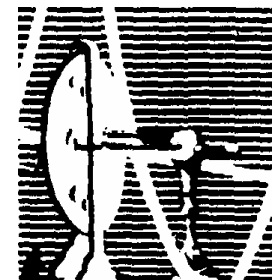




**Sinalização intracelular
ativada por ATP/P2X₇ na
apoptose de macrófagos
intraperitoniais é dependente
de fosfolipase A2 e proteína
cinase C**



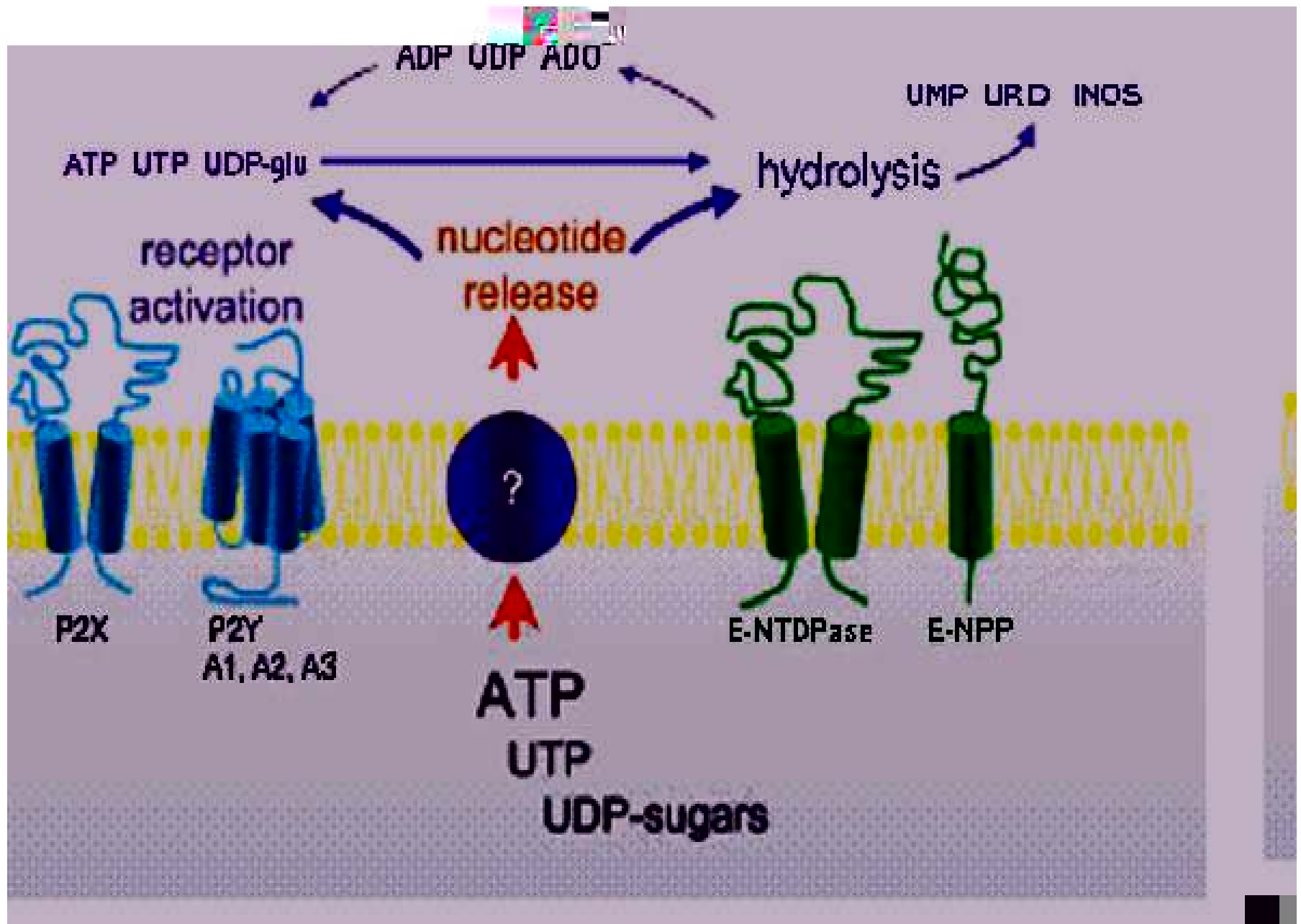
Helio Miranda Costa Junior
Prof. Pedro Muanis Persechini
Lab. Immunobiofísica
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Livros Grátis

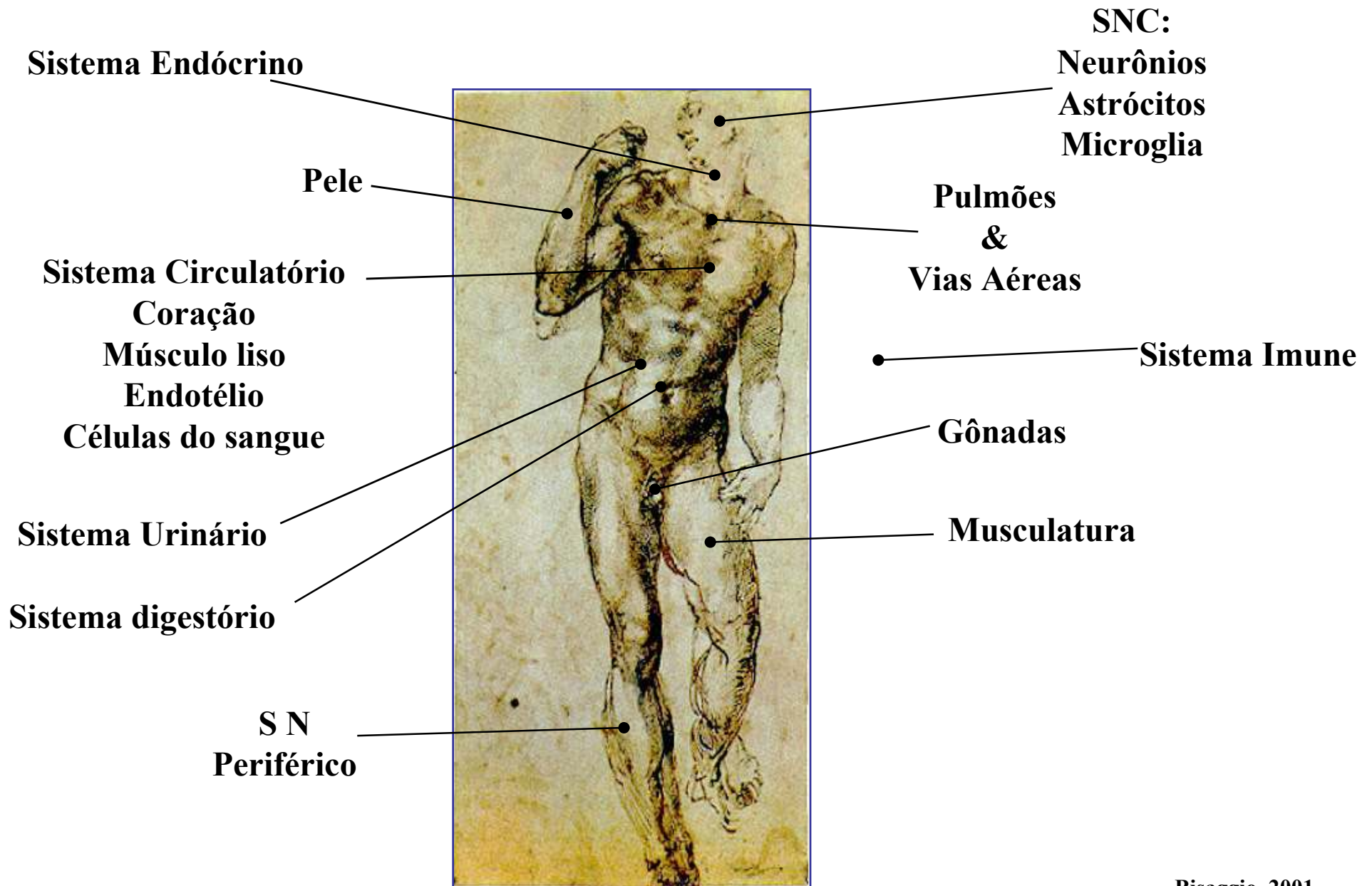
<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

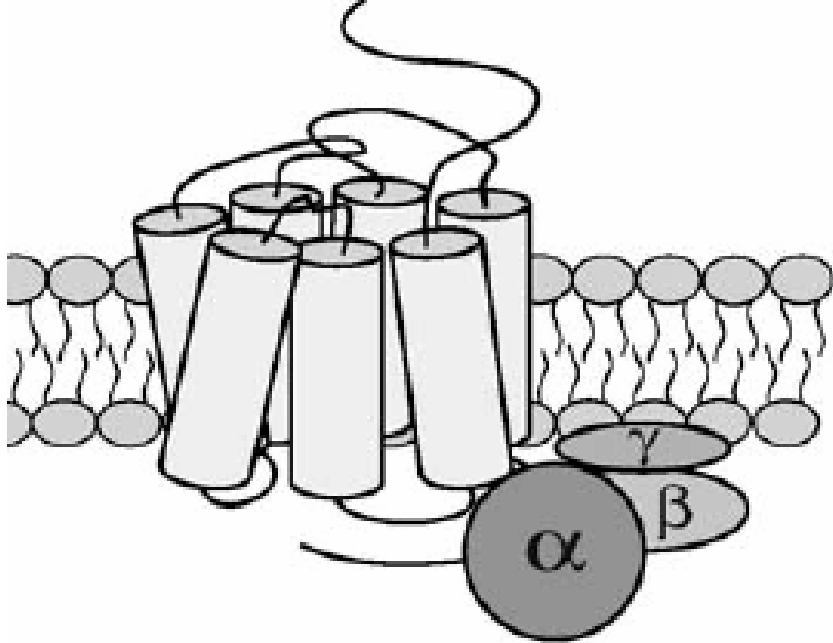
AP



Expressão de Receptores P2

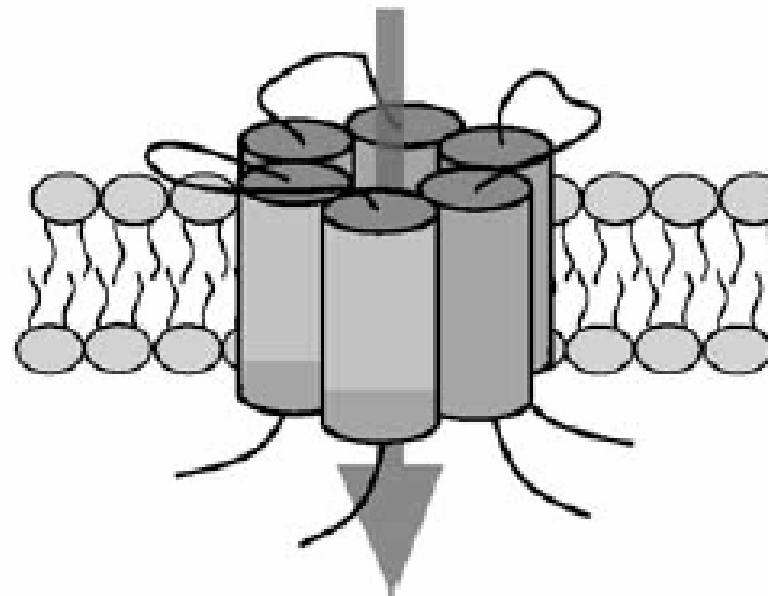


P2Y receptor
(P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14})



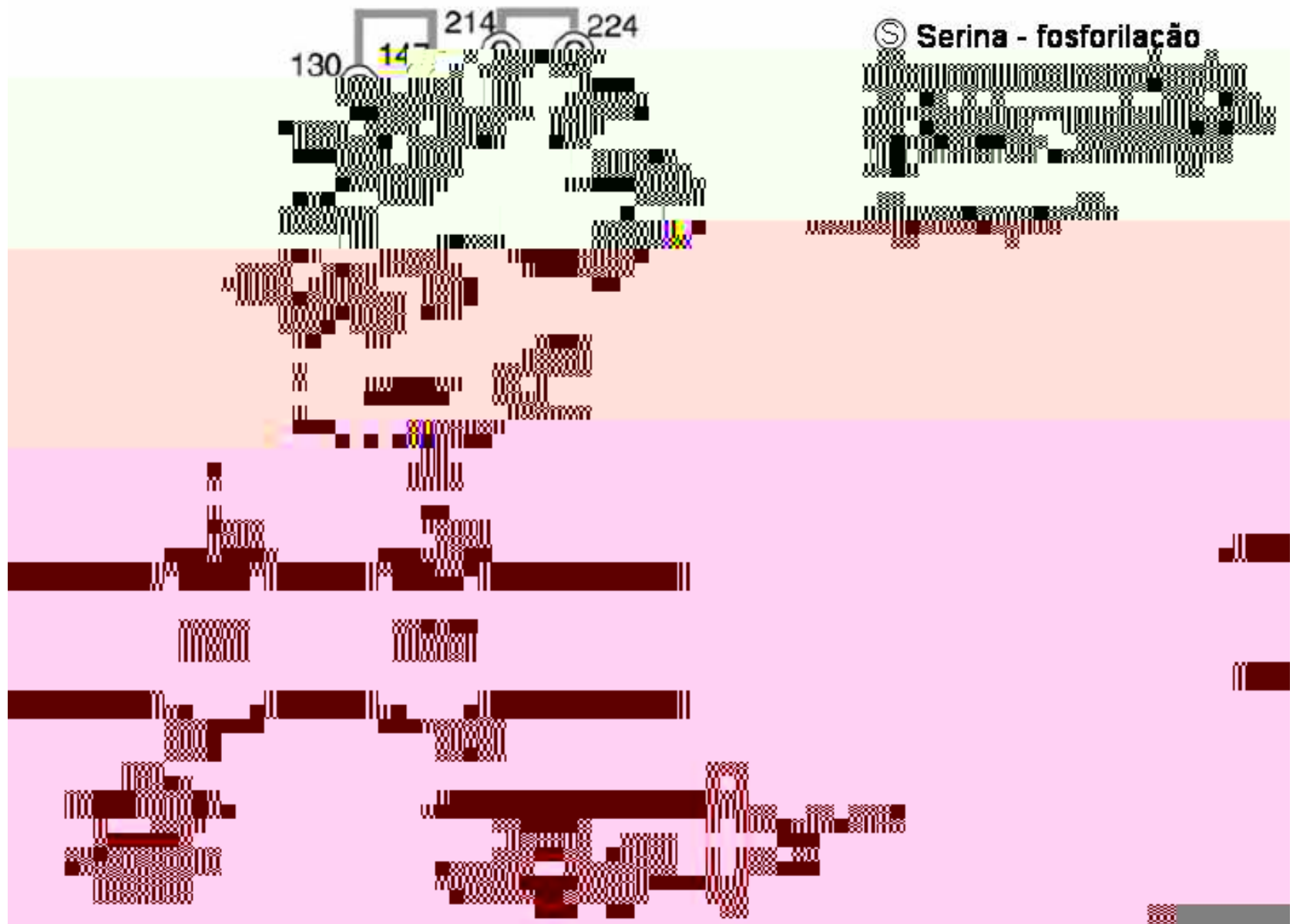
P2X receptor
(P2X₁₋₇)

Na⁺ Ca²⁺

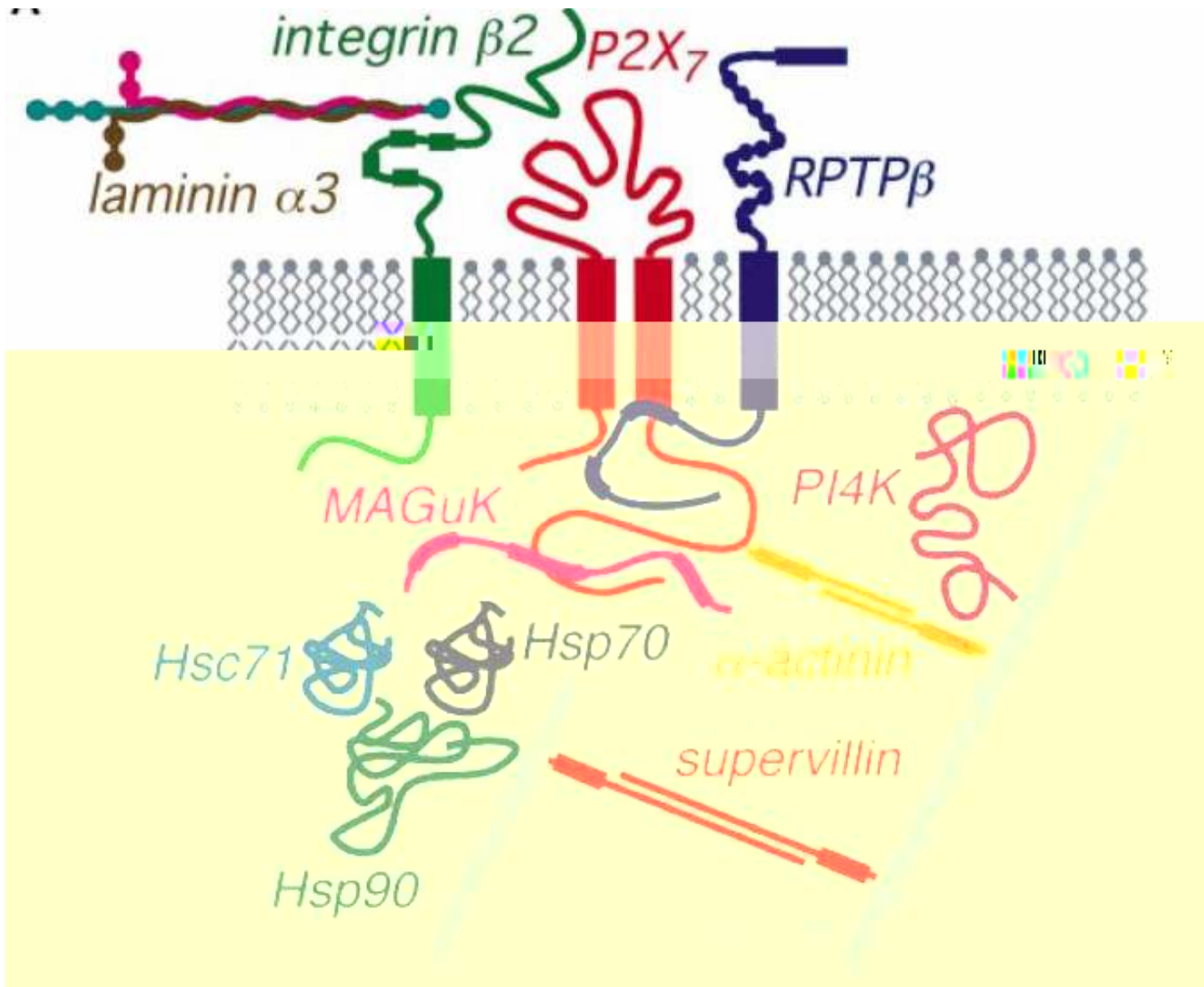


Expressão do Receptor P2X₇ em células do Sistema Imune

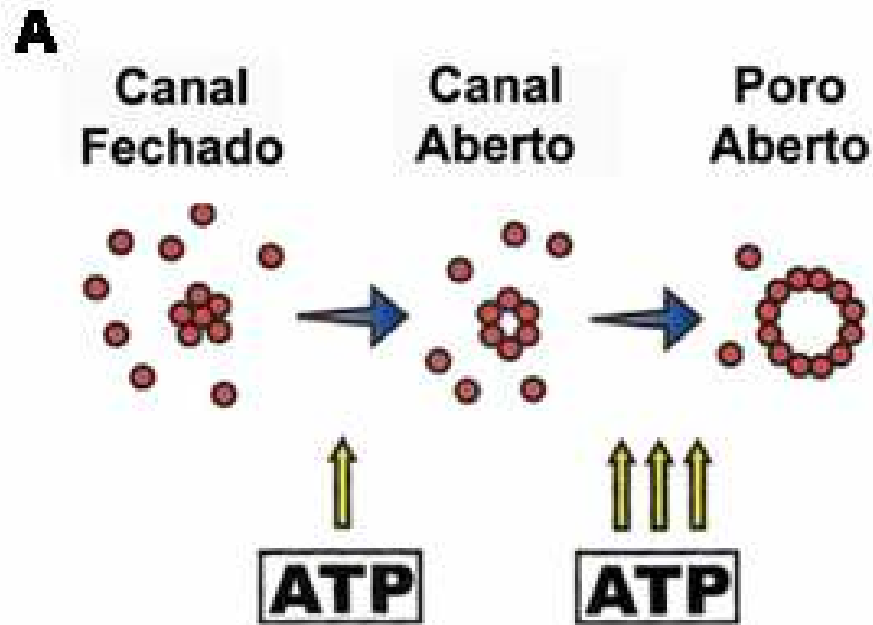
- Linfócitos T / Timócitos - P2X₇, P2X₁, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄
- Linfócitos B - P2X₇, P2Y
- Macrófagos - P2X₇, P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆
- Neutrófilos - P2X₇, P2Y₂
- Mastócitos - P2X₇, P2Y₁, P2Y₂
- NK - P2X₇, P2 (P2X₂ ?)
- Células Dendríticas - P2X₇, P2Y₂, P2Y₆(?)



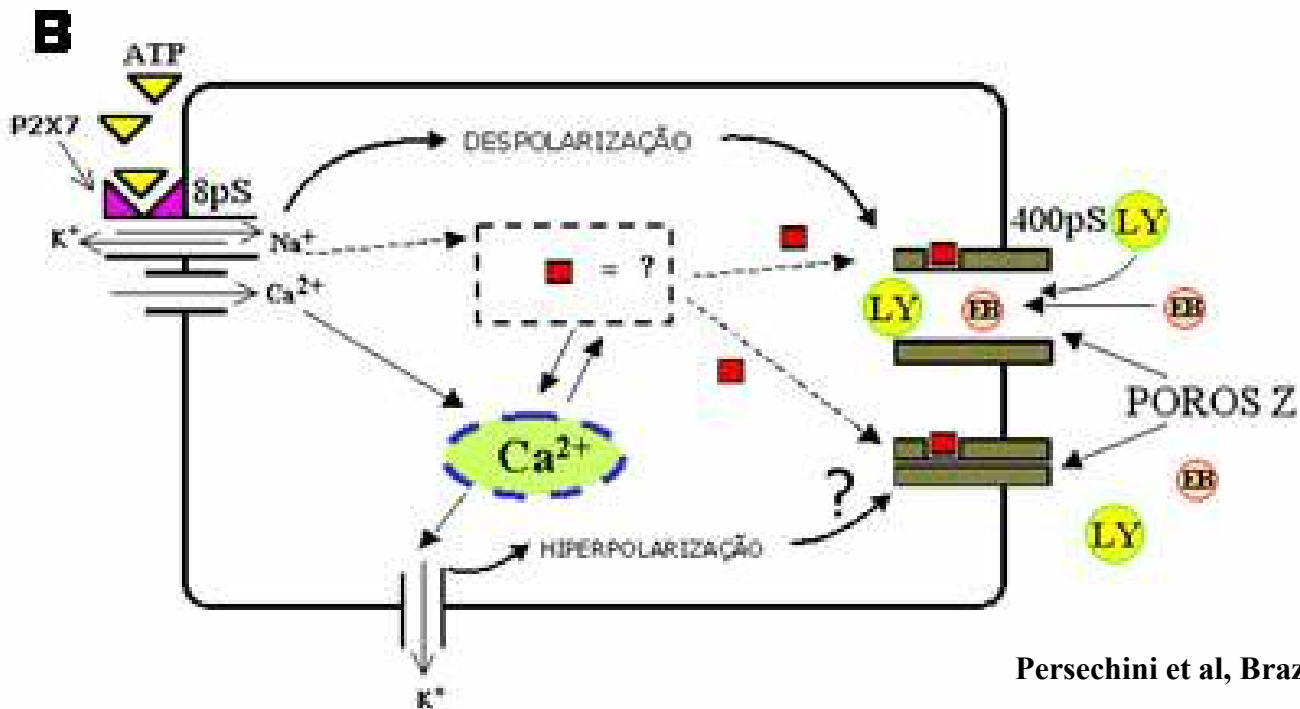
Modificado de North et al, *Physiol Rev* 2002



Kim, M et al, EMBO J. 2001



Di Virgilio et al, Blood 2001



Persechini et al, Braz J Med Biol Res 1998

P2X₇

The diagram features a central white circle representing the P2X7 receptor. To its left, the text 'P2X7' is enclosed in a dashed rectangular box. Seven curved arrows originate from the right side of the circle and point to the following text blocks:

Formação de Blebs via ROCK-1/Rho (Morelli, A. et al Mol Biol Cell 2003, Pfeiffer, Z.A et al J. Leuko Biol 2004, Mackenzie, A.B. et al JBC 2005)

Ativação de caspases 3, 8 e 9 (Steinberg, T.H. et al JBC 1987, Greenberg, S. et al JBC 1988, Chiozzi, P. et al JCB 1997, Bissagio, R. 2001)

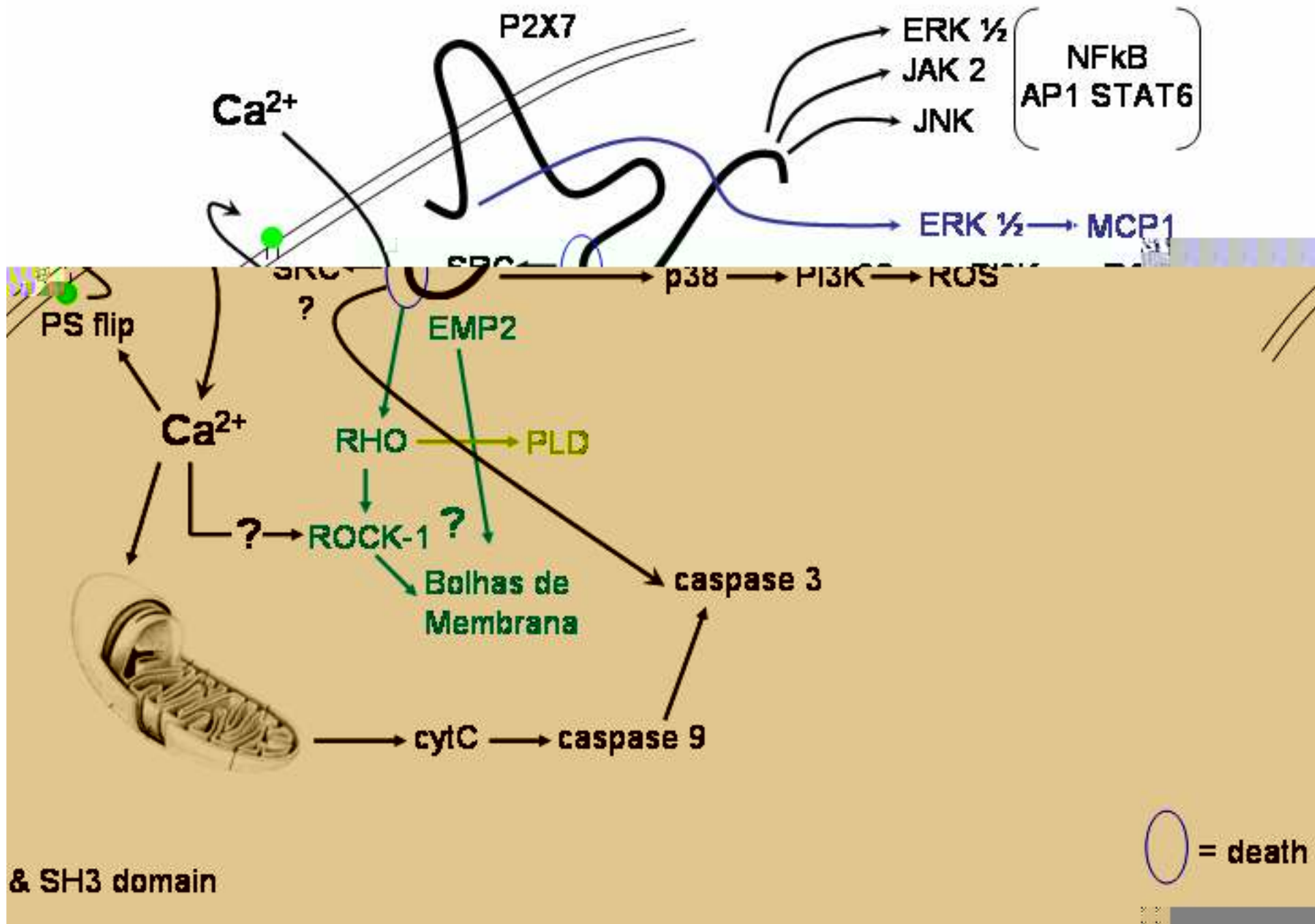
Aumento dos níveis de ceramida (Lepine, S. et al BBA 2005)

Externalização de PS (Elliot, J.I. et al Nat Cell Biol 2005, Mackenzie, A.B. et al JBC 2005)

Ativação de JNK (Humphreys, B.D et al JBC 2000)

Clivagem de Lamina (Ferrari, D. et al FEBS Lett 1999)

Frag. DNA (Schulze-Lohoff, E. et al Am J Physiol 1998)





Objetivo

Estudar a sinalização intracelular mediada por ATPe via P2X₇ na morte celular de macrófagos intraperitoneais murinos.

Objetivos Específicos:

- 1 – Estudar a dependência do receptor P2X₇ na morte por ATPe;
- 2 – Avaliar a dependência de Ca²⁺ nas diferentes etapas de nosso protocolo indutor de morte celular;
- 3 - Estudar o envolvimento das PLA2 na sinalização de morte celular induzida por ATPe/P2X₇;
- 4 – Estudar a participação das vias metabólicas abaixo das PLA2 na morte celular por ATPe/P2X₇;
- 5 – Estudar a participação de cinases nos processos de morte por ATPe/P2X₇, principalmente as PKC;
- 6 – Estabelecer a possível relação entre as PLA2 e as PKC na sinalização induzida por ATP;
- 7 – Avaliar o envolvimento dos receptores nucleares PPAR no morte promovida por ATPe/P2X₇.



