamente, em 2 (29,4 %  $\pm$  0,5 do total de células) e 3,5 vezes (52,5 %  $\pm$  2,9 do total de células) sua proliferação, respectivamente, comparado aos valores controles (14,9 %  $\pm$  2,1 do total de células). Para se determinar qual subtipo de mAChR mediava o efeito da acetilcolina no aumento da proliferação celular, as células progenitoras neuronais do dia 4 foram tratadas com muscarina (100  $\mu\text{M}$ ) na presença de inibidores específicos dos subtipos de mAChRs: Pirenzepina (0,1  $\mu\text{M}$ ), galamina (10  $\mu\text{M}$ ), 4-DAMP (0,1  $\mu\text{M}$ ) e MT3 (1  $\mu\text{M}$ ), que nestas concentrações são antagonistas específicos para os

subtipos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub>.



**Figura 28: Efeitos da nicotina e seus bloqueadores da sinalização de cálcio na proliferação de células P19 embriônicas.** As células foram pré-tratadas com 100 µM de nicotina ou com cada um dos respectivos inibidores, U73122 (5 µM, inibidor da fosfolipase C $\beta$ ), U73144 (5 µM, análogo inativo da U73122), CPA (10 µM, ácido ciclopiazônico, inibidor da bomba de Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático), BAPTA-AM (10 µM, quelante de Ca<sup>2+</sup> intracelular), EGTA (1 mM, quelante de Ca<sup>2+</sup> extracelular), MLA (3 µM, mecamilamina, antagonista inespecífico dos nAChRs) ou, a combinação do tratamento de 100 µM de nicotina com cada um destes inibidores separadamente. Os inibidores foram adicionados 30 min antes do tratamento com nicotina e deixados durante 8 h de exposição com as células. Os valores são representados como médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes em duplicata. \*  $p < 0,05$  comparada aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada aos valores controles.





**Figura 29: Indução da proliferação e diferenciação neuronal pelos subtipos específicos de mAChRs.** (A) As células progenitoras neuronais do quarto dia da diferenciação foram pré-tratadas com 0,1  $\mu\text{M}$  de pirenzepina, 10  $\mu\text{M}$  de galamina, 0,1  $\mu\text{M}$  de 4-DAMP, ou 1  $\mu\text{M}$  de MT3, que são os inibidores específicos para os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_2$  e  $M_4$  dos mAChRs, respectivamente, durante 30 min antes do co-tratamento com muscarina (100  $\mu\text{M}$ , Musc), por um período de 48 h. As células também foram tratadas com nicotina (100  $\mu\text{M}$ ), ou muscarina (100  $\mu\text{M}$ ), como controles da indução da proliferação. Células sem tratamento foram usadas como controle. (B) As células do dia 4 da diferenciação foram pré-tratadas com U73122 (5  $\mu\text{M}$ , inibidor da fosfolipase  $C\beta$ ), CPA (10  $\mu\text{M}$ , ácido ciclopiazônico, inibidor da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático), BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$ ,

quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular), YM-254890 (1  $\mu\text{M}$ , inibidor da proteína  $G\alpha_{q/11}$ ), PTX (Toxina Pertussis, 100 ng/mL, inibidor da proteína  $G\alpha_{i/o}$ ) e atropina (1  $\mu\text{M}$ , inibidor inespecífico dos mAChRs) durante 30 min antes do co-tratamento com muscarina (100  $\mu\text{M}$ ), por um período de 48 h. Foram utilizadas células sem tratamento (controle) e células tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de muscarina (controle de indução da proliferação). Os valores são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparado aos valores controles. (C) As células do dia 4 da diferenciação foram incubadas com muscarina (100  $\mu\text{M}$ ) sozinha e muscarina (100  $\mu\text{M}$ ) na presença de YM-254890 (1  $\mu\text{M}$ ), ou de PTX (100 ng/mL) durante 48 h e imunomarcadas com nestina (marcador de progenitor neuronal) e enolase neurônio-específico (NEL, marcador de neurônio maduro). Cada exemplo apresentado é representativo de 3 experimentos independentes. (C) As células do quarto dia da diferenciação foram incubadas com muscarina (100  $\mu\text{M}$ ) sozinha e muscarina (100  $\mu\text{M}$ ) na presença de YM-254890 (1  $\mu\text{M}$ ), ou de PTX (100 ng/mL) durante 48 h e então, nestina, NEL e  $\beta$ -actina foram detectadas por ensaios de RT-PCR, como descrito na seção Métodos. +, células tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de muscarina. -, células controles (não tratadas). Cada exemplo apresentado é representativo de 3 experimentos independentes.

Como demonstrado na figura 29A, pirenzepina e 4-DAMP inibiram significativamente os aumentos na incorporação de BrdU induzidas por 100  $\mu\text{M}$  de muscarina, respectivamente 35,9 %  $\pm$  3,0 e 38,6 %  $\pm$  3,4, comparada à muscarina sozinha (52,5 %  $\pm$  2,9 do total de células,  $p = 0,05$ ,  $n = 3$ ). Em contrário, nem a galamina (48,6 %  $\pm$  6,2 do total de células) e nem a MT3 (49,9 %  $\pm$  3,0 do total de células) inibiram significativamente a proliferação de células progenitoras induzida pela muscarina.

#### 5.1.4.5. A participação dos mAChRs e na diferenciação neuronal das células P19

Após ativação, os receptores muscarínicos acoplam-se às proteínas heterotriméricas ligantes do nucleotídeo guanina (proteínas G), regulando a atividade de mensageiros secundários e canais iônicos (para revisão veja Lanzafame et al., 2003). Estes efetores celulares dependem da ativação da subunidade  $G\alpha$ . Os receptores muscarínicos,  $M_2$  e  $M_4$ , acoplam-se preferencialmente à proteína  $G\alpha_{i/o}$ , e os subtipos muscarínicos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  à proteína  $G\alpha_{q/11}$ . Em alguns casos, as subunidades  $G\beta\gamma$  desempenham um papel na sinalização celular, pelo fornecimento, por exemplo, de um mecanismo pelo qual o receptor  $M_2$  ativa a PLC- $\beta$  e modula a condutância iônica específica. Os receptores muscarínicos  $M_2$  e  $M_4$  inibem a elevada atividade da adenilato ciclase, assim como prolongando a abertura dos canais de potássio, canais catiônicos não seletivos e canais de receptores de potenciais transientes (*transient receptor potential channels*, TRP) (Ashkenazi et al., 1987; Peralta et al., 1988;

Ashkenazi et al., 1989). Os receptores muscarínicos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  mobilizam fosfoinosítídeos de membrana produzindo o  $IP_3$  e o DAG, pela ativação da PLC- $\beta$  específica para fosfoinosítídeo, aumentando assim, o cálcio intracelular. Os receptores muscarínicos foram demonstrados regularem uma extensa rede de sinalização intermediária. Assim, os membros da subfamília acoplada às proteínas,  $G\alpha_{i/o}$  e  $G\alpha_{q/11}$ , exercem efeitos citoesqueléticos através da ativação da GTPase pequena Rho (Bonner et al., 1988; Liao et al., 1989; Birdsall et al., 1989; Ashkenazi et al., 1987; Peralta et al., 1988; Ashkenazi et al., 1989) e, efetores seguintes da via de sinalização, são expandidos para incluírem quinases de fosfoinosítídeos-3, quinases de tirosina de moléculas não receptores e as proteínas quinases ativadas por mitógeno (*mitogen-activated protein (MAP) kinases*) (van Koppen e Kaiser, 2003). Estas últimas vias de sinalização desempenham um papel principal em funções autócrinas para os receptores muscarínicos, em termos de controle de crescimento e proliferação celular (veja abaixo).

Baseando-se nestes relatos tratamos as células em diferenciação do dia 4 com muscarina (100  $\mu$ M) ou muscarina (100  $\mu$ M) na presença de atropina (1  $\mu$ M), ou U-73122 (5  $\mu$ M), ou CPA (10  $\mu$ M), ou BAPTA-AM (10  $\mu$ M), ou YM-254890 (1  $\mu$ M, um inibidor específico para  $G\alpha_{q/11}$ ) e PTX (100 ng/mL, um inibidor para  $G\alpha_{i/o}$ ). A figura 29B apresenta que, estas células, têm seus níveis de proliferação reduzidos aos níveis controles quando tratadas com muscarina mais YM-254890 (17,0 %  $\pm$  1,5 do total de células) comparado aos experimentos controles (14,8 %  $\pm$  2,2 do total de células) e nenhuma redução na incorporação de BrdU, pelas células do dia 4, foi observada quando do tratamento destas com PTX mais muscarina (41,6 %  $\pm$  5,5 do total de células). Isto indicou que os mAChRs acoplados à  $G\alpha_{q/11}$  mediarão a proliferação celular, enquanto os mAChRs acoplados à  $G\alpha_{i/o}$  não participaram deste processo.

Para confirmar que os receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  mediavam a proliferação celular, também tratamos as células com inibidores da via de ativação da PLC. A proliferação celular foi reduzida aos níveis controles quando se tratou as células com muscarina mais os respectivos inibidores, CPA (18,0 %  $\pm$  2,3 do total de células), BAPTA-AM (16,7 %  $\pm$  1,7 do total de células), e U-73122 (15,7 %  $\pm$  2,3 do total de células). Estes inibidores sozinhos apresentaram uma redução significativa na proliferação celular, além dos níveis controles, respectivamente, CPA (7,1 %  $\pm$  0,7 do total de células), BAPTA-AM (7,0 %  $\pm$  0,7 do total de

células), e U-73122 (7,1 %  $\pm$  0,5 do total de células) (Figura 29B). Também realizamos o tratamento destas células com o antagonista dos mAChRs, atropina (1  $\mu$ M). Esta droga, sozinha e na presença de muscarina, não apresentou nenhuma diferença nos níveis de incorporação de BrdU dos níveis controles, respectivamente 14,2 %  $\pm$  2,5 e 16,5 %  $\pm$  2,4.

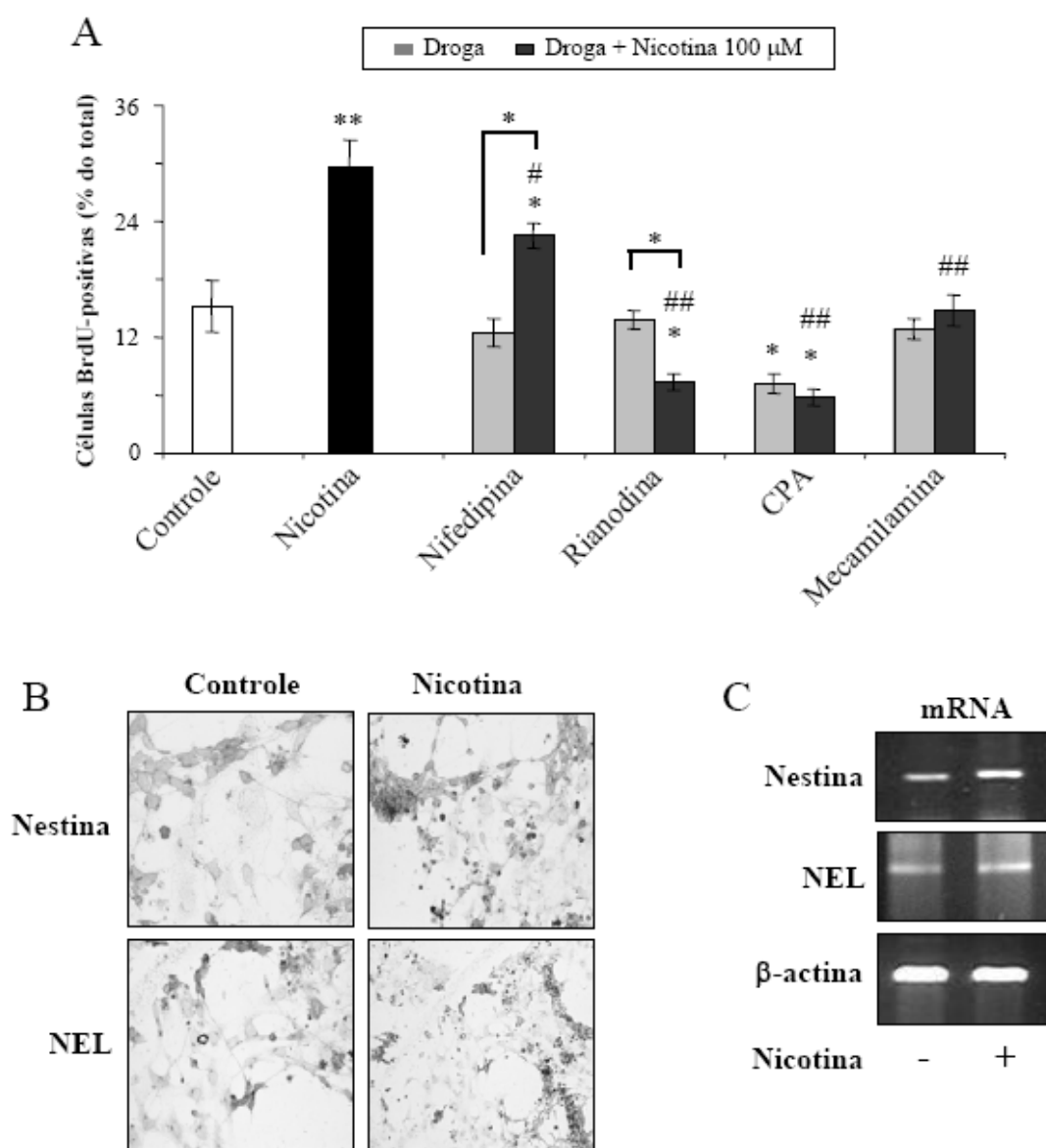
Para avaliar qual subgrupo de mAChR acoplado à proteína G mediou o aumento na proliferação e/ou na diferenciação neuronal, conduzimos experimentos de imunomarcaç o usando anticorpos contra nestina e NEL. As c elulas do quarto dia da diferencia o foram incubadas durante 48 horas na presen a de 100  $\mu$ M de muscarina ou de 100  $\mu$ M de muscarina mais 1  $\mu$ M de YM-254890, ou muscarina (100  $\mu$ M) mais 100 ng/mL de PTX. Para cada tratamento foram analisados os n meros de c elulas positivas para nestina e NEL. A muscarina sozinha promoveu um aumento significativo no n mero de ambas as c elulas, nestina (63 %  $\pm$  3,5 do total de c elulas,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) e NEL-positivas (73 %  $\pm$  3,5 do total de c elulas,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ). Da mesma maneira, os mAChRs acoplados   prote na  $G\alpha_{q/11}$  tratados com seu inibidor, YM-254890, apresentou um decr scimo (23 %  $\pm$  2,3 do total de c elulas, comparado ao controle, 33 %  $\pm$  2,3 do total de c elulas,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) e um aumento (81 %  $\pm$  3,5 do total de c elulas, comparado ao controle, 58 %  $\pm$  4,6 do total de c elulas,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) no n mero de c elulas positivas para nestina e NEL, respectivamente (Figura 29C). Entretanto, quando os mAChRs acoplados    $G\alpha_{i/o}$  foram inibidos pela PTX observamos uma redu o no n mero de c elulas positivas para NEL (43 %  $\pm$  2,9,  $n = 3$ ) e um aumento no n mero de c elulas positivas para nestina (53 %  $\pm$  2,9,  $n = 3$ ) (Figura 29C). Deste modo, estes dados demonstraram que a atividade dos receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  poderia aumentar a prolifera o das c elulas P19 em diferencia o, mas n o tendo nenhum efeito na modula o da diferencia o neuronal. Em oposto, os receptores  $M_2$  e  $M_4$  poderiam levar ao aumento na diferencia o destas c elulas, n o participando nos efeitos de prolifera o. Tamb m verificamos que os n veis de express o do mRNA de nestina e NEL das c elulas controles e tratadas com YM-254890 ou PTX (Figura 29D), apresentaram resultados similares aos dos experimentos de imunomarca o, confirmando assim, nossos resultados.

#### 5.1.4.6. nAChRs e diferencia o neuronal das c elulas P19

As respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pela nAChR em c elulas embri nicas   devida ao influxo de  ons  $Ca^{2+}$  via fontes extracelulares. Durante o desenvolvimento neuronal, as repostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina apresentaram uma participa o dos dep sitos de

Ca<sup>2+</sup> sensíveis à rianodina (vide seção 5.1.2.3. **A ativação dos nAChRs mobilizam Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular e da liberação do Ca<sup>2+</sup> de seus depósitos intracelulares**). Com o objetivo de verificar se os efeitos proliferativos destes receptores, na diferenciação neuronal, foram mediados pela mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos depósitos intracelulares, estudamos os efeitos do bloqueador de VOOC, nifedipina (5 µM), e o regulador dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelulares ligados aos receptores de rianodina (CICR), rianodina (10 µM). A taxa de proliferação celular na presença de nicotina (100 µM) foi de 28,8 % ± 1,5. A nifedipina inibiu significativamente os efeitos proliferativos induzidos pela nicotina (22,5 % ± 1,3,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ), porém, estes efeitos foram ainda, aproximadamente, 40 % além dos níveis controles (15,2 % ± 2,7). Em contrário, a rianodina (10 µM) na presença de nicotina (100 µM) reduziu significativamente a taxa de proliferação além dos mesmos níveis (7,4 % ± 0,8,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). A nifedipina e a rianodina sozinhas não reduziram significativamente a taxa de proliferação abaixo dos níveis controles, respectivamente 12,5 % ± 1,5 e 13,8 % ± 1,0 ( $n = 3$ ) (Figura 30A). Realizamos também, tratamentos com CPA (10 µM), para confirmarmos a participação dos depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> nos efeitos de proliferação dos nAChRs, e com MLA (3 µM), como um controle de inibição dos efeitos da nicotina. Como esperado, CPA sozinho (7,2 % ± 1,1,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) e na presença de nicotina (5,7 % ± 0,9,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) levou a uma inibição na proliferação maior do que em condições experimentais controles (15,2 % ± 2,7) (Figura 30A). O tratamento com MLA reduziu, aos níveis controles, a taxa proliferativa induzida pela nicotina (12,9 % ± 1,1,  $n = 3$ ) e quando usada sozinha (14,8 % ± 1,6,  $n = 3$ ).

Conduzimos experimentos fazendo imunomarcações com anticorpos contra, nestina e NEL, para verificarmos se os nAChRs aumentaram também a diferenciação neuronal, como fizeram com os efeitos de proliferação. Assim como foram feitos os experimentos para caracterizar os efeitos proliferativos e de diferenciação dos mAChRs, as células do quarto dia da diferenciação foram incubadas com e sem nicotina (100 µM). Em seguida, contamos os números de células marcadas com os anticorpos contra nestina e NEL. Os nAChRs levaram a um aumento (41 % ± 2,9 do total de células, comparada aos controles, 31 % ± 2,3 do total de células,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) e nenhum aumento significativo (61 % ± 4,0 do total de células, comparada aos controles, 55 % ± 4,6 do total de células,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ) nos números de



**Figura 30: Vias de sinalização na indução da proliferação de células progenitoras neuronais pela nicotina.** (A) As células progenitoras neuronais do quarto dia diferenciação foram pré-tratadas com de 5 µM de nifedipina (bloqueados dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L) , ou 10 µM de rianodina (nesta concentração é um inibidor dos receptores de rianodina), ou 10 µM de CPA (ácido ciclopiazônico, inibidor da bomba de Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático), ou 3 µM de MLA (mecamilamina, inibidor inespecífico dos nAChRs), durante 48 h, na ausência e na presença de 100 µM de nicotina. Os valores são representados como médias ± E.P.M. de 3 experimentos independentes em duplicata. \*  $p < 0,05$  comparada aos valores controles, \*\*  $p < 0,001$  comparada aos valores controles. As células do quarto dia da diferenciação, tratadas com nicotina (100 µM) e não tratadas (controle), deixadas durante 48 h em cultura, foram analisadas por ensaios de imunofluorescência para, nestina (marcador de progenitor neuronal) e NEL (marcador para neurônio maduro) (B) e por ensaios de RT-PCR, para nestina, NEL e β-actina (C), como descrito na seção Métodos. +, células tratadas com 100 µM de nicotina. -, células controles (não tratadas). Cada exemplo apresentado é representativo de 3 experimentos independentes.

células positivas para nestina e NEL, respectivamente (Figura 30B). Desta forma, a atividade dos nAChRs poderia ter somente o papel de aumentar a proliferação celular nas células P19 em diferenciação e nenhuma modulação na diferenciação neuronal. Também foram avaliados os níveis de expressão dos mRNAs de nestina e NEL das células controles e tratadas (Figura 30C). Em acordo com os dados da imunomarcção, a mesma proporção relativa dos níveis de mRNA foi obtida.

***DISCUSSÃO:  
RECEPTORES  
COLINÉRGICOS***



## 5.2. DISCUSSÃO

A presença das subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  e  $\beta_2$  dos nAChRs e dos subtipos  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  e  $M_5$  dos mAChRs já foram relatadas por Cauley et al. (1996) e Parnas et al. (1998), respectivamente. A expressão do subtipo  $M_3$  e a atividade dos receptores muscarínicos foram significativamente aumentadas nas células P19 diferenciadas em neurônios quando comparada às células indiferenciadas (Parnas et al., 1998). Entretanto, a expressão gênica dos nAChRs e sua funcionalidade em células P19 embriônicas, além da expressão gênica diferencial e da atividade dos diversos subtipos de receptores colinérgicos, não haviam sido, ainda, estudadas durante o curso da diferenciação neuronal desta linhagem celular.

Neste estudo, apresentamos evidências de que os receptores nicotínicos funcionais já estão presentes em células P19 embriônicas, assim como nos estágios de progenitora neural e durante a fase final da diferenciação neuronal. A expressão gênica e protéica das subunidades dos receptores nicotínicos, tais como  $\alpha_2$ - $\alpha_7$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_4$ , foram detectadas nestas células durante o processo de diferenciação, como evidenciado pelas análises da PCR em tempo real e imunocitoquímica. Em acordo com nossos achados, a expressão gênica dos nAChRs já foi detectada em tecidos e células embriônicas (Zoli et al., 1995). A transcrição dos mRNAs específicos das subunidades dos nAChRs também já foi relatada em córtex embriônico de roedores do décimo segundo dia embrionário (Zoli et al., 1995), e a atividade dos nAChRs foi observada em células embriônicas BLC6, que têm a habilidade de se diferenciarem em células com características de músculo esquelético (Rohwedel et al., 1994). A expressão de nAChRs funcionais em linhagem celulares, que são capazes de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos, levanta a questão sobre a função destes receptores em células embriônicas e progenitoras durante o desenvolvimento encefálico inicial.

### ***5.2.1. Vários subtipos de receptores nAChRs e mAChRs estão presentes em células P19 embriônicas e neuronais***

A expressão gênica das subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_4$  foi observada em células P19 indiferenciadas e foi regulada negativamente no estágio de progenitores, quando as células já estavam comprometidas com a diferenciação neuronal. A regulação positiva inicial da expressão gênica destas subunidades pode designar uma possível participação dos nAChRs em eventos iniciais da proliferação e no comprometimento da diferenciação neuronal. Demonstramos que a resposta principal dos receptores colinérgicos, pela sua

estimulação com ACh, em células indiferenciadas foi devida à ativação dos nAChR (Figura 20B), e dentre estes, a maior resposta devia-se ao subtipo homomérico  $\alpha_7$  (Figura 21C). De acordo com nossos dados obtidos durante a diferenciação *in vitro*, Atluri et al. (2001) relataram que nAChRs funcionais já estavam presentes em córtex cerebral de camundongo, em períodos tão recentes quanto o décimo dia embrionário do desenvolvimento, quando o córtex ainda consiste de células fontes e progenitoras. A colina, presente na membrana plasmática, poderia agir como um ativador endógeno da atividade dos nAChRs, levando-se em conta que ela possui alta afinidade pelos receptores homoméricos  $\alpha_7$ , os quais foram expressos em quase toda a população de células P19 indiferenciadas. Além do mais, a colina foi demonstrada disparar respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  em células cromafins (Fuentealba et al., 2004). Variações nas concentrações de colina demonstraram afetar o desenvolvimento pós-natal cerebral em ratos (Blusztajn et al., 1998).

### **5.2.2. Expressão dos subtipos de nAChRs durante a diferenciação neuronal das células P19**

Demonstramos que a expressão das subunidades  $\alpha_2$ - $\alpha_7$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_4$  dos nAChRs foram moduladas durante a diferenciação e que, todos os genes destas subunidades foram persistentemente expressos durante a determinação do fenótipo celular neuronal. A redução no percentual de células imunomarcadas para a subunidade  $\alpha_7$  durante a diferenciação poderia refletir uma regulação protéica negativa nas células em desenvolvimento ou a emergência de sub-populações negativas para esta subunidade. Por exemplo, como a população de células progenitoras decresceu e os diversos tipos neuronais prosseguiram na diferenciação, a nova progênie formada poderia não expressar algumas subunidades. As evidências imunocitoquímicas das subunidades dos nAChRs, embora consistentes com a identificação dos nAChRs, não revelaram, por elas mesmas, quando estas subunidades estão presentes na membrana plasmática ou dentro da célula. Além do mais, a expressão protéica por si só, também não indica quando estas subunidades irão formar receptores funcionais.

### **5.2.3. Expressão dos nAChRs e mAChRs funcionais durante a diferenciação neuronal de células P19**

Trezentos  $\mu$ M de ACh dispararam o aumento máximo na  $[Ca^{2+}]_i$  induzido pelos receptores colinérgicos em células indiferenciadas e diferenciadas, em acordo com o que foi encontrado por Atluri et al. (2001) e Marszalec et al. (2005), em culturas primárias de células

corticais de camundongos do décimo e décimo primeiro dia do desenvolvimento embrionário e em culturas primárias de células corticais de ratos, respectivamente. Também demonstramos que as elevações de  $[Ca^{2+}]_i$  mediados por estes receptores em neurônios P19 resultaram do influxo de  $Ca^{2+}$  a partir do meio extracelular e da mobilização do  $Ca^{2+}$  de seus depósitos intracelulares. Em células embrionárias, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ACh, resultaram principalmente da ativação dos nAChRs, como determinado pelas medidas da  $[Ca^{2+}]_i$  na presença de atropina e mecamilamina, que são inibidores específicos para os mAChRs e nAChRs, respectivamente.

Em células P19 diferenciadas em neurônios, as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ACh resultaram em, aproximadamente, iguais contribuições dos mAChRs e nAChRs. As elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ACh em células P19 neuronais alcançaram em torno de 1  $\mu$ M, enquanto às respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela ACh em células P19 embrionárias foi por volta de 100 nM. As amplitudes das variações na  $[Ca^{2+}]_i$  mais altas em células neuronais comparadas às células embrionárias após a estimulação com a aplicação de ACh, poderiam ser devido à uma fração mais alta de receptores ativos em células diferenciadas, assim como, à presença de canais de cálcio disparados por voltagem, que são ativados pela despolarização da membrana causada pelo fluxo de  $Ca^{2+}$  inicial induzido pela ACh, contribuindo assim, para a resposta dos receptores de acetilcolina (Trousard et al., 1993).

Os nAChRs neuronais, e particularmente o subtipo  $\alpha 7$ , exibem alta permeabilidade relativa aos íons  $Ca^{2+}$  (Seguela et al., 1993; McGehee e Role, 1995). Assim, a abertura dos canais de nAChR pode levar à um aumento direto na concentração citoplasmática de íons  $Ca^{2+}$ , enquanto o influxo dos íons  $Na^+$  pode causar uma despolarização neuronal, ativando os VOCC e amplificando subsequentemente os transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  (Vijayaraghavan et al., 1992; Rathouz e Berg, 1994).

#### ***5.2.4. Participação dos depósitos, intra e extracelulares, de $Ca^{2+}$ nas respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediada pelos nAChRs e mAChRs***

Os depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina, um canal CICR, cuja atividade é regulada pela  $[Ca^{2+}]_i$ , participam na modulação e amplificação dos sinais de  $[Ca^{2+}]_i$  em várias células neuronais (revisado por Berridge, 1998). Demonstramos que a ativação dos depósitos internos de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina foram os responsáveis por, aproximadamente, 50 % das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChRs. Mais evidências

para a presença de CICR em células P19 neuronais foi obtida pela observação de que as elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela cafeína foram bloqueadas na presença de rianodina, um inibidor específico para os canais CICR. A participação de canais CICR na regulação da  $[Ca^{2+}]_i$  foi sugerida em neurônios motores de ratos em desenvolvimento (Dayanithi et al., 2006).

Depósitos de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina (canais CICR) em células P19 indiferenciadas parecem não estar envolvidos nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChR. Estes resultados poderiam ser explicados pela ausência de tais depósitos em células embriônicas, o que está em acordo com estudos *in vivo* que demonstraram que os receptores de rianodina são expressos somente no sistema nervoso em desenvolvimento após a determinação da diferenciação neuronal (Mori et al., 2000). Como uma outra confirmação desta hipótese é que, inibidores dos canais de VOOCs, como o  $CdCl_2$  e a nifedipina, inibiram quase totalmente as repostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina em células indiferenciadas. Enquanto em células neuronais, esta inibição foi por volta de 50 % da resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pela nicotina, sugerindo que os 50 % de aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  remanescentes poderiam ser devidos à ativação dos canais CICR.

As respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotina foram determinadas pela pré-incubação de neurônios com o CPA, para se depletar os depósitos de  $Ca^{2+}$  sensíveis à rianodina e ao  $IP_3$  (Beck et al., 2004; Dayanithi et al., 2006), antes de estimular com o agonista, para demonstrar a mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular, tais como do CICR, como sendo parte das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChR. Em acordo com nossos resultados, Dajas-Bailador et al. (2002) demonstraram que a ativação dos nAChRs em células de neuroblastoma SH-SY5Y envolviam canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem e a liberação de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares. Resultados similares foram obtidos em astrócitos hipocâmpais (Sharma e Vijayaraghavan, 2001).

O tratamento das células com CPA, que bloqueia as bombas de  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático, levou a um aumento transiente do  $Ca^{2+}$  citosólico devido ao vazamento de  $Ca^{2+}$  dos depósitos sensíveis ao CPA. Em muitos tipos celulares estudados, este vazamento de  $Ca^{2+}$  pode ser variável, mas usualmente leva a uma completa depleção dos depósitos de  $Ca^{2+}$  endoplasmáticos em poucos minutos (Camello et al., 2002). O vazamento de  $Ca^{2+}$  dos depósitos internos foi demonstrado ser inibido pelo  $Ni^{2+}$  e ser, presumivelmente,

mediado por um canal especial na membrana do retículo endoplasmático (Wissing et al., 2002). Na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, este aumento transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  poderia prover uma estimativa da quantidade total de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado nos depósitos sensíveis ao CPA. Em cultura de neurônios ganglionares da raiz dorsal de rato, uma concentração de mais de 270  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  foi determinada nos depósitos do retículo endoplasmáticos, usando fluoróforos de  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa afinidade (Solovyova et al., 2002). Depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à cafeína (CICR) foram descritos em muitos tipos de neurônios de vertebrados, tanto *in situ* quanto *in vitro* (para revisão veja Verkhratsky e Shmigol, 1996).

Entretanto, existe mais de um mecanismo pelo qual os nAChR quando ativados resultam em elevações transientes da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Inicialmente, Foucart e colaboradores (Foucart et al., 1995) demonstraram que a ativação dos nAChR em neurônios simpáticos de rato não dependem dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste contexto, nossos estudos demonstraram que tais fontes usadas pelas respostas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChR alteraram durante a diferenciação neuronal das células P19. Em células embriônicas, o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular foi a principal fonte usada pelo componente nicotínico. Enquanto em neurônios diferenciados, os depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$  foram as principais fontes deste íon para o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dos nAChR e dos mAChR.

A participação do componente muscarínico no fluxo de íon induzido pela ACh foi monitorada na presença do inibidor específico dos nAChRs, a mecamilamina. As elevações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediada pelos receptores muscarínicos permaneceram na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, sugerindo que essas respostas envolviam principalmente os depósitos internos. Na presença do inibidor da PLC, U-73122, a maior fração das elevações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina foram eliminadas, indicando novamente que a ativação dos mAChR aumentam a atividade da PLC, a produção do  $\text{IP}_3$  e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos depósitos sensíveis ao  $\text{IP}_3$ . Investigamos a participação dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela muscarina. As medidas das variações na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na presença de inibidores específicos para cada subtipo muscarínico, indicou a atividade dos receptores  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  e  $M_5$  em células neuronais diferenciadas, o que está em acordo com dados prévios (Parnas et al., 1998; Ulrich e Majumder, 2006).

### 5.2.5. Inibição da proliferação de células P19 embriônicas pela ativação dos nAChRs e dos depósitos intracelulares de $Ca^{2+}$

Demonstramos que a nicotina reduz a proliferação celular em células embriônicas. Este efeito foi mediado pelos receptores nicotínicos, já que o bloqueio destes receptores com o antagonista de nAChR, MLA, aboliu a inibição induzida pela nicotina na proliferação celular. Também podemos extrapolar que, os efeitos mediados pela nicotina em células indiferenciadas foram devidos à ativação do subtipo  $\alpha_7$ , já que o mesmo induziu a maior resposta de  $[Ca^{2+}]_i$  (vide seção 5.1.2.3. **A ativação dos nAChRs mobilizam  $Ca^{2+}$  do meio extracelular e da liberação do  $Ca^{2+}$  de seus depósitos intracelulares**). Entretanto, é importante notar que, esta redução na proporção de células positivas para BrdU induzida pela nicotina, é menor do que a proporção de células embriônicas que expressavam a subunidade  $\alpha_7$  (Figuras 26 e 27). É possível que muitas células embriônicas devessem integrar outros sinais anti-proliferativos para sair do ciclo celular. Isto poderia ser devido a um outro fator extrínseco, tais como os sistemas de neurotransmissores (ex. glutamato, taurina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ATP), ou um componente intrínseco capaz de regular as respostas das células embriônicas aos fatores do ambiente. Isto foi confirmado pelo achado de que, a auto-administração de nicotina, reduz profundamente e de uma maneira dose dependente, a expressão de formas polissialiladas de moléculas de adesão neural (*polysialylated*, PSA, *forms of neural cell adhesion molecule*, NCAM), PSA-NCAM no giro dentado (*dentate gyrus*, DG). A neurogênese também foi reduzida no DG, e as mesmas doses que a reduziram, também aumentaram a morte celular (Abrous et al., 2002). É interessante notar que a nicotina foi descrita causar neurotoxicidade em altas doses (1 e 10 mM), como uma redução significativa da mitose celular e aumento na peroxidação lipídica, enquanto em baixas concentrações (10  $\mu$ M) teve um efeito protetor em experimentos de estresse oxidativo, como aumentar a taxa de viabilidade celular e inibir a produção da peroxidação lipídica resultante do peróxido de hidrogênio e da proteína beta-amilóide, em culturas de células PC12 (Guan et al., 2003). O efeito de inibição da proliferação foi observado após longo período de exposição à nicotina e isto, foi mais aparente, seguido de uma exposição de 48 horas. O que está em contraste com os efeitos, geralmente de curta duração, da ativação dos canais nAChRs. Quando a nicotina foi exposta por longos períodos, foi demonstrado que o número de sítios ligantes de nicotina foram regulados positivamente (Peng et al., 1997; Wang et al., 1998), e que as conseqüências funcionais desta longa exposição à nicotina parece inibir a proliferação, ao menos em células embriônicas e blastos (Giannopoulou et al., 2001; Tipton e

Dabbous, 1995). Isto poderia levar também a um aumento ou decréscimo nas respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  (Buisson e Bertrand, 2001; Molinari et al., 1998; Ridley et al., 2002).