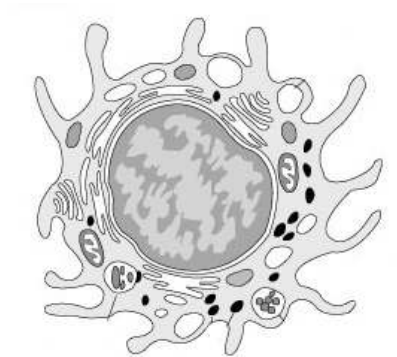
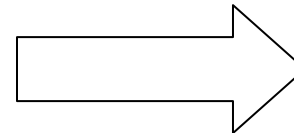
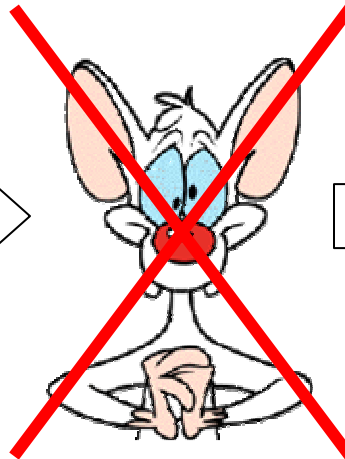
Material & Método

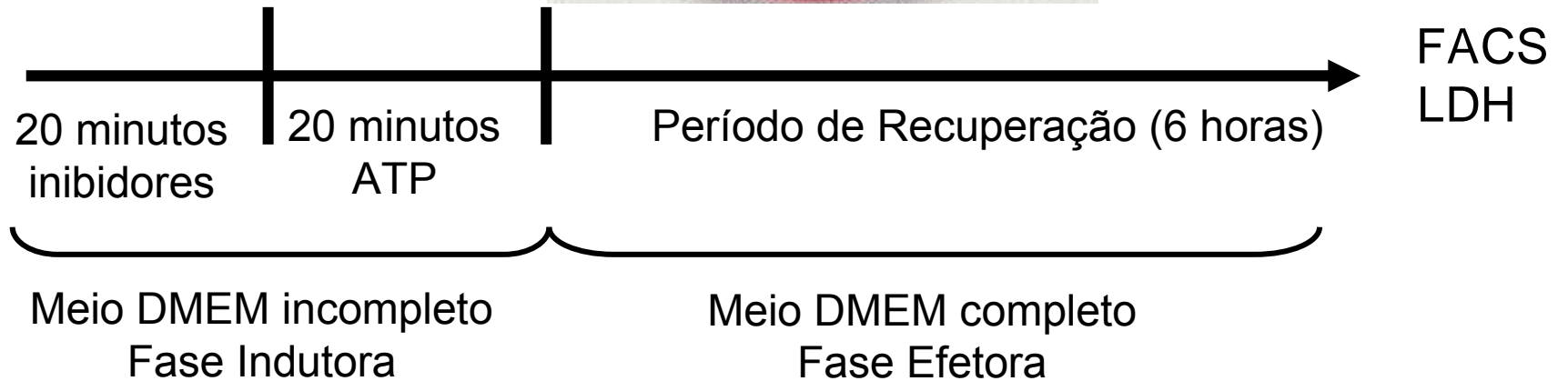
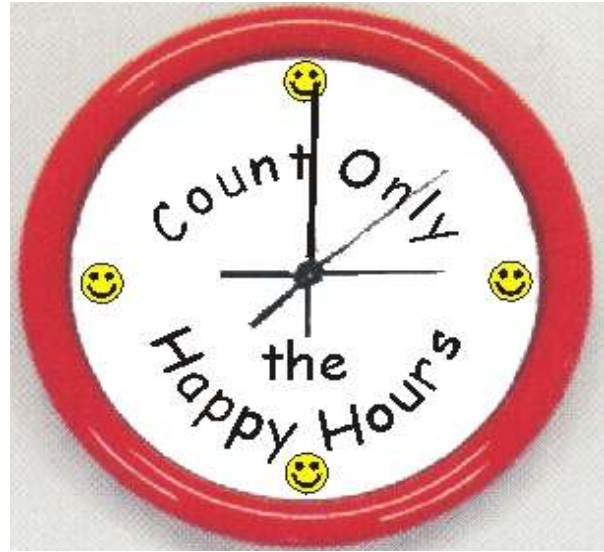


Cultura de Macrófagos Estimulados com Tioglicolato ou células frescas

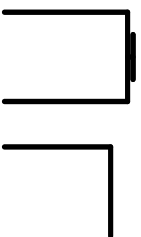


4 dias

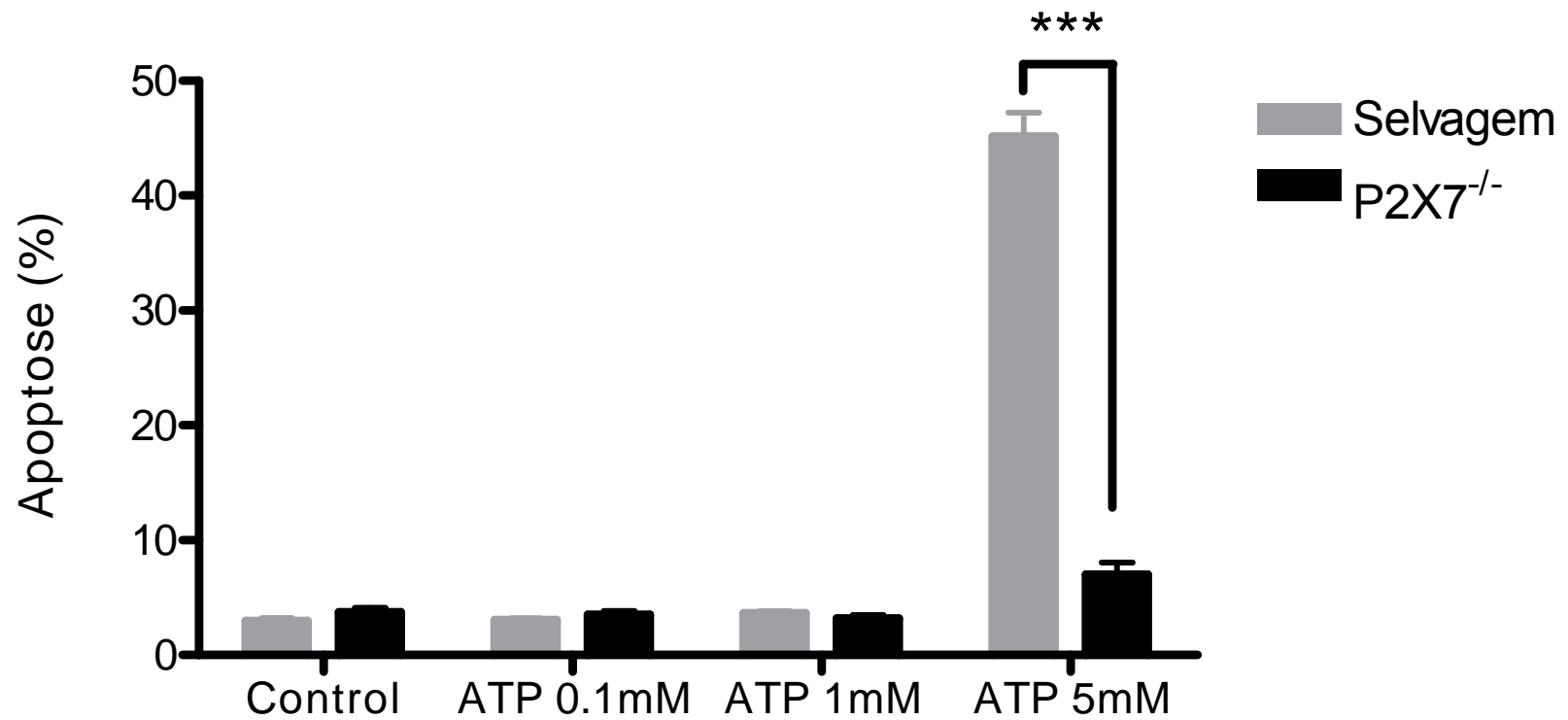




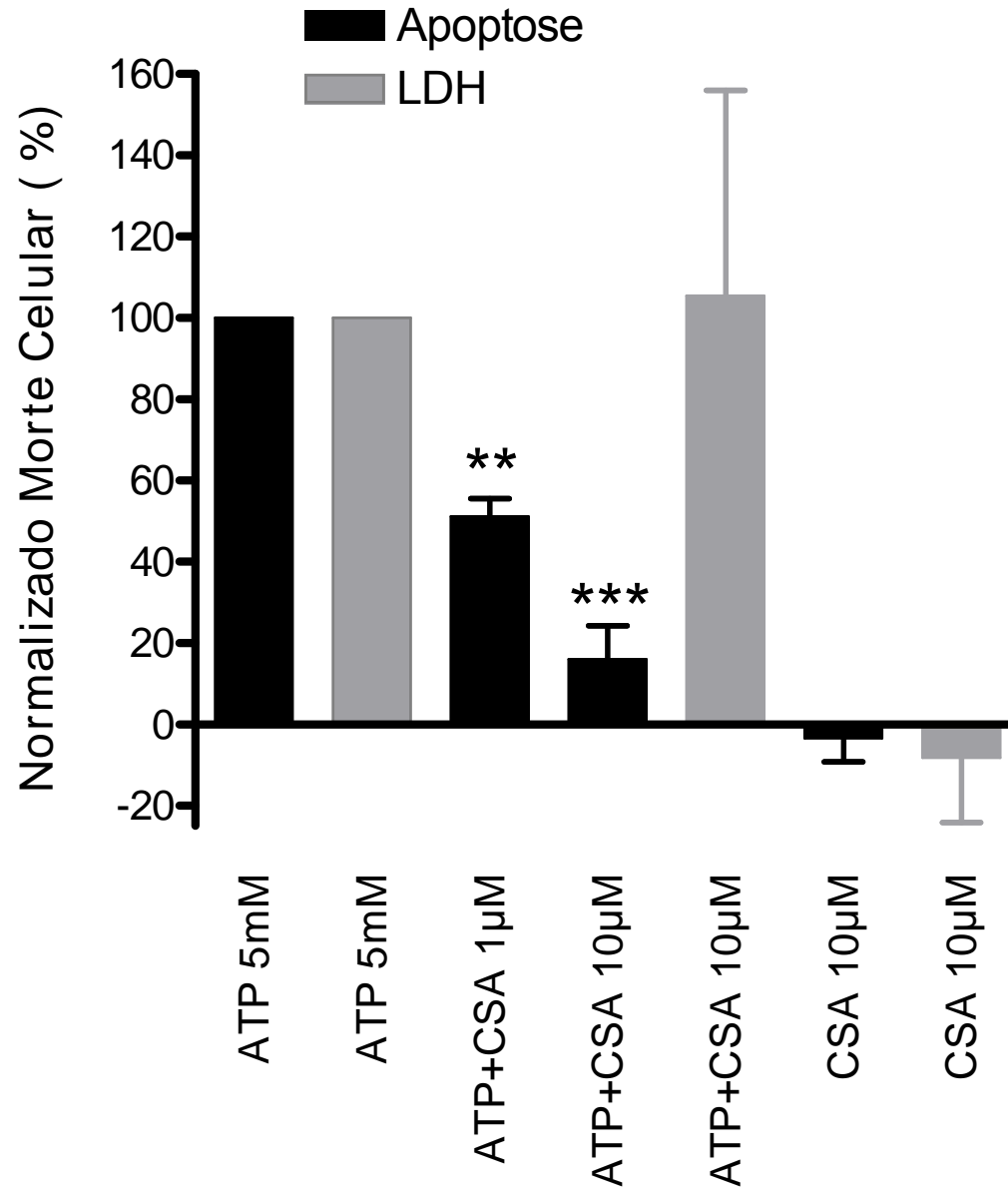
Indução de morte por nucleotídeo extracelular.



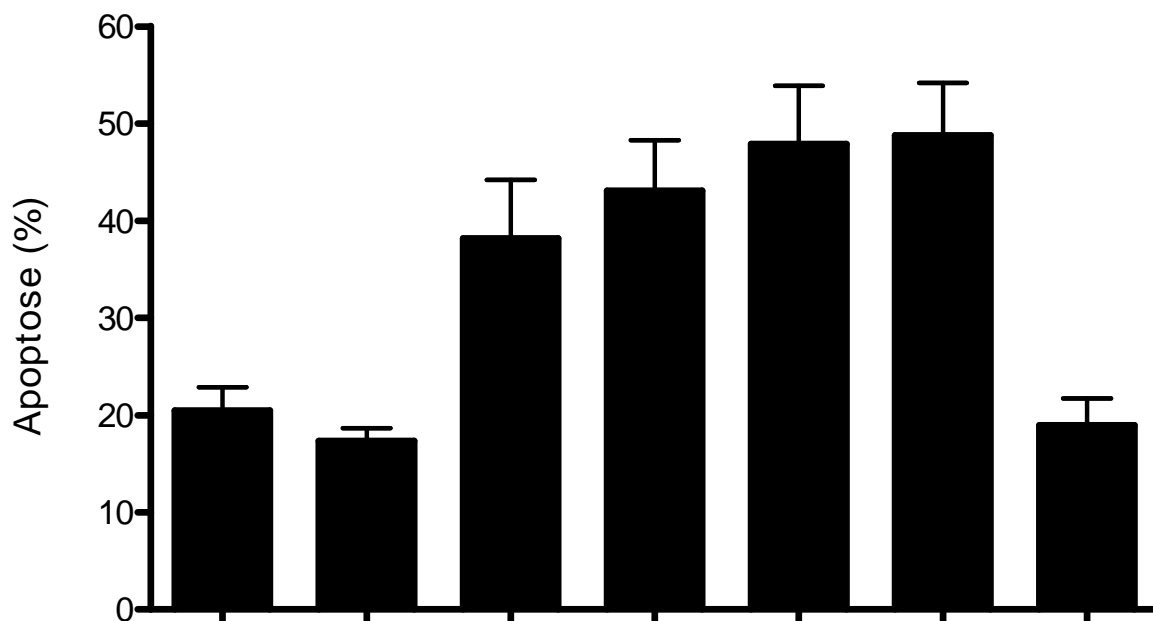
Dependência do receptor P2X₇ na apoptose induzida por ATPe.



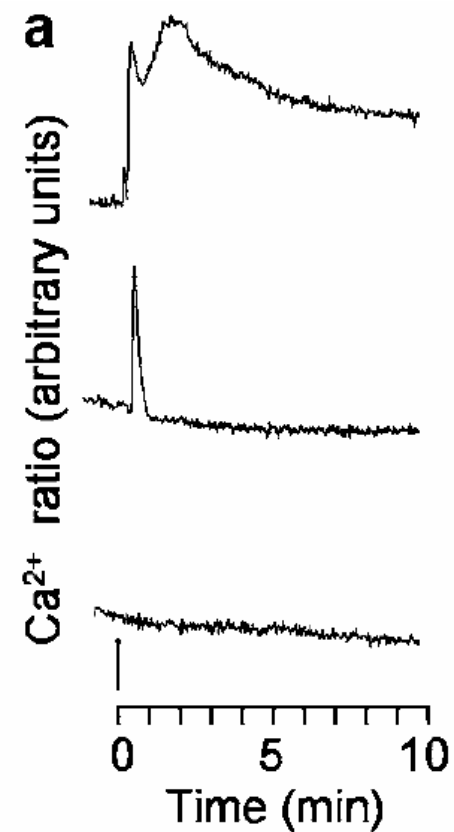
Ciclosporina A inibe a apoptose, mas não a liberação de LDH por ATPe/P2X₇.



BAPTA-AM não é capaz de inibir a apoptose gerada pelo ATPe.



ATP 5mM	-	-	+	+	+	+	-
EGTA 1mM	-	+	-	+	+	+	+
BAPTA-AM	-	-	-	-	0,5µg/mL	1µg/mL	1µg/mL

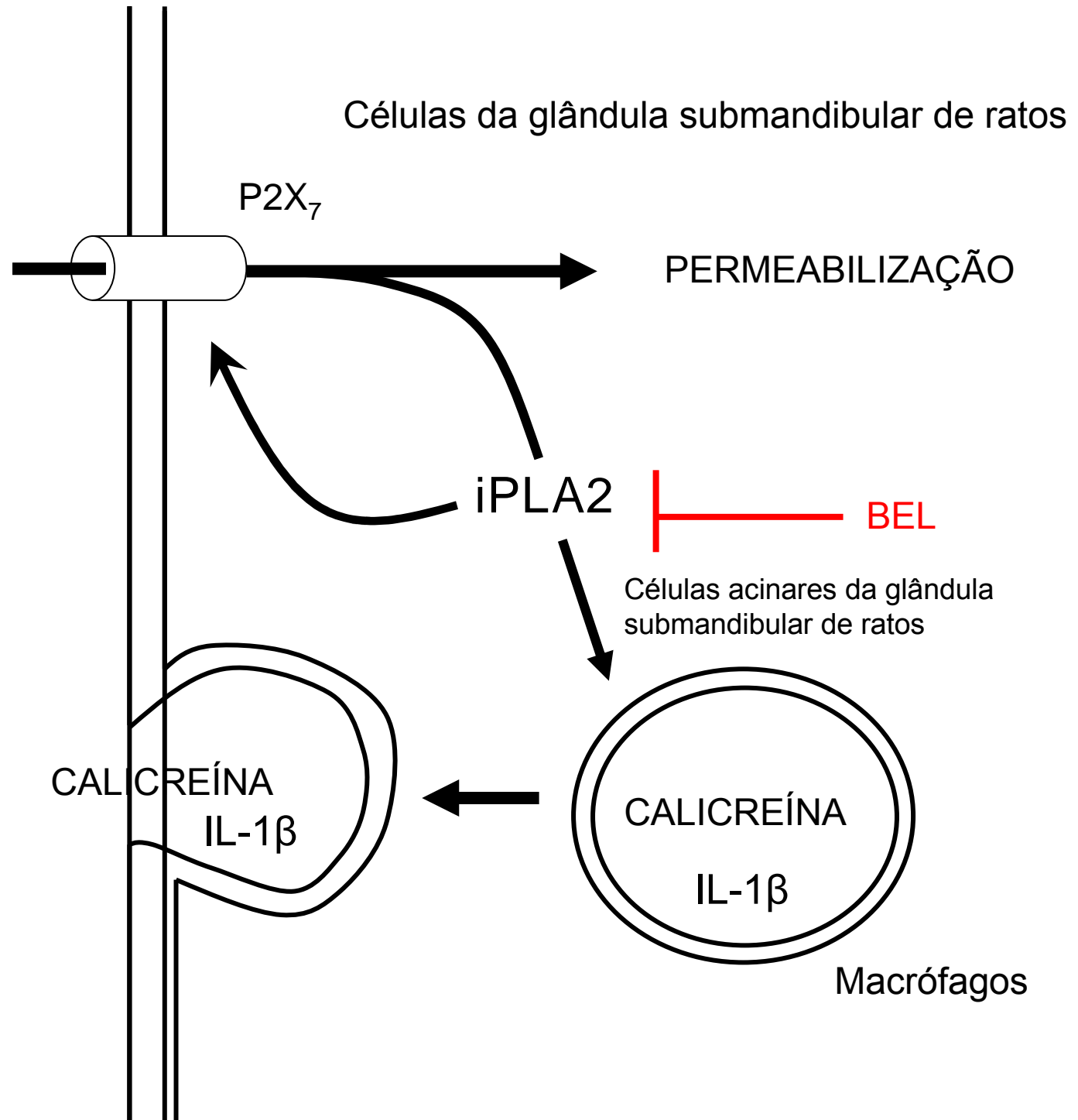


Fosfolipases A2

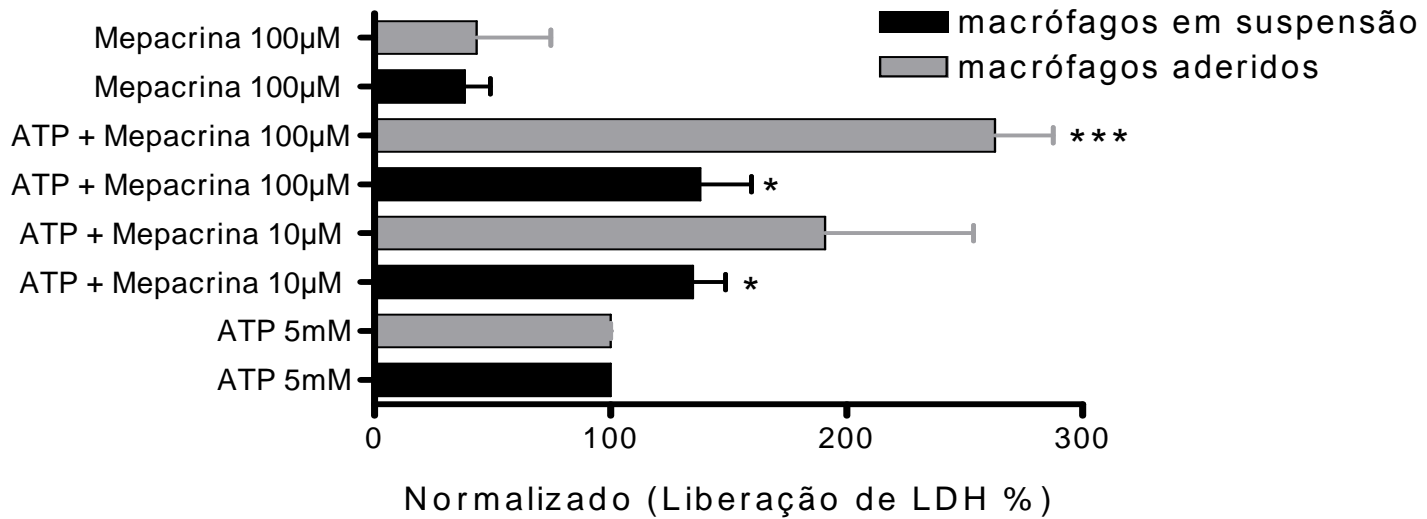
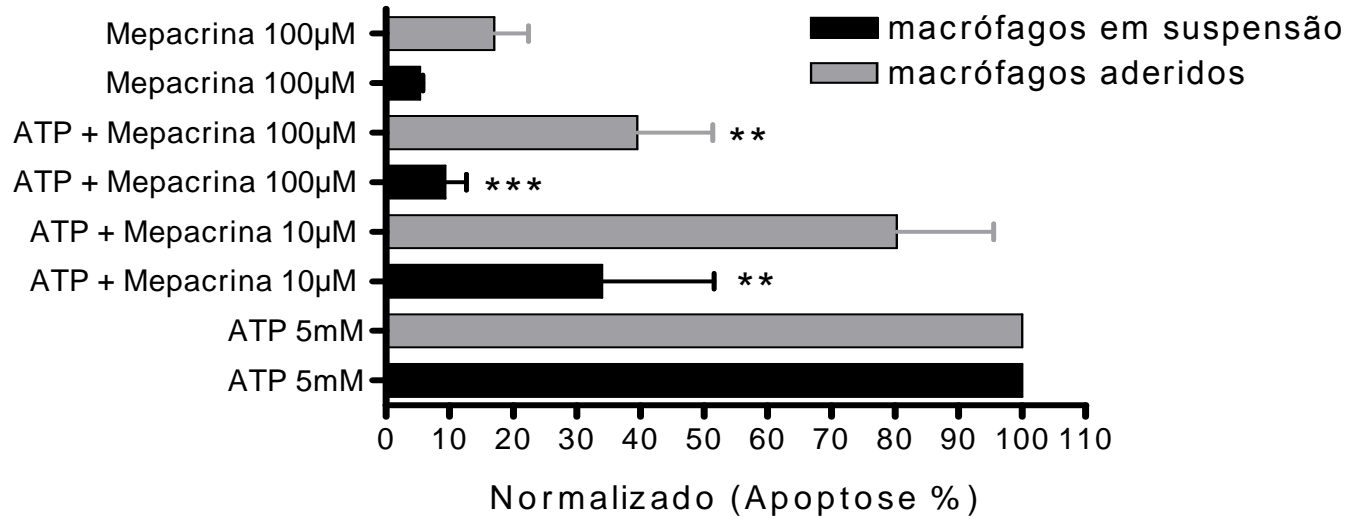
Fosfolipases A2 Secretórias

Fosfolipases A2 Citosólicas

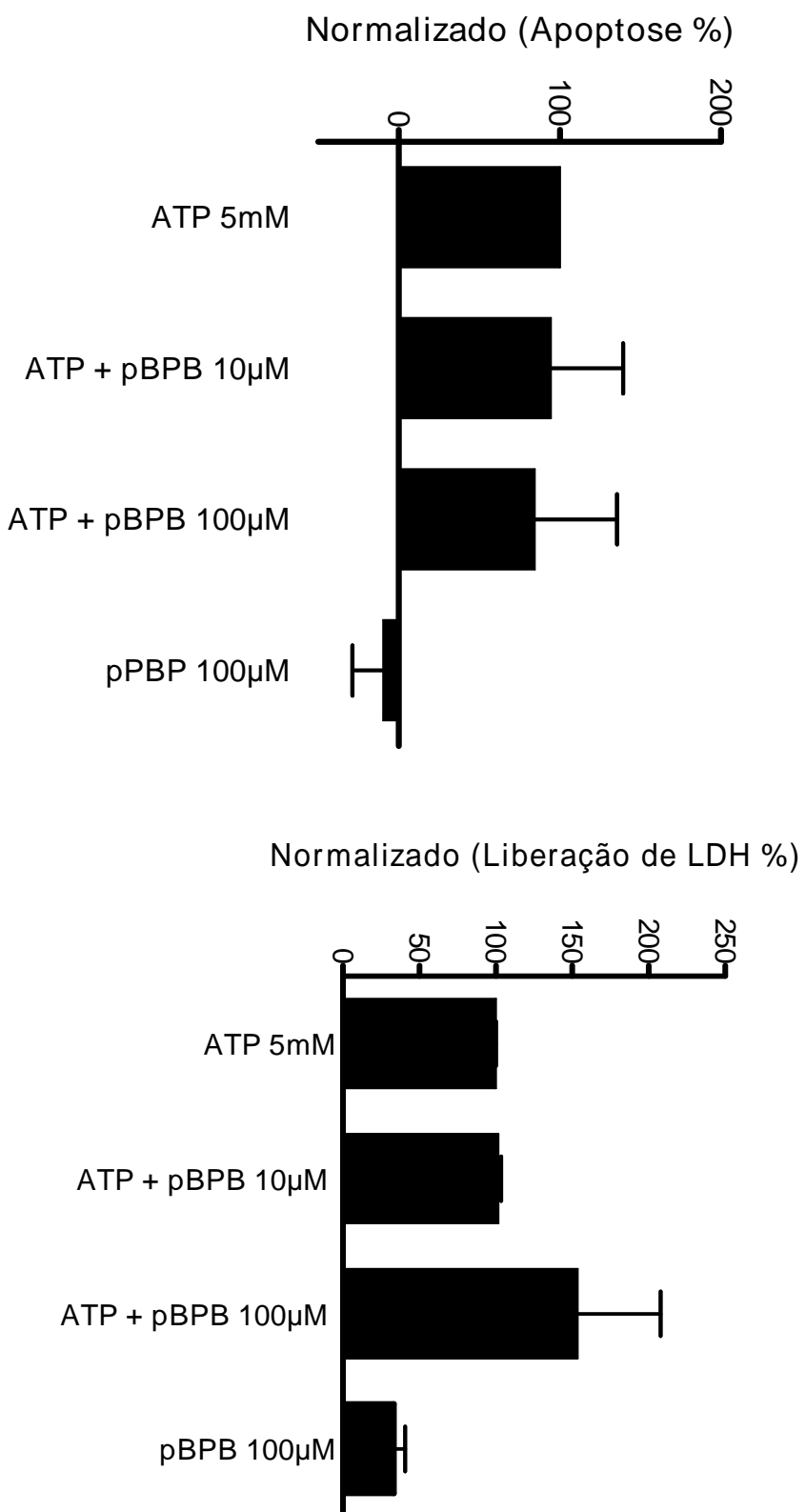




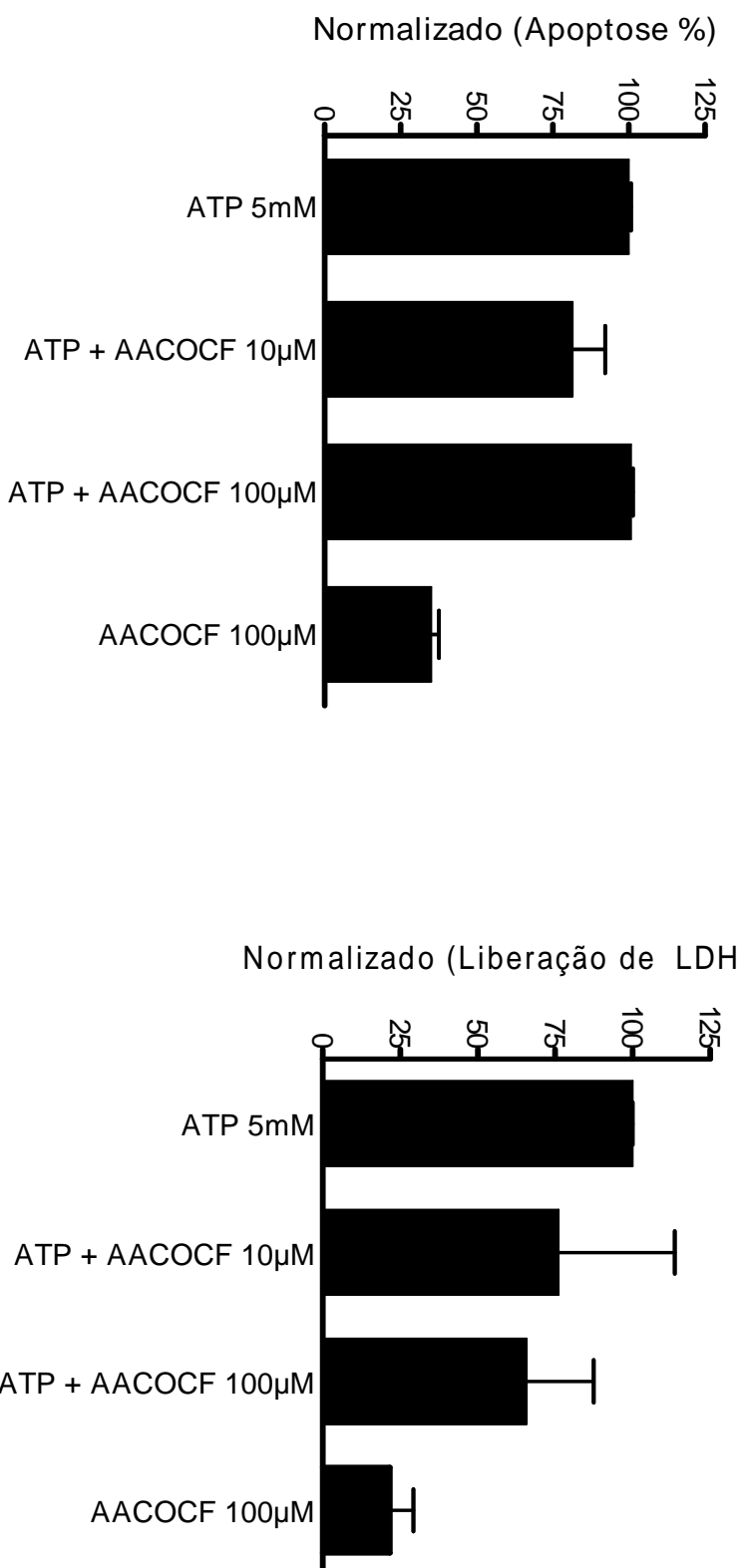
Participação das PLA2 na morte por ATPe/P2X₇ Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por mepacrina.



Envolvimento das sPLA₂ na morte por ATP α /P2X₇
O pBPB não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH.