Também consideramos que a proliferação das células embriônicas tenha sido mediada pelo envolvimento dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , via ativação dos IP3R, já que os inibidores U73122, CPA e BAPTA-AM por si sós, reduziram a proliferação destas células. Estes mesmos inibidores na presença de nicotina levaram a um aumento na inibição da proliferação em células embriônicas.

Experimentos adicionais podem ser necessários para identificar os principais eventos intracelulares relacionados aos efeitos dos nAChRs, já que estes foram demonstrados ativar a transcrição de genes iniciais em várias linhagens celulares e em ativar a via da MAP quinase (Schulte et al., 2005), apesar da rápida dessensibilização dos receptores nicotínicos.

#### ***5.2.6. Estimulação da proliferação de células progenitoras neuronais pela mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ através dos mAChRs acoplados à $G\alpha_{q/11}$***

Foi demonstrado que a ACh pode agir como sinais iniciais no sistema nervoso em desenvolvimento (Nguyen et al., 2001). A ACh aparece cedo na filogênese como um fator epigenético, sugerindo que ela apresente funções similares durante a ontogenia. Assim, os receptores nicotínicos e muscarínicos são amplamente expressos e aparecem em células embriônicas (Lammerding-Koppel et al., 1995), tão cedo quanto o décimo quarto dia embrionário, regulando a proliferação e a diferenciação neural (Schlumf et al., 1991; Zhou et al., 2004; Zhao et al., 2003). Em células progenitoras neuronais, a expressão dos receptores muscarínicos ocorre antes do estabelecimento da sinaptogênese e da neurotransmissão (Williams et al., 2004), sugerindo que a acetilcolina age através de uma alça autócrina no embrião.

Estudos prévios relataram que a proliferação e a diferenciação de células fontes neuronais poderiam ser mediadas pelos mAChRs (Zhou et al., 2004), e que a participação de cada subtipo poderia demonstrar uma regulação precisa de seus níveis de expressão e ativação (vide seções 5.1. **Resultados dos receptores colinérgicos**) o que poderia resultar em um efeito mitogênico. Os mecanismos deveriam primeiro envolver a amplificação do sinal dos mAChRs e nAChRs, permitindo o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular e a liberação subsequente de  $Ca^{2+}$  intracelular, ativando, conseqüentemente, a via de MAPK (Chang e

Karin, 2001). A demonstração de que a ativação dos mAChRs promove as elevações na  $[Ca^{2+}]_i$  e a subsequente indução da fosforilação da MAPK/ERK em células cancerígenas do tórax humano (*human breast cancer cells*, MCF-7) (Jimenez e Montiel, 2005), leva à suposição de que a ativação desta via induza o aumento na síntese protéica e na proliferação celular via quinase de quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated kinase kinase*, MAPKK) e, em células progenitoras neuronais, leva a um aumento na síntese de DNA durante as fases iniciais da neurogênese (Li et al., 2001). No presente estudo, nós demonstramos que a muscarina, agindo via mAChRs, os quais podem ativar as quinases, MAPK e PI-3 quinase, leva a um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  pela mobilização de  $Ca^{2+}$  dos depósitos intracelulares, resultando no aumento da síntese de DNA em células precursoras neuronais. Estes dados sugeriram que a ACh, agindo via mAChRs, funciona como um mitógeno que ativa as quinases MAPK e PI-3K e que, provavelmente está envolvida na indução da síntese de DNA durante os períodos iniciais da neurogênese.

Aqui, nós demonstramos que os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  de mAChRs, que estão acoplados à proteína  $G\alpha_{q/11}$ , induziram a taxa de proliferação de células precursoras neuronais. Estes mesmos receptores foram demonstrados modularem a proliferação celular de vários tipos de células progenitoras durante o desenvolvimento, como as células isoladas da traquéia (Metzen et al., 2003), célula pequena de carcinoma pulmonário (Song et al., 2003a) e células de adenocarcinoma de murinos (Song et al., 2003b).

A família das quinases reguladas por sinais extracelulares (Erk1 e Erk2) ou MAP quinases, foram implicadas como tendo um papel principal na promoção do crescimento celular (Datta et al., 1997; Songyang et al., 1997). Consistente com a função proposta das MAPKs e com o fato de que estas proteínas são fosforiladas com as elevações nas  $[Ca^{2+}]_i$ , e com as demonstrações de que os mAChR sinalizam para a Ras levando à MAPKK, tais como a ativação de MEK1 e MEK2 (MAPK quinase 1 e 2, *MAPK kinase 1 and 2*) (Li et al., 2001), nós propusemos que a sinalização dos mAChR, para a produção de  $IP_3$  e os aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$ , possam ser os principais responsáveis pela ativação da via de MAPK, o que por sua vez, regula a expressão gênica e a transcrição de fatores que são necessários para a proliferação de células progenitoras. Em acordo com o exposto, o quelante de  $Ca^{2+}$  intracelular, BAPTA-AM, e os inibidores da mobilização de  $Ca^{2+}$  interno, CPA, U73122, e o inibidor da proteína  $G\alpha_{q/11}$ , YM-254890, todos inibiram os efeitos proliferativos mediados pela muscarina (Figura 29B). Além do mais, estes mesmos inibidores produziram uma



inibição significativa na proliferação de células progenitoras.

Informações adicionais foram obtidas quando as células precursoras neuronais foram cultivadas na presença de muscarina e do inibidor da proteína  $G\alpha_{i/o}$ , PTX, permitindo que as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela muscarina fossem devidas somente aos mAChRs acoplados à  $G\alpha_{q/11}$ . Assim, o total percentual de células positivas para NEL e os níveis de mRNAs transcritos permaneceram inalterados, porém, o número de células positivas para nestina e os níveis de mRNA transcritos aumentaram (Figura 29).

### **5.2.7. Indução da diferenciação neuronal pelos mAChRs acoplados à $G\alpha_{i/o}$**

Nas fases iniciais do desenvolvimento, os receptores  $M_2$  foram demonstrados em controlarem a diferenciação e o crescimento axonal de neurônios sensoriais (Biagiono et al., 2000). Entretanto, poucos efeitos expressivos foram relatados em animais mutantes para a deleção gênica do receptor muscarínico (Wess et al., 2003; Wess, 2004), o que deixa em falta informações de quão crítica são as funções dos mAChRs ou, em contrário, se há alguma regulação colinérgica no desenvolvimento que seja similar à de outros sistemas de neurotransmissores.

As células P19, que são multipotentes, proliferam-se continuamente e diferenciam-se em resposta aos fatores de crescimento e sinais extracelulares. Neste estudo, o subtipo  $M_2$ , que é expresso na superfície de células P19 diferenciadas em neurônios e na sua progênie neuronal, foi observado acelerar a diferenciação neuronal de células progenitoras, mas não a proliferação destas (Figura 29). Isto foi confirmado pelo fato de que a galamina (um antagonista para o receptor  $M_2$ ) não aumentou o número de células BrdU-positivas. Além do mais, quando as células em diferenciação neuronal foram cultivadas com muscarina e o inibidor da proteína  $G\alpha_{q/11}$ , YM-254890, o que permitiria que as respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  fossem devidas somente aos mAChRs acoplados à  $G\alpha_{i/o}$ , o número de células NEL-positivas e o nível de mRNAs da NEL transcritos, aumentaram. Enquanto houve uma redução simultânea no número de células nestina-positivas e os níveis de mRNAs transcritos de nestina (Figura 29). Nós ainda poderíamos sugerir que somente os receptores  $M_2$ , mas não os subtipos  $M_4$ , mediarão o aumento na diferenciação das células progenitoras neuronais em cultura, já que havíamos demonstrado que, os receptores  $M_4$  não apresentaram respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  (vide seção 5.1.2.2. **Fontes extra e intracelulares de  $Ca^{2+}$  mobilizados pela ativação dos mAChRs e nAChRs em células P19 embriônicas e neuronais**). Estes dados, levou-nos a

concluir que, a ACh regula positivamente a diferenciação neuronal através dos receptores M<sub>2</sub>. Provavelmente, as bases mecânicas em que isto acontece, possa envolver os sinais de amplificação dos muscarínicos acoplados à proteína G, levando ao influxo e à liberação de Ca<sup>2+</sup>, e finalmente pela ativação da via de MAP quinase (Chang e Karin, 2001).

### **5.2.8. Indução da proliferação e diferenciação neuronal mediada pela mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular através da ativação dos mAChRs e nAChRs**

As respostas na proliferação de células progenitoras neuronais, induzidas por agonistas de nAChRs, foram consistentes, embora tenham sido relativamente pequenas. Isto poderia ser devido à dualidade das respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> envolvidas com os nAChRs nas células em diferenciação. O problema de fato foi demonstrado, que em células neuronais, metade das respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediadas pelos nAChRs foram devidas ao influxo de Ca<sup>2+</sup>, a partir dos depósitos extracelulares, e a outra metade, pela mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos depósitos intracelulares via ativação dos receptores de rianodina (vide seção 5.1.2.3. **A ativação dos nAChRs mobilizam Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular e da liberação do Ca<sup>2+</sup> de seus depósitos intracelulares**). Como mostra a figura 30, o bloqueador de VOOC, nifedipina, inibiu por volta de 20 % a proliferação induzida pela nicotina, enquanto a rianodina, na presença de nicotina, teve uma inibição além dos níveis controles. Este fato levou-nos a sugerir que a inibição dos nAChR na proliferação celular observada em células embriônicas poderia persistir durante a diferenciação neuronal, mas parece que ela é compensada e apresenta mesmo uma indução nos efeitos proliferativos devido à ativação dos receptores de rianodina. Os depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à rianodina, cuja atividade é regulada pelas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, participam na modulação e na amplificação dos sinais de Ca<sup>2+</sup> em várias células neuronais (revisado em Berridge, 1998). Estes resultados poderiam ser explicados pela ausência de tais depósitos em células embriônicas, o que está em acordo com os estudos *in vivo*. Nestes, foram demonstrados que os receptores de rianodina são expressos, no sistema nervoso em desenvolvimento, após o comprometimento da diferenciação neuronal (Mori et al., 2000).

Como discursado acima, os depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> apresentaram um papel pivotal nos efeitos de proliferação e diferenciação mediados pelos nAChRs e mAChRs. As elevações nas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> poderiam levar à ativação dos fatores de transcrição, CREB, cujo papel no controle da proliferação de células gliais já foi previamente relatado (Lee et al., 1999; Johnson et al., 2000; Shiga et al., 2005a; Shiga et al., 2005b) e AMP cíclico, que poderia

influenciar o crescimento e a diferenciação de neurônios em cultura (Kim et al., 2005; Lopez-Toledano et al., 2004; Hansen et al., 2000), assim, estes fatos poderiam explicar os papéis dos AChRs na proliferação e diferenciação neuronal. Além do mais, os transientes de  $[Ca^{2+}]_i$ , induzidos pela ACh, independentemente da ativação da MAP quinase, poderiam ser necessários para a diferenciação, já que a atropina bloqueia estes eventos transientes e o desenvolvimento subsequente (dados não mostrados). Como o papel dos mAChR na indução da proliferação e diferenciação de células precursoras neuronais foi estabelecido, mais estudos serão focalizados nos detalhes da associação entre os eventos transientes de cálcio e a diferenciação neuronal.

#### ***5.2.9. Vias de ativação das respostas de $[Ca^{2+}]_i$ mediadas pelos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal de células P19***

Resumindo, esta parte do trabalho contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos de ativação dos receptores colinérgicos durante os estágios iniciais da neurogênese *in vitro*. A diferenciação neuronal de células EC e, por extensão, ES *in vitro* assemelha-se às condições iniciais da diferenciação neuroectodermal (Gangemi et al., 2005). Após o estabelecimento da diferenciação, o subtipo  $\alpha_7$  do nAChR, que é altamente permeável ao  $Ca^{2+}$ , foi ativo e contribuiu para as elevações transientes nas  $[Ca^{2+}]_i$ , necessárias para iniciar a neurogênese. Os nAChRs mais expressos em células embrionárias foram os do subtipo  $\alpha_7$ , possivelmente seguido pelo subtipo  $\alpha_2\beta_4$  de nAChRs (Figura 26). Vários outros subtipos de nAChR, tais como:  $\alpha_3\beta_4$  e  $\alpha_4\beta_2$ , poderiam não ser formados durante a diferenciação, já que a expressão das subunidades  $\alpha_3$  e  $\beta_2$  foi baixa (Figuras 17 e 18). Seguindo com o comprometimento para um fenótipo neuronal e a continuação da diferenciação, os tipos de receptores nicotínicos e muscarínicos tornaram-se funcionais. Os picos de  $[Ca^{2+}]_i$ , atingindo concentrações de 1  $\mu M$ , foram induzidos por fluxos combinados de  $Ca^{2+}$ , do meio extracelular e dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Estas altas concentrações de  $Ca^{2+}$  devem ser necessárias para o final da sinaptogênese, para a manutenção da mesma e para a indução da liberação de neurotransmissores.

***CONCLUSÃO:  
RECEPTORES  
COLINÉRGICOS***

### **5.3. CONCLUSÃO PARCIAL**

#### **5.3.1. Indução da proliferação e diferenciação em células P19**

A proliferação coordenada de células progenitoras é a base da produção de números apropriados de neurônios e glias durante o desenvolvimento do sistema nervosa central, o que é relevante para estabelecer as funções cerebrais normais. A regulação de ações como, a proliferação, morte celular neuronal ou a diferenciação, é dependente de interações de diversas moléculas sinalizadoras extracelulares ligadas a uma rede de vias de transdução de sinais intracelulares. A descoberta de mecanismos regulatórios que controlem a proliferação de células embriônicas e progenitoras neuronais é importante para entender como as vias de transdução de sinais intracelulares regulam a proliferação durante a determinação inicial do fenótipo neuronal. Os objetivos desta parte do trabalho foram determinar, qual e em que extensão, os nAChRs e mAChRs mediavam os efeitos na proliferação e na diferenciação neuronal pela atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a diferenciação das células P19 embrionárias. A linhagem celular, teratocarcinoma de camundongo P19, expressa endogenamente as subunidades de receptores nicotínicos  $\alpha_2$  ao  $\alpha_7$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_4$  e os subtipos  $M_1$ - $M_5$  durante a diferenciação neuronal. As subunidades dos nAChRs podem formar vários subtipos diferentes de receptores, que podem prover um modelo viável para os estudos dos mecanismos neuronais e identificar os subtipos de receptores envolvidos nos efeitos da ACh. No presente estudo, confirmamos que o bloqueio dos mAChRs acoplados à proteína  $G_{\alpha_{q/11}}$ , que leva à produção de  $IP_3$ , e os mAChRs acoplados à  $G_{\alpha_{i/o}}$ , que inibem a síntese do cAMP, respectivamente, induziram a proliferação e a diferenciação neuronal das células progenitoras neuronais. Além do mais, os nAChRs mediavam os efeitos proliferativos através da mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular do retículo endoplasmático via ativação dos receptores de rianodina.