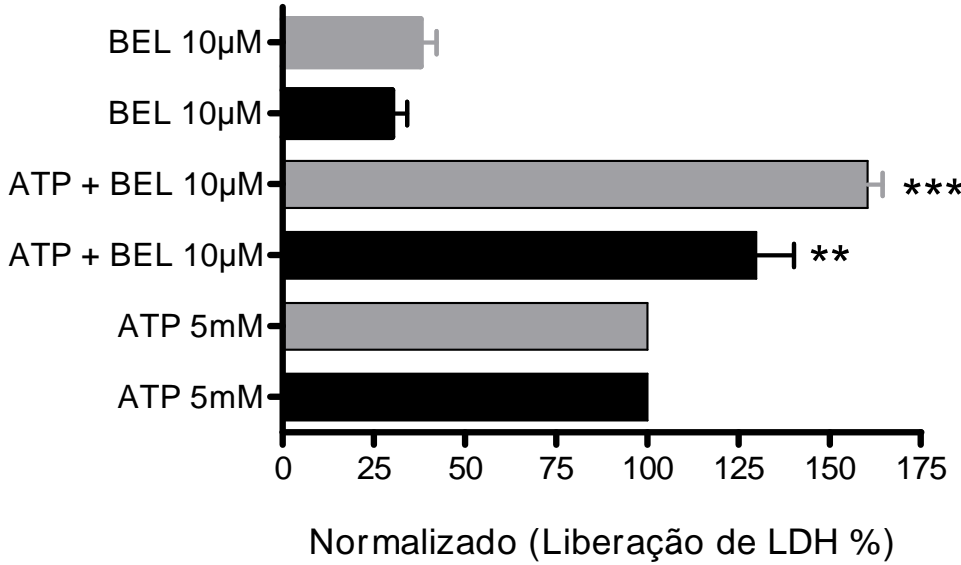
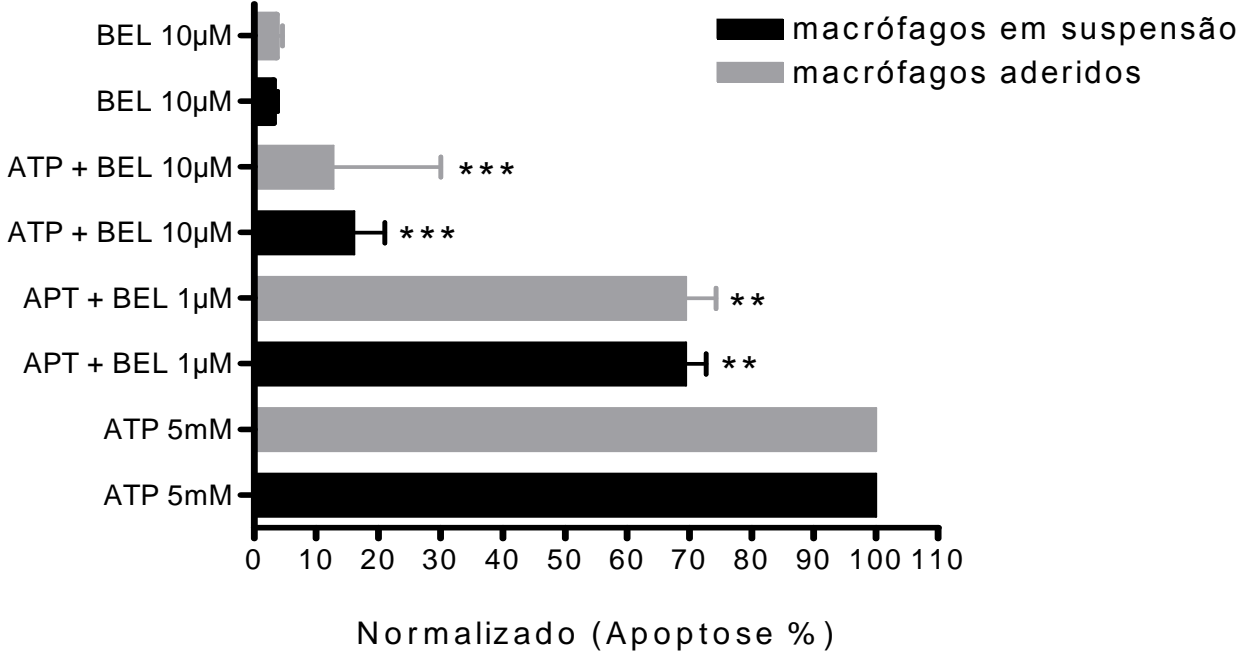


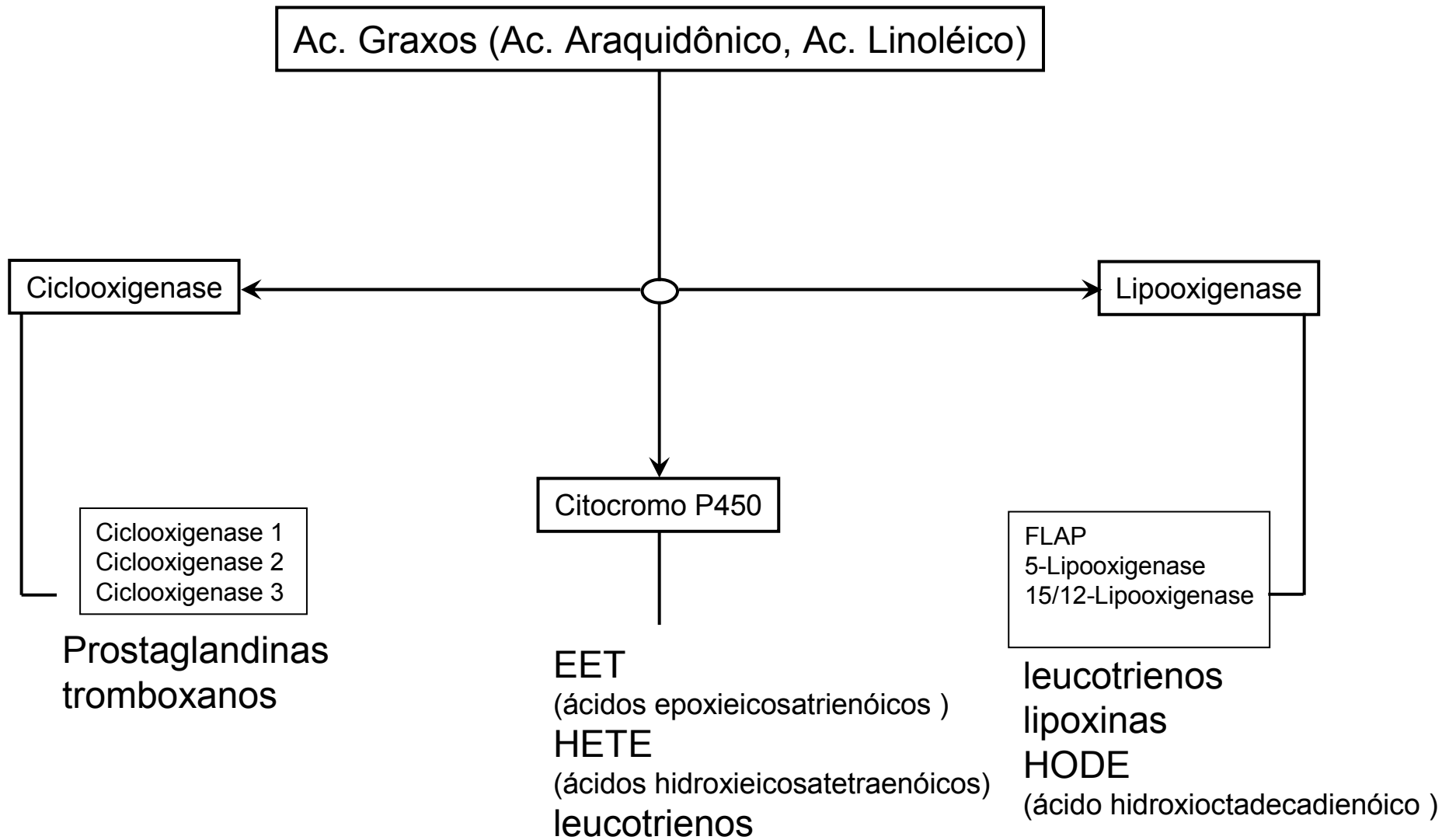
Envolvimento das cPLA2 na morte por ATPe/P2X₇ O AACOCF3 não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH.



Envolvimento das iPLA2 na morte por ATPe/P2X₇

Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por BEL.

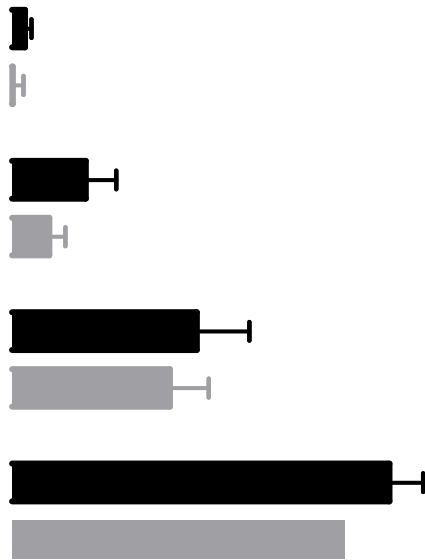
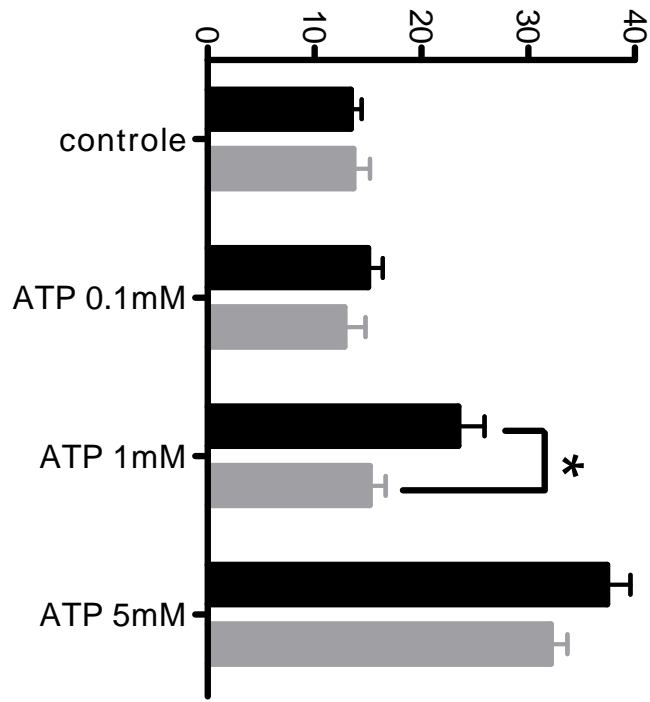




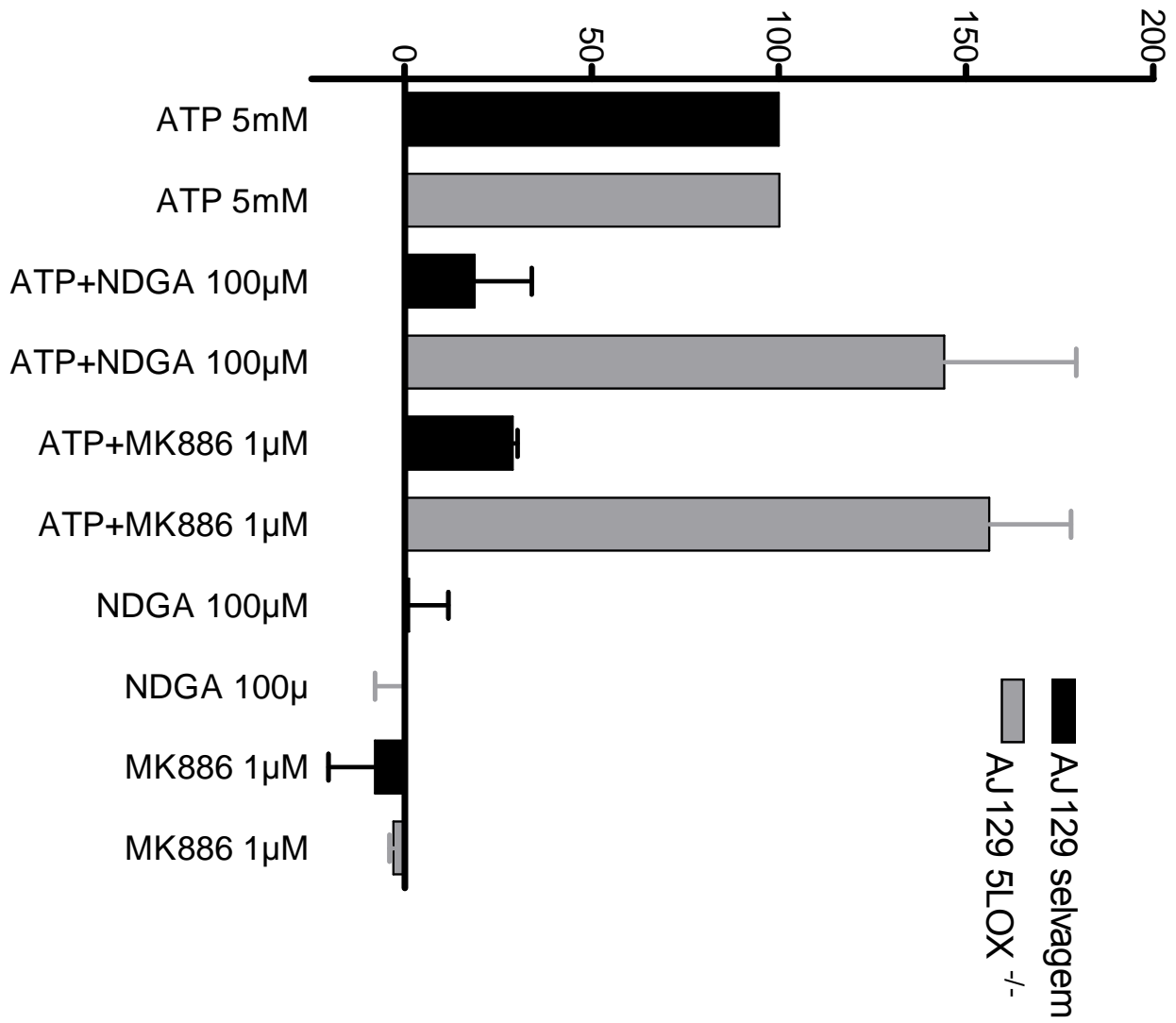
Ação dos inibidores das vias de COX e LOX na apoptose por ATPe/P2X₇.

FÁRMACO	% DE INIBIÇÃO DA APOPTOSE PROVOCADA POR ATPe/P2X₇	PROTEÍNA ALVO
AAS	S.E.	COX-1
NS-398	S.E.	COX-2
NDGA	80% macrófagos em suspensão 50% macrófago aderido	LOX em geral
Zileuton	45% macrófago aderido	5-LOX
AA-861	45% macrófago aderido	5-LOX
MK886	80% macrófago em suspensão e aderido	FLAP
MK571	S.E.	Receptor de LT
CP	S.E.	Receptor de cis-LT

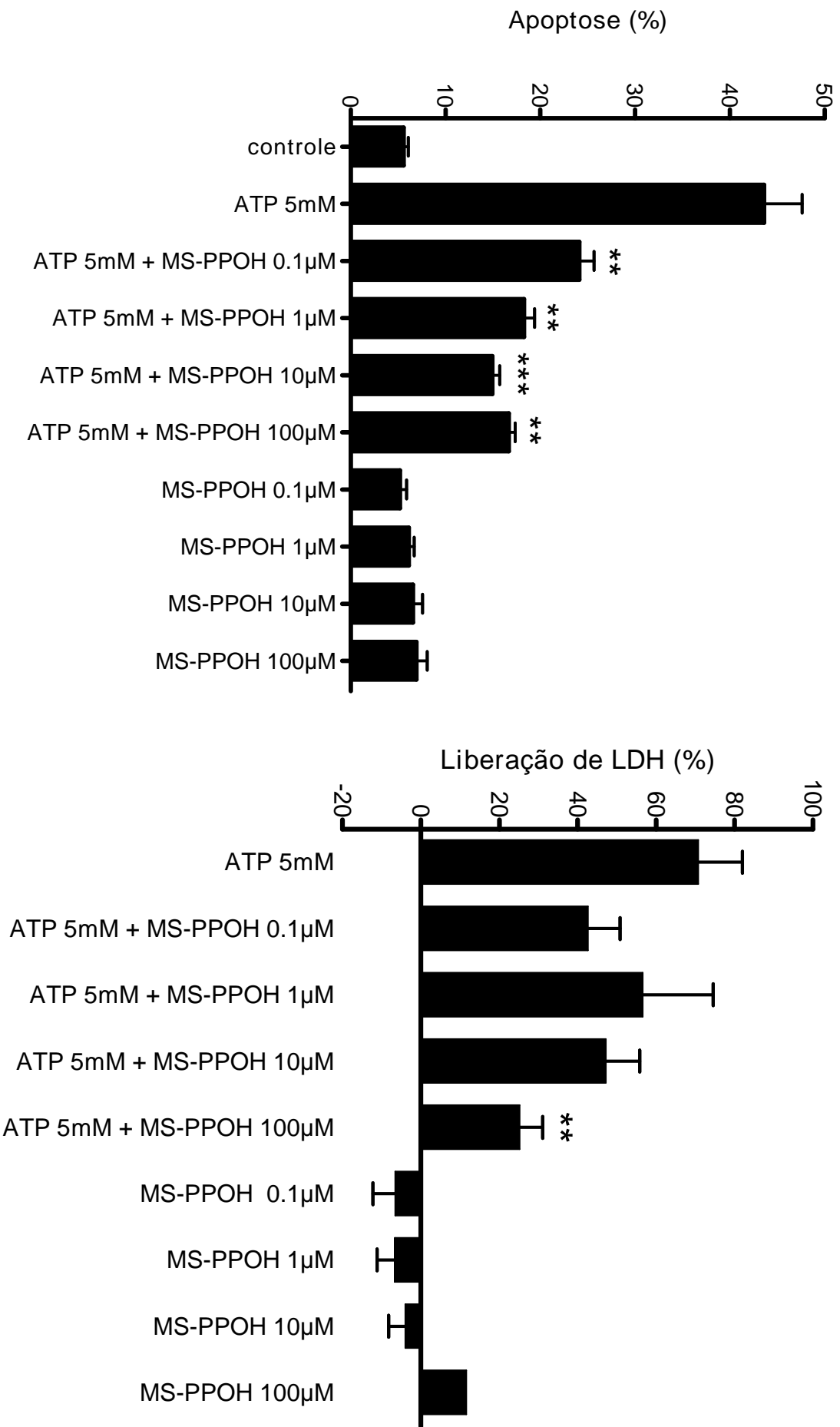
Apoptose (%)



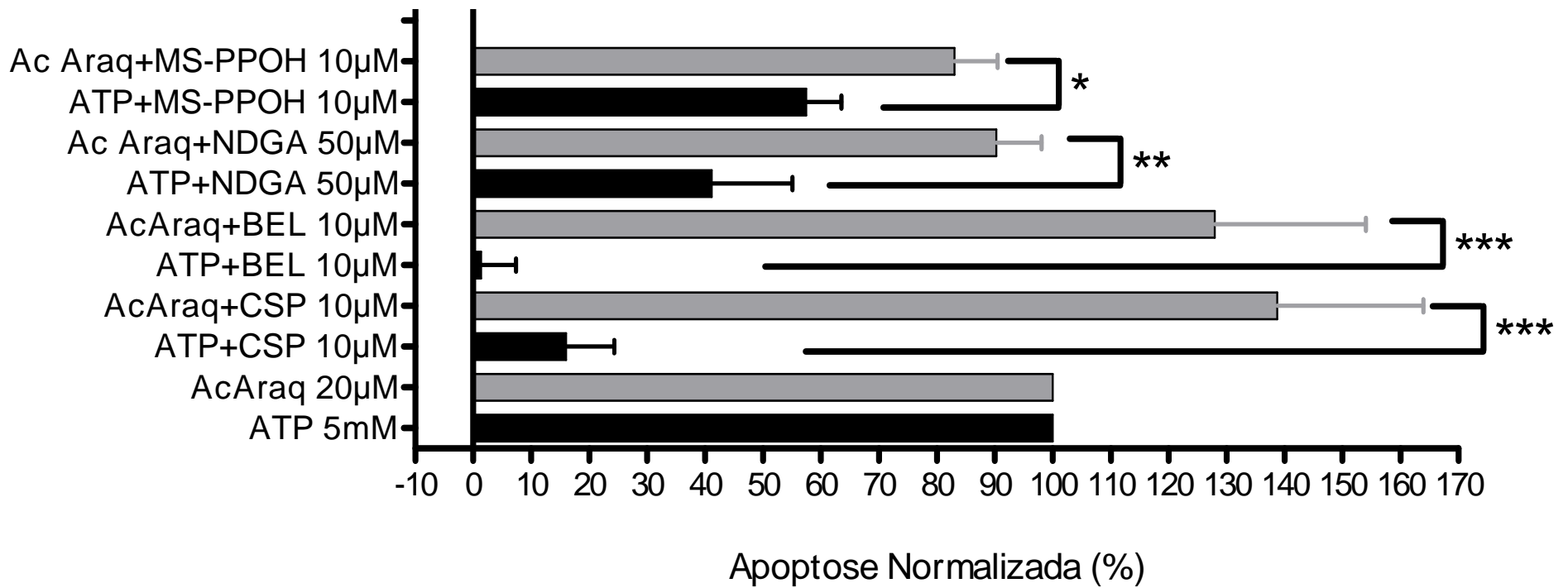
Normalizado (Apoptose %)



Efeito da inibição do citocromo P450
na morte celular provocada por ATPe/P2X₇.



Comparação entre as apoptoses induzidas por ATPe e AA.



Regulatory Domain

Catalytic Domain

hinge region

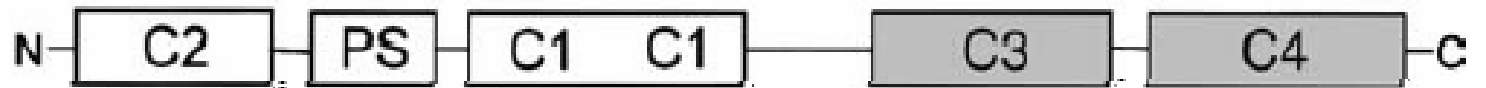


V3

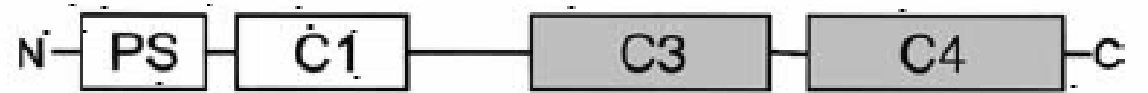
conventional

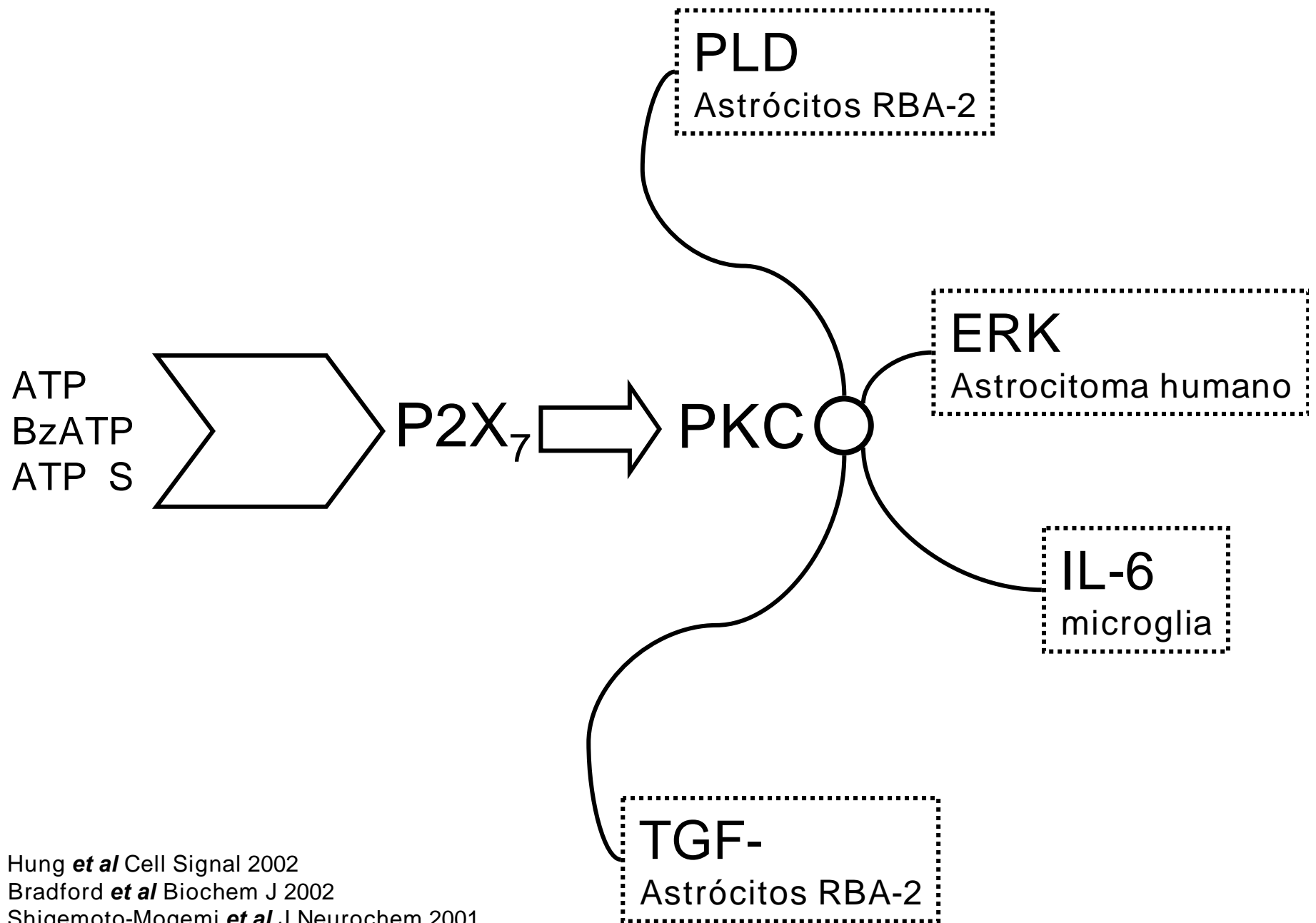


novel



atypical





Hung *et al* Cell Signal 2002
 Bradford *et al* Biochem J 2002
 Shigemoto-Mogemi *et al* J Neurochem 2001

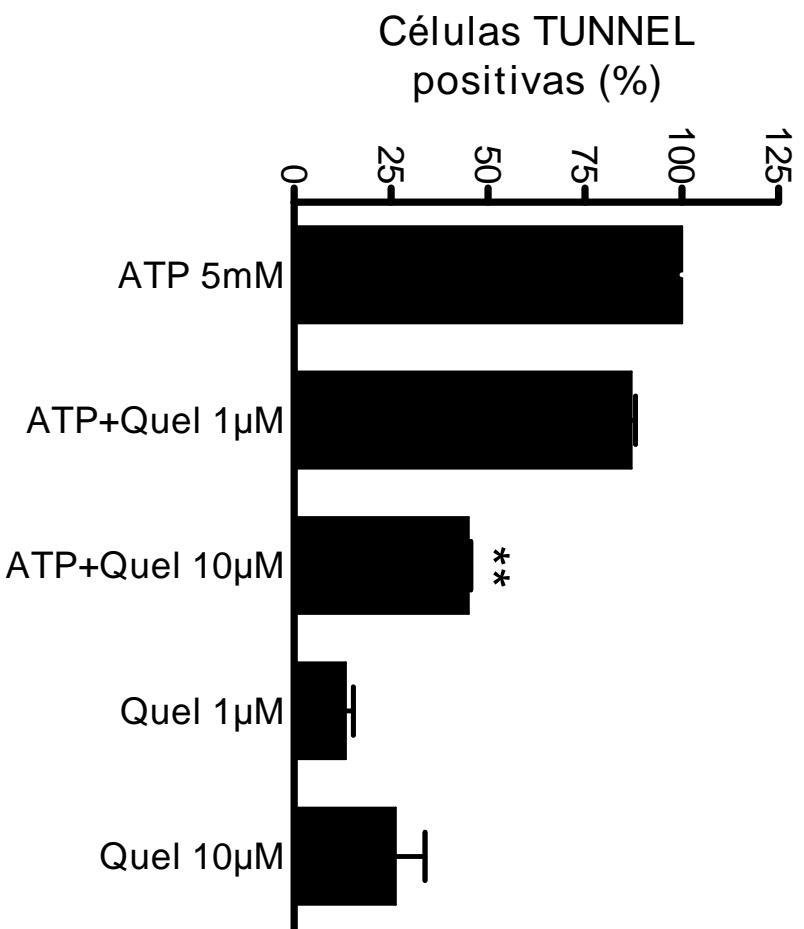
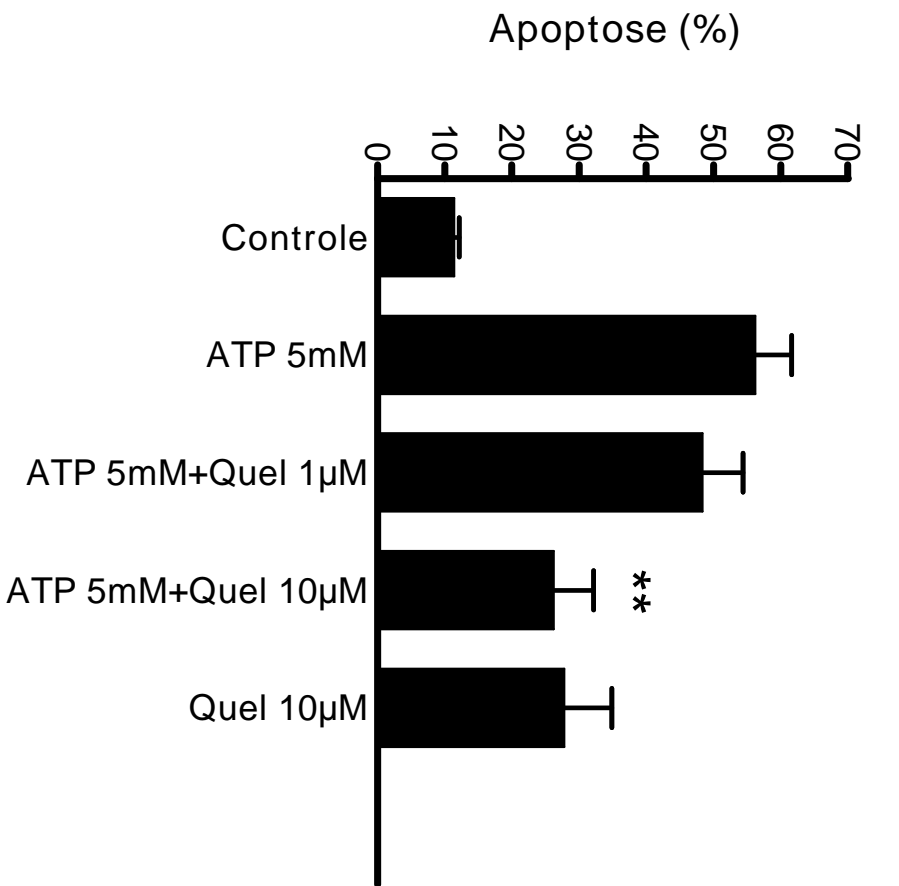
Imunoprecipitação

P2X₇

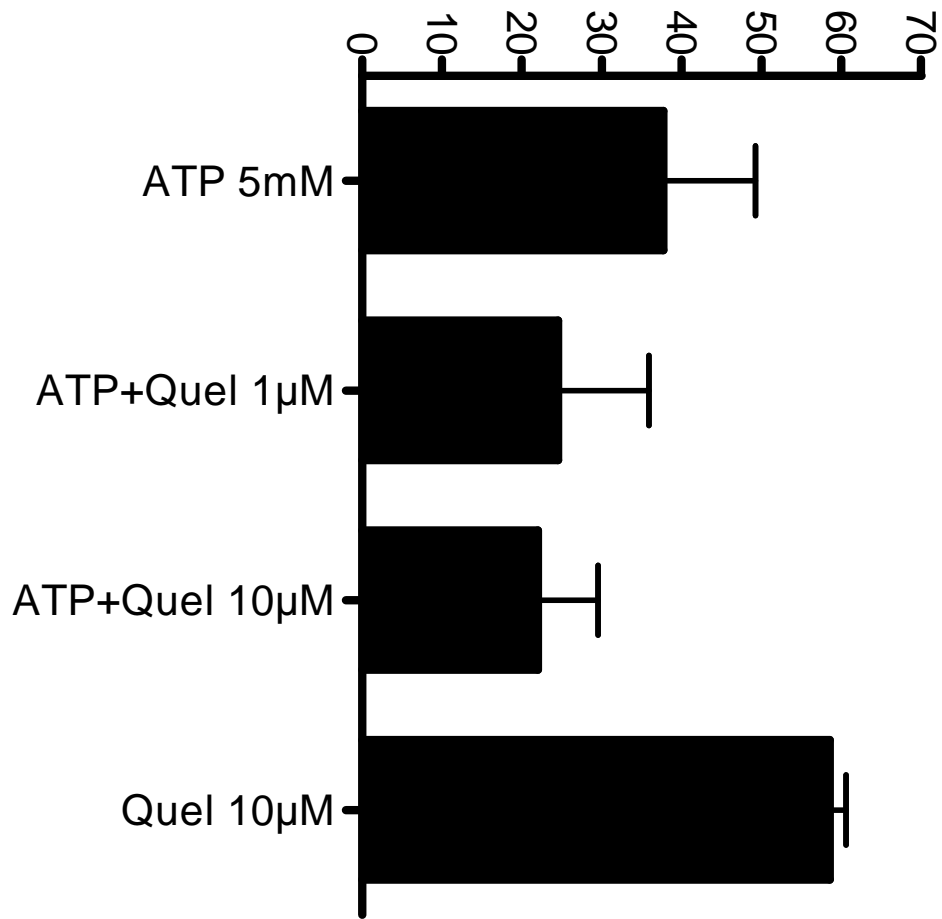
PKC

em astrócitos RBA-2

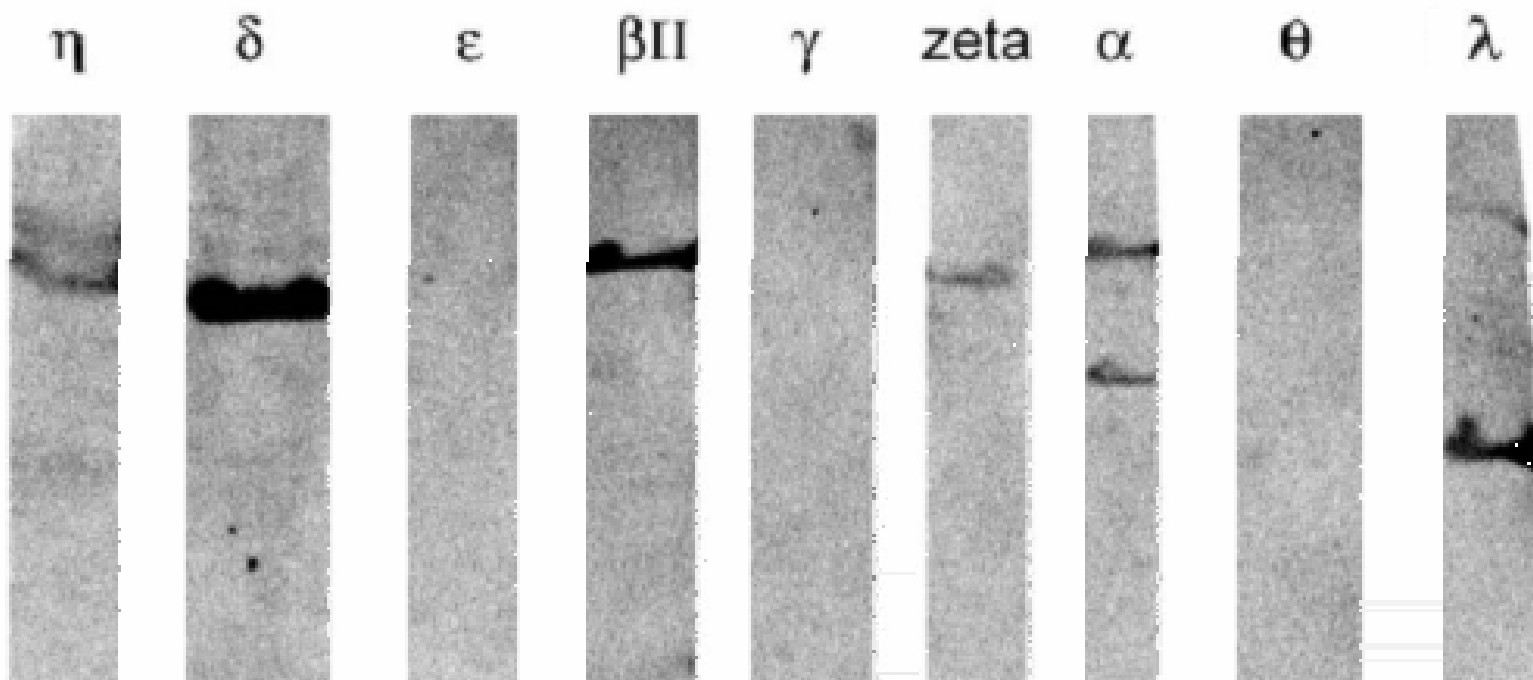
Cloreto de quelitrina inibe a apoptose,
mas não a liberação de LDH provocada por ATPe/P2X₇.



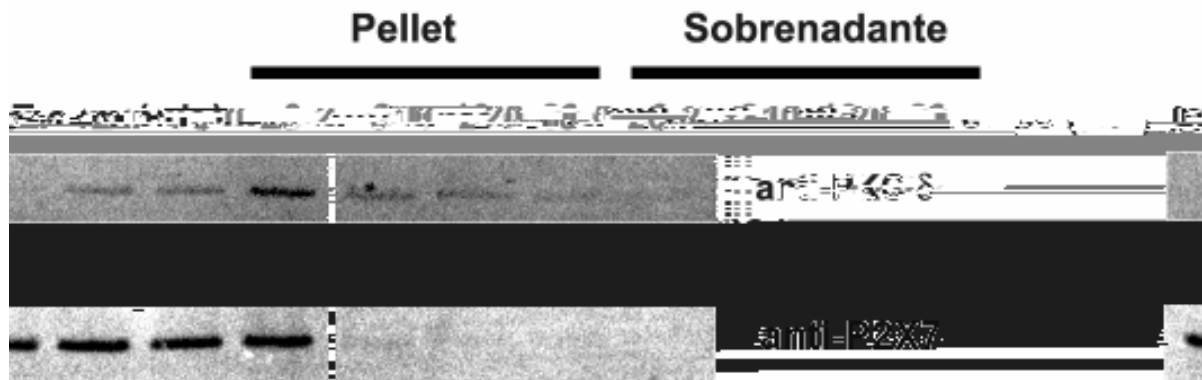
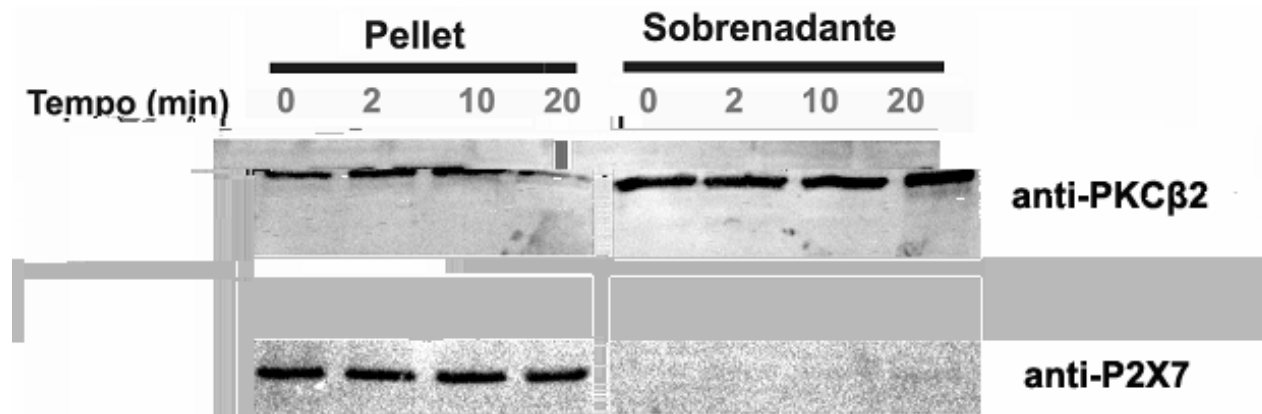
Liberação de LDH (%)



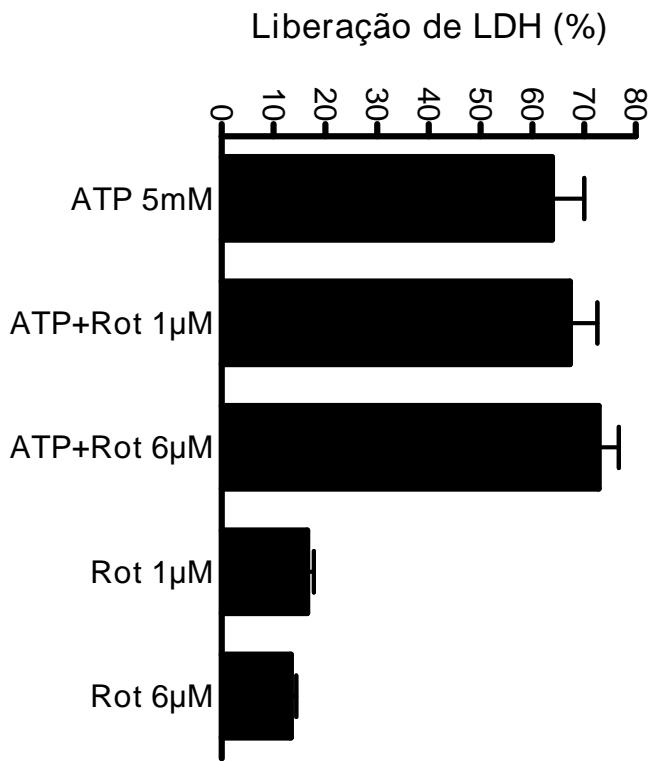
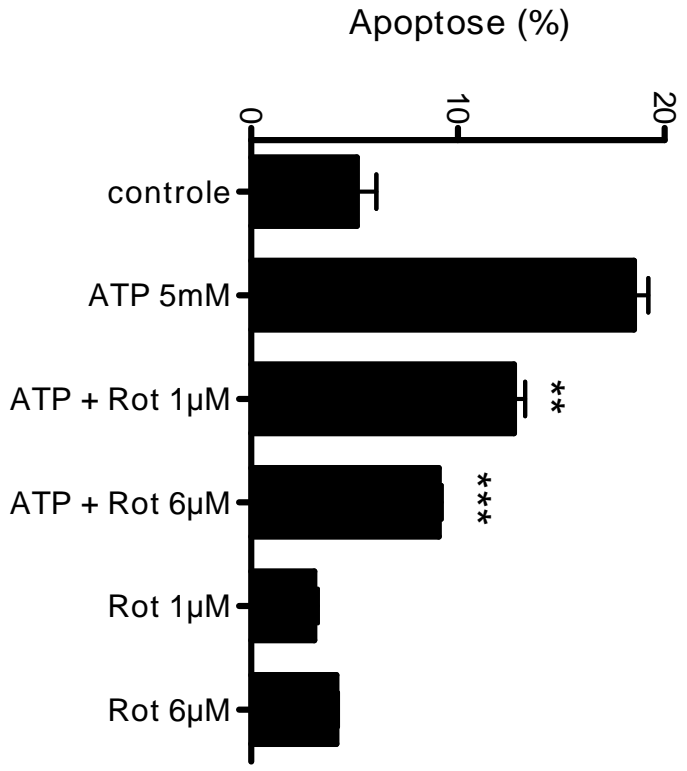
Expressão das isoenzimas de PKC em macrófagos aderidos.



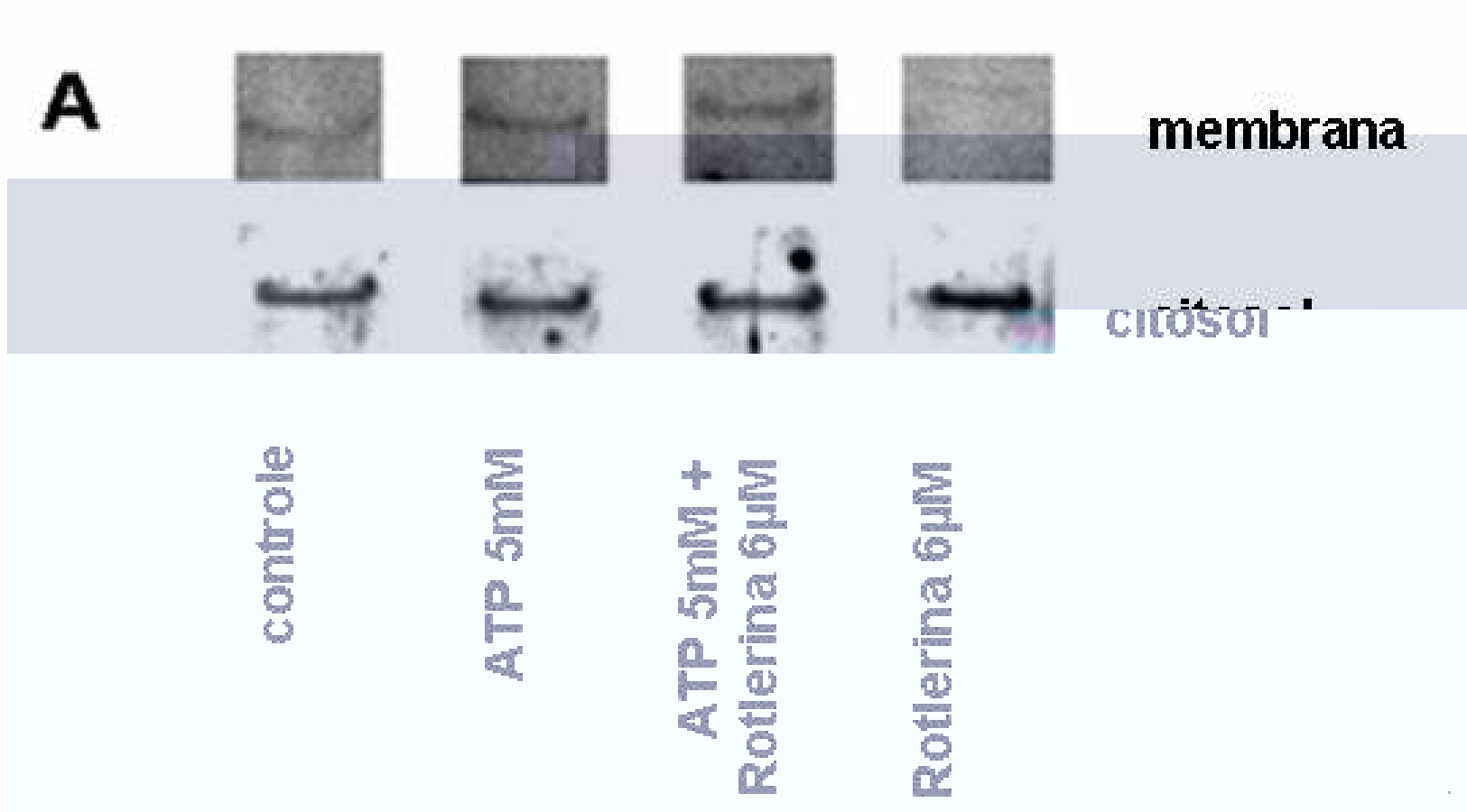
Translocação das isoenzimas de PKC II e PKC induzida por ATP



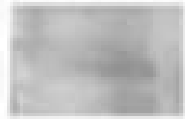
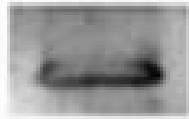
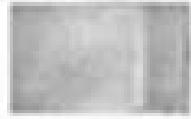
Inibidor específico para PKC bloqueia a apoptose provocada por ATPe/P2X₇.



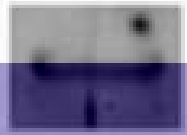
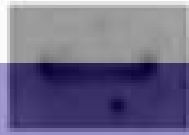
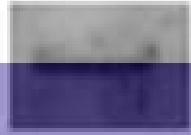
Ação dos inibidores da iPLA2 e PKC na translocação da PKC



B



membrana



citosol

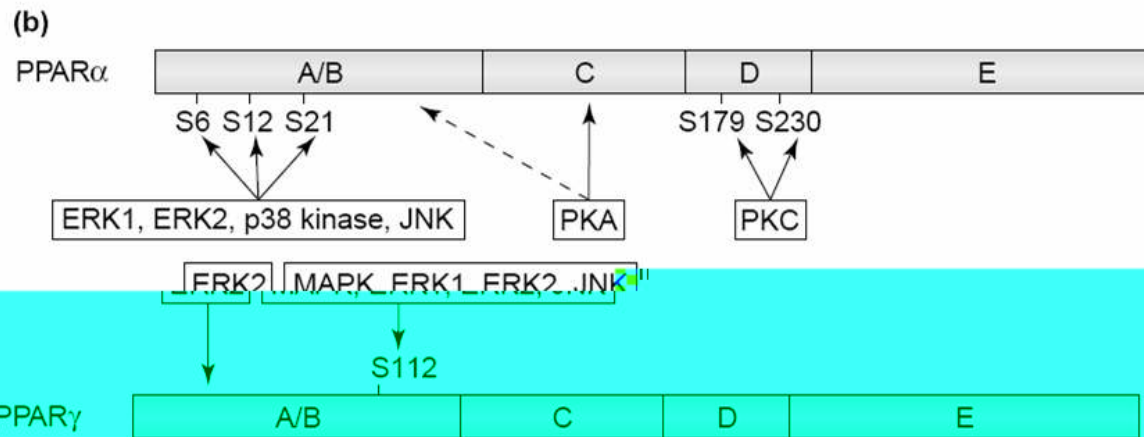
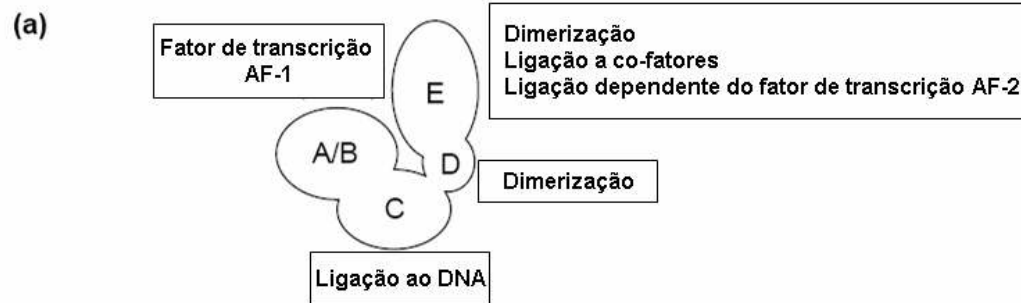
controle

ATP 5mM

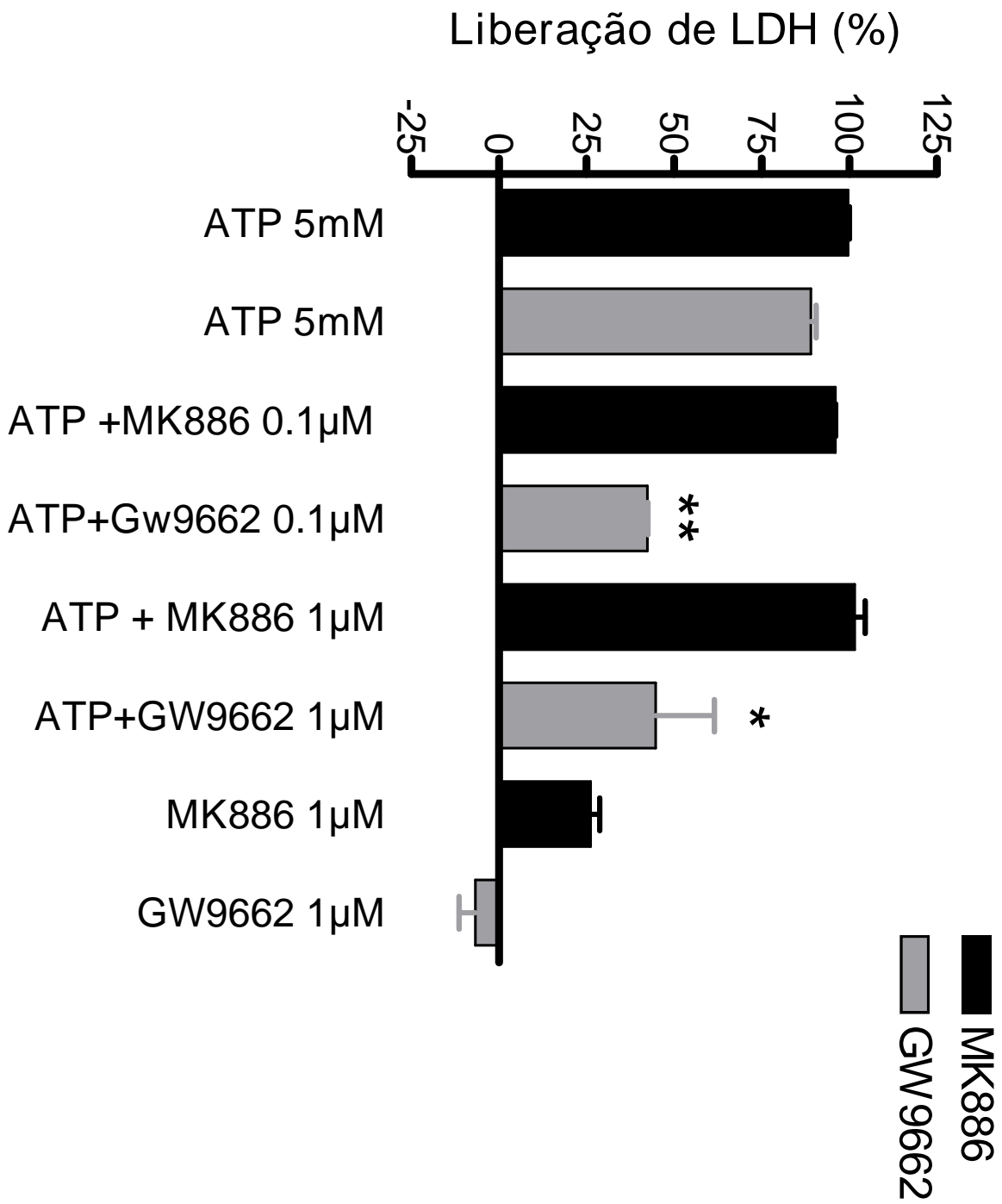
**ATP 5mM +
BEL 10µM**

BEL 10µM

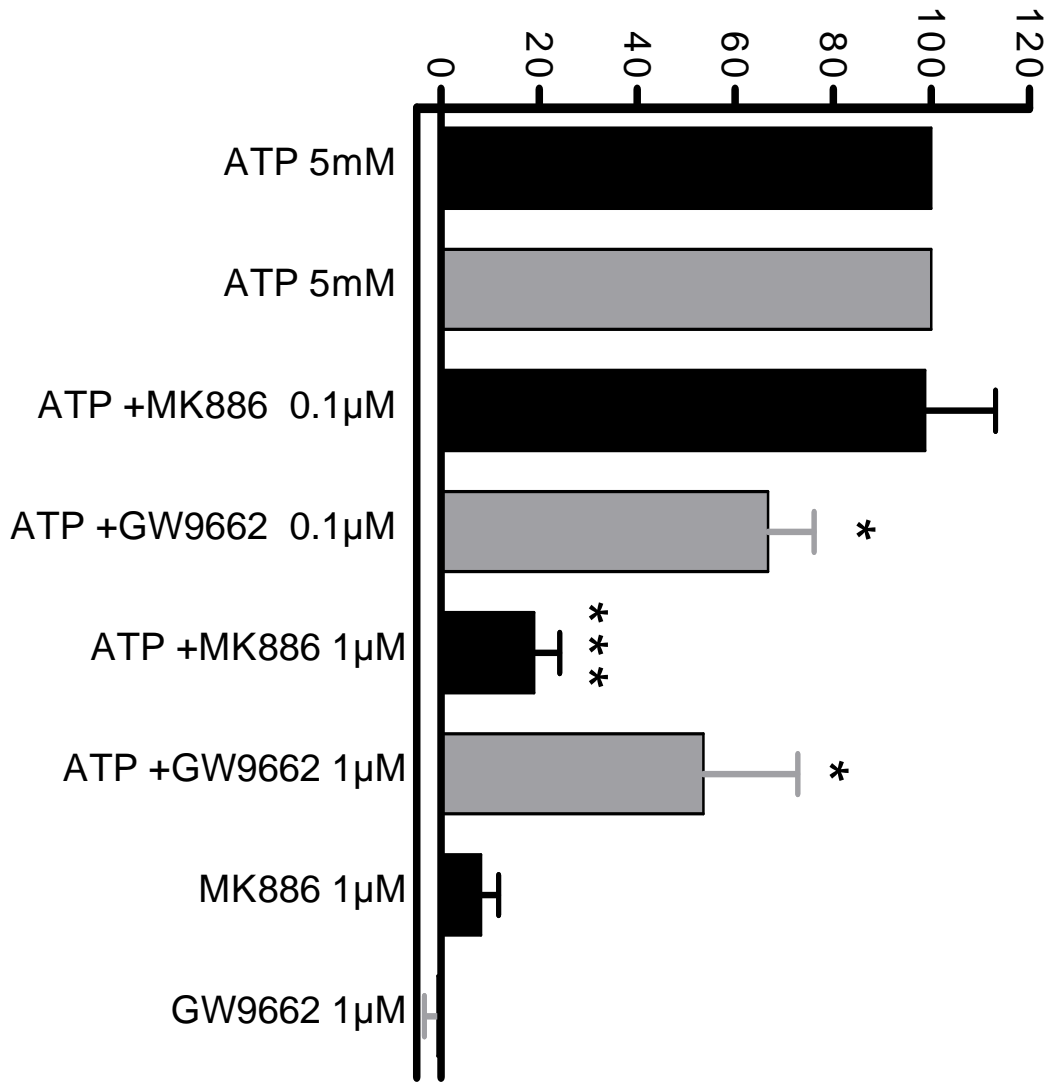
PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
<i>Ácido palmítico</i> <i>Ácido esteárico</i> <i>Ácido oléico</i> <i>Ácido linoléico</i> <i>Ácido araquidônico</i> <i>Eicosapentanoicos</i>	<i>Ácido linoléico</i> <i>Ácido araquidônico</i> <i>15d-PGJ2</i> <i>9-HODE</i> <i>13-HODE</i> <i>15-HETE</i>	<i>Ácidos graxos em geral</i>



Possível envolvimento dos PPAR e na apoptose por ATPe.



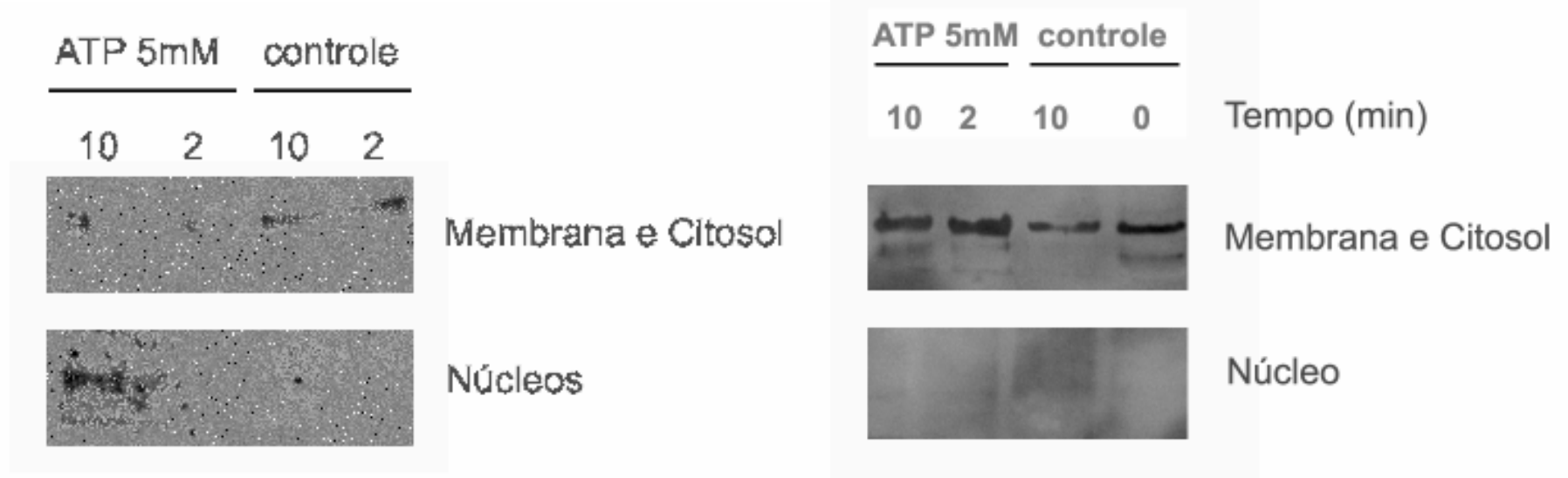
Normalizado (Apoptose %)



Indução da translocação nuclear dos PPAR α e PPAR γ por ATPe.

PPAR Alfa

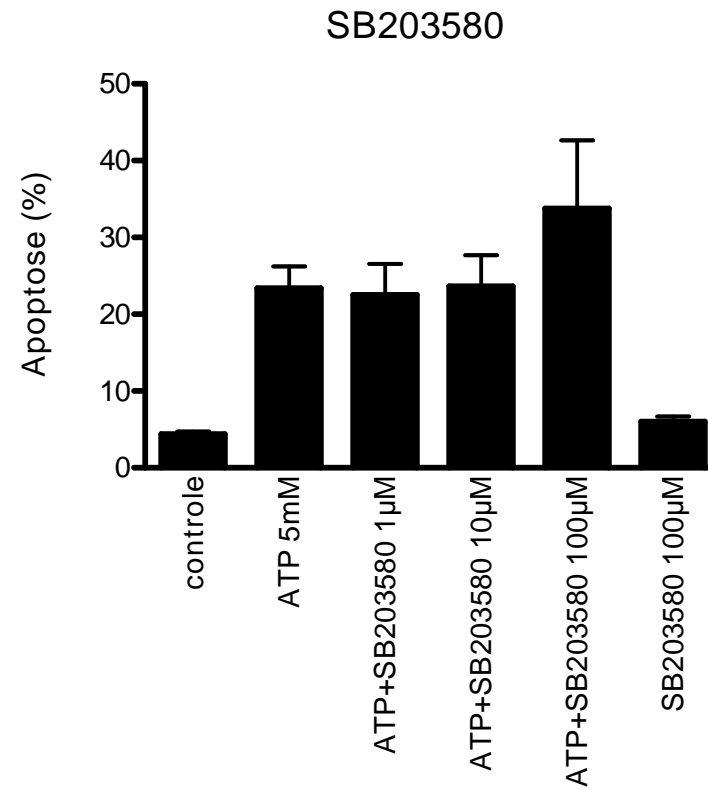
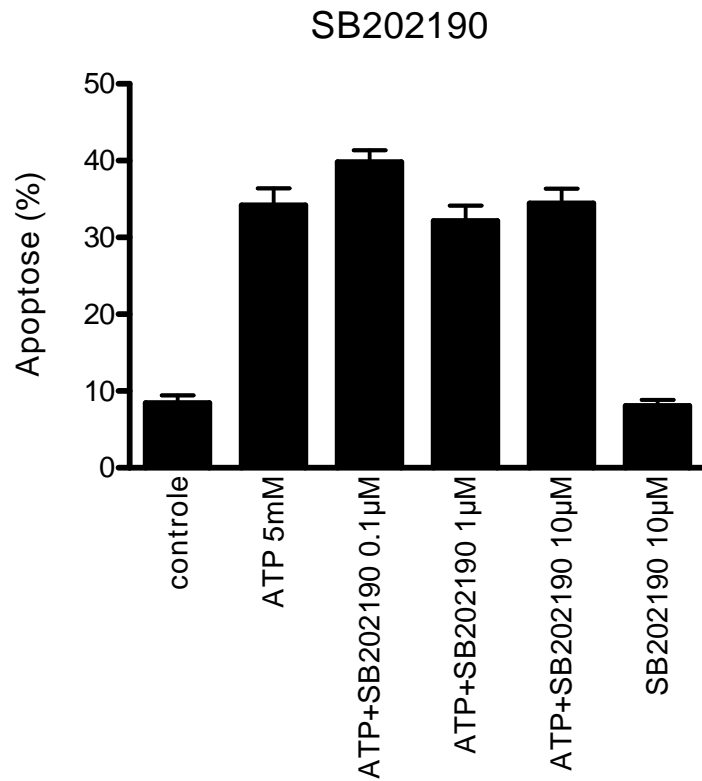
PPAR Gama

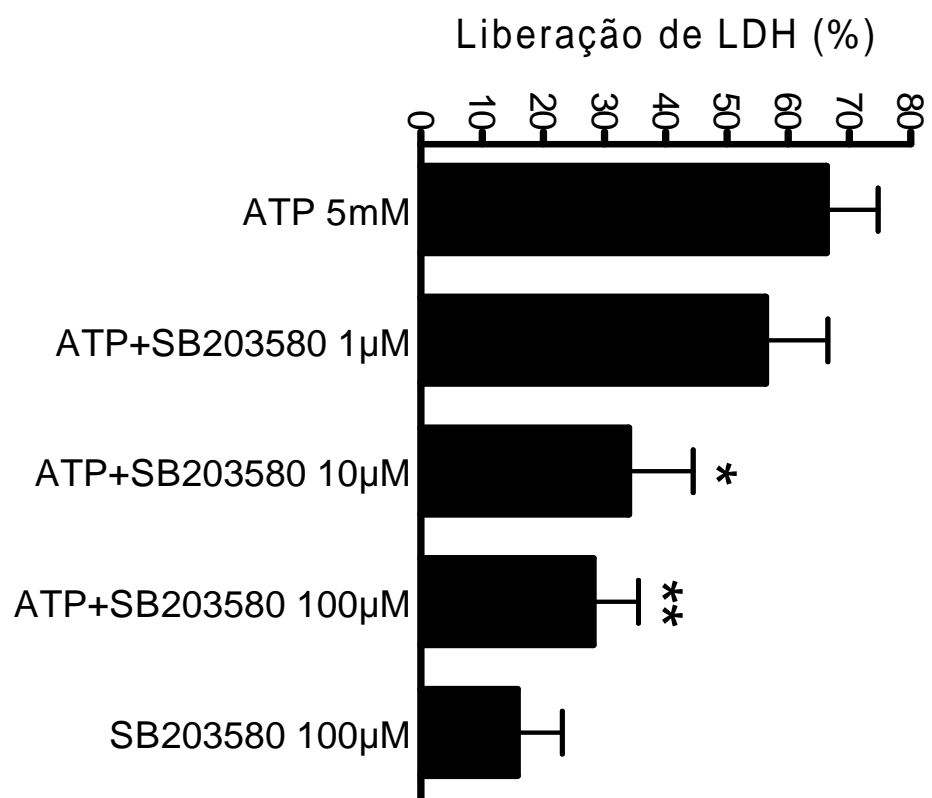


Outras Proteínas Cinases Estão Envolvidas com a Apoptose Induzida por ATP?