***RESULTADOS: EVENTOS  
ESPONTÂNEOS DE  $[Ca^{2+}]_i$***

## 6. CONVERGÊNCIA DAS RESPOSTAS DE $[Ca^{2+}]_i$ ATRAVÉS DE RECEPTORES DE MEMBRANA CELULAR NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

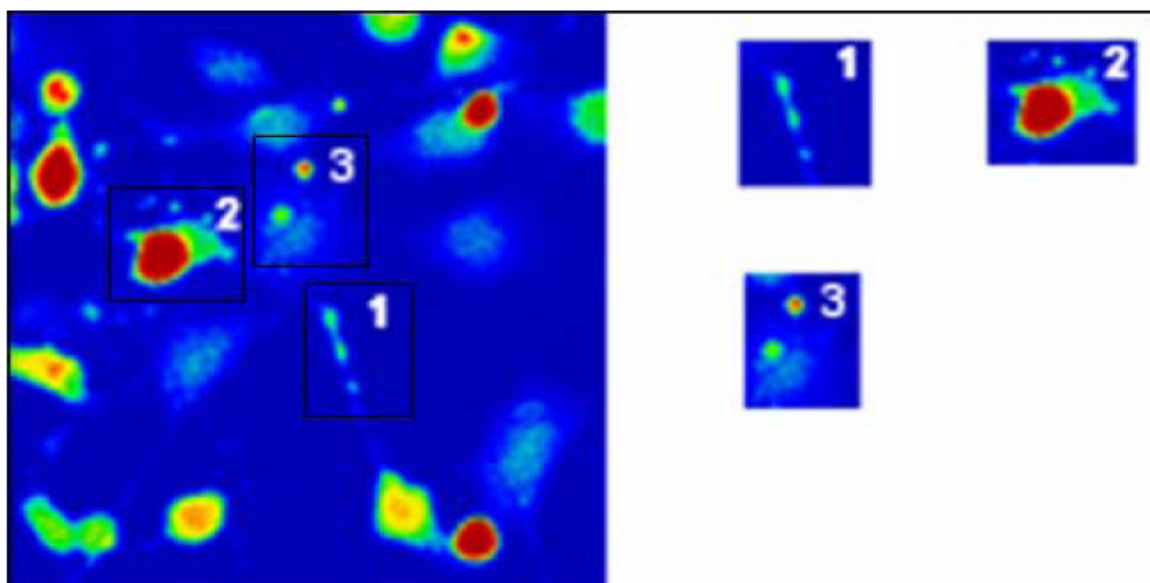
### 6.1. RESULTADOS

#### 6.1.1. Determinação dos padrões oscilatórios da atividade de $[Ca^{2+}]_i$ durante a diferenciação neuronal das células P19

Dois principais tipos de eventos espontâneos de  $[Ca^{2+}]_i$  foram encontrados nos precursores em diferenciação: eventos globais de  $[Ca^{2+}]_i$ , ocorridos em todo o corpo celular, e eventos localizados, em que os aumentos de  $[Ca^{2+}]_i$  eram limitados a uma região subcelular, normalmente um processo celular (Figura 31). Os eventos globais foram caracterizados por aumentos rápidos (geralmente menos que 2' 30'') e altos ou aumentos pequenos e irregulares na  $[Ca^{2+}]_i$ . Os sinais locais de  $[Ca^{2+}]_i$  foram de amplitudes e durações variáveis. Embora ocorressem ocasionalmente nos pericários, eles foram observados mais frequentemente nos processos celulares (Figura 31).

A razão da caracterização dos eventos globais e locais de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a diferenciação neuronal foi para investigar se, suas propriedades envolvendo os sinais transientes de  $[Ca^{2+}]_i$ , eram modificadas durante esse processo. Para cada estágio da diferenciação celular, foram observados os números de células ativas em adição às características dos sinais globais e locais de  $[Ca^{2+}]_i$ . Observamos que a porcentagem de células que apresentaram os eventos globais de  $[Ca^{2+}]_i$  aumentou a partir das células embriônicas até àquelas do terceiro dia da diferenciação, reduzindo subsequentemente (Figura 32A e Tabela IX). As frequências dos sinais globais reduziram (Figura 32B e Tabela X), e suas amplitudes mostraram um aumento significativo (Figura 32C e Tabela XI) com a diferenciação celular.

Os eventos locais de  $[Ca^{2+}]_i$  foram analisados a partir do dia 3 da diferenciação, dia em que as células já possuem neuritos em formação. Os eventos locais  $[Ca^{2+}]_i$  ocorreram com maior frequência nos processos celulares, por isso, estes eventos não foram analisados em células embriônicas. Como observado para os eventos globais, a porcentagem de células que apresentaram os aumentos transientes locais de  $[Ca^{2+}]_i$  e a frequência de tais eventos foram maiores durante os primeiros dias da diferenciação (Figura 32A e 32B). A amplitude dos sinais locais de  $[Ca^{2+}]_i$  reduziu em cerca de um terço da inicial. O padrão geral destes dados é que ambos os eventos espontâneos são observados mais frequentemente na fase em que



**Figura 31: Exemplos de eventos espontâneos locais e globais de sinais de  $[Ca^{2+}]_i$  em neurônios P19 do oitavo dia da diferenciação neuronal.** Imagem de microscopia confocal mostrando um campo de células incubadas com o indicador de  $[Ca^{2+}]_i$ , Fluo3-AM. Os números nos quadrados indicam as regiões subcelulares em que há sinais de  $[Ca^{2+}]_i$ . 1) Exemplo de eventos locais em um processo, 2) eventos globais em todo o pericário de um neurônio e 3) eventos localizados no corpo celular de uma célula glial.



existem os precursores neuronais.

Em todos os experimentos, os eventos locais e globais de  $[Ca^{2+}]_i$  foram avaliados somente em células progenitoras neuronais e células neuronais maduras. Todas as células analisadas apresentaram resultados em que sempre houve redução no número dos eventos globais. As tabelas IX, X e XI seguintes resumem os resultados obtidos.

**Tabela IX:** Média dos números totais de células que apresentaram os eventos local e global da atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a diferenciação neuronal de células P19.

Dias da Diferenciação	Média dos números totais de células ativas	
	Eventos Globais	Eventos Locais
0	21,1 ± 0,90 ( <i>n</i> = 87)	-
3	58,6 ± 0,76 ( <i>n</i> = 52)	41,4 ± 0,90 ( <i>n</i> = 52)
4	40,8 ± 0,39 ( <i>n</i> = 73)	27,5 ± 1,44 ( <i>n</i> = 73)
6	29,2 ± 2,08 ( <i>n</i> = 65)	10,4 ± 1,70 ( <i>n</i> = 65)
8	21,9 ± 0,39 ( <i>n</i> = 81)	2,6 ± 3,72 ( <i>n</i> = 81)

*n* = número de células avaliadas.

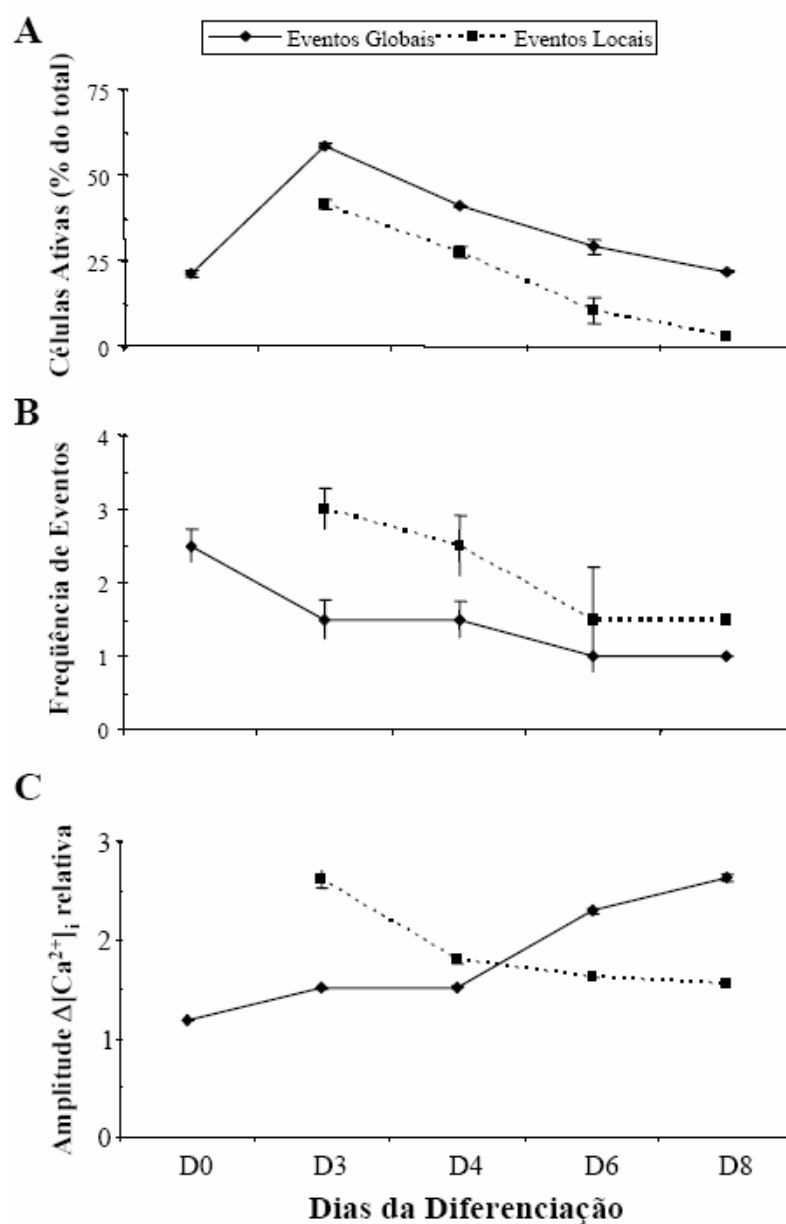
Os valores dos eventos globais e locais foram expressos em média ± E.P.M.

**Tabela X:** Médias das freqüências de eventos globais e locais da atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  por célula durante a diferenciação neuronal de células P19.

Dias da Diferenciação	Média das freqüências de eventos de $[Ca^{2+}]_i$ por célula	
	Eventos Globais	Eventos Locais
0	2,5 ± 0,70 ( <i>n</i> = 87)	-
3	1,5 ± 0,70 ( <i>n</i> = 52)	3,0 ± 0,00 ( <i>n</i> = 52)
4	1,5 ± 0,7 ( <i>n</i> = 73)	2,5 ± 0,70 ( <i>n</i> = 73)
6	1,0 ± 0,00 ( <i>n</i> = 65)	1,5 ± 0,70 ( <i>n</i> = 65)
8	1,0 ± 0,00 ( <i>n</i> = 81)	1,5 ± 0,70 ( <i>n</i> = 81)

*n* = número de células avaliadas.

Os valores dos eventos globais e locais foram expressos em média ± E.P.M.



**Figura 32: Atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  medida por microscopia confocal. A ocorrência de eventos espontâneos de alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  no corpo e nos prolongamentos celulares.** (A) Indica o número de células ativas durante a diferenciação neuronal, (B) a frequência dos eventos (número de eventos por célula ou ramificação durante o tempo de registro, 10 min), e (C) a amplitude dos sinais de  $[Ca^{2+}]_i$  no corpo e nos prolongamentos celulares durante a diferenciação. As respostas locais de alterações na  $[Ca^{2+}]_i$  foram obtidas somente de células com morfologia de neurônios. As respostas globais são medidas de células que estão diferenciando-se tanto em neurônios quanto em glia, para mostrar a diminuição dos eventos e o aumento da amplitude durante a diferenciação na cultura. Os dados representam os valores médios  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. O número total de células analisadas em cada experimento foi de 22-41.

**Tabela XI:** Médias das  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  relativas máximas dos eventos globais e locais da atividade de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a diferenciação neuronal de células P19.

Dias da Diferenciação	Média das $\Delta[Ca^{2+}]_i$ relativas máximas de eventos de $[Ca^{2+}]_i$	
	Eventos Globais	Eventos Locais
<b>0</b>	1,2 ± 0,00 ( <i>n</i> = 87)	-
<b>3</b>	1,5 ± 0,01 ( <i>n</i> = 52)	2,6 ± 0,04 ( <i>n</i> = 52)
<b>4</b>	1,5 ± 0,00 ( <i>n</i> = 73)	1,8 ± 0,09 ( <i>n</i> = 73)
<b>6</b>	2,3 ± 0,03 ( <i>n</i> = 65)	1,6 ± 0,03 ( <i>n</i> = 65)
<b>8</b>	2,6 ± 0,03 ( <i>n</i> = 81)	1,6 ± 0,00 ( <i>n</i> = 81)

*n* = número de células avaliadas.

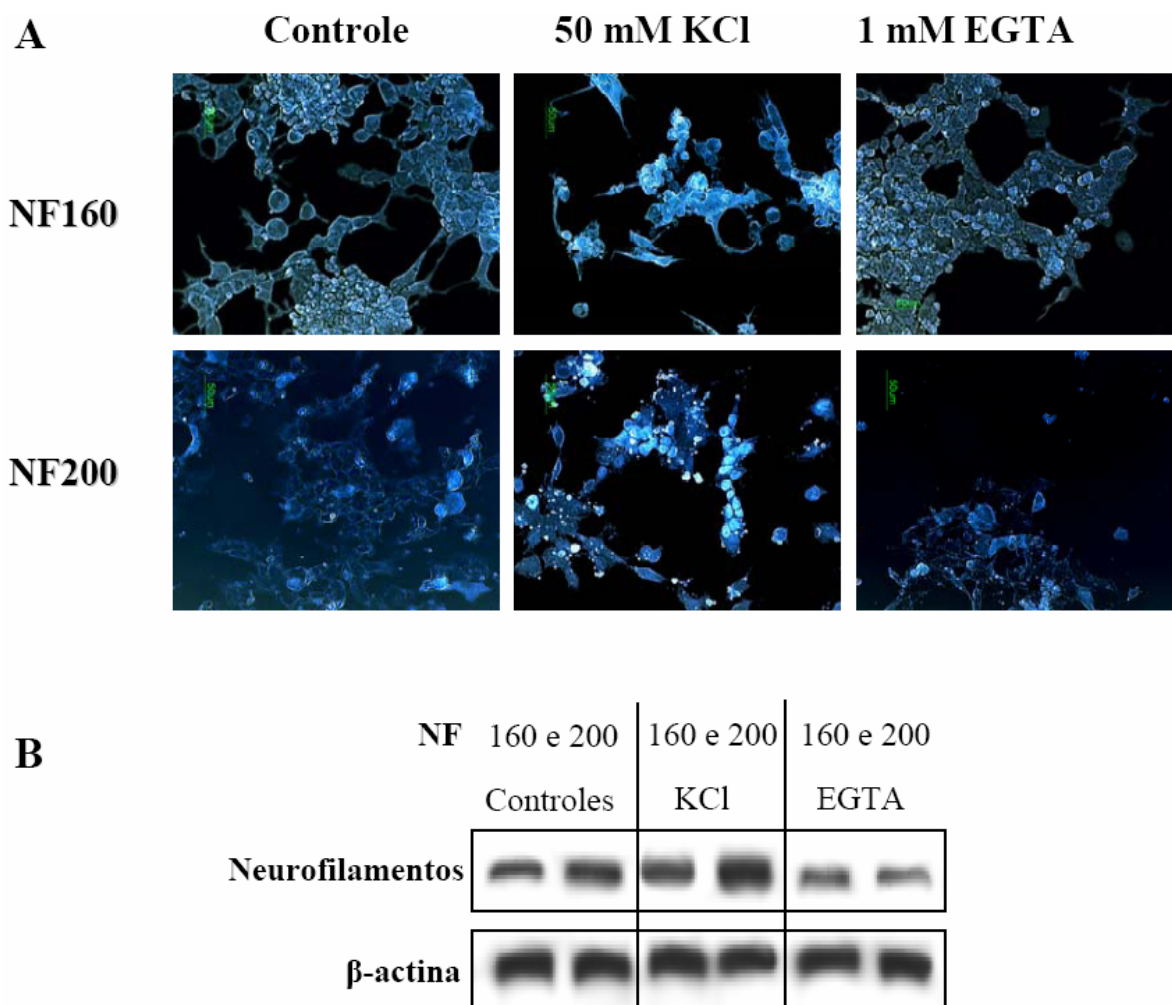
Os valores dos eventos globais e locais foram expressos em média ± E.P.M.

$\Delta[Ca^{2+}]_i$  relativa = variação relativa das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas pela nicotinas.

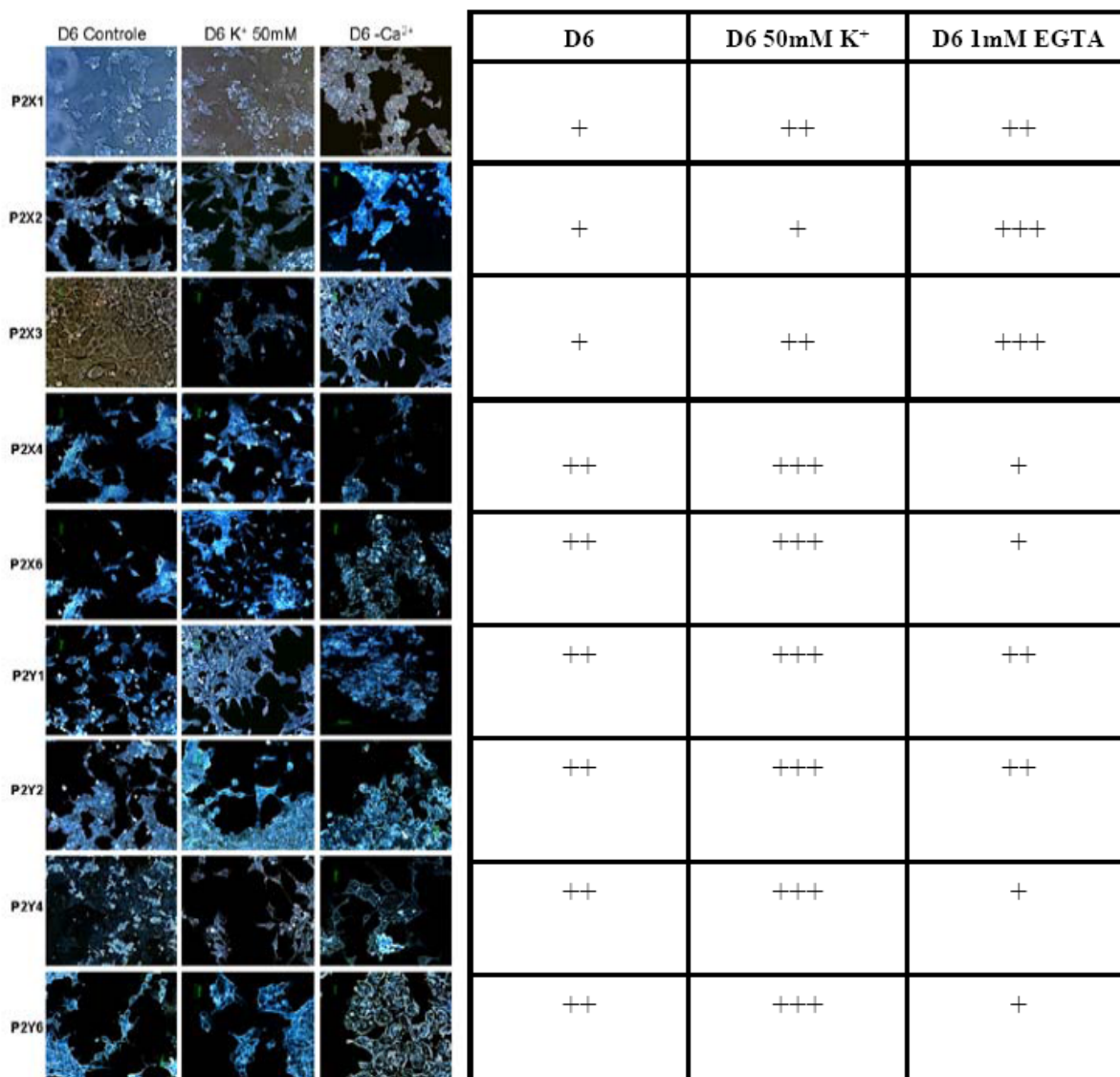
### **6.1.2. A frequência dos sinais de $[Ca^{2+}]_i$ correlaciona-se com a aquisição do fenótipo de célula responsiva aos neurotransmissores**

Com a diferenciação neuronal ocorrendo sob condições controladas, tornou-se possível inibir na presença de 1 mM de EGTA ou aumentar na presença de 20 e 50 mM de KCl) os sinais espontâneos de  $[Ca^{2+}]_i$  relativo às condições controles. Assim, utilizamos essas condições experimentais para avaliar o efeito das atividades espontâneas de  $[Ca^{2+}]_i$  no desenvolvimento do fenótipo neurotransmissor das células P19 neuronais.

Para avaliar o efeito destes tratamentos no fenótipo neurotransmissor, realizamos imunocitoquímicas no dia 6 para os neurofilamentos de médio e alto peso moleculares, NF-160 e NF-200, os quais tiveram sua expressão aumentada tanto em células individuais quanto na população celular (figura 33). Foram realizadas imunocitoquímicas contra os subtipos dos receptores purinérgicos e contra as subunidades de nAChRs, para averiguar se os padrões de expressão dos receptores foram modificados. Estimativas de aumentos na expressão de receptores em células mantidas em meios tratados com KCl foram observados para os subtipos purinérgicos P2X<sub>1,3,4 e 6</sub>, P2Y<sub>1,2,4 e 6</sub> e para as subunidades de nAChRs  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  e  $\beta_2$ , no entanto, alguns receptores também apresentaram aumentos em suas expressões nas células mantidas sob condições sem  $Ca^{2+}$  extracelular livre (como os nAChRs  $\alpha_3$  e  $\beta_2$ , e os purinérgicos P2X<sub>1,2,3</sub>). Estimativas de reduções na expressão dos receptores purinérgicos foram observadas para os subtipos P2X<sub>4,6</sub> e P2Y<sub>4,6</sub>, e para as subunidades de



**Figura 33: Detecção dos perfis de expressão de marcadores de células neuronais maduras durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem  $\text{Ca}^{2+}$  livre extracelular por imunocitoquímica e Western blot.** Células do quarto dia diferenciação foram mantidas durante 48 h em meio definido na ausência (controle) e na presença de 50 mM de KCl ou de 1 mM de EGTA. (A) Após fixação, as células foram incubadas com anticorpos primários para os neurofilamentos de médio e alto peso moleculares (NF-160 e NF-200) seguida pela adição de um anticorpo secundário biotilado. A reação foi revelada pela coloração por imunoperoxidase. (B) A detecção da expressão dos neurofilamentos 160 e 200 no sexto dia após tratamento com 50 mM de KCl ou 1 mM de EGTA foi realizada pela análise de Western blot como descrito na seção de Métodos. A expressão de  $\beta$ -actina foi detectada como controle interno para avaliar a integridade dos extratos de proteínas. Células sem tratamento foram usadas como controles experimentais. Alguns experimentos controles, com células tratadas e não tratadas, foram deixados diferenciarem e as células mantiveram-se viáveis.



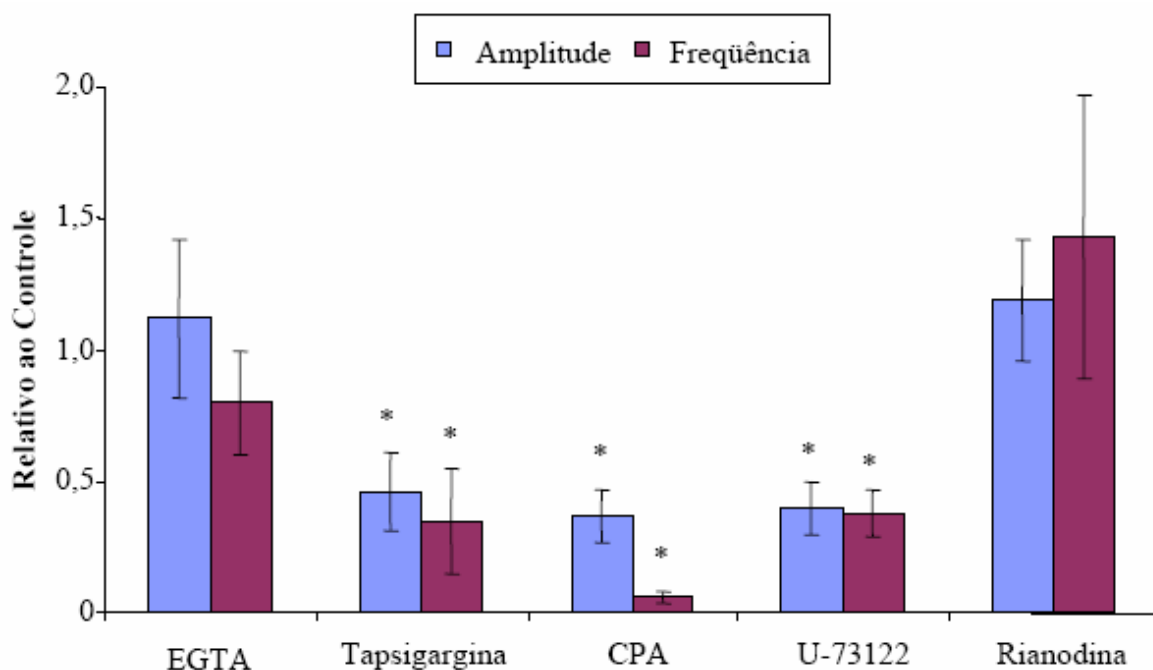
**Figura 34: Detecção dos perfis de expressão dos receptores purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem Ca<sup>2+</sup> livre extracelular pela marcação imunocitoquímica.** Células do quarto dia diferenciação foram mantidas durante 48 h em meio definido na ausência (controle) e na presença de 50 mM de KCl ou de 1 mM de EGTA. Após fixação, as células foram incubadas com anticorpos primários subtipo-específicos para os receptores purinérgicos seguida pela adição de um anticorpo secundário biotilado. A reação foi revelada pela coloração por imunoperoxidase.

	D6 Controle	D6 K <sup>+</sup> 50mM	D6 -Ca <sup>2+</sup>	D6	D6 K <sup>+</sup> 50mM	D6 1mM EGTA
Alfa 3				+	++	++
Alfa 4				++	+++	n.d.
Alfa 5				++	+++	++
Alfa 6				++	+++	++
Alfa 7				++	+++	+
Beta 2				+	+++	++

**Figura 35: Detecção dos perfis de expressão das subunidades dos receptores nicotínicos durante a diferenciação neuronal das células P19 em meio despolarizante e sem Ca<sup>2+</sup> livre extracelular pela marcação imunocitoquímica.** Células do quarto dia diferenciação foram mantidas durante 48 h em meio definido na ausência (controle) e na presença de 50 mM de KCl ou de 1 mM de EGTA. Após fixação, as células foram incubadas com anticorpos primários subunidades-específicos dos receptores nicotínicos seguida pela adição de um anticorpo secundário biotilado. A reação foi revelada pela coloração por imunoperoxidase.

nAChRs  $\alpha_4$  e  $\alpha_7$ . Análises posteriores por Western-blot serão realizadas para confirmar estas alterações na expressão dos receptores colinérgicos e purinérgicos.

Para elucidar as vias utilizadas para a transdução de sinal dos eventos espontâneos de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a neurogênese foram realizados experimentos com: quelante de  $Ca^{2+}$  extracelular, que inibiria a mobilização de  $Ca^{2+}$  pelos canais iônicos da membrana plasmática; com os inibidores da via da PLC, que levariam à mobilização do  $[Ca^{2+}]_i$  a partir dos receptores sensíveis ao  $IP_3$  e com o inibidor do receptor de rianodina, uma outra via da mobilização de  $[Ca^{2+}]_i$ . As células progenitoras neuronais foram avaliadas para as modulações de amplitude e de frequência dos eventos globais de  $[Ca^{2+}]_i$ . Ambas as modulações, AM e FM, foram significativamente reduzidas quando se inibia a via da mobilização de  $[Ca^{2+}]_i$  ativada pelos receptores de  $IP_3$ . Isto sugeriu que a produção ou iniciação daqueles eventos teria como partida a ativação dos receptores do retículo endoplasmático sensíveis ao  $IP_3$  e que, ao menos para os eventos globais de  $[Ca^{2+}]_i$ , os VOOCs não seriam essenciais para a sua ocorrência.



**Figura 36. Análise da participação dos depósitos, extra e intracelulares, de  $\text{Ca}^{2+}$  na produção dos eventos espontâneos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .** A depleção dos depósitos intracelulares de cálcio com, tapsigargina ( $1 \mu\text{M}$ ) ou CPA (ácido ciclopiazônico,  $30 \mu\text{M}$ ) \_ inibidores da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático \_ ou a inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada pelo  $\text{IP}_3$  com U-73122 ( $5 \mu\text{M}$ ) eliminou as ondas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Eventos Globais). Em contrário, as ondas de cálcio continuam em meio sem cálcio extracelular (com  $1 \text{ mM}$  EGTA) ou pela inibição da liberação de cálcio através dos canais sensíveis à rianodina com rianodina ( $20 \mu\text{M}$ ). Os dados representam os valores médios  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. O número total de células analisadas em cada experimento foi de 32-41. \*  $p < 0,05$  comparado aos valores controles.



***DISCUSSÃO: EVENTOS  
ESPONTÂNEOS DE  $[Ca^{2+}]_i$***

## 6.2. DISCUSSÃO

As oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  não são apenas conseqüências esperadas para o controle da retroalimentação da  $[Ca^{2+}]_i$ , mas demonstramos que há muitas evidências que sugerem sua relação com a proliferação e diferenciação celular (vide as seções de resultados 4.1.5.3. **Envolvimento da PLC e dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  na proliferação celular**; 4.1.5.4. **Envolvimento do  $Ca^{2+}$  extra e intracelular na proliferação celular**; 5.1.4.2. **Envolvimento das fontes intra e extracelulares de  $Ca^{2+}$  na proliferação de células P19 embriônicas**; 5.1.4.3. **Envolvimento da PLC e dos depósitos internos de  $Ca^{2+}$  na proliferação de células P19 embriônicas**; e as seções de discussões 4.2.5. **A sinalização de  $[Ca^{2+}]_i$  intracelular influencia a proliferação celular**; 5.2.5. **Inibição da proliferação de células P19 embriônicas pela ativação dos nAChRs e dos depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$** ; 5.2.9. **Vias de ativação das respostas de  $[Ca^{2+}]_i$  mediadas pelos nAChRs e mAChRs durante a diferenciação neuronal de células P19**). A frequência das oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  foram demonstradas regular a secreção (Li et al., 1998) , enquanto a amplitude destas oscilações demonstraram-se regular a expressão gênica na linhagem de células P19 (Figuras 33, 34 e 35) e em outros sistemas celulares (Dolmetsch et al., 1998; Li et al., 1998). Há vários estudos em embriões que apresentam oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  periódicas que poderiam controlar a divisão embriônica e o crescimento celular (Gu e Spitzer, 1995; Gomez e Spitzer, 1999). Por causa de sua habilidade em controlar a diferenciação e a proliferação celular, acreditamos que as oscilações de  $[Ca^{2+}]_i$  em células P19 poderia produzir sinais intracelulares altamente específicos.

***CONSIDERAÇÕES  
FINAIS***

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 7.1. *Perfil de expressão*

O perfil de expressão serial de células em diferenciação deve revelar fatores chaves envolvidos no processo de transformação fenotípica de uma célula tronco para um neurônio funcional. Observações baseadas na construção de redes a partir de análise gene-por-gene também sugerem que as células hematopoiéticas fontes ativam múltiplos programas que competem subsequentemente com outros, embora a maneira pela qual esta competição seja resolvida não esteja clara (Swiers et al., 2006). Comparações de eventos iniciais e tardios de diferenciação revelam um aumento no número de genes diferencialmente regulados no último (Theilgaard-Monch et al., 2005). Isto pode ser explicado pelas multilinhagens iniciadoras; células iniciais da diferenciação ainda expressam genes que correlacionam com múltiplas linhagens, mas com a continuação da diferenciação, os programas que não são requeridos são inativados, enquanto que os marcadores terminais da diferenciação são ativados. Claramente, muitas funções terminais, tais como o controle do ciclo celular e a regulação da maquinaria constitutiva, serão em comum com outras células diferenciadas (Theilgaard-Monch et al., 2005).

Para o entendimento da topologia e da dinâmica das redes regulatórias transcricionais que governam os processos biológicos tais como o ciclo celular ou a diferenciação, são desenvolvidos enfoques para avaliar:

1. a identidade e os níveis de expressão dos pontos de intersecção de interação;
2. como as interações mudam com o tempo (ex., através do ciclo celular ou durante a diferenciação) e
3. o impacto fenotípico da interrupção dos pontos chaves de intersecção.

A complexidade da maquinaria de regulação transcricional eucariótica reflete as várias respostas que ela controla e torna a elucidação das redes regulatórias transcricionais uma tarefa difícil. Isto leva às questões óbvias envolvendo os mecanismos pelos quais uma resposta transcricional específica é disparada, incluindo como uma dada via de sinalização ativa um fator de transcrição particular, como a especificidade temporal é gerada, e as

origens da especificidade de alvo. Assim, ainda o é difícil contar precisamente para todos os níveis de regulação, e além do mais, algumas suposições são feitas. Por exemplo, é frequentemente assumido que o estado de equilíbrio de um mRNA (medido em um perfil de expressão experimental utilizando microarranjos de DNA) é indicativo da taxa de transcrição ou do nível de tradução protéica a partir do mRNA. Além do mais, é frequentemente sugerido que se um fator de transcrição é expresso, este é ativo, embora seja claro de que dimerização, modificações pós-traducionais, localização subcelular e outros fatores também devam ser considerados.

Mesmo na ausência de conhecimento de uma rede arquitetural específica, é possível usar o amplo padrão de expressão gênica para provar que o estado da estrutura espacial de uma rede complexa e natural e extrair as assinaturas características de um atrator de alta dimensão estável. Não é de todo evidente que tal comportamento estável deva surgir da interação de um grande número de elementos conectados irregularmente (May, 1972), mas um resultado importante da análise de conjuntos estatísticos de redes genéticas discretas é a que nos fornecem as características arquiteturais da rede global, uma rede complexa irá produzir padrões de ativação gênica globalmente coerente espontaneamente, por ex., rápida desaceleração em um de um grupo de atratores estáveis, relativamente pequenos, ao invés de visitar eventualmente todo o estado espacial (Kauffman, 1993). As características arquiteturais da rede conhecida em aumentar o regime de comportamento ordenado incluem:

1. Poucas interações (Kauffman, 1993).
2. Uso preferencial de certos grupos de funções para as interações regulatórias entre genes (Kauffman, 1993)
3. É uma topologia sem escala (Aldana e Cluzel, 2003).

Essas características têm sido predominantes nas redes gênicas e protéicas regulatórias reais. Sob estas condições foi verificado que a diferenciação de células embrionárias P19 em neurônios, assim como as células HL60 em neutrófilos (Chang et al., 2006) não resulta de um simples estado de transição de uma chave biestável como o modelo tradicional (Ferrell e Xiong, 2001; Xiong e Ferrell, 2003). Ao invés disso, a diferenciação em células de mamíferos parece ser um processo de vários passos em um sistema de alta dimensão, um resultado que é consistente com a alta conectividade do complexo celular que sustenta a rede genômica regulatória. Estudos de análises revelaram que a diferenciação é um

processo de vários passos consistente com um modelo nos quais várias chaves estão acopladas ao longo de vários estados de espaço e dimensões que dão origem a múltiplos estados estáveis que representam atratores de alta dimensão na ampla rede genômica regulatória celular (Huang et al., 2005; Kauffman, 1993.). Este enfoque abre uma nova maneira de especificar os processos de vários passos da diferenciação celular em uma seqüência de estados metaestáveis intermediários discretos que evadem a análise convencional de tempo decorrido de toda população. A existência de um comportamento multiestável e multidimensional durante a determinação celular em células de mamíferos têm importantes implicações na maneira em que a diferenciação é interpretada e ultimamente, em como podem ser explicados e controlados os processos de comprometimento de linhagem de células fontes durante o desenvolvimento tecidual.