Genesteína, Tirfostina e PD98059 não inibiram a morte causada por ATP 5mM

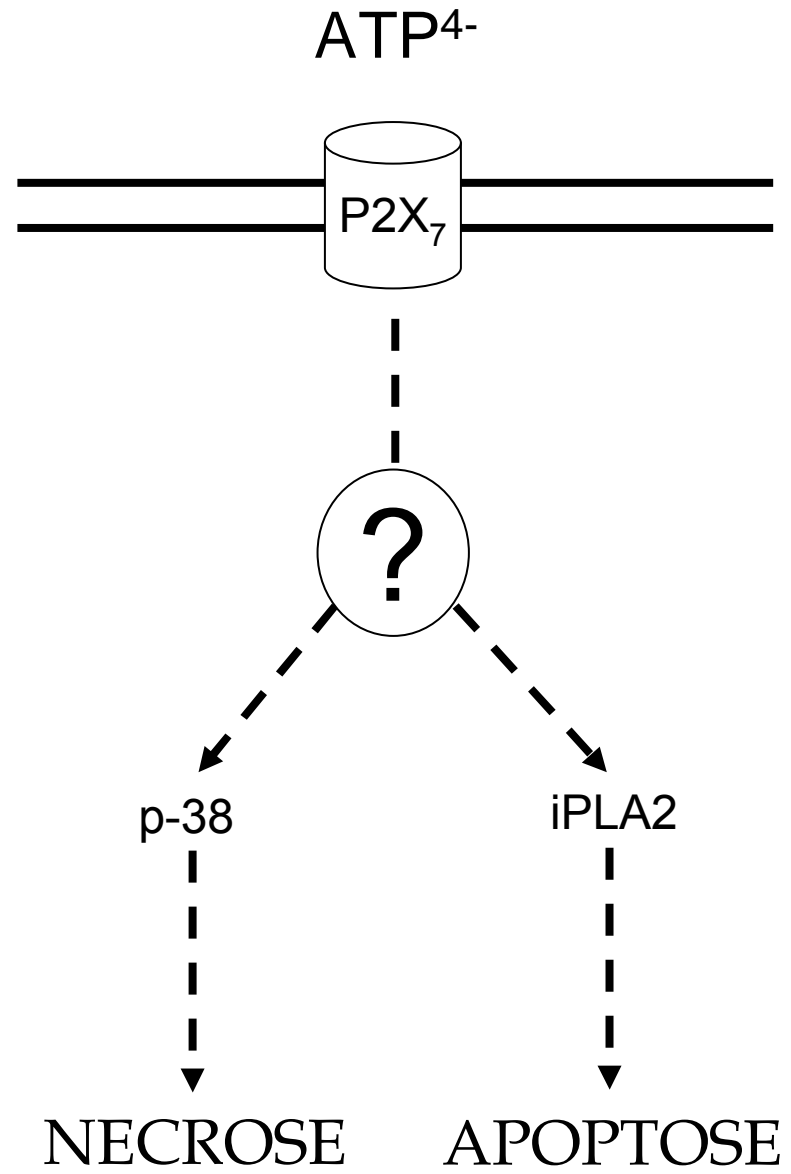
Dissertação de Mestrado, Cruz, C.M. 2002



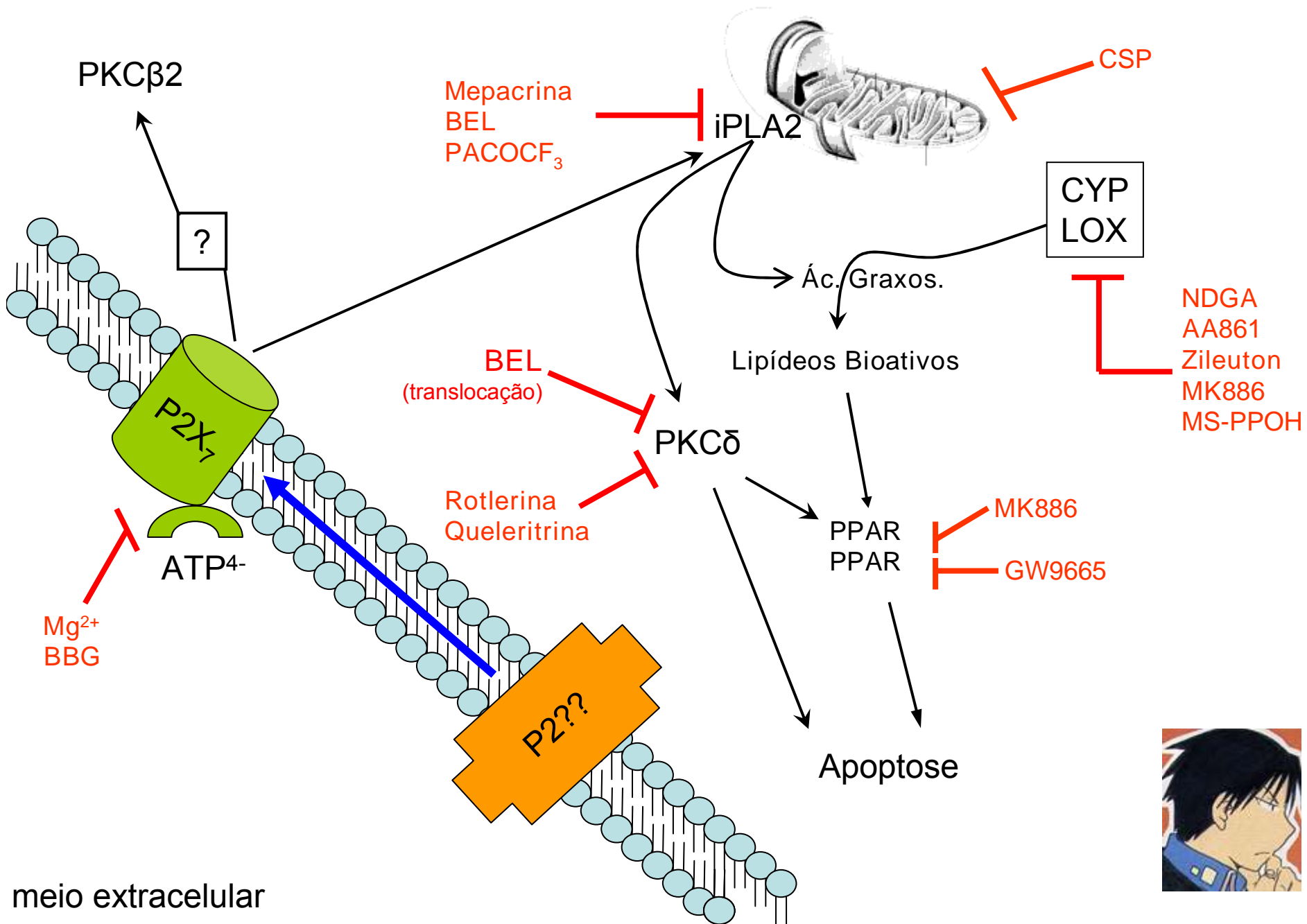


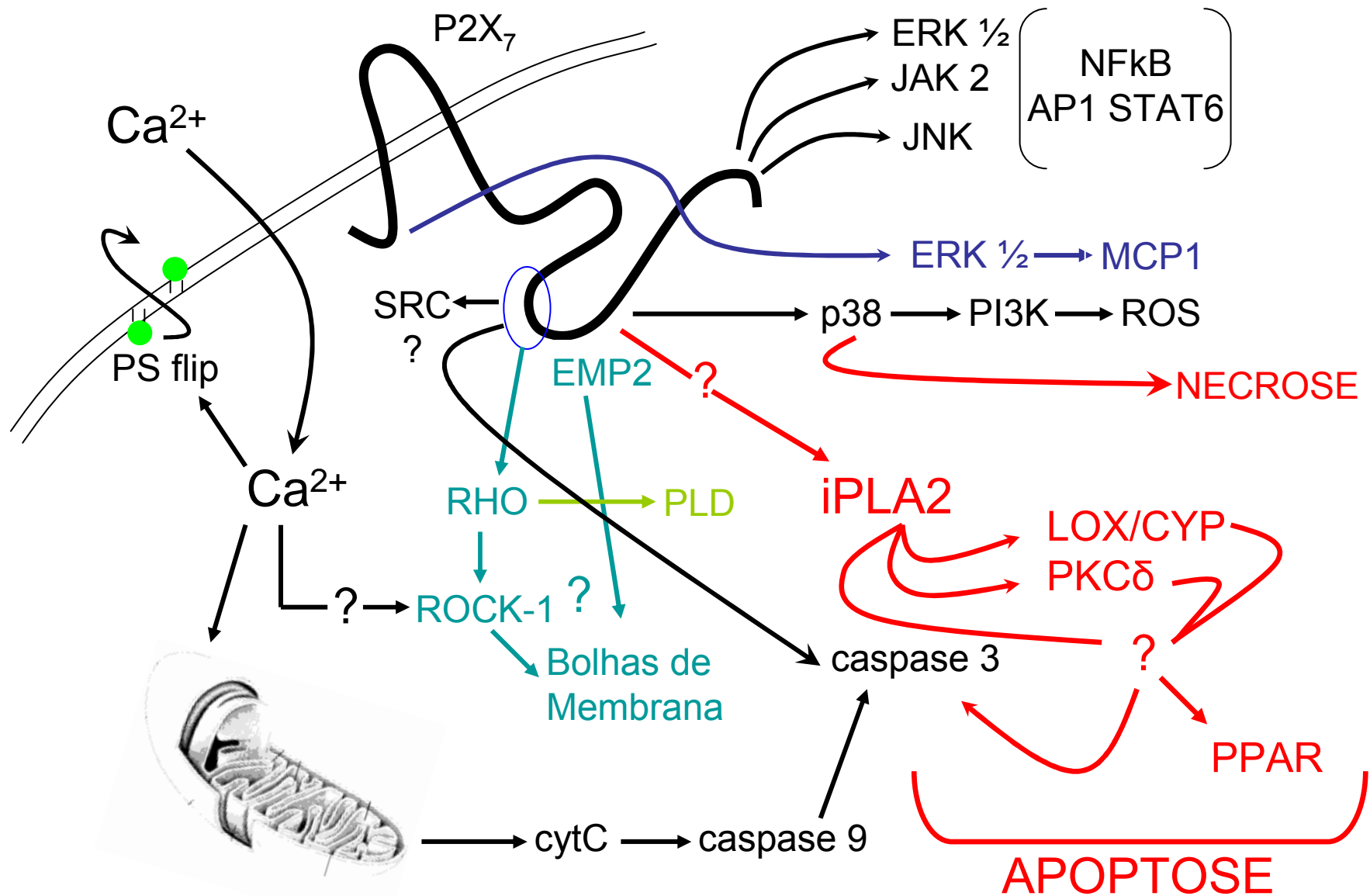
Conclusões

1. A morte induzida por ATPe é dependente do P2X₇ e, em uma fase inicial é independente de Ca²⁺.
2. Uma iPLA2 é a responsável pela morte evocada por ATPe/P2X₇, ativando a PKCδ e em paralelo ativando as vias de LOX e de síntese de EET por CYP450.
3. Macrófagos intraperitoneais murinos ativados por tioglicolato e mantidos em cultura por 96 horas possuem como formas majoritárias de PKC as PKCβ2 e PKCδ.
4. A PKCδ é ativada por ATPe, translocando para frações de membrana. A rotlerina, seu inibidor seletivo, é capaz de inibir sua atividade, vista pela inibição da apoptose por ATP/P2X₇, mas não é capaz de inibir sua translocação.
5. A inibição da cinase p38 por SB203580 é capaz de inibir a lise celular provocada por ATPe/P2X₇.
6. A apoptose provocada por ATP/P2X₇ é revertida pela inibição farmacológica de PPARα e PPARγ, sendo apenas o PPARα é ativado por ATPe.

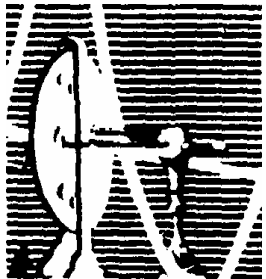


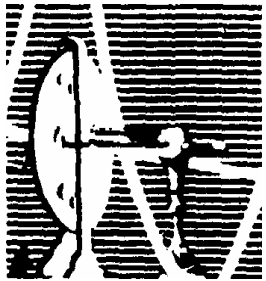
citoplasma





○ = death & SH3 domain







*“Sei que a Arte é irmã da Ciência
Ambas filhas de um Deus fugaz”*

Quanta, Gilberto Gil

13/07/2006

HELIO MIRANDA COSTA JUNIOR

“Sinalização intracelular ativada por ATP
via receptores P2X₇ na apoptose de
macrófagos intraperitoniais é
dependente de fosfolipase A2 e proteína
cinase C”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO

Costa-Junior, Helio Miranda

Sinalização intracelular ativada por ATP/P2X7 na apoptose de macrófagos intraperitoneais é dependente de fosfolipase A2 e proteína cinase C

xx, 138 fls

Tese: Doutorado em Ciências (Biofísica)

1. Fosfolipases A2. 2. PKC. 3.PPAR. 4.P2X₇. 5. Macrófago. 6. Apoptose.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

II. Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiofísica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Dr. Pedro Muanis Persechini, tendo sido financiado pelas seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX)

Fundação José Bonifácio (FUJB)

Olhos Inocentes: A Evolução da Visão

“No início, existiam criaturas unicelulares que podiam flutuar de um lado para o outro e farejar algumas mudanças químicas em seu mundo de “caldo primitivo”. “Isto é tudo que existe para ser aprendido”, elas disseram, e continuaram suas existências limitadas, absorvendo e dividindo, absorvendo e dividindo, e criando muitas outras iguais a si mesmas.

Mas uma minoria radical de alguma forma sabia que havia muito mais lá fora do que proteínas e cadeias de aminoácido. Elas podiam sentir isso em seus cílios, flagelos e nucléolos. Elas não tinham como provar, mas sabiam que havia mais a ser conhecido Lá Fora. Embora a maior parte da comunidade biológica rejeitasse essa tese radical e taxassem seus defensores de loucos, uns poucos quiseram levantar o véu e conhecer o restante de seu universo.

Então eles colocaram sua vida potencialmente eterna em risco e, com medo e água quente, organizaram-se em monstros multicelulares. Naquele momento transcendente eles ABRIRAM SEU PRIMEIRO OLHO! Não um olho verdadeiro, claro, mas uma coleção de nervos óticos ativos.

Boa jogada! Agora elas podiam SENTIR suas conexões com o caldo primitivo que as envolvia e sabiam um pouco mais sobre o que havia Lá Fora. Isto concedeu-lhe uma vantagem extraordinária sobre os desprovidos de sentidos, os quais tornaram-se seu alimento. Impulsionados por esse novo fluxo de informações, a nação nematóide inventou o sexo. Outra boa jogada, porque assim, além de se multiplicarem como doidos, naquele momento mágico de união enlouquecida, também entravam em contato com um sentimento silencioso nas profundezas de seus nervos.

Ainda havia mais a ser aprendido! E enquanto o restante dos vermes escarnecia deles e chamavam-nos de loucos, os pioneiros concentravam seus nervos na direção do estímulo fraco, impossivelmente fraco que dirigia-se a eles todos. Num momento transcendente, eles ABRIRAM SEU SEGUNDO OLHO!

Luz! Som! Filmes coloridos! Mais uma boa jogada! O universo continuou a se descortinar para eles, numa cornucópia sensual de

informação sobre O Que Está Lá Fora e sua conexão com essa coisa. E eles mergulharam nesse universo de possibilidades - comendo, reproduzindo, assistindo 500 canais de tevê a cabo. Um frenesi de diversão sensual mais tarde, o caldo orgânico agora estava cheio desses Filhos do Agrupamento Organizado de Nervos.

Embora algo nas profundezas de suas glândulas lhes dissesse que ainda havia mais a ser conhecido, a maioria deles cometeu o erro de seus ancestrais unicelulares. Eles escarneceram da noção de que ainda havia mais a ser descoberto e muitas formas de descobrir e chamaram esses dissidentes de loucos. Muito bem, mas uns pioneiros concentraram a sua atenção no som parado e doce que se encontrava do outro lado da consciência sensorial, misturado em alguma parte dentro dos recessos do seu sistema glandular e, num momento transcendente, ABRIRAM SEU TERCEIRO OLHO!

Mais uma boa jogada! Eles receberam mensagens e informações sensoriais desconhecidas pelo povão ou pelos analistas de mercado, e tão difícil de serem explicadas às pessoas comuns, quanto ensinar trigonometria a uma minhoca. Eles deram outro salto quântico em seu conhecimento sobre O Que Esta Lá Fora e sua conexão inefável com essa coisa. Mas o resto das pessoas comuns e dos analistas de sistemas chamaram-nos de loucos. Bem, vinte e três zilhões de bactérias disseram a mesma coisa há um milhão de anos. E Adivinha o que elas são hoje? Bactérias!

Portanto, eu lhe digo: seja louco! Seja voluntariamente insano diante do resto do mundo. Vista a sua loucura individual com orgulho! Derrube a tirania dos mecanismos de abastecimento neurológico e liberte os sentidos!"

*Livro do Clã Malkavian
Editora Devir, página 16*

1996

Este tese é dedicada a todos que vieram antes de mim, que ela ajude os que
estão ainda por vir.

AGRADECIMENTOS:

Talvez esta seja a parte mais difícil para se escrever durante qualquer tipo de tese, dissertação, monografia ou discurso. Sempre temos muitas pessoas para agradecer e nem sempre lembramos de todos, especialmente no meu caso, pois minha memória anda “caducando” recentemente, então se eu por incapacidade minha esqueci de você, ou ainda se você lembrou de alguém que eu esqueci, me desculpe e saiba de antemão que você também foi importante para a conclusão desta tese.

Primeiramente quero agradecer à minha mãe e à minha irmã, pois sem elas eu provavelmente não teria chegado na metade do caminho que percorri, ambas são as pessoas mais importantes na minha vida, sempre estando do meu lado, mesmo quando estou errado (salvo quando elas estão certas). Muito obrigado mãe. Muito obrigado Camila.

À Velha, mesmo que no momento ela não se encontre mais conosco. Ela só deixava eu e minha prima Paula chamá-la de Velha. Vó muito obrigado por tudo, obrigado por esconder da minha mãe as besteiras que eu fazia. Eu sinto a sua falta.

À Camila, meu amorzinho, por me aturar e ter muita, mais muita paciência comigo, eu sei que não sou das pessoas de mais fácil trato. Que o nosso futuro seja tudo que desejamos juntos.

A Celeste e Roberto, por ter colocado a Camila no mundo.

A minhas tias, tios, primos e primas por sempre se importarem, mesmo em graus diferentes.

À Luna, por sempre chegar na hora que eu não posso brincar com ela.

Ao Seu Nome, pela cantoria.

Ao Pedro, meu chefe, mesmo que as vezes a vontade de brigar com ele seja grande. Eu tenho muito a lhe agradecer, aprendi muito no laboratório dele. Principalmente como ser chato com controles e experimentos e detalhes.

Ao Robson, que mesmo tendo me perdido quando fui procurar o laboratório pela primeira vez, sempre se empolgou com os dados que eu levava a ele.

Ao Vandir e ao Hércules, os nossos técnicos para toda obra, pela ajuda, conversas e cafezinhos ao longo desses 6 anos.

Ao povo do laboratório de Imunobiofísica; Fernanda (Fernandinha-Queima-Fusível), Julieta (Violeta), Flavinha, Carol, Natália e Camila pelos anos de brigas, descontração e bagunça. Muito obrigado.

À Cristiane pela companheira e amiga que ela foi e é.

Ao Anderson, esse cara é 10.

Aos meus grandes ex-alunos de iniciação científica; Rafael Cordão, o primeiro de todos, sempre “na boa”; Gustavo, um chaveirinho de gente, mas uma grande pessoa; Flávia Calmon, a melhor aluna que eu já tive (isso vai deixá-la feliz!). Ao Eduardo e à Biscoito, mesmo não tendo sido meus alunos de iniciação, tive o prazer de partilhar o pouco que sei com eles durante seus seis meses comigo. E, por último ao Bruno (jovem-gafanhoto-do-campo-florido) que continuará meus passos no laboratório.

A Professora Narcisa Leal da Cunha-e-Silva, pelo apoio na revisão desta tese e pela paz que me transmitiu ao avaliar a mesma.

A Professora Maria Helena da Silva do Instituto de Microbiologia por sua ajuda durante nossas tentativas de adentrar no mundo da purificação de proteínas.

Aos Professores Takashi e Gisele, por terem me recebido no início de minha vida científica.

Ao Professor Paulo Melo, que sempre ao me encontrar mede minha pressão e pergunta se está tudo bem.

Aos Professores Lucia Faccioli e Auro Mizuno por terem recebido a mim e ao Anderson em Ribeirão Preto.

Aos Professores Célio Freire, Bruno Diaz e Marcelo Lamas por sua ajuda ao longo de meu doutorado.

Ao Brian “O Cara” pela ajuda no *tunnel*. Obrigado Brian e obrigado aos Professores Rafael Linden e Mariana Silveira.

À Professora Vivian que me orientou em uma fase de transição importante, que resultou no meu ingresso no laboratório do Pedro.

À Professora Cerli, a mais jovial do programa de Imunobiologia, as cervejas que ela cedeu na FeSBE passada foram salvadoras.

À Sandrinha e ao Diogo por todas as vezes que eu ia incomodá-los com perguntas que as respostas estavam no sito da pós-graduação.

À Deborah Schetchman, por sua ajuda com o desenvolvimento desta tese.

À Rika-sensei, muito obrigado por acreditar em mim, mesmo que não continuando o japonês, saiba que eu sinto falta de ambos. Domo arigatoo gozaimasu sensei.

Ao Professor Dino Rotondo, por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Strathclyde, mas continuo achando o PC mais fácil de usar que o MAC.

À mala do Rodrigo, meu irmão de ventre diferente. Ao Daniel Jack, meu amigo mais “imparcial e humanitário”. Ao Fábio “hepato-pâncreas do inferno”, meu amigo você faz falta aqui. À Miriam, uma pessoa a quem tenho guardada em um lugar especial. Aos meus amigos da gangue; Ilona (minha outra irmãzinha), Corinthio, Michel, Baran (Eloquência Silenciosa), Ana Partidão, Alf, ao grande Tito-kun, minha comadre Dani e meu afilhado Davi, Fernanda Queiroz, ao casal “até que em fim casaram” Flávio e Carina, Amandinha (a mais espivitada de todas que conheço), a todos vocês meus amigos. Vocês são a família que eu escolhi para ter ao meu lado, mesmo que às vezes eu fique distante fisicamente, eu sempre penso em vocês. A alegria de vocês é a minha alegria. A Felicidade de vocês é a minha felicidade. A tristeza de vocês é o sinal para que eu apareça falando bobagem e fazendo besteira para vocês sorrirem.

Ao meu pai.

Minasan, hontooni iroiro osewani narimashita.

Domo arigatoo gozaimashita.

ABREVIATURAS

- AA Ácido araquidônico
- AA8612,3,5-trimetil-6-(12-hidroxi-5,10-dodecadinil)-1,4-benzoquinona
- AACOOCF₃ araquidoniltrifluorometil cetona
- ADP difosfato de adenosina
- AMP monofosfato de adenosina
- AMPc monofosfato de adenosina cíclico
- aPKC Proteína cinase C atípica
- ATP trifosfato de adenosina ou adenosina trsfosfato
- ATPe trifosfato de adenosina extracelular
- BBG Azul brilhante G – *brillant blue G*
- BE Brometo de etídio
- BEL 2-bromo-enol lactona
- BzATP 3`-O-(4-benzoil)-5`-trifosfato de adenosina
- COX Cicloxigenase
- cPKC Proteína cinase C convencional
- cPLA2 Fosfolipase A2 citosólica dependente de cálcio
- CSA Ciclosporina A
- CYP450 Cítocromo P450
- DAG Diacilglicerol
- DNA Ácido de desoxirribonucléico
- EET Ácidos cis-epoxieicosatrienólicos
- ERK Cinase regulada por sinal extracelular
- FLAP Proteína ativadora da 5-lipoxigenase – *five lipoxygenase activated protein*

- HEPES Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etanosulfônico
- HETE Ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos
- HODE Ácidos hidroxi-octadecadienóicos
- IL-xxx Interleucina xxx
- IP3 Inositol trifosfato
- iPLA2 Fosfolipase A2 citosólica independente de cálcio
- JNK Cinase do N-terminal da c-jun – *c-jun N-terminal kinase*
- LDH Lactato desidrogenase
- LOX Lipoxigenase
- LPA Ácido liso-fosfatídico
- LPC Liso-fosfatidilcolina
- LT Leucotrieno
- MAGuK Guanilato cinase associada a membrana
- MAPK Proteínas cinases ativadas por mitógeno – *mitogen activated protein kinase*
- MEK MAP/ERK cinases – *MAP kinase kinases*
- MEKK MAP/ERK cinases cinases – *MAP kinase kinase kinases*
- MgDDP Fosfatidato-fosfohidrolase dependente de Mg²⁺
- MK571 Ácido(E)-3-[[[3-[2-(7-Cloro-2-cinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxopropil]thio]metil]tio]-propanóico
- MK886 Ácido 3-[1-(para-Clorobenzil)-5-(isopropil)-3-t-butiltioindol-2-il]-2, 2-dimetilpropanóico
- MS-PPOH N-metilsulfonil-6-(2-propargiolxifenil)-hexamida
- NFAT Fator nuclear de ativação de células T - *nuclear factor of activated T cells*

- NDGA Ácido Nordihidroguaiarético
- nPKC Proteína cinase C nova
- NS-398 N-(2-Ciclohexiloxi-4-nitrofenil)-Metanosulfonamida
- P2X7t Receptor P2X7 truncado
- PACOCF₃ Palmitoil trifluorometil cetona
- PAF Fator ativador de plaquetas – *platelets activating factor*
- PARP Poli-ADP ribose polimerase
- pBPB Brometo de para-bromofenacila
- PBS Tampão salina fosfato
- PG Prostaglandina
- PI4K Fosfatidilinositol 4 cinase
- PKC Proteína cinase C
- PLA2 Fosfolipase A2
- PLC Fosfolipase C
- PLD Fosfolipase D
- PMSF Fenilmetano-sulfonil fluorado
- PPADS pirodoxalfosfato-6-azofenil 2',4'-ácido disulfúrico
- PPAR Receptores de ativação de proliferação peroxisomais -
Peroxisome proliferation-activated receptor
- PS Fosfatidilserina
- PTN G Proteína G heterotrimérica
- PTP Poros de permeabilidade transiente – *permeability transition pore*
- Quel Cloreto de queleritina

- RACK Receptores de proteína cinase C ativada – *receptor for activated C-kinases*
- RE Reticulo endoplasmático
- RNA Ácido ribonucléico
- Rot Rotlerina
- SB202190 [4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)1H-imidazolio]
- SB203580 [4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazolio]
- SDS Dodecil Sulfato de sódio
- sPLA2 Fosfolipase A2 secretória
- TBS Tampão salina trizma-HCl
- TNFR1 Receptor 1 de TNF
- Triton X-100 t-octilfenolpolietoxietanol
- U-73122 {1-[6((17 -3-Metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il)-1H-pirrole-2,5diona)}
- UDP difosfato de uridina
- UTP trifosfato de uridina

RESUMO:

O P2X₇ é um receptor capaz de ativar múltiplas vias de sinalização intracelular. No presente trabalho, procuramos estudar algumas destas vias de sinalização, associando-as com a indução de morte por ATP extracelular (ATPe) via o receptor P2X₇. Nós estabelecemos um protocolo de indução de morte, dividindo-o em duas fases: uma fase indutora com tratamento com ATPe por 20 minutos; seguido de uma fase efetora, com 6 horas de incubação e ausência do ATPe. Observamos que a morte celular por ATPe/P2X₇ foi independente do íon Ca⁺² durante a fase indutora, mas possivelmente envolve fenômenos dependentes de Ca⁺², como sugere a inibição causada por ciclosporina A na fase efetora. Identificamos a participação de uma fosfolipase A2 independente de Ca²⁺ (iPLA2) no processo de morte celular por ATPe/P2X₇, pela utilização de dois inibidores específicos, PACOCF₃ e BEL, que promoveram a diminuição da apoptose e o aumento da lise celular. Subsequentemente à ação da iPLA2, foram observadas as ativações de três vias distintas. Dados prévios mostravam que a morte celular por ATPe/P2X₇ é parcialmente dependente da via das lipoxigenases. Entretanto, animais deficientes na 5-LOX não sofreram redução nos níveis de morte causado por ATPe/P2X₇oi5

r Aêe

ABSTRACT:

The P2X₇ is a receptor related with multiple signaling activation pathways. In the present work, we had investigated some signaling pathways, associating the cell death induced by extracellular ATP (ATPe) with P2X₇ receptor. We had established a protocol that divides the cell death analysis in two steps: the induction phase, with 20 min treatment of ATPe; followed by the effector phase, with 6 h of chase in the absence of ATPe. We observed that cell death by ATPe/P2X₇ presents two distinct moments, a earlier Ca²⁺ independent phase, followed by a delayed phase with a Ca²⁺ dependent phenomena, as suggested by the inhibition with cyclosporine A. We have identified an involvement of an iPLA2 in the process of cell death by ATPe/P2X₇, using two specific inhibitors, PACOCF₃ and BEL, where both provoke a reduction of apoptosis and enhance of necrosis. Subsequently to iPLA2 action, we detected the activation of three distinct signaling pathways. Previous data had demonstrated that cell death by ATP/P2X₇ is partially dependent of LOX pathway. However, knock-out mice for 5-LOX had not suffered reduction in cell death levels caused by ATPe/P2X₇, suggesting the participation of another signaling pathway. This pathway might correspond to the CYP450, as an inhibitor of EET synthesis, MS-PPOH, was responsible by inhibition of both apoptosis and necrosis. The third signaling pathway triggered by iPLA2 corresponds to an activation of the specific PKC , where the inhibition by rottlerin was capable to abolish the apoptosis induced by ATPe/P2X₇, and its activation was blocked by BEL. Finally, we had observed that the inhibitors for PPAR_α and PPAR_β , blocked the apoptosis induced by ATPe/P2X₇, but only the PPAR_α was activated in cells treated with ATPe. Our results suggest the involvement of the iPLA2, with the activation LOX and CYP450 pathways together with the PKC , and participation of PPAR_α and PPAR_β in apoptosis induced by ATPe/P2X₇.

INDICE:

A	Introdução	1
A.1	Adenosina Trifosfato	1
A.1.1	Exocitose do ATP	2
A.1.2	Controle do ATP extracelular	4
A.2	Receptores Purinérgicos	6
A.2.1	Receptores P2Y	7
A.2.2	Receptores P2X	11
A.2.3	O receptor P2X7	15
A.2.4	Morte celular induzida por P2X7	20
A.3	Vias de sinalização intracelular mediadas por lipídeos	23
A.3.1	Fosfolipases A2	23
A.3.2	Ciclooxigenases, lipooxigenases, citocromo P450 e o metabolismo de ácidos graxos	26
A.4	Proteínas cinases	33
A.4.1	A MAPK p38	33
A.4.2	Proteína cinase C	35
A.5	Receptores de ativação de proliferação peroxisomais	39
B	Objetivos	43
B.1	Objetivo geral	43
B.2	Objetivos específicos	43
C	MATERIAIS & MÉTODOS	45
C.1	Obtenção de macrófagos intraperitoneais murinos	45
C.2	Cultura de macrófagos intraperitoneais murinos	46
C.3	Protocolo experimental de indução de morte celular	46
C.4	Deteção de morte celular por citometria de fluxo	47
C.5	Ensaio da liberação de LDH	49
C.6	Dosagem de proteína	49
C.7	Fracionamento e translocação	50
C.8	Eletroforese SDS-PAGE e western blotting	51
C.9	Ensaio de <i>tunnel</i>	52
C.10	Normalizações e teste estatístico	52
C.11	Reagentes	53
D	RESULTADOS	57
D.1	ATPe induz apoptose e liberação de LDH de forma dependente de P2X7	55
D.2	Independência de Ca ²⁺ na fase de indução	62
D.3	Ciclosporina A inibe a apoptose induzida por ATPe	65

D.4	Apoptose induzida por ATPe é dependente de fosfolipase A2 independente de Ca ²⁺	64
D.5	AA e as vias abaixo da iPLA2	77
D.6	Participação da p38 na lise celular por ATPe/P2X7	87
D.7	Morte celular induzida por ATPe/P2X7 é dependente de proteína cinase C	91
D.8	Ativação de PPAR por ATPe/P2X7	101
E	Discussão	103
F	Conclusões	123
G	Referências	124

INDICE DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1 - Fórmula estrutural da molécula de ATP.	2
Figura 2 - Modelo da ação do ATP na maturação de linfócitos.	4
Figura 3 - Ação das ecto-nucleotidases sobre o ATPe.	6
Figura 4 - Caracterização dos receptores P2Y.	8
Figura 5 - Esquema ilustrativo da organização dos receptores P2X.	12
Figura 6 - Modelos da abertura do poro do P2X ₇ .	18
Figura 7 - Esquema representativo da estrutura de um fosfolípídeo e a ação da PLA2.	25
Figura 8 - Vias abaixo a PLA2.	27
Figura 9 - Esquema ilustrativo das vias de COX e LOX.	29
Figura 10 - Metabolização do ácido araquidônico pela via do CYP450.	30
Figura 11 - Cascata de ativação das MAPK.	34
Figura 12 - Caracterização estrutural e comparativa das subfamílias de PKC.	36
Figura 13 - Modelo da estrutura da PKC .	39
Figura 14 - Esquema ilustrativo do PPAR com o mecanismo de ativação, regulação e sítios de fosforilação.	42
Figura 15 - Gráficos ilustrativos do método de análise da fragmentação do DNA das células alvos.	48
Figura 16 - Indução de morte por nucleotídeo extracelular.	57
Figura 17 – Ação do Mg ²⁺ e do BBG na apoptose induzida por P2X ₇ .	60
Figura 18 - Dependência do receptor P2X ₇ na apoptose induzida por ATPe.	61
Figura 19 - BAPTA-AM não é capaz de inibir a apoptose gerada pelo ATPe.	64
Figura 20 - Ciclosporina A inibe a apoptose, mas não a liberação de LDH por ATPe/P2X ₇ .	66
Figura 21 - Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por mepacrina.	70
Figura 22 - O pBPB não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH.	71
Figura 23 - O AACOCF ₃ não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH.	72
Figura 24 - Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por PACOCF ₃ .	73
Figura 25 - Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por BEL.	74
Figura 26 - Efeito do propranolol na apoptose induzida por ATPe/P2X ₇ .	76
Figura 27 - Indução de morte celular por metabólitos da PLA2.	78
Figura 28 - Efeito do ATPe nos animais 5-LOX ^{-/-} .	81
Figura 29 - Inibidores da 5-LOX não inibem a apoptose nas células 5-LOX ^{-/-} .	82
Figura 30 - Efeito da inibição do citocromo P450 na morte celular provocado por ATPe/P2X ₇ .	84
Figura 31 - Comparação entre as apoptoses induzidas por ATPe e AA.	86
Figura 32 - SB202190 não afeta a morte celular promovida por ATPe/P2X ₇ .	89
Figura 33 - SB203580 não afeta a apoptose promovida por ATPe/P2X ₇ , mas inibe a liberação de	90

LDH.