### **7.2. Modificações dos padrões oscilatórios da sinalização de $[Ca^{2+}]_i$ para o controle da proliferação e diferenciação celular**

As breves elevações nos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  para a ativação celular são usualmente produzida pela abertura coordenada dos receptores de rianodina e  $IP_3$  em uma região específica, que podemos chamar como sítio de iniciação. A difusão de  $Ca^{2+}$  através do citosol excitando os receptores vizinhos levam à produção de uma onda de  $[Ca^{2+}]_i$ , que poderá propagar-se por longas distâncias através de contínuas, porém regenerativas, liberações de  $Ca^{2+}$  de domínios celulares especializados separados por regiões passivas para a difusão de  $[Ca^{2+}]_i$  (Laskey et al., 1998; Simpson et al., 1997; Yagodin et al., 1995). Estes sítios de propagação das ondas de  $[Ca^{2+}]_i$  foram identificados como sendo regiões ricas em proteínas do ER: SERCA, calreticulina,  $IP_3Rs$  e como regiões em que as mitocôndrias são presentes (Laskey et al., 1998; Sheppard et al., 1997; Simpson et al., 1997; Vallot et al., 2001). Um evento global de  $[Ca^{2+}]_i$  é criado pela liberação coordenada a partir de todos os receptores, utilizando o  $Ca^{2+}$  como o mensageiro.

Em conclusão, dois tipos principais de eventos de sinalização de  $[Ca^{2+}]_i$  podem ser distinguidos: 1) eventos elementares ou locais (*puffs* e *sparks*); e 2) eventos globais (ondas regenerativas) que requerem coordenação temporal de um número suficiente dos eventos elementares, assim, suas contribuições individuais irão fornecer aditivamente um aumento nas  $[Ca^{2+}]_i$ . Um simples evento de  $[Ca^{2+}]_i$  é capaz de produzir um grande aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  (10-100  $\mu M$ ) em uma pequena região celular, que pode ser menor do que 1 % de seu volume, embora este evento aumente a  $[Ca^{2+}]_i$  global em menos de 2 nM (Jaggard et al., 1998a; Jaggard

et al., 1998b; Nelson et al., 1995). Os eventos locais de  $[Ca^{2+}]_i$  têm o potencial para modular processos dependentes de  $Ca^{2+}$  que não são responsivos aos aumentos globais de  $[Ca^{2+}]_i$ , tais como a ativação de quinases e fosfatases que também são irregularmente distribuídos no citoplasma. A ativação de quinases e fosfatases diferentes poderia levar à ativação de diferentes vias de transcrição.

***CONCLUSÕES  
FINAIS***



## 8. CONCLUSÕES FINAIS

Os receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2X<sub>4</sub>, ou os heteromultímeros de P2X que possuam uma farmacologia semelhante à do subtipo P2X<sub>4</sub>, são os responsáveis pelos aumentos transientes na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidos pelo ATP nas células embriônicas P19;

Os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>6</sub> e os subtipos P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>2b</sub> foram os principais mediadores das respostas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> em células P19 diferenciadas em neurônios;

O receptor P2Y<sub>1</sub> é o principal subtipo purinérgico que regula a proliferação e a diferenciação neuronal, seguido pelo receptor P2Y<sub>2</sub>;

As subunidades dos receptores nicotínicos α<sub>2</sub> ao α<sub>7</sub>, β<sub>2</sub> e β<sub>4</sub> e os subtipos M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> são expressos durante a diferenciação neuronal. Enquanto os nAChRs são funcionais tanto em células P19 embriônicas e diferenciadas em neurônios, os mAChRs são funcionais somente após a indução da diferenciação;

Os nAChRs mediam a atividade de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pelo influxo de cálcio a partir do meio extracelular em células embriônicas. Em células neuronais, as elevações transientes de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> são devidas à mobilização do cálcio extracelular e do retículo endoplasmático, pela ativação dos receptores de rianodina;

O bloqueio dos mAChRs acoplados à proteína Gα<sub>q/11</sub>, que leva à produção de IP<sub>3</sub>, e os mAChRs acoplados à Gα<sub>i/o</sub>, que inibem a síntese do cAMP, respectivamente, induziram a proliferação e a diferenciação neuronal das células progenitoras neuronais;

Em células embriônicas, os nAChRs inibiram a proliferação celular, talvez pela ausência dos receptores de rianodina;

Os nAChRs medeiam os efeitos proliferativos através da mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular do retículo endoplasmático via ativação dos receptores de rianodina.

## ***REFERÊNCIAS***

## 9. REFERÊNCIAS

- Abrous D.N., Adriani W., Montaron M.F., Aurousseau C., Rougon G., Le Moal M., Piazza P.V. (2002) Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 22, 3656-62.
- Adhikari A., Penatti C.A., Resende R.R, Ulrich H., Britto L.R., Bechara E.J. (2006) 5-Aminolevulinate and 4, 5-dioxovalerate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res.* 1093, 95-104.
- Agresti C., Meomartini M.E., Amadio S., Ambrosini E., Serafini B., Franchini L., Volonte C., Aloisi F., Visentin S. (2005) Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development. *Glia.* 50, 132-44.
- Alcazar A., Martin de la Vega C., Bazan E., Fando J.L., Salinas M. (1997) Calcium mobilization by ryanodine promotes the phosphorylation of initiation factor 2alpha subunit and inhibits protein synthesis in cultured neurons. *J. Neurochem.* 69, 1703-8.
- Aldana M., Cluzel P. (2003) A natural class of robust networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 8710-4.
- An S., Bleu T., Zheng Y. (1999) Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol. Pharmacol.* 55, 787-94.
- Arslan G., Filipeanu C.M., Irenius E., Kull B., Clementi E., Allgaier C., Erlinge D., Fredholm B.B. (2000) P2Y receptors contribute to ATP-induced increases in intracellular calcium in differentiated but not undifferentiated PC12 cells. *Neuropharmacology.* 39, 482-96.
- Arthur D.B., Akassoglou K., Insel P.A. (2005) P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 19138-43.

- Arthur J.M., Lawrence M.S., Payne C.R., Rane M.J., McLeish K.R. (2000) The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 538-41.
- Ashkenazi A., Ramachandran J., Capon D.J. (1989) Acetylcholine analogue stimulates DNA synthesis in brain-derived cells via specific muscarinic receptor subtypes. *Nature.* 340, 146-50.
- Ashkenazi A., Winslow J.W., Peralta E.G., Peterson G.L., Schimerlik M.I., Capon D.J., Ramachandran J. (1987) An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science.* 238, 672-5.
- Atluri P., Fleck M.W., Shen Q., et al., (2001) Functional nicotinic acetylcholine receptor expression in stem and progenitor cells of the early embryonic mouse cerebral cortex. *Dev. Biol.* 240, 143-56.
- Bartlett P.F., Brooker G.J., Faux C.H., Dutton R., Murphy M., Turnley A., Kilpatrick T.J. (1998) Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain. *Immunol. Cell Biol.* 76, 414-8.
- Bayer S.A., Altman J. (1995) Development: neurogenesis and neuronal migration. In *The Rat Nervous System*, (Paxinos G, ed.), pp 1041—1078 San Diego: Academic Press.
- Beck A., Nieden R.Z., Schneider H.P., Deitmer J.W. (2004) Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium.* 35, 47-58.
- Berg R.W., McBurney M.W. (1990) Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *Dev Biol.* 138, 123-35.
- Berridge M.J. (1997) Elementary and global aspects of Ca<sup>2+</sup> signalling. *J. Physiol.* 499, 291-306.
- Berridge M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 21, 3 – 26.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000) The versatility and universality of Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.

Biagiono S., Tata A.M., De Jaco A., Augusti-Tocco G. (2000). Acetylcholine synthesis and neuron differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 689–97.

Bianchi B.R., Lynch K.J., Touma E., Niforatos W., Burgard E.C., Alexander K.M., Park H.S., Yu H., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis M.F., van Biesen T. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 127–38.

Bignami F., Bevilacqua P., Biagioni S., De Jaco A., Casamenti F., Felsani A., Augusti-Tocco G. (1997) Cellular acetylcholine content and neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 69, 1374-81.

Birdsall N.J., Curtis C.A., Eveleigh P., Hulme E.C., Pedder E.K., Poyner D., Wheatley M. (1988) Muscarinic receptor subtypes and the selectivity of agonists and antagonists. *Pharmacology.* 37, 22-31.

Blusztajn J.K., Cermak J.M., Holler T., Jackson D.A. (1998) Imprinting of hippocampal metabolism of choline by its availability during gestation: implications for cholinergic neurotransmission. *J. Physiol. Paris.* 92, 199-203.

Bo X., Zhang Y., Nassar M., Burnstock G., Schoepfer R. (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375, 129-33.

Bonner T.I., Young A.C., Brann M.R., Buckley N.J. (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1, 403-10.

Bootman M.D., Berridge M.J., Roderick H.L. (2002) Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* 12, R563-5.

Bootman M.D., Lipp P., Berridge M.J. (2001) The organisation and functions of local Ca<sup>2+</sup> signals. *J. Cell. Sci.* 114, 2213-22.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 71, 248-54.

- Buckley N.J., Bonner T.I., Buckley C.M., Brann M.R. (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cell. *Mol. Pharmacol.* 35, 469-76.
- Buisson B., Bertrand D. (2001) Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurosci.* 21, 1819-29.
- Buonanno A., Fields R.D. (1999) Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 110-20.
- Burnstock G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology.* 36, 1127-39.
- Burnstock G. (2006a) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166-76.
- Burnstock G. (2006b) Purinergic signalling. *Br. J. Pharmacol.* 147, S172-81.
- Buznikov G.A., Shmukler Y.B., Lauder J.M. (1996) From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 533-59.
- Calabresi P., Centonze D., Gubellini P., Pisani A., Bernardi G. (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci.* 23, 120-6.
- Calof A.L. (1995). Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Curr. Op. Neurobiol.* 5, 19-27.
- Camello C., Lomax R., Petersen O.H., Tepikin A.V. (2002) Calcium leak from intracellular stores—the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium.* 32, 355-61.
- Carey M.B., Matsumoto S.G. (1999) Neurons differentiating from murine neural crest in culture exhibit sensory or sympathetic-like calcium currents. *J. Neurobiol.* 39, 501-14.
- Cauley K., Marks M., Gahring L.C., Rogers S.W. (1996) Nicotinic receptor subtypes alpha 3, alpha 4, and beta 2 and high affinity nicotine binding sites are expressed by P19 embryonal cells. *J. Neurobiol.* 30, 303-14.

Caulfield M.P. (1997) Muscarinic receptor classification, in *Muscarinic Receptor Subtypes in Smooth Muscle* (Eglen RM ed) pp 1-37, CRC Press, New York.

Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50, 279–90.

Chang H.H., Oh P.Y., Ingber D.E., Huang S. (2006) Multistable and multistep dynamics in neutrophil differentiation. *BMC Cell Biol.* 28, 7:11.

Chang L., Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410, 37–40.

Changeux J., Edelstein S.J. (2001) Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 369–77.

Chen C.C., Akopian A.N., Sivilotti L., Colquhoun D., Burnstock G., Wood J.N. (1995) A P2X purinoceptors expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* 377, 428–31.

Cheung K.K., Chan W.Y., Burnstock G. (2005) Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience.* 133, 937-45.

Collo G., North R.A., Kawashima E., Merlopich E., Neidhart S., Surprenant A., Buell G. (1996). Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosc.* 16, 2495–507.

Cook S.P., Vulchanova L., Hargreaves K.M., Elde R., McCleskey E.W. (1997) Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature.* 387, 505-8.

Corbetta S., Lania A., Filopanti M., Vicentini L., Ballare E., Spada A. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2201-5.

Crespo P., Xu N., Simonds W.F., Gutkind J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature.* 369, 418-20.

Dajas-Bailador F.A., Mogg A.J., Wonnacott S. (2002) Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> stores. *J. Neurochem.* 81, 606-14.

Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91, 231-41.

Dayanithi G., Mechaly I., Viero C., et al. (2006) Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in rat motoneurons during development. *Cell Calcium.* 39, 237-46.

de Jesus Ferreira M.C., Helies-Toussaint C., Imbert-Teboul M., Bailly C., Verbavatz J.M., Bellanger A.C., Chabardes D. (1998) Co-expression of a Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 273, 15192-202.

Demaurex N., Lew D.P., Krause K.H. (1992) Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 267, 2318-24.

Doelman C.J., Sprong R.C., Nagtegaal J.E., Rodrigues de Miranda J.F., Bast A. (1991) Prejunctional muscarinic receptors on cholinergic nerves in guinea pig airways are of the M2 subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 193, 117-19.

Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C., Healy J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386, 855-8.

Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S. (1998) Ca<sup>2+</sup> oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392, 933-6.

Dubyak G.R., El-Moatassim C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* 265, 577-606.

Edwards F.A., Gibb A.J., Colquhoun D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359, 144-7.



Edwards M.K., Harris J.F., McBurney M.W. (1983) Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol. Cell Biol.* 3, 2280-6.

Evans R.J., Derkach V., Surprenant A. (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 357, 503-5.

Felder C.C. (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9, 619-25.

Ferrari M.B., Ribbeck K., Hagler D.J., Spitzer N.C. (1998) A calcium signaling cascade essential for myosin thick filament assembly in *Xenopus* myocytes. *J. Cell Biol.* 141, 1349-56.

Ferrell J.E., Xiong W. (2001) Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos.* 11, 227-36.

Fieber L.A., Adams D.J. (1991) Acetylcholine-evoked currents in cultured neurons dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J. Physiol.* 434, 215-37.

Foucart S., Gibbons S.J., Brorson J.R., Miller R.J. (1995) Increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by CCh in adult rat sympathetic neurons are not dependent on intracellular  $Ca^{2+}$  pools. *Am. J. Physiol.* 268, 829-37.

Frucht H., Jensen R.T., Dexter D., Yang W.L., Xiao Y. (1999) Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin. Cancer Res.* 5, 2532-9.

Fuentealba J., Olivares R., Ales E., et al. (2004) A choline-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *FASEB J.* 18, 1468-70.

Fumagalli M., Brambilla R., D'Ambrosi N., Volonte' C., Matteoli M., Verderio C., Abracchio M.P. (2003) Nucleotide-mediated calcium signalling in rat cortical astrocytes: role of P2X and P2Y receptors. *Glia.* 43, 218-30.

- Gafni J., Munsch J.A., Lam T.H., Catlin M.C., Costa L.G., Molinski T.F., Pessah I.N. (1997) Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Neuron*, 19, 723–33.
- Gangemi R.M.R., Perera M., Corte G. (2004) Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells. *J. Neurochem.* 89, 286–306.
- Giannopoulou C., Roehrich N., Mombelli A. (2001) Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J. Clin. Periodontol.* 28, 769-75.
- Gomez T.M., Spitzer N.C. (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature.* 397, 350-5.
- Gotti C., Fornasari D., Clementi F. (1997) Human neuronal nicotinic receptors, *Prog. Neurobiol.* 53, 199–237.
- Grando S.A. (1997). Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2, 41–8.
- Greenwood J.M., Dragunow M. (2002) Muscarinic receptor-mediated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 82, 389-97.
- Gritti A., Frolichsthal-Schoeller P., Galli R., Parati E.A., Cova L., Pagano S.F., Bjornson C.R, Vescovi A.L. (1999) Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J. Neurosci.* 19, 3287-97.
- Grobstein C. (1959) Autoradiography of the interzone between tissues in inductive interaction. *J. Exp. Zool.* 142, 203-13.
- Gu X., Spitzer N.C. (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous neuronal Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature.* 375, 784-7.

Guan Z.Z., Yu W.F., Nordberg A. (2003) Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 43, 243-9.

Guizzetti M., Costa P., Peters J., Costa L.G. (1996) Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 297, 265-73.

Hallett M.B., Dormer R.L., Campbell A.K. (1990) In *Peptide Hormone Action: A Practical Approach*, (Siddle K and Hutton JC, eds.), pp 115-150 New York: Oxford University Press.

Hamilton S.E., Nathanson N.M. (2001) The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 15850-3.

Handlogten M.E., Huang C., Shiraishi N., Awata H., Miller R.T. (2001) The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a Gqalpha -dependent ERK-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 13941-8.

Hansen T.V.O., Rehfeld J.F., Nielsen F.C. (2000) Cyclic AMP-induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* 75, 1870-7.

Hardy A.R., Conley P.B., Luo J., Benovic J.L., Poole A.W., Mundell S.J. (2005) P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood.* 105, 3552-60.

He M.L., Koshimizu T.A., Tomic M., Stojilkovic S.S. (2002) Purinergic P2X(2) receptor desensitization depends on coupling between ectodomain and C-terminal domain. *Mol. Pharmacol.* 62, 1187-97.

Ho C.L., Liem R.K. (1996) Intermediate filaments in the nervous system: implications in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 483-97.

Hogg R.C., Chipperfield H., Whyte K.A., Stafford M.R., Hansen M.A., Cool S.M., Nurcombe V., Adams D.J. (2004) Functional maturation of isolated neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2410-20.

- Hogg R.C., Raggenbass M., Bertrand D. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147, 1–46.
- Horiuchi Y., Kimura R., Kato N., Fujii T., Maseko S., Endo T., Kato T., Kawashima K. (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* 72, 1745–56.
- Huang C., Handlogten M.E., Miller R.T. (2002) Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by the extracellular calcium-sensing receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 20293-300.
- Huang S., Eichler G., Bar-Yam Y., Ingber D.E. (2005) Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys. Ver. Lett.* 94, 128701:5.
- Jaggari J.H., Stevenson A.S., Nelson M.T. (1998a) Voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> sparks in intact cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 274, C1755–61.
- Jaggari J.H., Wellman G.C., Heppner T.J., Porter V.A., Perez G.J., Gollasch M., Kleppisch T., Rubart M., Stevenson A.S., Lederer W.J. *et al.* (1998b) Ca<sup>2+</sup> channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol. Scand.* 164, 577–87.
- Jimenez E., Montiel M. (2005) Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells. *J. Cell Physiol.* 204, 678-86.
- Johnson J.R., Chu A.K., Sato-Bigbee C. (2000) Possible role of CREB in the stimulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation by neurotrophin-3. *J. Neurochem.* 74, 1409-17.
- Jolkonen M., van Giersbergen P.L., Hellman U., Wernstedt C., Karlsson E. (1994) A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. *FEBS Lett.* 352, 91-4.
- Jones-Villeneuve E.M., McBurney M.W., Rogers K.A., Kalnins V.I. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* 94, 253-62.

Jonk L.J.C., de Jonge M., McBurney M.W., Reuhl K.R., Ally A.I., Nasipuri S., Bell J.C., Craig J. (1988) Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* 8, 1063-73.

Jr. Putney J.W., Broad L.M., Braun F.J., Lievremont J.P., Bird G.S. (2001) Mechanisms of capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *J. Cell Sci.* 114, 2223-9.

Kadanoff L.P. (2000) *Statistical Physics: Statics, Dynamics and Renormalization* World Scientific, Singapore, River Edge, N.J.

Katada T., Ui M. (1982) ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by is letal activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 257, 7210–6.

Kauffman S. (1993) *The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution* (Oxford Univ. Press, New York).

Kauffman S. (1995) *At Home in the Universe* (Oxford Univ. Press, New York).

Kawashima K., Fujii T. (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Therap.* 86, 29–48.

Kawashima K., Fujii T. (2004) Expression of nonneuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front. Biosci.* 9, 2063–85.

Kifor O., Diaz R., Butters R., Brown E.M. (1997) The  $Ca^{2+}$ -sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Bone Miner. Res.* 12, 715-25.

Kifor O., MacLeod R.J., Diaz R., Bai M., Yamaguchi T., Yao T., Kifor I., Brown E.M. (2001) Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280, F291-302.

Kim S.S., Choi J.M., Kim J.W., Ham D.S., Ghil S.H., Kim M.K., Kim-Kwon Y., Hong S.Y., Ahn S.C., Kim S.U., Lee Y.D., Suh-Kim H. (2005) cAMP induces neuronal differentiation of

mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK. *Neuroreport*. 16, 357-61.

King B.F., Townsend-Nicholson A. (2000) Recombinant P2Y receptors: the UCL experience. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 164-70.

Koblar S.A., Turnley A.M., Classon B.J., Reid K.L., Ware C.B., Cheema S.S., Murphy M., Bartlett P.F. (1998) Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3178-81.

Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G., Thal L.J., Gage F.H. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17, 5820-9.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-5.

Lambrecht G. (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 340-50.

Lammerding-Koppel M., Greiner-Schroder A., Drews U. (1995) Muscarinic receptors in the prenatal mouse embryo. Comparison of M35-immunohistochemistry with [<sup>3</sup>H] quinuclidinyl benzylate autoradiography. *Histochem. Cell Biol.* 103, 301-10.

Lanzafame A.A., Christopoulos A., Mitchelson F. (2003) Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels*. 9, 241-60.

Larocca J.N., Almazan G. (1997) Acetylcholine agonists stimulate mitogen-activated protein kinase in oligodendrocyte progenitors by muscarinic receptors. *Neurosci. Res.* 50, 743-54.

Laskey A.D., Roth B.J., Simpson P.B., Russell J.T. (1998) Images of Ca<sup>2+</sup> flux in astrocytes: evidence for spatially distinct sites of Ca<sup>2+</sup> release and uptake. *Cell Calcium*. 23, 423-32.

Lautermilch N.J., Spitzer N.C. (2000) Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J. Neurosci.* 20, 315-25.

- Lazarowski E.R., Paradiso A.M., Watt W.C., Harden T.K., Boucher R.C. (1997) UDP activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the P2Y2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* A94, 2599–603.
- Le K.T., Babinski K., Seguela P. (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subtypes coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci.* 18, 7152-9.
- Le Novere N., Changeux J.P. (1995) Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40, 155–172.
- Lee M.M., Badache A., De Vries H. (1999) Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J. Neurosci. Res.* 55, 702-12.
- Lekanne Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F. (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.* 307, 63-9.
- Lemoli R.M., Ferrari D., Fogli M., Rossi L., Pizzirani C., Forchap S., Chiozzi P., Vaselli D., Bertolini F., Foutz T., Aluigi M., Baccarani M., Di Virgilio F. (2004) Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood.* 104, 1662-70.
- Levitt P., Harvey J.A., Friedman E., Simansky K., Murphy E.H. (1997) New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* 20, 269-74.
- Lewis C., Neidhart S., Holy C., North R.A., Buell G., Surprenant A. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subtypes can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* 377, 432–5.
- Li B.S., Ma W., Zhang L., Barker J.L., Stenger D.A., Pant H.C. (2001) Activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) and extracellular regulated kinases (Erk1/2) is involved in muscarinic receptor-mediated DNA synthesis in neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 21, 1569-79.
- Li W., Llopis J., Whitney M., Zlokarnik G., Tsien R.Y. (1998) Cell-permeant caged InsP<sub>3</sub> ester shows that Ca<sup>2+</sup> spike frequency can optimize gene expression. *Nature.* 392, 936-41.

- Liao C.F., Themmen A.P., Joho R., Barberis C., Birnbaumer M., Birnbaumer L. (1989) Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 7328-37.
- Lindstrom J. (1997) Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease, *Mol. Neurobiol.* 15, 193–222.
- Lindstrom J. (2000) The structures of neuronal nicotinic receptors In: F. Clementi, D. Fornasari and C. Gotti, Editors, *Handbook of Experimental Pharmacology Vol. Neuronal Nicotinic Receptors*, Springer, Berlin, pp. 101–162.
- Ling K.K., Siow N.L., Choi R.C., Ting A.K., Kong L.W., Tsim K.W. (2004) ATP potentiates agrin-induced AChR aggregation in cultured myotubes: activation of RhoA in P2Y1 nucleotide receptor signaling at vertebrate neuromuscular junctions. *J. Biol. Chem.* 279, 31081-8.
- Lopez-Illasaca M., Crespo P., Pellici P.G., Gutkind J.S., Wetzker R. (1997) Linkage of G-protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI-3 kinase- $\gamma$ . *Science.* 275, 394-7.
- Lopez-Toledano M.A., Redondo C., Lobo M.V., Reimers D., Herranz A.S., Paino C.L., Bazán E. (2004) Tyrosine hydroxylase induction by basic fibroblast growth factor and cyclic AMP analogs in striatal neural stem cells: role of ERK1/ERK2 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 1177-89.
- Ma W., Li B-S., Zhang L., Pant H.C. (2004) Signaling cascades implicated in muscarinic regulation of proliferation of neural stem and progenitor cells. *Drug News Perspect.* 17, 258–66.
- Ma W., Maric D., Li B.S., Hu Q., Andreadis J.D., Grant G.M., Liu Q.Y., Shaffer K.M., Chang Y.H., Zhang L., Pancrazio J.J., Pant H.C., Stenger D.A., Barker J.L. (2000) Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1227-40.
- Mailland M., Waelchli R., Ruat M., Boddeke H.G., Seuwen K. (1997) Stimulation of cell proliferation by calcium and a calcimimetic compound. *Endocrinology.* 138, 3601-5.



- Marszalec W., Yeh J.Z., Narahashi T. (2005) Desensitization of nicotine acetylcholine receptors: modulation by kinase activation and phosphatase inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 83-90.
- Matsui M., Yamada S., Oki T., Manabe T., Taketo M.M., Ehlert F.J. (2004) Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sci.* 75, 2971-81.
- May R.M. (1972) Will a large complex system be stable? *Nature.* 238, 413-4.
- McBurney M.W., Jones-Villeneuve E.M., Edwards M.K., Anderson P.J. (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature.* 299, 165-7.
- McGehee D.S., Role L.W. (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 521-46.
- McLaren G.J., Sneddon P., Kennedy C. (1998). Comparison of the actions of ATP and UTP and P(2X1) receptors in smooth muscle of the rat tail artery. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 139-44.
- McNeil S.E., Hobson S.A., Nipper V., Rodland K.D. (1998) Functional calcium-sensing receptors in rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 273, 1114-20.
- Meldolesi J. (2001) Rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Prog. Neurobiol.* 65, 309-38.
- Metzen J., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Kilbinger H., Wessler I. (2003) Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M<sub>1</sub> subtype. *Life Sci.* 72, 2075-80.
- Meyer M.P., Clarke J.D., Patel K., Townsend-Nicholson A., Burnstock G. (1999) Selective expression of purinoceptor cP2Y1 suggests a role for nucleotide signalling in development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* 214, 152-8.

Michel A.D., Delmendo R.E., Lopez M., Whiting R.L. (1990) On the interaction of gallamine with muscarinic receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 182, 335-45.

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

Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic Ca<sup>2+</sup> based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264, 8171-8.

Mishra S.K., Braun N., Shukla V., Fullgrabe M., Schomerus C., Korf H.W., Gachet C., Ikehara Y., Sevigny J., Robson S.C., Zimmermann H. (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development.* 133, 675-84.

Molinari E.J., Delbono O., Messi M.L., Renganathan M., Arneric S.P., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M. (1998) Up-regulation of human alpha7 nicotinic receptors by chronic treatment with activator and antagonist ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 131-9.

Mori F., Fukaya M., Abe H., Wakabayashi K., Watanabe M. (2000) Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain, *Neurosci. Lett.* 285, 57-60.

Neary J.T., Rathbone M.P., Cattabeni F., Abbracchio M.P., Burnstock G. (1996) Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 19, 13-8.

Nelson M.T., Cheng H., Rubart M., Santana L.F., Bonev A.D., Knot H.J., Lederer W.J. (1995) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* 270, 633-7.

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

Nörenberg W.; Illes P. (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 324-39.

North, R.A. (1996) P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp.* 198, 91-109.

Olianas M.C., Adem A., Karlsson E., Onali P. (1996) Rat striatal muscarinic receptors coupled to the inhibition of adenylyl cyclase activity: potent block by the selective m4 ligand muscarinic toxin 3 (MT3). *Br. J. Pharmacol.* 118, 283-8.

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

Peralta E.G., Ashkenazi A., Winslow J.W., Ramachandran J., Capon D.J. (1988) Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature.* 334, 434-7.

Pyle S.J., Roberts K.G., Reuhl K.R. (2001) Delayed expression of the NFH subunit in differentiating P19 cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 132, 103-6.

Ralevic V., Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Reviews.* 50, 413-92.

Rathouz M.M., Berg D.K. (1994) Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J. Neurosci.* 14, 6935-45.

Rayford W., Noble M.J., Austenfeld M.A., Weigel J., Mebust W.K., Shah G.V. (1997) Muscarinic cholinergic receptors promote growth of human prostate cancer cells. *Prostate.* 30, 160-6.

Ridley D.L., Pakkanen J., Wonnacott S. (2002) Effects of chronic drug treatments on increases in intracellular calcium mediated by nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1051-9.

Rosenblum K., Futter M., Jones M., Hulme E.C., Bliss T.V. (2000) ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J. Neurosci.* 20, 977-85.

- Sailer M., Oppitz M., Drews U. (2000) Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation. *Anat. Embryol. (Berl)*. 201, 27–37.
- Scemes E., Duval N., Meda P. (2003) Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 23, 11444-52.
- Schlumpf M., Palacios J.M., Cortes R., Lichtensteiger W. (1991) Regional development of muscarinic cholinergic binding sites in the prenatal rat brain. *Neuroscience*. 45, 347–57.
- Schulte J.H., Schramm A., Klein-Hitpass L., Klenk M., Wessels H., Hauffa B.P., Eils J., Eils R., Brodeur G.M., Schweigerer L., Havers W., Eggert A. (2005) Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene*. 24, 165–77.
- Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W. (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain  $\alpha 7$ : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13, 596–604.
- Sharma G., Vijayaraghavan S. (2001) Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 4148–53.
- Sheppard C.A., Simpson P.B., Sharp A.H., Nucifoi F.C., Ross C.A., Lange G.D., Russell J.T. (1997) Comparison of type 2-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca<sup>2+</sup> release sites that support Ca<sup>2+</sup> waves in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 68, 2317–27.
- Shiga H., Asou H., Ito E. (2005a) Advancement of differentiation of oligodendrocyte progenitor cells by a cascade including protein kinase A and cyclic AMP-response element binding protein. *Neurosci. Res.* 53, 436-41.
- Shiga H., Yamane Y., Kubo M., Sakurai Y., Asou H., Ito E. (2005b) Differentiation of immature oligodendrocytes is regulated by phosphorylation of cyclic AMP-response element binding protein by a protein kinase C signaling cascade. *J. Neurosci. Res.* 80, 767-76.

Shukla V., Zimmermann H., Wang L., Kettenmann H., Raab S., Hammer K., Sevigny J., Robson S.C., Braun N. (2005) Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80, 600-10.

Simpson P.B., Mehotra S., Lange G.D., Russell J.T. (1997) High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca<sup>2+</sup> release sites in oligodendrocyte processes. *J. Biol. Chem.* 272, 22654–61.

Solovyova N., Veselovsky N., Toescu E.C., Verkhratsky A. (2002) Ca<sup>2+</sup> dynamics in the lumen of the endoplasmic reticulum in sensory neurons: direct visualization of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release triggered by physiological Ca<sup>2+</sup> entry. *EMBO J.* 21, 622–30.

Song P., Sekhon H.S., Jia Y., Keller J.A., Bluszatajn J.K., Mark G.P., Spindel E.R. (2003a) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 63, 214–21.

Song P., Sekhon H.S., Proskocil B., Blusztajn J.K., Mark G.P., Spindel E.R. (2003b) Synthesis of acetylcholine by lung cancer. *Life Sci.* 72, 2159–68.

Songyang Z., Baltimore D., Cantley L.C., Kaplan D.R., Franke T.F. (1997) Interleukin-3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 11345-50.

Spitzer N.C., Lautermilch N.J., Smith R.D., Gomez T.M. (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *BioEssays.* 22, 811-7.

Stoop R., Surprenant A., North R.A. (1997) Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J. Neurophysiol.* 78, 1837-40.

Suzuki M., Muraki K., Imaizumi Y., Watanabe M. (1992) Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump, reduces Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> currents in guinea-pig smooth muscle cells, *Br. J. Pharmacol.* 107, 134-40.

Swiers G., Patient R., Loose M. (2006) Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification. *Dev. Biol.* 294, 525-40.

Takasaki J., Saito T., Taniguchi M., Kawasaki T., Moritani Y., Hayashi K., Kobori M. (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J. Biol. Chem.* 279, 47438-45.

Tarnok A., Ulrich H. (2001) Characterization of pressure-induced calcium response in neuronal cell lines. *Cytometry.* 43, 175-81.

Taupin P., Ray J., Fischer W.H., Suhr S.T., Hakansson K., Grubb A., Gage F.H. (2000) FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron.* 28, 385-97.

Taylor S.C., Peers C. (1999) Store-operated  $Ca^{2+}$  influx and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels coupled to exocytosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Neurochem.* 73, 874–80.

Theilgaard-Monch K., Jacobsen L.C., Borup R., Rasmussen T., Bjerregaard M.D., Nielsen F.C., Cowland J.B., Borregaard N. (2005) The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood.* 105, 1785-96.

Tipton D.A., Dabbous M.K. (1995) Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.* 66, 1056-64.

Tischler A.S. (2000) Divergent differentiation in neuroendocrine tumors of the adrenal gland. *Semin. Diagn. Pathol.* 17, 120–6.

Tischler A.S., Powers J.F., Alroy J. (2004) Animal models of pheochromocytoma. *Histol. Histopathol.* 19, 883–95.

Tobin A.B., Budd D.C. (2003) The anti-apoptotic response of the Gq/11 coupled muscarinic receptor family. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1182–5.

Torres G.E., Egan T.M., Voigt M.M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274, 6653-9.

Trouslard J., Marsh S.J., Brown D.A. (1993) Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* 468, 53–71.

Tu M.T., Luo S.F., Wang C.C., Chien C.S., Chiu C.T., Lin C.C., Yang C.M. (2000) P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1481-9.

Ueno S., Yamada H., Moriyama T., et al. (2002) Measurement of dorsal root ganglion P2X mRNA by SYBR Green fluorescence. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 10, 95-101.