Figura 34 - Inibidor genérico para PKCs inibi a apoptose, mas não a liberação de LDH provocada por ATPe/P2X ₇ .	92
Figura 35 - Expressão das isoenzimas de PKC em macrófagos aderidos.	94
Figura 36 - Translocação da PKC α por ATPe.	96
Figura 37 - Translocação da PKC β por ATPe.	96
Figura 38 - Inibidor específico para PKC α bloqueia a apoptose provocada por ATPe/P2X ₇ .	98
Figura 39 - Ação dos inibidores da iPLA ₂ e PKC α na translocação da PKC α .	100
Figura 40 - Possível envolvimento dos PPAR α e β na apoptose por ATPe.	102
Figura 41 - Indução da translocação nuclear dos PPAR α e PPAR β por ATPe.	103
Figura 42 - Modelo proposto da sinalização via ATPe/P2X ₇ .	117
Figura 43 - Provável ponto divisor entre as sinalizações apoptóticas e necróticas.	119
Figura 44 - Modelo esquemático da multi-ativação de vias de sinalização por P2X ₇ .	122
Tabela I - A família dos receptores P2Y.	10
Tabela II - A família dos receptores P2X.	14
Tabela III - Tabela dos ácidos graxos mais comuns em animais.	31
Tabela IV - Ação dos inibidores das vias de COX e LOX na apoptose por ATPe/P2X ₇ .	33
Tabela V - Lipídeos ativadores dos diferentes PPAR.	40

“Os corações estavam pesados e muitos estremeciam diante da sombra. Mas eram um povo resoluto, leal ao seu senhor, e ouvia-se pouco de choro ou murmúrio, mesmo no acampamento da Fortaleza, onde se abrigavam os exilados de Edoras, mulheres, crianças e velhos. O destino pairava sobre eles, que o enfrentavam em silêncio.”

(O Senhor dos Anéis – As Duas Torres)

A - INTRODUÇÃO

“Mas as coisas loucas do mundo, escolheu-as Deus para confundir os sábios; e as coisas fracas, escolheu-as Deus para confundir os fortes...”

1 Coríntios 1:27

Por muitos anos a molécula de adenosina trifosfato (ATP) foi tratada como sendo apenas parte integrante das macromoléculas informacionais, ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), ou então como a fonte de energia para a célula. Contudo, avanços em diferentes áreas do conhecimento transformaram o que pensávamos do ATP. No meio extracelular ele é uma importante molécula sinalizadora, atuando em diferentes células e sistemas.

No presente trabalho, iremos investigar o papel do ATP extracelular (ATPe) na sinalização intracelular, através dos receptores de nucleotídeos P2 e seu envolvimento com a morte celular.

A.1 – Adenosina trifosfato

Um nucleosídeo consiste de uma base purina (adenina e guanina) ou pirimidina (citocina e timidina) (Fig. 1) ligada a uma pentose. Já os nucleotídeos são ésteres de fosfato compostos a partir dos nucleosídeos, com a esterificação no carbono 5 da pentose (Fig. 1).

O ATP é um nucleotídeo formado por uma adenina, uma pentose e uma unidade trifosfato. A unidade trifosfato possui duas ligações fosfoanidrido, de aproximadamente 12 kcal/mol de energia livre, tendo sido Lipmann e Kalckar em 1941 os primeiros a estabelecer o papel central do ATP nas trocas de energia em sistemas biológicos (Apud *Stryer, 1988*).

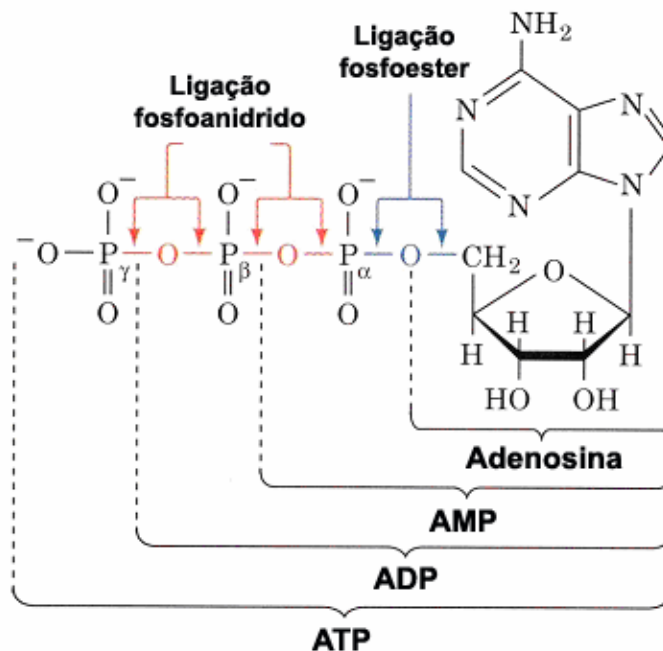


Figura 1: Fórmula estrutural da molécula de ATP. Fórmula estrutural da molécula de ATP e a sua decomposição até a adenosina, com as ligações fosfoanidrido (em vermelho) e fosfoéster (em azul) assinaladas em destaque.

A.1.1 – Exocitose do ATP

Se pretendermos estudar os efeitos do ATP em receptores celulares, é importante ter em mente como esse ATP ganha o meio extracelular. As primeiras propostas de como o ATP poderia ser levado para fora da célula baseavam-se no simples fato da lise celular liberar todo o conteúdo das células, inclusive o ATP (Ferrari *et al*, 2006). Este conceito simples é correto, mas pode explicar a liberação de ATP apenas diante de um quadro de injúria celular.

Autores como Burnstock, Di Virgilio e Lazarowski revisaram amplamente este tema, demonstrando que vários estímulos diferentes são capazes de acarretar na liberação do ATP sem causar a lise da célula (Bodin e Burnstock 2001; Lazarowski *et al* 2003a; Ferrari *et al* 2006). Estes mecanismos podem ser divididos em 2 grupos distintos: o primeiro através da exocitose de grânulos; e o segundo pela ação

envolvendo canais iônicos e transportadores de membrana (Fig. 2) (*Bodin e Burnstock. 2001; Lazarowski et al 2003a, Ferrair et al 2006*).

Em neurônios, o ATP é co-estocado com catecolaminas, serotoninas e outras moléculas nos grânulos secretórios dos terminais sinápticos. A ativação de proteínas secretórias por sinais de Ca^{+2} promove secreção destes grânulos e liberação do ATP (*Lazarowski et al 2003a*). Fenômeno semelhante ocorre com os mastócitos estimulados com IgE, que acarreta na liberação de seus grânulos contendo ATP (*Schulman et al 1999*).

Já os outros mecanismos de liberação de ATP variam de acordo com o modelo estudado. Entre eles podemos destacar os estímulos mecânicos, como a distensão do músculo liso e o atrito do sangue nos vasos, que são capazes de levar à liberação de ATP pelas células endoteliais (*Bodin e Burnstock 2001*), a exposição a LPS ou IL-1 induz a liberação de ATP por parte do macrófago e microglia (*Ferrari et al 2006*) ou a ligação de agonista de vários receptores, como ADP (difosfato de adenosina) ou trombina (*Bodin e Burnstock 2001; Di Virgilio et al 2001*) que também são capazes de liberar ATP em plaquetas, linfócitos e outros tipos celulares. Estes estímulos levam à liberação de ATP por canais iônicos ou transportadores do tipo ABC em vários tipos celulares (*Bodin e Burnstock 2001; Lazarowski et al 2003a; Ferrari et al 2006*).

A Figura 2 ilustra um modelo de liberação de ATP na ativação da célula T, onde uma célula apresentadora de antígeno (APC) libera ATP para o meio extracelular por poros de membranas. Este ATP agora agirá sobre receptores para nucleotídeos no timócito, auxiliando na sua maturação. O ATP pode ainda ser convertido a outros nucleotídeos ou a adenosina e atuar sobre outros receptores modulando a resposta da célula T ativada (*Sitkovsky 1998*)

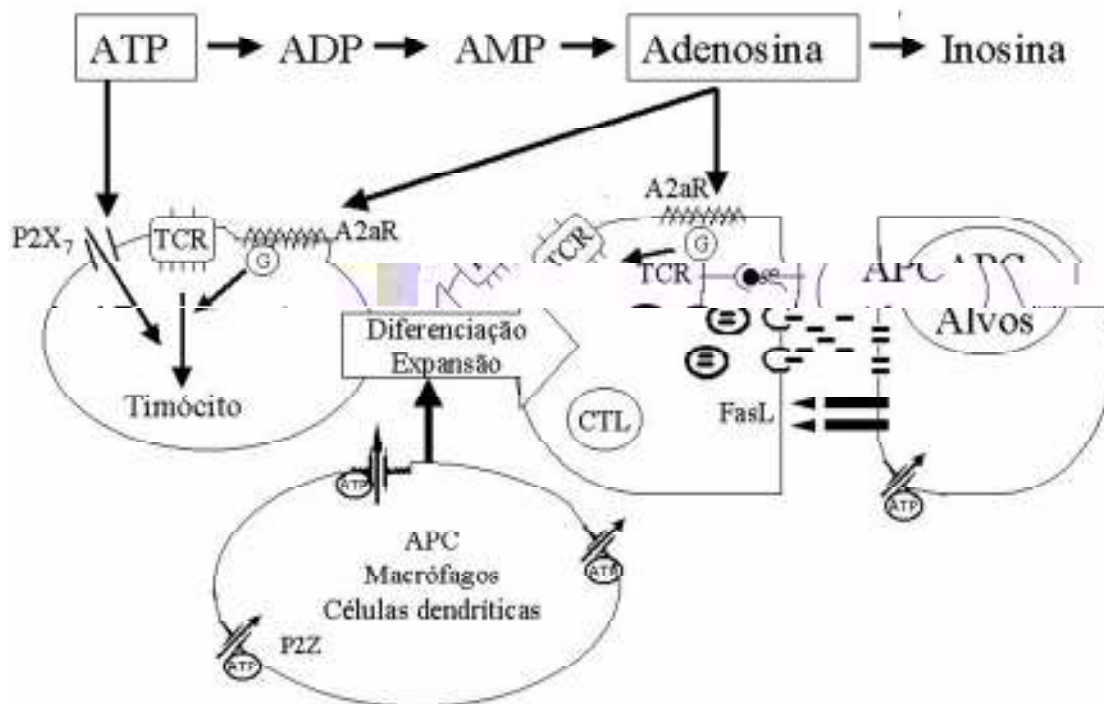


Figura 2: Modelo da ação do ATP na maturação de linfócitos. No modelo acima se observa o ATP ser liberado por células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos ou células dendríticas, por poros ou canais. No meio extracelular o ATP ativa o receptor P2X₇ em timócitos levando a sua diferenciação para linfócitos T citotóxicos (CTL). O CTL ativado interagirá com a APC podendo sofrer influências do próprio ATP ou de seus metabólitos, como a adenosina que pode agir nos receptores A2aR., que entre outras ações é capaz de modular o receptor de célula T (TRC). (Sitkovsky 1998)

A.1.2 – Controle do ATP extracelular

Estima-se que a concentração de ATP no meio extracelular seja de 1 a 10 μM (Adinolfi, E. et al 2005), enquanto que no interior de célula estas concentrações poderiam atingir 10 mM no citoplasma e 150 mM em grânulos secretórios (Lazarowski, E. R. et al 2003a). Uma vez no meio extracelular, o ATPe pode atuar sobre receptores para ele ou ser metabolizado para suas formas di- ou monofosfato, ativando diferentes receptores (Fig. 3).

O principal mecanismo responsável por controlar a função do ATPe é a ação de um grupo de enzimas associada ao lado extracelular da membrana plasmática, as ecto-nucleotidasas. Estas enzimas são responsáveis pela clivagem do ATPe em suas moléculas relacionadas, pela retirada do fosfato inorgânico até a molécula de adenosina (*Zimmermann 2000; Zimmermann 2001; Novak 2003*). A família da 5' trifosfato difosfohidrolase é a mais bem estudada entre as ecto-nucleotidasas, sendo proteínas integrais de membranas capazes de hidrolisar trinucleotídeos ou dinucleotídeos (*Zimmermann 2001*).

Já a família das ecto-fosfodiesterases/nucleotídeo pirofosfatases é capaz de converter os trifosfo-nucleotídeos em monofosfo-nucleotídeos, inclusive nucleotídeos conjugados com açúcares, e são proteínas transmembranas semelhantes à família descrita acima. Por último, a ecto-5'-nucleotidase e a fosfatase alcalina, ambas ancoradas na membrana via glicosil fosfatidilinositol, são as maiores responsáveis pela geração de AMP (monofosfato de adenosina) (*Zimmermann 2001; Novak 2003*).

Além das ecto-nucleotidasas, existem também outras enzimas que são capazes de promover a troca do fosfato inorgânico entre os nucleotídeos, como é o caso do nucleosídeo difosfocinase que pode fazer a fosforilação reversa entre UDP (difosfato de uracila) ou GDP (difosfato de guanina) com ATP ($ATP + UDP \rightarrow ADP + UTP$ [trifosfato de uracila]) e da adenilil ciclase que a partir de duas moléculas de ADP é capaz de gerar uma de ATP e uma de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) (*Novak. 2003*).

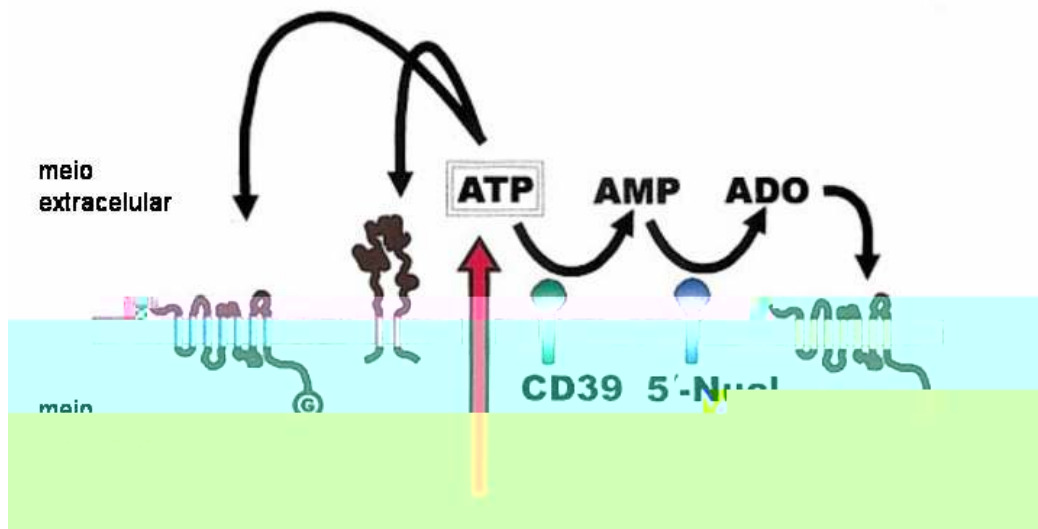


Figura 3: Ação das ecto-nucleotidases sobre o ATPe. O esquema ilustra uma situação hipotética de liberação de ATP, onde uma vez no meio extracelular este pode atuar em receptores próprios, ou ainda ser metabolizado pela ecto-nucleotidase fosfato difosfatase 1 (CD39) e pela 5'-nucleotidase, gerando AMP e adenosina respectivamente. A adenosina por sua vez é capaz de ativar os receptores próprios. (Di Virgilio et al 2001)

A.2 – Receptores Purinérgicos

A classificação dos receptores de nucleotídeos foi proposta originalmente em 1978 por Burnstock (Apud (Ralevic e Burnstock 1998; Burnstock e Knight 2004)). Dividiam-se então os receptores em duas famílias: uma que respondia a adenosina classificada como P1 e a outra responsiva a nucleotídeos classificada como P2 (Communi e Boeynaems 1997; King et al 1998; Ralevic e Burnstock 1998).

Hoje, os receptores da família P1 são divididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} , e A_3 de acordo com suas características farmacológicas, bioquímicas e estruturais (Ralevic e Burnstock 1998). São receptores do tipo associado à proteína heterotrimérica G (PTN G), com sete passagens transmembrana, sendo o receptor A_{2B} responsável pela ativação da PTN G_s (estimulatória, com aumentos dos níveis de AMPc [monofosfato de adenosina cíclico]) e G_q (envolvida na ativação da PLC) (Fredholm et al 2000;

Haas e Selbach. 2000; Feoktistov et al 2003; Bucehimer e Linden 2004), A₁ e A_{2A} ativando a PTN G_i (inibitória, com a diminuição dos níveis de AMPc) (*Fredholm et al 2000; Haas e Selbach 2000; Olah e Caldwell 2003; Bucehimer e Linden 2004*), e o A₃ ativando a PTN G_i e G_q (*Fredholm et al 2000; Haas e Selbach 2000; Bucehimer e Linden 2004*). Em geral, são ativados por adenosina e possuem como antagonistas alcalóides metilxantinas, como a teofilina (*Apasov et al 1995; Ralevic e Burnstock 1998; Illes et al 2000*).

Até 1985 os receptores P2 eram subdivididos em P2X e o P2Y (*Burnstock e Kennedy 1985*); sendo a seguir identificados os receptores: P2T de plaquetas, mais seletivo para ADP (*Murgo e Sistare 1992; Lazarowski et al 1994*); P2Z, identificado em macrófagos, sendo capaz induzir a formação de um poro (*Nuttall et al 1993; Nuttall e DUBYAK 1994; Coutinho-Silva et al 1996*) e P2U, inicialmente relacionado com fibrose cística, capaz de ser ativado por UTP (*Erb et al 1993; Parr et al 1994*). Com os avanços de técnicas de clonagem e seqüenciamento, observou-se que alguns dos receptores identificados coincidiam entre si, diferindo apenas no modelo no qual foram descritos. Em 1994 Abbracchio e Burnstock propuseram uma nova classificação baseada em duas grandes subfamílias dentro dos receptores P2: P2X, receptores acoplados a canais iônicos e P2Y, acoplados a PTN G (*Burnstock e Kennedy 1985; Burnstock e King 1996; Burnstock 2004; Burnstock e Knight 2004*).

A.2.1 – Receptores P2Y

A subfamília dos receptores P2Y é composta por 8 membros, todos associados à PTN G (Fig. 4) (*Burnstock 2004; Burnstock e Knight 2004; Inoue 2006*). A subfamília de receptores P2Y possui sete domínios transmembrana e são compostos de 328 a 538 aminoácidos. Seu N-terminal encontra-se no meio extracelular e o C-

terminal é intracelular. Estes receptores podem ser agrupados em: receptores ligados a PTN G_q (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁); receptores que ativam PLC β ; e os ligados a PTN G_i (P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄), que inibem adenilato ciclase (*Di Virgilio et al 1996; Burnstock e Knight 2004; Inoue 2006*) e alguns deles podem atuar via PTN G_q e G_i ao mesmo tempo.

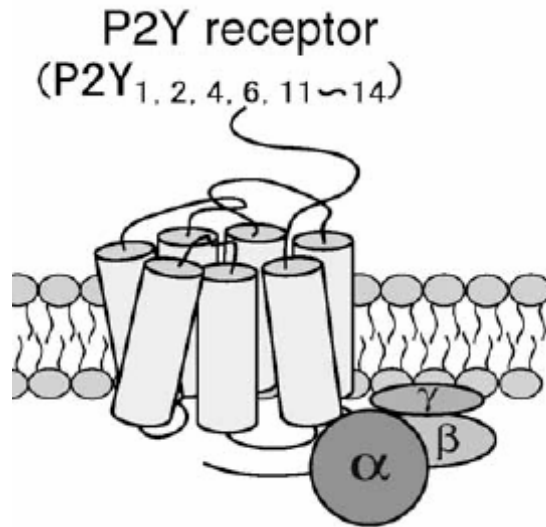


Figura 4: Caracterização dos receptores P2Y. Modelo geral dos receptores P2Y com sete passagens transmembranares, estando o N-terminal voltado para o meio extracelular e o C-terminal para o meio intracelular. Os receptores P2Y estão em associação direta com as subunidades da PTN G como na Figura. (*Inoue 2006*)

A baixa homologia geral entre os membros da subfamília P2Y cria entre eles uma farmacologia extremamente diferente e variada. O P2Y₁ possui como principal agonista o 2-metil-tio-ADP, mas também pode ser ativado por ATP, ADP, e ATP γ S, sendo expresso em músculo liso, endotélio, sistema nervoso e em oócito de *Xenopus* (*Burnstock e Knight 2004*).

O receptor P2Y₂, clonado em humanos, ratos e camundongos, possui como agonista preferencial os nucleotídeos trifosfato ATP e UTP (*von e Wetter 2000*) e é

um receptor de ampla distribuição no organismo (*Burnstock e Knight 2004*). O receptor P2Y₄, semelhante ao P2Y₂, também é ativado por ATP e UTP, sendo sensível também a derivados da uracila, encontrados na placenta humana e coração de rato, estando associados à PTN G_i em estágios de ativação iniciais e G_q em estágios tardios (*Ralevic e Burnstock 1998; von e Wetter 2000; Burnstock e Knight 2004*).

O UDP é o principal agonista do P2Y₆, diferentemente dos receptores anteriormente descritos (*Communi et al 1996; von e Wetter 2000; Ralevic e Burnstock 2003*). Este receptor está acoplado à PTN G_q e à ativação de PLC, induzindo a formação de inositol-trifosfato (IP3) (*Ralevic e Burnstock 2003*). É encontrado no trato digestivo, timo, placenta, coração, pulmão, cérebro e baço (*Burnstock e Knight 2004*). Já o receptor P2Y₁₁ é importante na diferenciação linfocitária (*Conigrave et al 2001*) e ativado por ATP e seus análogos ATP γ S e o 2-propiltio- β,γ -diclorometileno-d-ATP. É acoplado a PTN G_q, PLC, proteína cinase C (PKC) e ao aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ (*von e Wetter 2000; White et al 2003; Kaufmann et al 2005*).

O receptor P2Y₁₂ é inibido por ATP e ativado por ADP e 2MeADP. Está acoplado a PTN G_i e induz o bloqueio da adenilato ciclase, sendo encontrado em conjunto com o P2Y₁ em plaquetas, eritroblastos e monócitos (*Dorsam e Kunapuli 2004; Jagroop et al 2003*). O P2Y₁₃ foi identificado por possuir uma alta homologia com o P2Y₁₂ (*Zhang et al 2001; Zhang et al 2002*), sendo identificado em cérebro, estômago, pulmão e coração de camundongos e humanos. Possui como principal agonista o 2MeSATP e o agonista fisiológico é o ADP. Está associado com a PTN G_i, inibição da adenilato ciclase (*Communi et al 2001; Kaufmann et al 2005*) e a regulação de canais iônicos (*Chhatrivala et al 2004*).

Por fim, o receptor P2Y₁₄ é o mais recente receptor da subfamília P2Y, e seu mecanismo de ação é pouco conhecido. É único P2Y capaz de ser ativado por um nucleotídeo conjugado a um açúcar, o UDP-glicose (*Abbracchio et al 2003; Lazarowski et al 2003b; Scrivens e Dickenson 2005*). A tabela I sintetiza algumas das características dos receptores P2Y.

Receptor	Principal Agonista	Antagonistas	Sinalização
P2Y ₁	ADP > ATP	MRS2179 PPADS	Gq/PLC/Ca ²⁺ PKC
P2Y ₂	UTP = ATP	Suramina	Gq/PLC/Ca ²⁺ PKC
P2Y ₄	UTP > ATP	PPADS	Gq/Go/PLC/Ca ²⁺ PKC
P2Y ₆	UDP >> UTP > ATP	PPADS Suramina	Gq/PLC/Ca ²⁺ PKC
P2Y ₁₁	ATP	Suramina RB-2	Gq/PLC/Ca ²⁺ PKC Gi/AC/ cAMP
P2Y ₁₂	ADP	Clopidogrel	Gi/AC/ cAMP G12/13/RhoA
P2Y ₁₃	ADP	-	Gi/AC/ cAMP
P2Y ₁₄	UDP-glicose	-	PLC, liberação de Ca ²⁺

Tabela I – A família dos receptores P2Y. Tabela contendo os principais agonistas e antagonistas de cada receptor, bem como suas vias principais de sinalização (Erb *et al*, 2006).

A.2.2 – Receptores P2X

A subfamília dos receptores P2X é composta por 7 membros, P2X₁ ao P2X₇ (Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Stojilkovic et al 2005). São receptores acoplados a canais iônicos com grande similaridade estrutural, possuindo dois domínios transmembranares, 10 cisteínas formando pontes dissulfeto envolvidas na formação da estrutura terciária da proteína, e seis sítios de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr), com as regiões C-terminal e N-terminal voltadas para o citoplasma. (Fig. 5) (Burnstock 2004; Burnstock e Knight 2004; Stojilkovic et al 2005).

Os receptores P2X são capazes de formar homotrímeros e heterotrímeros, com as exceções do P2X₆, que é capaz apenas de formar heterotrímeros, e do P2X₇ que forma unicamente homotrímeros (North 2002). Os receptores P2X formam canais iônicos, seletivos para os cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (North e Surprenant 2000; North 2002; Stojilkovic et al 2005) com grande homologia entre si, com abertura em menos de 10 milisegundos após o estímulo, podendo levar à despolarização da membrana e ao aumento na concentração de Ca²⁺ livre no meio intracelular (North 2002; Egan et al 2004).

O ATP é o principal agonista em todos os receptores P2X, sendo sua forma preferencial de interação a de ATP⁴⁻, principalmente para o P2X₄ e P2X₇ (Abbracchio e Burnstock 1994), ou então associado a cátions de Mg²⁺ ou hidrogênio para os demais P2X (Liming e Wiley 1999).

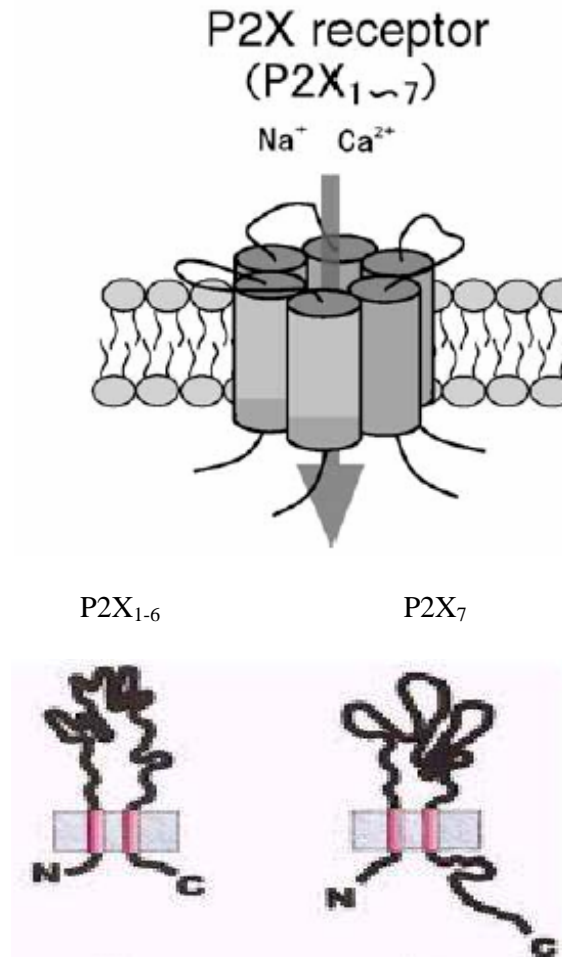


Figura 5: Esquema ilustrativo da organização dos receptores P2X. Onde na parte superior da Figura, com a formação do canal composto por 3 subunidades de um P2X (Inoue, K. 2005). Abaixo temos a topologia das subunidades dos receptores P2X₁ a ₆ e P2X₇ na membrana. Os receptores P2X₁ a ₆ são formados de duas subunidades transmembrana com C- e N- terminais voltados para o meio citoplasmático. O receptor P2X₇ diferem do outros membros da família P2X por possuir uma maior cadeia C-terminal. (Di Virgilio et al 2001)

O receptor P2X₁, inicialmente clonado de vasos deferentes de rato, é composto por 399 aminoácidos. Seus principais agonistas são o 2MeADP, o 2-MeSATP, ATP, -metilenoATP e o ADP (Scase et al 1998; Burnstock e Knight 2004). Já o P2X₂, clonado a partir de células PC12 de rato, possui de 401 a 472 aminoácidos,

dependendo do variante, sendo ativado por 2-MeSATP e 5-O-(3-tiotrifosfato) tetralítio de adenosina (*Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Egan et al 2004*). O receptor P2X₃ foi clonado a partir de gânglio dorsal de rato, possui 397 aminoácidos e tem como principais agonistas 2MeATP, ATP, αβ-MeATP (*Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Egan et al 2004*).

Identificado em células do sistema nervoso e da ilhota pancreática, o receptor P2X₄ possui dois “splices” variantes de 388 e 329 aminoácidos e o ATP é seu principal agonista (*Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Egan et al 2004*). Os receptores P2X₅ e P2X₆ possuem como agonista principal o 3'-O-(4-benzoil-)5' ATP (BzATP), seguido do ATP, 2MeATP e ADP e inibível por suramina e PPADS (*Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Egan et al 2004*). E por fim, o receptor P2X₇, clonado inicialmente de cérebro de rato (*Burnstock e Knight 2004; Burnstock 2004; Egan et al 2004; Adinolfi et al 2005*), com 595 aminoácidos, é o maior receptor da subfamília P2X, sendo encontrado em macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos, astrócitos, músculo e em uma grande variedade celular (*Virginio et al 1999; North e Surprenant 2000; Burnstock 2004; Egan et al 2004; Inoue 2006*). Além de funcionar como um canal para cátions, o receptor P2X₇ apresenta uma capacidade de induzir a formação de poro na membrana de até 900 Da, que antigamente eram atribuídas ao receptor P2Z. Este poro não é seletivo e possui um tamanho estimado entre 3-5nm, sendo permeável a solventes e pequenos solutos de até 900 Da em macrófagos ou 600 Da em linfócitos (*Chiozzi et al 1997; Di Virgilio 2000; Burnstock e Knight 2004; Zhang et al 2005*). Mais detalhes do receptor P2X₇ serão discutidos a seguir em um tópico isolado.

A dessensibilização, que é um fenômeno presente em vários receptores, constitui um mecanismo importante de controle da resposta a agonista. Nos receptores

da subfamília P2X a dessensibilização pode ser classificada como rápida para os P2X₁ e P2X₃, em torno de 100 milissegundos e lenta ou inexistente para os demais P2X, como por exemplo, 5 a 10 segundos para o P2X₄ (North 2002).

A tabela abaixo (tabela II) possui dados referentes à farmacologia conhecida dos receptores P2X.

Receptor	EC50 ATP (μM)	Antagonistas	Dessensibilização
P2X ₁	1	Suramina PPADS	Rápida
P2X ₂	10	PPADS Suramina	Lenta
P2X ₃	1	PPADS Suramina	Rápida
P2X ₄	7	TNP-ATP	Muito Lenta
P2X ₅	0,5	PPADS Suramina	Pouca
P2X ₆	0,5	PPADS	Não se sabe
P2X ₇	> 100	KN-62 BBG	Inexistente

Tabela II – A família dos receptores P2X. Tabela contendo os principais antagonistas de cada receptor, a dose de ATP que os ativa e a velocidade de dessensibilização. Rápida = 100 ms. Lenta = 5 – 10 s. (Erb *et al*, 2006).

A.2.3 – O receptor P2X₇

Como os demais receptores da subfamília P2X, o receptor P2X₇ é um canal de cátions seletivo para Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, e parece ser formado apenas pela homotrimerização de subunidades do próprio P2X₇ (North 2002). Este receptor é encontrado em uma grande variedade de células, incluindo células do sistema nervoso central, células epiteliais, sistema imune e hematopoiético, além de células dendríticas, monócitos, macrófagos, timócitos, linfócito T e B, células “natural killer”, neutrófilos e mastócitos (Burnstock e Knight 2004). Possui uma homologia de 40-45% com os demais P2X, mas apresenta uma cadeia C-terminal mais longa, com 100-200 aminoácidos a mais que os demais membros da sua família (North 2002; Roberts et al 2006).

Em 1996, foi identificado que o BzATP era o principal agonista para o receptor P2X₇, seguido por ATP, 2MeSATP, ATP_γS e ADP (Burnstock e Knight 2004). Por outro lado, este receptor apresenta como antagonistas Zn²⁺, Cu²⁺, suramina e seu análogo NF279, PPADS, azul brilhante G-250 (BBG – *brilhant blue G*) (Burnstock e Knight 2004). Sendo o ATP oxidado (ATPo) o mais seletivo estudado (Michel et al 2000; Fumagalli et al 2003) capaz de inibir por completo fenômenos dependentes de P2X₇ (Evans et al 1995; Fumagalli et al 2003). No entanto, o mecanismo exato de ação do ATPo não é completamente conhecido e, recentemente, tem sido discutido de seletividade d

receptor P2X₇ consiste de 13 exons, sendo que os exons 12 e 13 codificam a porção C-terminal (*Rassendren et al 1997*)

A ativação do P2X₇ gera um processo de despolarização rápida da membrana da célula, acarretando em um influxo de cátions. O canal aberto pelo P2X₇ possui uma condutância unitária de 5 a 8 ps e o poro de 400 ps (*Coutinho-Silva e Persechini 1997*). A ativação do P2X₇ por períodos de 1 a 30 segundos leva a um aumento da permeabilização celular tanto ao influxo de cátions, quanto ao efluxo de ânions (*Ralevic e Burnstock 1998; Wilson et al 2002*) característico da abertura do poro associado a este receptor.

A abertura deste poro consiste em um dos aspectos mais estudados e menos compreendidos do receptor P2X₇, existindo duas teorias postuladas que procuram explicar a ocorrência deste fenômeno (Fig. 6). A primeira delas defende a idéia que o P2X₇ seria capaz de não apenas formar homotrímeros responsáveis pelo canal, mas continuar agregando mais subunidades e assim alargar este canal, transformando-o num poro (Fig. 6A) (*Di Virgilio et al 2001*). Os que defendem esta teoria demonstram que células HEK293, que naturalmente não possuem o P2X₇, quando transfectadas passam a ser permeabilizadas por ATPe (*Petrou et al 1997*), o mesmo acontecendo com oócitos de *Xenopus* que expressam o P2X₇ proveniente de células B (*Klapperstuck et al 2000*). Entretanto, outros trabalhos de transfecção com P2X₇ não corroboram com esta idéia, inclusive sendo controversa a afirmação de que oócitos transfectados são permeabilizáveis, pois Michel e colaboradores não foram capazes de reproduzir este evento em seus experimentos (*Michel et al 1999*).

A segunda teoria, defendida por nosso laboratório, acredita-se que o canal do P2X₇ e o poro formado sejam entidades diferentes, sem excluir a possibilidade da molécula P2X₇ participar do poro (Fig.6B) (*Persechini et al 1998*). Coutinho-Silva e

Persechini demonstraram por dados eletrofisiológicos, registros da abertura do poro do P2X₇ em uma região isolada da membrana, quando a célula era estimulada com ATP, por intermédio da metodologia de *patch-clamp*. Esta metodologia na configuração denominada *cell-attached* consistente em uma pipeta inerte de vidro, que entra em contato com uma região da membrana, isolando-a do restante do meio extracelular, registrando variações elétricas isoladas dentro daquela região. Por essa metodologia, a única forma de induzir a abertura do poro é pela ação de um segundo mensageiro gerando um sinal que atuaria em outro ponto da membrana abrindo o poro.

Seja qual for o mecanismo regulatório do poro induzido por P2X₇, o consenso é que seu C-terminal é necessário para a abertura do poro e é capaz de interagir com diversas moléculas adaptadoras e sinalizadoras (*Kim et al 2001*). Em 2001, Kim e colaboradores realizaram a imunoprecipitação do receptor P2X₇ com possíveis proteínas associadas (*Kim et al 2001*), relatando um complexo protéico constituído por matriz extracelular laminina $\alpha 3$; proteínas do citoesqueleto α -actinina 4, β -actina

MAGuK; chaperonas, Hsp90, Hsp70, Hsp71 e proteínas de sinalização

e colaboradores apóiam a idéia da participação das cinases reguladas por sinal extracelular (ERK – *extracelullar signal-related kinase*) e p38 na formação do poro (*Faria et al 2004*). Ao mesmo tempo, tal idéia é refutada por Monteiro-da-Cruz e colaboradores, insistindo na não participação das ERK e p38 na abertura do poro ou mobilização de Ca^{2+} por P2X_7 (*Monteiro-da-Cruz et al 2006*), e indução de morte provocada por ATP (*Monteiro-da-Cruz, 2003*).

partir da estimulação do receptor P2X₇ por ATPe, cogita-se uma importante participação da despolarização da membrana plasmática no processo (Persechini et al 1998). Ly – *lucifer yellow*. EB – bormeto de etídeo.

A ativação do receptor P2X₇ pode ainda acarretar outros efeitos para os diferentes tipos celulares. Em macrófagos, o receptor P2X₇ pode levar à maturação e secreção de IL-1 via a despolarização da célula, com a saída de K⁺ e a ativação da caspase-1 (Ferrari et al 2006). Em paralelo a IL-1, outras interleucinas foram descritas como tendo seus níveis alterados por ação do P2X₇, entre elas temos: TNF, IFN γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-18 (Vieira et al 2003; (Le Feuvre et al 2002; Perregaux et al 2000; Gourine et al 2005; Zhang et al 2005; Caraccio et al 2005; Denlinger et al 2005; Marty et al 2005). O P2X₇ leva também ao aumento nos níveis de mRNA da óxido nítrico sintase induzível (Ferrari et al 1994) e ativação do fator de transcrição NF- κ B (Budagian et al 2003; Korcok et al 2004).

Outras ações envolvem a indução e formação de macrófagos multinucleados (Chiozzi et al 1997); aumento de espécies reativas de oxigênio e morte de macrófagos parasitados por *Mycobacterium tuberculosis* (Kusner e Adams 2000); na ativação da fosfolipase D (PLD), culminando na morte apenas da *Chlamydia* em macrófagos parasitados (Coutinho-Silva et al 2003); na resposta imune aplicada à sepsis dependente de LPS (Gourine et al 2005); com o seqüestro de proteínas da membrana plasmática, como a molécula de MHC1 e integrinas (Elliott e Higgins 2004; Moon et al 2005); e indução de morte celular, tanto por necrose, quanto por apoptose (Di Virgilio et al 1998; Coutinho-Silva et al 2001; Schrier et al 2002; Franke et al 2004; Sugiyama et al 2005).

O receptor P2X₇ está associado com sinais de perigo (Ferrari et al 2006); a ativação de moléculas sinalizadoras como as cinases p56 (Budagian et al 2003); a

ativação de AP-1, ERK e cinase do N-terminal de c-Jun (JNK – *c-jun N-terminal kinase*) em linfócitos; JAK2, STAT6 e caspase-3 em mastócito (*Humphreys et al 2000; Budagian et al 2003; Liu et al 2004; Okuno et al 2004; Bulanova et al 2005; Auger et al 2005; Erb et al 2006b;*); RhoA em células BAC1 murinas e HEK297 (*Verhoef et al 2003a*);

Contudo, a ativação de múltiplos receptores promovidos pelo ATPe, associada com uma fraca farmacologia, muitas vezes torna difícil a interpretação de fenômenos associados aos receptores P2. Em parte, muito foi esclarecido com o uso de animais deficientes nos receptores P2. Em especial deficiente no receptor P2X₇ (P2X₇^{-/-}), várias das funções celulares atribuídas a este puderam ser testadas e, em muitos casos, a ausência do receptor prejudicava a função estudada, confirmando sua importância. Os P2X₇^{-/-} são animais viáveis não apresentando nenhuma desordem grave. O ATPe é incapaz de permeabilizar células retiradas desses animais (*Solle et al 2001; Ke et al 2003*). Elas apresentam defeitos na maturação e secreção de IL-1 e IL-6 induzida por ATP (*Solle et al 2001*) e não entram em apoptose, nem em necrose (*Le Feuvre et al 2003a; Coutinho-Silva et al 2003*). Resultados semelhantes aos dos P2X₇^{-/-} são encontrados em células transfectadas com o receptor P2X₇ truncado sem o C-terminal (P2X_{7t}) (*Wiley et al 2002; Le Stunff et al 2004*). A única exceção relatada até o momento é a ativação de ERK que parece estar associada ao N-terminal do receptor (*Amstrup e Novak. 2003*)

A.2.4 – Morte celular induzida por P2X₇

Além de um potente indutor de permeabilização e agente inflamatório, entre outras ações, o ATPe, através do receptor P2X₇, é capaz também de causar morte celular em vários tipos celulares tanto por necrose, quanto por apoptose, dependendo

do tempo de incubação, dose e alvo. Silverstein e colaboradores haviam demonstrado que a exposição prolongada de macrófagos a altas concentrações de ATP acarretava na morte destes (*Steinberg et al 1987; Steinberg e Silverstein 1987*), porém esta morte não era caracterizada como uma lise colóide-osmótica pela abertura do canal ou do poro em resposta ao ATP (*Steinberg et al 1987; Steinberg e Silverstein 1987*), mas sim um evento regulado causando a desestruturação celular. Di Virgilio nos anos 90 foi quem primeiro demonstrou a morte celular induzida por ATP em células P-815 e YAC com características apoptóticas, como fragmentação de DNA, e externalização de fosfatidilserina (PS) (*Zanovello et al 1990*) e, subsequentemente, em J774 (*Murgia et al 1992*).

Macrófagos J774 apresentaram uma morte celular rápida, com características de lise colóide-osmótica, rápido encolhimento celular e liberação do conteúdo citoplasmático pela medição da lise por cromo⁵¹, uma morte tipicamente necrótica (*Murgia et al 1992*). Por outro lado, as linhagens microgliais N9 e N13, ao serem estimuladas com ATP apresentaram a condensação de seus núcleos, com fragmentação de DNA e ativação das caspases-3 e 8 e clivagem de PARP e lamina B (*Ferrari et al 1997; Ferrari et al 1998*). A ativação das caspases-3 e 9 foi demonstrada também em células epiteliais cervicais humanas (*Adinolfi et al 2005*). A indução de apoptose também foi relatada em células mensenquimais, inclusive com a ativação da proteína supressora de tumor p-53, mediada por ATP (*Schulze-Lohoff et al 1998*). Desde os primeiros relatos com macrófagos e células P-815, várias outras linhagens foram incluídas na longa lista na qual o ATP possui um papel citotóxico. A citotoxicidade do ATP está intimamente relacionada com o receptor P2X₇, uma vez que com o uso de fármacos capazes de atuar sobre o P2X₇, como o ATPo (*Nagy et al 2000; Melo et al 2001*) e o BBG (dados de nosso laboratório) inibe a apoptose e os

animais $P2X_7^{-/-}$ não entram em processos de morte celular na presença do ATP (Coutinho-Silva et al 2003).

O receptor $P2X_7$ é capaz de promover a exteriorização da PS (Mackenzie et al 2005), um fosfolípido de membrana encontrado no folheto interno em condições de homeostasia. Contudo, a real participação da PS nos processos apoptóticos induzidos por $P2X_7$ são questionáveis, pois recentemente estudos têm indicado que o $P2X_7$ é capaz de realizar a alteração de posição da PS sem necessariamente comprometer a célula com a apoptose (Mackenzie et al 2005; Elliott et al 2005). Fato semelhante ocorre com a formação de bolhas na membrana plasmática, um evento associado como um dos marcadores iniciais da apoptose, que tem sido relacionado com a ativação de ROCK1 por $P2X_7$ (Verhoef et al 2003a; Pfeiffer et al 2004). O ATP leva também à ativação da JNK (Humphreys et al 2000), ativada em eventos de estresse oxidativo e relacionado a apoptose em diversos tipos celulares.

O mecanismo utilizado pelo receptor $P2X_7$ para indução de morte não é claro. Caminhos como a formação de bolhas por ROCK1 ou a ativação de JNK não são suficientes para explicar todas as profundas alterações que ocorrem na vias apoptóticas ou mesmo nas necróticas. Mais estudos se fazem necessários para que um quadro mais fiel dos eventos engatilhados pelo $P2X_7$ sejam compreendidos.

Embora pareça claro que o ATPe ativa a apoptose e necrose via o receptor $P2X_7$, não se sabe como se dá a transdução de sinal, especialmente a conexão entre o $P2X_7$ com as vias acima da ativação das caspases e outros marcos da morte celular programada.

A.3 – Vias de sinalização intracelular mediadas por lipídeos

A.3.1 - Fosfolipase A2

Fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas capazes de promover a hidrólise de fosfolipídeos na posição *sn-2*, liberando uma molécula de ácido graxo com aproximadamente 20 carbonos e um liso-fosfolipídeo (Six e Dennis 2000; Diaz e Arm. 2003) (Fig. 7). Até o presente momento existem 13 isoenzimas de PLA2 descritas, agrupadas de acordo com características estruturais, requerimento de Ca^{2+} para sua atividade, peso molecular e sítio catalítico (Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003). As PLA2 podem ser divididas em quatro grandes grupos: as PLA2 secretórias (sPLA2); as PLA2 citosólicas dependentes de Ca^{2+} (cPLA2); as PLA2 citosólicas independentes de Ca^{2+} (iPLA2); e as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF [*platelet activating factor*] acetil-hidrolases).

As sPLA2 são também divididas em grupos de acordo com homologia estrutural entre si, sendo compostas pelos grupos I (IA e IB), II (IIA, IIB, IIC, IID, IIE e IIF), III (III humana e III de veneno de abelha), V, X, IX, XI (XIA e XIB) e XII (Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003), de peso molecular entre 15 a 20 kDa, com uma única exceção para a grupo III humana com 56 kDa (Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003). As sPLA2 possuem um domínio de interação com a membrana C2, dependente de Ca^{2+} , e um sítio catalítico com uma histidina reativa que requer a interação com Ca^{2+} para sua estabilização. Esses dois fatores contribuem para o alto requerimento de Ca^{2+} a níveis mM para seu correto funcionamento (Six e Dennis 2000). Inicialmente as sPLA2 foram descritas em venenos de ofídeos (grupos IA, IIA e IIB) e de vespas e abelhas (grupo III) (Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003). A primeira PLA2 a ser identificada em mamíferos do grupo IB, foi identificada e caracterizada de pâncreas

bovinos (*Six e Dennis 2000*). As sPLA2 dos grupos IIA e V estão entre as mais estudadas por possuírem efeitos pro-inflamatórios e estarem ligadas a alguns tipos de câncer (*Diaz e Arm 2003*).

As cPLA2 ou grupo IV possuem três isoformas (IVA, IVB e IVC), foram inicialmente identificadas em neutrófilos humanos e plaquetas (*Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003*). Possuem uma especificidade por fosfolipídeos que contenham ácido araquidônico na posição *sn-2*. Este grupo de enzimas diferem das sPLA2 por terem 85 kDa e uma serina no sítio catalítico (*Six e Dennis 2000*). Além disso, possuem o mesmo domínio C2 das sPLA2, mas seu sítio catalítico não necessita de Ca^{2+} , acarretando em um requerimento menor deste íon na faixa de μM (*Six e Dennis 2000*). As cPLA2 possuem um papel importante na biossíntese de moléculas das vias dos eicosanóides (*Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003*), regulando pressão sanguínea, musculatura lisa das vias aéreas, migração celular, secreção e apoptose (*Hirabayashi et al 2004*).

As iPLA2 foram isoladas e clonadas de células CHO, P388D e linfomas humanos (*Six e Dennis 2000*). Com aproximadamente 750 aminoácidos e 85 kDa, possuem uma serina no sítio catalítico (*Six e Dennis 2000*) e não apresentam o domínio C2. As suas isoformas (VIA-1, VIA-2 e VIB) não necessitam de Ca^{2+} , mas possuem um sítio de ação para calmodulina, que é dependente de Ca^{2+} , capaz de regular sua atividade (*Six e Dennis 2000; Diaz e Arm 2003*). Estas enzimas não possuem especificidade para nenhum ácido graxo, podendo hidrolisar qualquer fosfolipídeo. Este grupo de enzimas tem sido associado com funções de remodelamento de membrana (*Six e Dennis 2000*) e recentemente, foram apontadas como sendo reguladas em miocárdio por uma PKC (*Meyer et al 2005*). O último grupo, as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas, ou grupos VII e VIII, foram

clonadas em 1995, tendo um peso molecular em torno de 45 kDa e com o *motif* de lípase contendo o consenso Gly-X-Ser²⁷³-X-Gly (Diaz e Arm 2003).

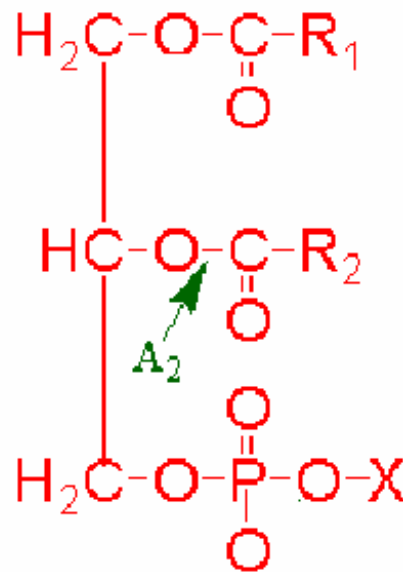


Figura 7: Esquema representativo da estrutura de um fosfolípídeo e a ação da PLA2. A Figura mostra a fórmula estrutural um fosfolípídeo qualquer, onde a seta indica a posição *sn-2* de clivagem das PLA2.

Em 1993, Cifone e colaboradores demonstraram que uma PLA2 estava envolvida nas funções líticas de células NK purificadas de rato. Eles mostraram que ao se inibir a PLA2 com brometo de para-bromofenacila (p-BPB), um inibidor inespecífico das sPLA2 (Cifone et al 1993), as células *natural killers* perdiam a capacidade lítica. Mais tarde o mesmo grupo reafirmou estes dados em células ativadas por citocinas (LAK – *lymphocyte activated killers*) demonstrando ainda que células efetoras eram protegidas da ação de sPLA2 pela expressão de anexina na membrana plasmática, o que impedia de forma competitiva o acesso da sPLA2 ao seu substrato (Cifone et al 1996).

Outros autores sugerem que através da estimulação por Fas ocorra a ativação da iPLA2. Neste sistema, a ativação da caspase 3 aumenta a liberação de ácido

araquidônico (AA) em células U-937 por iPLA2 e provoca a inativação da cPLA2, levando a célula a morrer (*Atsumi et al 2000a*). Ao contrário, outros autores observaram que TNF- α , por intermédio da caspase 3, pode levar a um aumento da atividade da cPLA2 e à morte celular (*Cauwels et al 2003*).

A ativação da cPLA2 e subsequente liberação de AA por estímulo a partir de NO é capaz de levar células do músculo liso a entrarem em apoptose de forma proporcional à concentração de AA liberado (*Pilane e LaBelle 2002*).

O envolvimento da PLA2 com o receptor P2X₇ foi proposto inicialmente a partir do relato de que a secreção de calicreína em células da glândula submandibular de ratos pode ser induzida por P2X₇, sendo regulada por atividade das PLA2 (*Alzola et al 1998*). Neste trabalho, os autores utilizam inibidores tanto das cPLA2, quanto das iPLA2, observando a inibição da liberação de ácido araquidônico tritriado. Em seguida, Kahlenberg e Dubyak demonstraram que a iPLA2 está envolvida ou é requerida para a secreção de IL-1 (*Kahlenberg e Dubyak 2004*); Ballerini demonstrou que quando o P2X₇ era estimulado, uma PLA2 era ativada e participante na síntese de eicosanóides (*Ballerini et al 2005*); e Chaib e colaboradores demonstraram que o BEL, o principal inibidor para iPLA2, era capaz de aumentar a permeabilização em células acinares de glândula submandibular de ratos, quando estas eram estimuladas com agonistas de P2X₇ (*Chaib et al 2000*).

A.3.2 – Ciclooxygenases, lipooxygenases, citocromo P450 e o metabolismo de ácidos graxos

PLA2 são capazes de liberar ácidos graxos da posição *sn-2* de qualquer fosfolípídeo. Estes ácidos graxos podem ser principalmente o AA, ácido linoléico, ácido oléico e ácido palmítico (*Six e Dennis 2000; Zeldin 2001*). Todos esses ácidos

graxos podem ainda ser metabolizados por enzimas das vias da lipooxigenase (LOX), ciclooxigenase (COX) e do citocromo P450 (CYP450) (Fig. 8). Apenas no caso do AA, podem ser gerados em torno de 25 lipídeos bioativos (Gaddi et al 2004), e cada um destes possui de 2 a 5 diferentes ações celulares ou extracelulares (Fig. 9). Com a finalidade de facilitar a compreensão das vias metabólicas envolvidas com essas enzimas, discutiremos o ácido araquidônico como modelo, mas devemos manter em mente que os demais ácidos graxos também são metabolizados gerando outros compostos ativos.

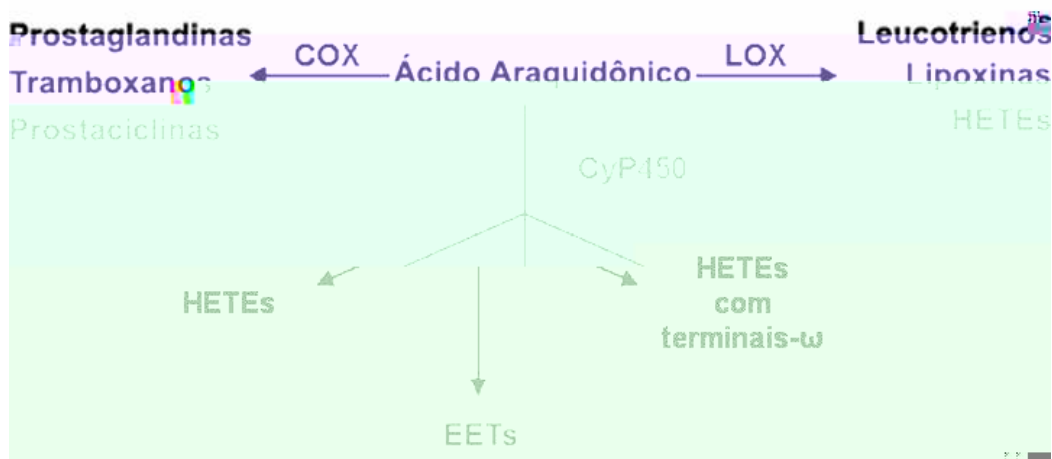


Figura 8: Vias abaixo a PLA2. Vias de síntese de derivados do AA por enzimas das vias da LOX, COX e CYP450. Com a geração de prostaglandinas, tramboxanos e prostaciclina por COX; leucotrienos, lipoxinas e HETEs por LOX; e EETs, HETEs -terminais e cadeias medias de HETEs por CYP450 (Zeldin 2001).

Uma vez liberado, o AA serve como o precursor para uma família de compostos denominados eicosanóides, que possuem um grande espectro de ação em sistemas biológicos. As COXs são um grupo de enzimas responsáveis pela conversão do AA, promovendo sua redução e formação da prostaglandina H2 (PGH2), precursor imediato das outras prostaglandinas e dos tromboxanos (Gaddi et al 2004). As COXs promovem a formação de um anel na molécula de AA (Gaddi et al 2004), o que faz a

síntese de prostaglandinas ser conhecida como cíclica. Basicamente, duas isoformas têm sido descritas em diversos tipos celulares: COX-1 expressa constitutivamente e COX-2 que é induzida por fatores de crescimento e citocinas (*Fleming 2004; Gaddi et al 2004*).

As prostaglandinas possuem a capacidade de regular os níveis de AMPc e hormônios (Alberts et al., 2002), exercem influência na pressão sanguínea, promovem respostas em diversos órgãos e são importantes agentes inflamatórios, causando aumento da temperatura corporal por influenciar o hipotálamo, produzindo estados febris e podendo causar reações inflamatórias locais (Alberts et al., 2002) (Fig. 9).

Já as LOXs são as enzimas responsáveis pela formação de compostos lineares a partir do ácido araquidônicos, os leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (*Peters-Golden et al 2005*). A via de síntese dos LT se dá pela ação conjunta da 5-LOX com a proteína ativadora da 5-LOX (FLAP – *five lipoxygenase activated protein*) (*Hedi e Norbert 2004; Peters-Golden et al 2005*). A FLAP é responsável por interagir com o ácido araquidônico livre e apresentá-lo para 5-LOX, produzindo assim o 5-hidroperoxy-6,8,1-eicosatetranóico (conhecido como 5-HPETE), em seguida gerando-se o leucotrieno A4 (LTA4) (*Hedi e Norbert 2004; Peters-Golden et al 2005*). A partir do LTA4 e por ações das 12-LOX/15-LOX, podem ser gerados outros cisteil-LT, os LTC4, LTD4 e LTE4, com importantes funções bronquiodilatadoras (*Hedi e Norbert 2004; Peters-Golden et al 2005*); ou do leucotrieno LTB4, um importante fator quimiotático e pró-inflamatório (*Hedi e Norbert 2004*). Em paralelo a síntese de LT, as 12-LOX e 15-LOX podem ainda metabolizar o ácido araquidônico em LX (*Jala e Haribabu 2004; Gaddi et al 2004; Zhao e Funk 2004*).

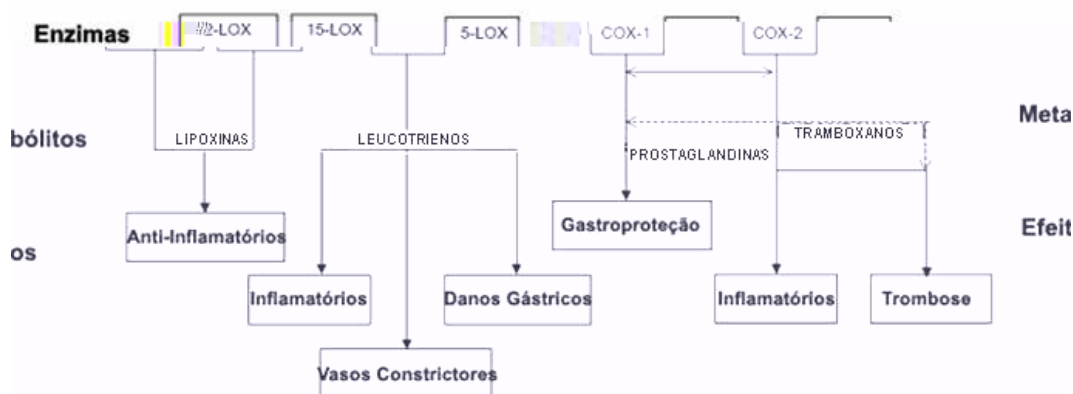


Figura 9: Esquema ilustrativo das vias de COX e LOX. Diagrama ilustrativo das vias de metabolismo do AA, com metabólitos gerados e principais funções (de forma simplificada) descritas na literatura. Na primeira linha da Figura temos as enzimas conversoras do AA, seguindo pelas setas para os metabólitos gerados por elas na segunda linha. Terminando com as diferentes ações e efeitos exercidos por cada um na terceira linha da Figura (*Gaddi et al 2004*)

Por último, o citocromo P450 tem sido apontado como a terceira via de metabolização do AA, convertendo-o em dois principais compostos: os ácidos cis-epoxieicosatrienóicos (EET), formados principalmente pelas CYP4502C e CYP4502J em humanos (*Zeldin 2001; Gross et al 2005*); e os ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE), pela ação das CYP4504A e CYP4504F em humanos (*Zeldin 2001; Gross et al 2005*). Os HETEs ainda se sub-dividem em derivados de conjugados dienóis (conhecidos como produtos análogos de LT), sendo os mais abundantes HETEs formados, e os ω -terminal (Fig. 10).

O efeito dos EETs tem sido relacionado com alterações de potencial elétrico, induzindo hiperpolarização e relaxamento em células de músculo liso pela ativação dos canais de potássio dependentes de Ca^{2+} (K_{Ca} -canais) (*Caro e Cederbaum 2006*). Os EETs são capazes de ativar tirosinas cinases reguladas por ERK, p38 e inositol-trifosfato cinase em células epiteliais e endoteliais (*Zhao et al 2004; Caro e Cederbaum 2006*). O efeitos sistêmicos dos EETs incluem ainda secreção de

hormônios e indução de citotoxicidade (Caro, A. A. e Cederbaum, A. I. 2006). Já os HETEs são capazes de provocar vasoconstrição pela inibição dos K_{Ca} -canais e despolarização da célula, promove ainda agregação plaquetária (Caro e Cederbaum 2006)

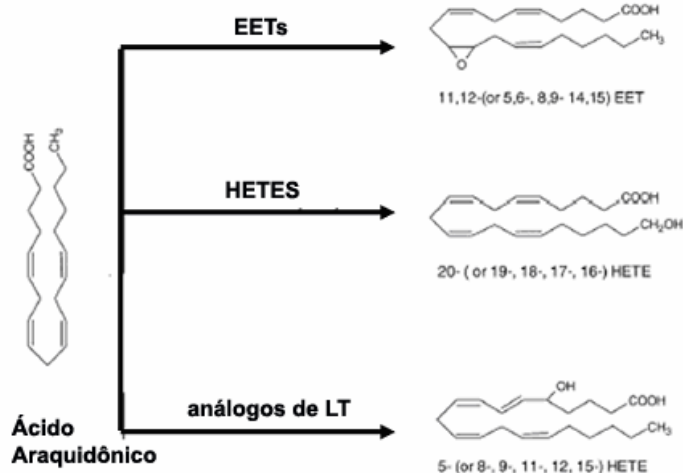


Figura 10: Metabolização do ácido araquidônico pela via do CYP450. Metabolização do AA pelos CYP450 acarretando na formação de EETs, HETEs ou análogos de LT. (Caro, A. A. e Cederbaum, A. I. 2006)

Contudo, é importante lembrar que os eventos metabólicos acima apresentados são referentes apenas ao AA. Outro ácido graxo que apresenta grande importância biológica junto com seus metabólitos é o ácido linolérico (tabela III). Este composto é liberado da posição *sn*-2 dos fosfolipídeos pela ação preferencial da iPLA2, pode ser metabolizado a ácido 9-S ou 13-S-hidroxiocetadecadienóico (13-S-HODE) pela 15-LOX (Shureiqi et al 2003). O 13-S-HODE tem sido relacionado com a apoptose de células de câncer gástrico MKN28 humano e cólon colo-320 (Kuniyasu et al 2006). O ácido linolérico também pode ser levado a PGEJ2 por ação da COX-2 (Wang et al 2006; Alba-Loureiro et al 2006), e por ação da isoenzima endotelial CYP4502C9

(isoenzima da CYP450), ser transformado em leucotoxina (*Draper e Hammock 2000*). Esta por sua vez é capaz de provocar vasodilatação (*Viswanathan et al 2003*) e em altas concentrações induzir falência de múltiplos órgãos (*Draper e Hammock 2000*) (*Moran et al 1997*), além de possuir um papel relevante contra infecções.

Ácido graxo comum em animais	Número de Carbonos	Número de duplas ligações
Palmitóico	16	1
Oléico	18	1
Linoléico	18	2
Araquidônico	20	4

Tabela III: Tabela dos ácidos graxos mais comuns em animais. Tabela contendo os ácidos graxos mais comuns em animais, com o tamanho de suas cadeias de carbonos e número de duplas ligações.

Não existem muitos trabalhos relacionando a LOX e COX com o receptor P2X₇. Encontramos apenas um trabalho onde Ballerini e colaboradores mostraram que o P2X₇ era capaz de controlar a liberação de cisteil-LT pela LOX em astrócitos (*Ballerini et al 2005*). Já as COX são apenas relacionadas com os receptores P2Y e a produção de PGE₂ (*Fisher et al 2003*). Até o presente momento não foram implicados com o P2X₇ e CYP450.