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., Tarnok A., Schaller H.C. (1996) Head-activator induced mitosis of NH15-CA2 cells requires calcium influx and hyperpolarization. *J. Physiol. Paris.* 90, 85-94.

Vallot O., Combettes L., Lompre A.M. (2001) Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. J.* 357, 363–71.

van Koppen C.J., Kaiser B. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.* 98, 197-220.

Verkhatsky A., Shmigol A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurons. *Cell Calcium.* 19, 1–14.

Vijayaraghavan S., Pugh P.C., Zhang Z.W., Rathouz M.M., Berg D.K. (1992) Nicotinic receptors that bind  $\alpha$ -bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca<sup>2+</sup>. *Neuron.* 8, 353–62.

Volonte C., Amadio S., Cavaliere F., D'Ambrosi N., Vacca F., Bernardi G. (2003) Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr. Drug Targets C.N.S. Neurol. Disord.* 2, 403-12.

von Kügelgen I., Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 310–23.

- Walch L., Gascard J.P., Dulmet E., Brink C., Norel X. (2000) Evidence for a M(1) muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. *Br. J. Pharmacol.* 130, 73-8.
- Wang F., Nelson M.E., Kuryatov A., Olale F., Cooper J., Keyser K., Lindstrom J. (1998) Chronic nicotine treatment up-regulates human alpha3 beta2 but not alpha3 beta4 acetylcholine receptors stably transfected in human embryonic kidney cells. *J. Biol. Chem.* 273, 28721–32.
- Wess J., Duttaroy A., Zhang W. *et al.* (2003) M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Recept. Channels.* 9, 279–90.
- Wess, J. (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 423–50.
- Wessler C.J., Kirkpatrick, Racké K. (1999) The cholinergic pitfall: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems including humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 198–205.
- Wessler I., Reinheimer T., Kilbinger H., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Salogo J., Knop J. (2003b) Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci.* 72, 2169–72.
- Williams B.P., Milligan C.J., Street M., Hornby F.M., Deuchars J., Buckley N.J. (2004b) Transcription of the M1 muscarinic receptor gene in neurons and neural progenitors of the embryonic rat forebrain. *J. Neurochem.* 88, 70–7.
- Wissing F., Nerou E.P., Taylor C.W. (2002) A novel Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors. *Biochem. J.* 361, 605–11.
- Wong B.R., Josien R., Choi Y. (1999) TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J. Leukoc. Biol.* 65, 715-24.



Wood E.H., Allen D.G., Jewell B.R. (1975) Preponderance of postsystolic period in the positive inotropic effects of increases in  $(Ca^{2+})$ . *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 8, 201-17.

Wu M.Y., Chow S.N. (2005) Derivation of germ cells from mouse embryonic stem cells. *J. Formos. Med. Assoc.* 104, 697-706.

Xia S.L., Wang L., Cash M.N., Teng X., Schwalbe R.A., Wingo C.S. (2004) Extracellular ATP-induced calcium signaling in mIMCD-3 cells requires both P2X and P2Y purinoceptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F204-14.

Xiang Z., Burnstock G. (2005) Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia.* 52, 119-26.

Xiong W., Ferrell J.E. Jr. (2003) A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature.* 426, 460-5.

Yagodin S., Holtzclaw L.A., Russell J.T. (1995). Subcellular calcium oscillators and calcium influx support agonist-induced calcium waves in cultured astrocytes. *Mol. Cell Biochem.* 149, 137-44.

Yanagida E., Shoji S., Hirayama Y., Yoshikawa F., Otsu K., Uematsu H., Hiraoka M., Furuichi T., Kawano S. (2004) Functional expression of  $Ca^{2+}$  signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Calcium.* 36, 135-46.

Yule D.I., Williams J.A. (1992) U73122 inhibits  $Ca^{2+}$  oscillations in response to cholecystinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 267, 13830-5.

Zhao W.Q., Alkon D.L., Ma W. (2003) c-Src protein tyrosine kinase activity is required for muscarinic receptor-mediated DNA synthesis and neurogenesis via ERK1/2 and c-AMP-responsive element-binding protein signaling in neural precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 72, 334-42.

Zhou C., Wen Z.X., Shi D.M., Xie Z.P. (2004) Muscarinic acetylcholine receptors involved in the regulation of neural stem cell proliferation and differentiation in vitro. *Cell Biol. Int.* 28, 63-7.

Zoli M., Le Novere N., Jr. Hill J.A., Changeux J.P. (1995) Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 15, 1912-39.

***ANEXOS***

## Súmula Curricular

Rodrigo Ribeiro Resende  
Divinópolis, MG, Brasil. 22/09/1976  
Correio eletrônico [resendefesta@yahoo.com.br](mailto:resendefesta@yahoo.com.br)

### 1.1 Nove trabalhos completos publicados

#### \* Contribuição equivalente

1. **Resende, R.R.**; Gomes, K.N.; Adhikari, A.; Britto, L.R.G.; Ulrich, H. (2007) Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of p19 embryonal carcinoma cells *in vitro*. *Cell Calcium*. (no prelo)
2. **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 NMDA-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*.(no prelo)
3. **Resende, R.R.**; Faria, M.; Ulrich, H. (2007) The contribution of nitric oxide and carbon monoxide to neuronal function and development. *Current Medicinal Chemistry / Central Nervous System Agents*.(no prelo)
4. **Resende, R.R.**; Ulrich, H.; Faria, M. (2007) Is there a rational approach for increasing drug specificity? Considerations on CNS target choice and validation. *Recent Patents on Central Nervous System Drug Discovery*. 2, 37-46.
5. Silva, R.L.\*; **Resende, R.R.**\* and Ulrich, H. (2007) Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during embryonal carcinoma P19 cells neuronal differentiation *in vitro*. *Experimental Physiology*. 92, 139-145.
6. Ulrich, H.; Trujillo, C.A.; Nery, A.A.; Alves, J.M.; Majumder, P.; **Resende, R.R.** And Martins, A.H. (2006) DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb Chem High Throughput Screen* 9, 619-632.
7. Adhikari, A., Penatti, C.A.A., **Resende, R.R.**, Ulrich, H., Britto, RG, Bechara, E. (2006). 5-aminolevulinate and 4,5-dioxovalerate ions decrease GABAA receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Research* 1093, 95-104.
8. Martins, A.H.B., **Resende, R.R.**, Majumder, P., Faria, M., Casarini, D.E., Tárnok, A., Colli, W., Pesquero, J.B., Ulrich, H. (2005) Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *Journal of Biological Chemistry* 280, 19576-19586
9. Andrade, R.G.F.; Singi, G; **Resende, R.R.** (2002) Efeitos do extrato de *Allium sativum* (alho) sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. *Revista Lecta*. Bragança Paulista, 20, 167-169.

### 2.1 Ocupação

Bosista de doutorado direto, CAPES, vigência bolsa

### 3.1 Outras informações biográficas

#### 3.1.1. – Principais etapas da carreira

- **Habilitação Técnico em Processamento de Dados (concluído em dezembro de 1994)** – Escola Técnica de Divinópolis.
- **Bacharel em Farmácia (concluído em dezembro de 2001)** - Universidade Federal de Alfenas
- **Modalidade Análises Clínicas (concluído em dezembro de 2002)** - Universidade Federal de Alfenas
- **Bacharel em Ciências Biológicas (concluído em dezembro de 2003)** - Universidade Federal de Alfenas
- **Doutorado Direto em Bioquímica (início julho de 2003 – atual)** – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

#### 3.1.2. – Trabalhos submetidos para publicação (total de 3)

**Resende, R.R.**; Britto, L.R.G.; Ulrich, H. Induction of proliferation and neuronal differentiation by P2Y1 and P2Y2 receptors depends on Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores.

**Resende, R.R.;** Torres, H.A.M; Yuahasi, K.K.; Majumder, P.; Ulrich, H. delivery systems of nucleic acids drugs for *in vivo* use

**Resende, R.R.;** Ulrich, H.; Britto, L.R.G. The role of cholinergic receptors on embryonic and P19 neuronal cells differentiation and proliferation.

3.1.3. – **Manuscritos em preparação para publicação** (total de 3)

**Resende, R.R.;** et al. Cell fates as determinants of hierarchical transitions in hematopoiesis and neuronal differentiation.

**Resende, R.R.;** et al. Cholinergic receptors pathways involved in cell proliferation and neuronal differentiation.

**Resende, R.R.;** et al. Purinergic receptors and their pathways activated on cell proliferation and neuronal differentiation.

3.1.4. – **Demais tipos de publicação** (total de 2)

**Resende, R.R.;** Singi, G. Lidocaína associada à epinefrina mais felipressina x lidocaína com epinefrina 1:100.000. Estudo Hemodinâmico comparativo.. 2003 (Trabalho de conclusão de curso - Graduação em Ciências Biológicas).

**Resende, R.R.;** Singi, G. Efeitos da associação adrenalina+felipressina+lidocaína sobre a pressão arterial e o eletrocardiograma de ratos anestesiados.. 2002 (Estágio curricular em Ciências Biológicas).

3.1.5. – **Prêmios e títulos** (total de 4)

Premio SBBq (Pôster 2006), Sociedade Brasileira de Bioquímica de Biologia Molecular pelo trabalho “**Expression And Activity Of Nicotinic And Muscarinic Acetylcholine Receptors During Neuronal Differentiation In Vitro.**” . **Resende, R.R.;** Gomes, K.N.; Britto, L.R.G.; Ulrich, H.

Premio SBBq (Pôster 2006), Sociedade Brasileira de Bioquímica de Biologia Molecular pelo trabalho “**Detection of alpha 7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons.**” Nery, A.A.; **Resende, R.R.;** Martins, A.H.B.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H.

Premio SBBq (Pôster 2005), Sociedade Brasileira de Bioquímica de Biologia Molecular.

Menção honrosa Poster, Federacao de Sociedades de Biologia Experimental. (2005).

3.1.6. – **Resumos publicados, apresentações orais em congressos, demais tipos de apresentações** (total de 16)

1. **Resende, R.R.** Estudo das Bases Mecanísticas da Diferenciação Neuronal Mediada pela Atividade de Cálcio através dos Receptores Purinérgicos e Colinérgicos. Seminários Gerais do programa de pós-graduação em Bioquímica – Instituto de Química, USP. 22/03/2007. **Convidado especial para apresentação oral**
2. **Resende, R.R.** Convidado especial do curso “Tópicos Avançados em Neurociências” para apresentação do trabalho “Participation of spontaneous Ca<sup>2+</sup>-transients and Ca<sup>2+</sup>-fluxes generated by purinergic and nicotinic acetylcholine receptors in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.”
3. **Resende, R.R.;** Britto, L.R.G.; Ulrich, H. Participation Of Spontaneous Ca<sup>2+</sup>-Transients And Ca<sup>2+</sup>-Fluxes Generated By Purinergic And Nicotinic Acetylcholine Receptors In Neuronal Differentiation Of P19 Embryonal Carcinoma Cells. . SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindóia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. São Paulo: SBBq, 2006. p. 105-105. **Apresentação oral**
4. **Resende, R.R.;** Gomes, K.N.; Britto, L.R.G.; Ulrich, H. Expression And Activity Of Nicotinic And Muscarinic Acetylcholine Receptors During Neuronal Differentiation *In Vitro*. SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindóia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. São Paulo : SBBq, 2006. p. 105-105. **Apresentação oral.**
5. Nery, A.A.; **Resende, R.R.;** Martins, A.H.B.; Trujillo, C.A.; Ulrich, H. Detection of alpha 7 receptor expression and activity during differentiation of PC12 cells to neurons. SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindóia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. Águas de Lindóia, S.P. : SBBq, 2006. p. 104-104.

6. Silva, R.L.; **Resende, R.R.**; Lopes, C.G.; Elias, C.F. ; Ulrich, H. Detection of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>6</sub> purinergic receptor expression during neuronal differentiation of P19 cells by RT-PCR and *in situ* hybridization. SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindoia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. São Paulo : SBBq, 2006. p. 39-39.
7. Lopes, C. G.; Trujillo, C.A.; **Resende, R.R.**; Silva, R.L.; Ulrich, H. Study of P2X<sub>4</sub> receptor function during *in vitro* neuronal differentiation of P19 and PC12 cells through gene knockdown induced by RNAi. SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindoia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. São Paulo : SBBq, 2006. p. 40-40.
8. Ribeiro, C.C.; Martins, A.H.B.; **Resende, R.R.**; Casarini, D.E.; Pesquero, J.B. and Ulrich, H. Detection of peptides resulting from bradykinin hydrolysis during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular) 2006. XXXV. Reunião Annual, 2006, Águas de Lindoia, S.P.. SBBq 2006: XXXV Reunião anual, Programa e CD. Águas de Lindoia, S.P. : SBBq, 2006. p. 103-103.
9. **Resende, R. R.** ; Martins, A. H. B. ; Nery, A. A. ; Ulrich, H. Nicotinic and cholinergic receptors subunits are expressed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. In: SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular), 2005, Águas de Lindoia. XXXIV Reunião Annual. São Paulo: XXXIV Reunião anual, 2005. p. 82-82.
10. Nery, A. A. ; Martins, A. H. B. ; **Resende, R. R.** ; Trujillo, C.A. ; Ulrich, H. Detection and functionality of nicotinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells.. In: SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular), 2005, Águas de Lindoia. XXXIV Reunião Annual. São Paulo : SBBq 2005, 2005. p. 80-80.
11. Martins, A.H.B.; Ribeiro, C.C.; **Resende, R.R.**; Casarini, D.E.; Pesquero, J.B.; Ulrich, H. Kinin-B1 receptor activity during commitment of P19 teratocarcinoma cells to neuronal differentiation.. In: 5th Annual Meeting of the German Society for Cytometry, 2005, Leipzig. Cell Proliferation. Leipzig: Cell Proliferation, 2005. v. 38. p. 192-192. **Apresentação oral.**
12. **Resende, R. R.**; Martins, A.H.B.; Silva, R.L.; Ulrich, H. Differential Expression of Purinergic P2X Receptors During Neuronal Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells in Vitro.. In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambu, MG. SBBq 2004, XXXIII Reunião Anual Programa e Índices. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004. v. XXXIII. p. 80-80
13. Pelegrino, K.O.; Martins, A.H.B.; **Resende, R.R.**; Ulrich, H. Expressão e atividade do receptor P2Y<sub>4</sub> ao longo da diferenciação neuronal.. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo - SIICUSP, 2004, Ribeirão Preto. Simpósio Internacional de Iniciação Científica (CD): Areas biológicas. Ribeirão Preto: SIICUSP, 2004., 2004.
14. Martins, A.H.B.; Faria, M.; **Resende, R.R.**; Pesquero, J.B.; Tarnok, A.; Colli, W.; Ulrich, H. Kinin B2 receptor function during neuronal differentiation of embryonal P19 cells.. In: 14th Annual Conference of the German Society of Cytometry and 17th Heidelberg Cytometry Symposium, 2004, Heidelberg, Alemanha. Final program: 14th Annual Conference of the German Society of Cytometry and 17th Heidelberg Cytometry Symposium.. Heidelberg: : Heidelberg Cytometry Symposium Local Organization, 2004., 2004.
15. **Resende, R. R.**; Singi, G.; Gazola, R. Efeitos do Extrato de *Allium sativum* (alho) sobre a Pressão Arterial de Ratos Anestesiados. (apresentação de trabalho), (Regional) 8ª Jornada de Iniciação Científica de Alfenas e (Nacional) Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Salvador – BA.
16. **Resende, R. R.**; Claudino, A. L. R.; Soares, F.; Gazola, R. Efeitos do Extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) sobre o Coração Isolado de Ratos Anestesiados. (apresentação de trabalho), (Nacional) 4.º Encontro Nacional de Biólogos, 2002, p. 131, Ouro Preto – MG.

### 3.1.7. – **Extensão cultural**

- Participação do “II International Workshop on Imaging Function in Cells and Organisms” (Avanços em Microscopia Confocal e suas Aplicações em Biologia Celular). USP/Ribeirão Preto.
- Monitor da Disciplina de Bioquímica para o curso de Química. Período: Primeiro semestre de 2006.
- Bases Moleculares da Biotecnologia (180 h)
- Neurobiologia I (120 h)
- Bioquímica Avançada (300 h)
- Porção Central do Sistema Nervoso: Um Enfoque Neuroquímico (75 h)

- Neurofisiologia Básica (120 h)
- Comunicação Celular no Sistema Nervoso (90 h)
- Progressos em Neurofisiologia (75 h)
- Preparação Pedagógica (15 h)
- Proteção Radiológica. (40 h)
- Presidente do Diretório Central de Estudantes Leão de Faria Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas – Centro Universitário Federal (EFOA/Ceufe). Período: outubro de 2001 a outubro de 2002
- Presidente do Centro Acadêmico de Farmácia – CAFAR da EFOA/Ceufe. Período: outubro de 2000 a outubro de 2001.
- 1º Tesoureiro do Diretório Central de Estudantes Leão de Faria da EFOA/Ceufe. Período: outubro de 1999 a outubro de 2000.
- Secretário Geral do Diretório Central de Estudantes Leão de Faria da EFOA/Ceufe. Período: outubro de 1998 a outubro de 1999.
- Representante do Corpo Discente junto à Egrégia Congregação da EFOA/Ceufe. Período: março de 1999 a março de 2000.
- Representante do Corpo Discente junto ao Departamento de Ciências Exatas da EFOA/Ceufe. Período: junho de 1999 a fevereiro de 2000.