Em recente dissertação de mestrado defendida em nosso laboratório, Mendes, com nossa colaboração, estudou a participação das vias de COX e LOX na morte celular provocada por ATPe/P2X₇, utilizando para tal inibidores farmacológicos para enzimas específicas destas vias. Para as vias das COX foram utilizados: o ácido acetilsalicílico (AAS) para COX-1 e o NS-398 para a COX-2, sendo que ambas não apresentaram efeitos sobre a morte celular gerada por ATPe/P2X₇ (*Mendes 2006*). Para a via das LOX foram usados o NDGA; um anti-oxidante que atua genericamente

nas 5-, 12- e 15-LOX; o zileuton que sequestra o ferro da 5-LOX, um co-fator importante para sua atividade; AA-861, que atua no sítio catalítico da 5-LOX; e o MK886 que atua na FLAP, uma proteína importante para o funcionamento da -5LOX. A maioria dos fármacos utilizados na via das LOX foram parcialmente efetivos na inibição da apoptose evocada por ATPe/P2X₇ (Mendes 2006) (tabela IV), com exceção do MK886, que foi capaz de inibir em 80% a apoptose (tabela IV) e o NDGA que apresentou 80% de inibição em macrófagos aderidos. Levantamos a hipótese que a maior potência do MK886 na inibição da apoptose se deva à possibilidade deste estar atuando em dois mecanismos distintos, mas que seriam interligados, pois o MK886 tem sido descrito também como inibidor de PPAR . Retornaremos a tratar da via dos PPAR mais a frente neste trabalho.

A inibição da via da LOX sugere que seus metabólitos possuam um papel na apoptose provocada por ATPe/P2X₇. Dentre os metabólitos gerados pelas LOX, os principais são os LT que podem ainda ser divididos em cis-LT (LTA₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e LTB₄. Estes dois produtos da LOX podem ser excitados e se ligar a receptores transmembranares específicos (Alloisio et al 2006), constituindo assim, um possível mecanismo de ação na morte observada por ATPe/P2X₇. No entanto, quando macrófagos aderidos foram tratados com antagonista de receptores para LT ou cis-LT, não foi observada inibição da apoptose (tabela IV). Estes dados são consistentes com a literatura que mostra que os LT e cis-LT via seus receptores não são citotóxicos a macrófagos, induzindo sinais de sobrevivência destas células (Wikstrom et al 2003; Zhang et al 2005; Petrin et al 2006).

Abaixo se encontra uma tabela IV resumando os dados acima citados, e que fizeram parte da dissertação de mestrado de Anderson Nogueira Mendes.

FÁRMACO	% DE INIBIÇÃO DA APOPTOSE PROVOCADA POR ATPe/P2X ₇	PROTEÍNA ALVO
AAS	S.E.	COX-1
NS-398	S.E.	COX-2
NDGA	80% macrófagos em suspensão 50% macrófago aderido	LOX em geral
Zileuton	45% macrófago aderido	5-LOX
AA-861	45% macrófago aderido	5-LOX
MK886	80% macrófago em suspensão e aderido	FLAP
MK571	S.E.	Receptor de cis-LT
CP	S.E.	Receptor de LTB4

Tabela IV: Ação dos inibidores das vias de COX e LOX na apoptose por ATPe/P2X₇.

Tabela com a os resultados encontrados na dissertação de mestrado de Anderson Nogueira Mendes.

S.E. = sem efeito (adaptado de *Mendes, 2006*)

A.4 – Proteínas cinases

A.4.1 – A MAPK p38

Entre os anos de 1989 e 1991, surgiu na literatura uma nova família de proteínas cinases que, com o passar dos anos, demonstrou-se um importante componente em diversas vias de sinalização (*Pearson et al 2001*). As MAPK são reguladas por uma cascata de fosforilação, antecedida por duas outras cinases específicas (Fig. 11). Imediatamente acima das MAPK, temos as MAP/ERK cinases (MEK ou MKK – *MAP kinase kinases*) que são antecedidas pelas MAP/ERK cinase-cinase (MEKK ou MKKK – *MAP kinase kinase kinases*) (*Pearson et al 2001*). A cascata de ativação começa nas MEKK e é amplificada pelas MEK.

Comparativamente as MEK estão presentes em maior quantidade nas células que as MEKK (*Pearson et al 2001*). A existência de processos intermediários de ativação das MAPK aparenta estar relacionada aos controles corretos de quais cinases serão ativadas no final do processo.



Figura 11: Cascata de ativação das MAPK. Cascata de ativação das MAPK, onde um sinal ativa uma MEKK específica e responsável por ativar uma MEK. Esta por sua vez irá ativar uma MAPK final que ativará outras proteínas. (*Pearson et al 2001*)

Uma das enzimas constituintes da super família da MAPK, a p38, é ativada de forma dependente das ações das MEK3 e MEK6 (*Pearson et al 2001*) em respostas a agentes como: citocinas, hormônios, choques térmico e osmótico. Esta pode ser alvo de “splices” variantes gerando diversas isoenzimas (p38_α, p38_β, p38_γ, e p38_δ) (*Pearson et al 2001*), e possui como alvo a JNK (*Hsu et al 2001; Okuno et al 2004*) e PKC (*Ryer et al 2005*). A especificidade da p38 em fosforilar proteínas relacionadas com vias de morte celular a torna sempre candidata a participar de processos indutores de morte. Assim, a p38 foi associada em conjunto com o P2X₇ às seguintes vias: formação de bolhas de membranas dependentes de Rho (*Pfeiffer et al 2004*); ativando a transmissão sináptica em fibras CA-3 (*Armstrong et al 2002*); ativação conjunta

com JNK em situação de estresse (*Loomis et al 2003*); produção e liberação de TNF (*Suzuki et al 2004*); produção de IL-2 com ativação de NF B (*Loomis et al 2003*); e produção de espécies reativas de oxigênio na microglia de pacientes com Alzheimer (*Parvathenani et al 2003*).

É importante ressaltar que a p38 encontra-se em uma situação de destaque, pois ela é um dos pivôs da discussão do mecanismo de permeabilização dependente de P2X₇, no qual Faria e colaboradores defendem seu envolvimento (*Faria et al 2004b*), com evidências de que sua inibição prejudica a formação do poro por P2X₇. Em entretanto, Montiero-da-Cruz e colaboradores (*Monteiro-da-Cruz et al 2006*) não inibem a permeabilização em macrófagos primários pela inibição da p38. A necessidade da p38 para os processos da abertura do poro por ATPe/P2X₇ é ainda uma questão em aberto

A.4.2 – Proteína cinase C

Em 1977, uma nova proteína cinase ativada por clivagem proteolítica e dependente de cálcio (Ca²⁺) e fosfolípídeos foi descrita em mamíferos e nomeada proteína cinase C (PKC) (Apud (*Ohno e Nishizuka 2002*)). Hoje se sabe que na verdade a PKC, que fosforila serina e treonina, é constituída de uma família de pelo menos 10 isoenzimas subdivididas em 3 subfamílias (*Ohno e Nishizuka 2002*) (Fig. 12). A primeira subfamília denominada PKCs convencionais (cPKC) é composta das isoenzimas α , β , γ , δ , ϵ , ζ e η que são dependentes de diacilglicerol (DAG) e Ca²⁺ para sua ativação. A segunda subfamília, conhecida como PKC nova (nPKC), é composta das isoformas θ , ι , κ e λ . Estas enzimas não apresentam a dependência de Ca²⁺, porém também requerem DAG para a sua ativação. A terceira subfamília, conhecida como a família das PKC atípicas (aPKC), é composta pelas isoformas ξ e μ não requer Ca²⁺

ou DAG para a sua ativação, porém depende de outros lipídeos como ceramida para a sua ativação.

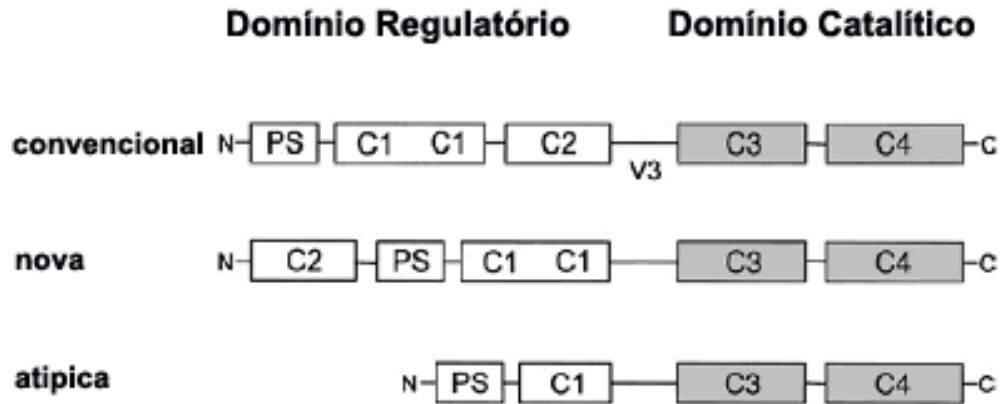


Figura 12: Caracterização estrutural e comparativa das subfamílias de PKC. Organização estrutural das diferentes PKC com seus quatro domínios conservados (C1 - 4), a região análoga ao substrato (PS) e a região variante V3. O domínio C1 corresponde à região de interação com lipídeos, a C2 é o domínio dependente de Ca^{2+} e de interação com a membrana plasmática. No domínio catalítico, o C3 é o sítio de ligação do ATP e o C4 o de interação com o substrato. (Gutcher *et al* 2003).

Um fator importante para a ativação e função das PKCs é a translocação de cada isoenzima do citosol para a fração particular da célula aonde atua atuando fosforilando os seus substratos (Shirai e Saito 2002). A dinâmica de movimentação das PKCs é isoenzima-específica e pode ser diferente para cada isoenzima dependendo do estímulo. Por exemplo: o AA promove a translocação da PKC para o complexo de Golgi, enquanto o mesmo AA induz a translocação da isoenzima para o núcleo (Shirai e Saito 2002); Diferentes estímulos podem promover a translocação de uma mesma isoenzima para localizações subcelulares específicas ativando cascatas de sinalização específicas. Por exemplo: o TNF- α induz a translocação da PKC δ para o complexo de Golgi ativando a cascata de apoptose, enquanto o éster de forbol induz a translocação da PKC para membrana plasmática promovendo um arrasto da célula

nas fases G2/M do ciclo celular. Outro fator essencial para compreendermos a modulação da translocação e ativação das PKC são as interações proteína-proteína e PKC-substrato. Muitas destas interações protéicas ainda são desconhecidas. Porém, Mochly-Rosen e colaboradores identificaram e caracterizaram “receptores de proteína cinase C ativada” (RACK – *receptors for activated C-kinases*) que se ligam especificamente às PKC ativadas ancorando as mesmas à fração particular da célula e facilitando sua interação com os seus respectivos substratos. Cada isoenzima da PKC possui uma RACK específica (*Schechtman e Mochly-Rosen 2001*).

Até recentemente não era possível determinarmos o papel específico das diferentes isoenzimas das PKC, pois, devido à natureza altamente conservada das PKC, principalmente no seu domínio catalítico, não havia inibidores seletivos para cada PKC. Baseando-se na interação das PKC com as suas RACK, Schetchtman e colaboradores desenvolveram moduladores da interação das diferentes isoenzimas das PKC com as suas RACK específicas (*Schechtman e Mochly-Rosen 2001*). Estes moduladores são peptídeos sintéticos de 6 a 10 aminoácidos que induzem ou inibem a interação de uma isoenzima específica da PKC com a sua RACK específica, de forma a ativar ou inibir a translocação e conseqüentemente a atividade das mesmas.

Vários trabalhos vêm demonstrando a interação entre o receptor P2X₇ e algumas isoenzimas da PKC. Tanto o BzATP quanto o próprio ATP são capazes de ativar uma PKC, que leva ao aumento do mRNA para TGF- 1 (*Wang et al 2003*). Este aumento mostrou-se sensível às ações do ATPo e de inibidores genéricos de PKC (Gö6976 e GF109203x). PKC ativadas via P2X₇ por BZATP, ATP ou ATP S parecem ser capazes de ativar uma PLD em células da glândula submandibular de ratos (*Pochet et al 2003a*), promover a ativação de ERKs em células acinares de ratos (*Bradford e Soltoff 2002*) e aumentar os níveis de IL-6 em células MG-5 microgliais,

em um processo aparentemente dependente cPKC (*Shigemoto-Mogami et al 2001*). Além disso, em recente trabalho Hung e colaboradores demonstraram que o P2X₇ é capaz de ser co-imonoprecipitado junto com a PKC em astrócitos RBA-2 (*Hung et al 2005*).

Em geral, a literatura aponta as isoenzimas de PKC e PKCs 1 e 2 como possuindo efeitos anti-apoptóticos (*Gutcher et al 2003*) e as isoenzimas PKC , PKC e, em alguns casos, a PKC como sendo responsáveis por efeitos pró-apoptóticos (*Gutcher et al 2003*). A PKC , como membro das nPKC, possui um domínio regulatório, onde se localiza a região C1 de interação com lipídeos, uma região homóloga aos substratos; e um domínio catalítico, onde se localiza o sitio de fosforilação e de interação com ATP (Fig. 13). A PKC , por ser ativada pela via de fosforilação da treonina 505 no seu sitio regulatório, gera a auto-fosforilação de outros resíduos e sua ativação; podendo ainda ser ativada por clivagem proteolítica da caspase-3 na região variável entre os dois domínios, gerando um fragmento regulatório e outro enzimaticamente ativo (*Shirai e Saito 2002*). Uma vez ativa, a PKC é capaz de fosforilar os seguintes alvos: a própria caspase-3, a proteína cinase do DNA (DNA-PK), sendo capaz de gerar a fragmentação de DNA; o gene supressor de tumor p-73 e lamina B no núcleo, promovendo a desorganização da lâmina nuclear (*Basu 2003*).

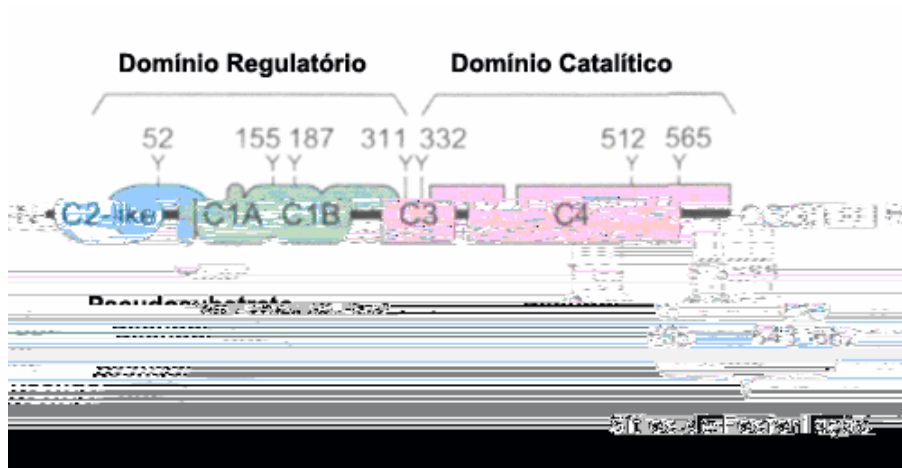


Figura 13: Modelo da estrutura da PKC . Esquema ilustrativo dos domínios da PKC . A Figura mostra os domínios regulatório, com a região de interação com lipídeos, o pseudo-substrato e a pseudo-região de interação com Ca^{2+} , catalítico com a região catalítica e o sítio de fosforilação com as treoninas reguladoras. (Kikkawa *et al* 2002).

A.5 – Receptores de ativação de proliferação peroxisomais

Os receptores de ativação de proliferação peroxisomais (PPAR - *Peroxisome proliferation-activated receptor*) são proteínas pertencentes à grande gama de receptores nucleares que modulam da transcrição de genes regulatórios dos metabolismos lipídicos e do metabolismo de glicose (Clark 2002; Gelman *et al* 2005; Li e Palinski 2006). A família dos PPAR é composta por três membros com diferentes ativadores endógenos entre si (tabela V), estão localizados no citosol da célula e são translocados para o núcleo após ativação. O PPAR α , identificado em 1990 (Fonteh *et al* 2001; Gelman *et al* 2005; Li e Palinski 2006), possui como ligantes naturais ácidos graxos de longas cadeias de carbonos poli-insaturados (20:5n-3 e 22:6n-3 – tabela III) e seus derivados lipídicos (Gelman *et al* 2005; Kota *et al* 2005). O PPAR γ , expresso preferencialmente em musculatura esquelética (Fonteh *et al* 2001; ; Kota *et al* 2005; Gelman *et al* 2005; Li e Palinski 2006) tem como ligante endógeno ácidos graxos e

prostaciclina (Gelman et al 2005). O PPAR possui o *splice*

Gelman et al 2005) (Fig. 14), responsivos a PKCs e MAPKs (*Fonteh et al 2001; Gelman et al 2005*).

Recentemente os PPARs têm sido relacionados com diversos eventos celulares. O PPAR α apresenta importante papel no sistema cardiovascular, induzindo apoptose em células da musculatura lisa (*Schiffirin 2005*) e possui efeitos anti-inflamatórios, através da produção de IL-6 e PG (*Chinetti et al 2000; Li e Palinski 2006*) atuando antagonicamente a angiotensina 2 (*Schiffirin 2005*), podendo regular negativamente os genes de algumas citocinas e de moléculas de adesão (*Li e Palinski 2006*) e ativando de NF B (*Chinetti et al 2000*). O PPAR β por sua vez tem sido observado em células endoteliais, musculares lisas, monócitos e macrófagos (*Chinetti et al 2000*). Esta molécula é capaz de induzir a ativação e proliferação em células musculares lisas (*Wang et al 2004*) e supressão da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), metaloproteinases de matriz e receptores *scavengers* em macrófagos e monócitos (*Chinetti et al 2000*); e apoptose em alguns tipos celulares (*Clark 2002; Boitier et al 2003*). Já o PPAR γ encontra-se envolvido na patologia da diabetes do tipo 2 (*Kota et al 2005*) e doenças cardiovasculares (*Kota et al 2005; Schiffirin 2005*).

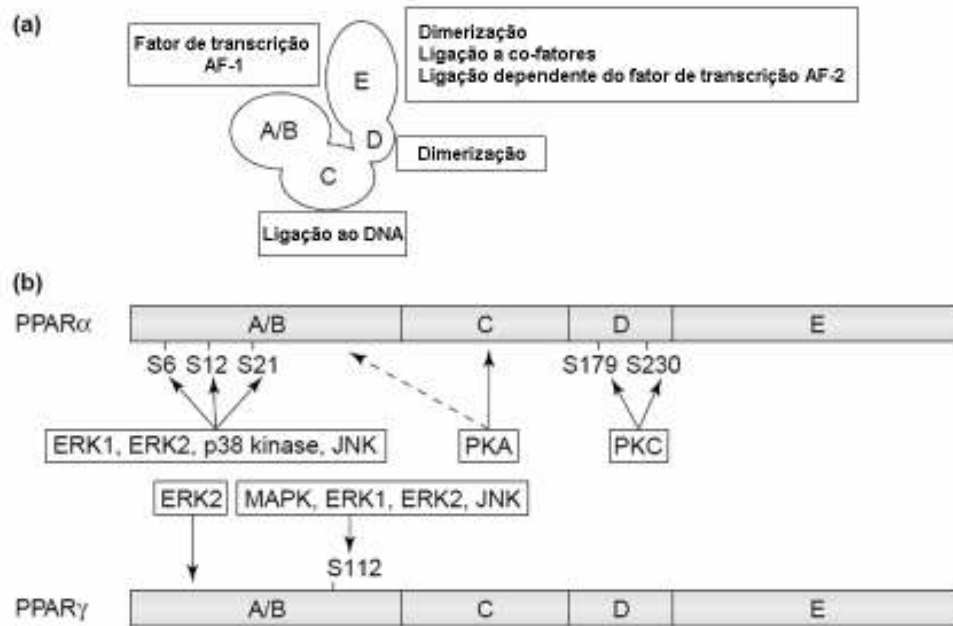


Figura 14: Esquema ilustrativo do PPAR com o mecanismo de ativação, regulação e sítios de fosforilação. A Figura mostra os quatro domínios na molécula de PPAR, o A/B de interação com o AF1, o C com a região de interação com o DNA, o domínio regulatório D e o domínio E/F de interação com moléculas coativadoras e coinibitórias; além dos sítios de fosforilação para PKA, PKC e MAPKs. (Gelman *et al* 2005)

B – Objetivos

“Embora isso tudo seja loucura, ainda há lógica nela.”

William Shakespeare - *Hamlet*

Tendo em vista que a sinalização intracelular mediada por ATPe ativa múltiplos receptores, entre eles o receptor P2X₇, nosso presente objetivo é realizar varredura de algumas das vias de sinalização e associá-las à ativação do receptor P2X₇, utilizando como ferramental de análise a apoptose e necrose induzidas por ATPe via P2X₇ em macrófagos murinos.

B.1 – Objetivo geral

Estudar a sinalização intracelular mediada por ATPe via P2X₇ na morte celular de macrófagos intraperitoneais murinos.

B.2 – Objetivos específicos

Como objetivos específicos deste trabalho temos:

- 1 – Estudar a dependência do receptor P2X₇ na morte por ATPe;
- 2 – Avaliar a dependência de Ca²⁺ nas diferentes etapas de nosso protocolo indutor de morte celular;
- 3 - Estudar o envolvimento das PLA2 na sinalização de morte celular induzida por ATPe/P2X₇;
- 4 – Estudar a participação das vias metabólicas abaixo das PLA2 na morte celular por ATPe/P2X₇;
- 5 – Estudar a participação de cinases nos processos de morte por ATPe/P2X₇, principalmente as PKC;

6 – Estabelecer a possível relação entre as PLA2 e as PKC na sinalização induzida por ATP;

7 – Avaliar o envolvimento dos receptores nucleares PPAR no morte promovida por ATPe/P2X₇.

C. MATERIAIS & MÉTODOS

Ferve, Ferve, esforço e problema.

Caldeirão que borbulha e o fogo que queima!

William Shakespeare – *Macbeth*

C.1 – Obtenção de macrófagos intraperitoneais murinos

Camundongos *Swiss webster*, AJ129 selvagem, AJ129 5-lipooxigenase^{-/-}, C57/BL6 selvagem e C57/BL6-P2X₇^{-/-} pesando entre 20 e 30g e com idade entre 8 e 12 semanas foram elicitados com injeção intraperitoneal de 1mL meio de tioglicolato, com o intuito de provocar uma reação inflamatória e assim recrutar macrófagos para esta região. Após 4 dias, período correspondente ao pico de macrófagos na região inflamada, estes animais foram sacrificados por asfixia em uma câmara de CO₂ e fixados em uma placa de cortiça para auxiliar na lavagem de suas cavidades peritoniais com 10mL de RPMI 1640 ou DMEN sem soro, massageando-se suavemente a cavidade peritoneal para a obtenção do maior número de células possível. Este método garante que a grande maioria das células obtidas sejam macrófagos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com RPMI 1640 ou DMEN sem soro e o número total de células contado com o auxílio de uma câmara de

C.2 – Cultura de macrófagos intraperitoneais murinos

As células obtidas, como descrito acima, foram plaqueadas com meio incompleto em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^5 células por poço por 40 minutos em estufa umedecida contendo 5% de CO₂. Após esse período, os poços eram lavados com meio incompleto e as células que não aderissem à placa eram descartadas. Em seguida, na presença de meio completo (RPMI 1640 ou DMEN suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 g/L bicarbonato de sódio, 0.3 mg/L L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) as células eram mantidas por 4 dias em cultura, em uma estufa umedecida contendo 5% de CO₂. Este processo constitui um protocolo seguro para a utilização apenas de macrófagos oriundos do peritônio, evitando a possível contaminação com outras células recrutadas pelo tioglicolato, como por exemplo, os linfócitos.

C.3 – Protocolo experimental de indução de morte celular

Células em suspensão ou células aderidas foram utilizadas na proporção de 2×10^5 células por eppendorf ou poços. Em todos os experimentos as células eram aclimatizadas em meio de cultura incompleto por 15 minutos e em seguida eram adicionados inibidores de certas vias de sinalização ou o veículo destes por 20 minutos. Ao término deste período, adicionava-se ATP em concentrações variáveis e incubava-se por mais 20 minutos, constituindo assim a primeira fase do protocolo, a fase de indução. Em todos os passos aqui descritos as células eram mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

Para a segunda fase do protocolo, a fase efetora, as células eram lavadas uma vez e o sobrenadante era substituído por meio de cultura completo, re-adicionando os inibidores utilizados por 6 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. A menos

que indicado nas legendas, todos os inibidores permaneceram presentes com as células durante todo o experimento.

Ao término da fase efetora, as células eram centrifugadas a 11000 rpm por 45 segundos (centrífuga Costar Mini Centrifuge), o sobrenadante recolhido para ensaios de liberação de LDH e o precipitado era tratado para análise do percentual de núcleos hipo-diplóides por citometria de fluxo.

C.4 - Detecção de morte celular por citometria de fluxo

Ao término da fase efetora, o precipitado obtido da centrifugado a 11000rpm por 45 segundos era tratado com 250 μ L tampão de lise com concentração saturante de brometo de etídeo (0.01g de citrato de sódio, 0.1% de Triton-X 100, 50 μ g/mL de brometo de etídeo, volume final de 10mL de água destilada) por 15 a 30 minutos.

A contagem dos núcleos foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo BD FACScalibur, equipado com um laser de argônio (excitação a 488nm) e ajustado para coletar 5000 eventos. Os parâmetros avaliados foram a amplitude do espalhamento de luz frontal (*forward scatter*, FSH), a amplitude do espalhamento de luz a 90⁰ (*side scatter*, SSH), a emissão de fluorescência a 633 nm na escala linear, a emissão de fluorescência a 575 nm na escala logarítmica (FL3 e FL2 respectivamente) e a área sob a curva de fluorescência a 633nm (FL3 area).

Avaliando a relação entre FL3, na abscissa, e FL3 área, na ordenada, fomos capazes de excluir os eventos que não se encontravam dentro da diagonal, que representa a relação direta entre a quantidade de luz detectada pelo fotodetector FL3 e o "tamanho" do evento avaliado (FL3 área). O evento dentro deste espalhamento obedece a uma relação direta entre tamanho e quantidade de material genético, onde traçávamos uma região para análise. Assim, se qualquer evento fora desta região (R1

na Figura 15) não era analisado, podendo corresponder a núcleos grumados, tamanho pequeno e muito material genético, representando falsos resultados que poderiam comprometer a qualidade da análise (Fig. 15).

Os resultados foram todos analisados com o auxílio do programa WinMDI (Multiple Document Interface Flow Cytometry Application, versão 2.8), desenvolvido por Joseph Trotter, The Scripps Research Institute (La Jolla, E.U.A.).

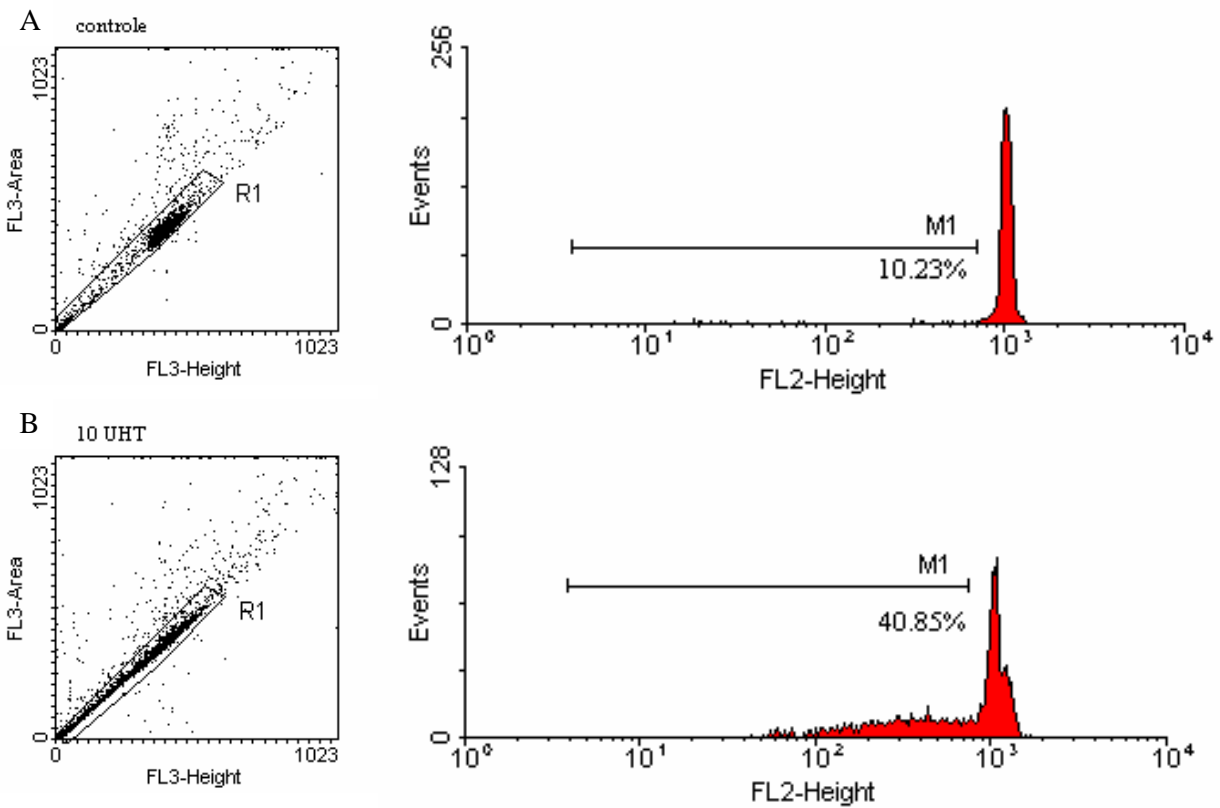


Figura 15: Gráficos ilustrativos do método de análise da fragmentação do DNA de macrófagos. A região R1 representa uma relação direta entre intensidade de brilho do DNA ligado ao BE, avaliada pelo fotodetector FL3 e a quantidade de material genético avaliada pela área de FL3. Os dados dentro deste grupo foram reavaliados quanto ao de fragmentação através da intensidade de brilho na escala logarítmica, onde determinamos o valor de 10^3 como o ponto de nossos núcleos $2n$ íntegros, os valores abaixo até 3×10^2 foram considerados núcleos hipo-diplóides, estando dentro da região M1. Em A temos as células alvo controle, em B as células alvo expostas a 5mM de ATP extracelular.

C.5 - Ensaio da liberação de LDH

Com a perda da integridade da membrana citoplasmática que ocorre na morte celular, diversas moléculas encontradas somente no interior da célula passam a ser observadas no meio extracelular. Assim sendo, pode-se utilizar a detecção destas moléculas no meio extracelular como parâmetro para determinar o grau de morte celular. A enzima lactato desidrogenase (LDH), constitutivamente expressa em altas concentrações em todas as células estudadas é altamente estável e muito utilizada como marcador de lise celular pelo comprometimento da membrana plasmática, caracterizado como morte por necrose.

A avaliação do LDH liberado durante a indução de morte por ATPe foi realizada com o auxílio de kit comercial (Doles Reagentes, Goiás, Brasil) e medido em leitor de microplacas. A densidade óptica (D.O.) a 490 nm era determinada e o percentual de citotoxicidade calculado segundo a fórmula:

$$\frac{DO_{\text{exp}} - DO_0}{DO_{100} - DO_0} \times 100$$

Onde, DO_{exp} = densidade óptica correspondente à quantidade de LDH liberado das células alvos durante o experimento; DO_0 = quantidade de LDH liberado espontaneamente que corresponde ao controle zero; DO_{100} = total de LDH liberado quando todas as células são rompidas com triton X-100 0.1%.

C.6 - Dosagem de proteína

A determinação da quantidade de proteína contida nas diferentes formas de preparação utilizadas para procedimentos de géis SDS-PAGE e *western blotting* foi realizada pelo método descrito por Bradford em 1976 (*Bradford, M. M. 1976*).

C.7 – Fracionamento e translocação

Procurou-se avaliar a translocação das PKCs II e e dos PPARs e quanto à possibilidade de serem ativados pelo ATP extracelular. O protocolo consistia em aderir 6×10^6 a 10^7 células por poço em placa de 6 poços, protocolo muito semelhante ao descrito anteriormente para os ensaios de morte celular. Após os 4 dias de cultura as células eram estabilizadas por 15 minutos em meio incompleto, em seguida adicionada inibidores de vias de sinalização, quando necessário, por 20 minutos e por fim o ATP nos tempos de 2, 10 e 20 minutos. Ao término das incubações com ATP, as células eram transferidas para o gelo e com o auxílio de um rodo de cultura eram homogeneizadas em tampão contendo: 20mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 0,25M sucrose, leupeptina (25 mg/mL), aprotinina (25 mg/mL) e PMSF (17 mg/mL). As células homogeneizadas eram então submetidas de 25 a 30 passagens pela agulha de seringa de insulina. Este procedimento cria as condições de pressão necessárias para causar o rompimento da membrana plasmática. Uma vez lisadas, estas células eram centrifugadas a $1000 \times g$ para a sedimentação dos núcleos e o sobrenadante era então ultra centrifugado a $100.000 \times g$ por 40 minutos em ultra-centrifuga HITACHI. O novo sobrenadante era coletado e armazenado e o precipitado re-solubilizado no mesmo tampão descrito acima. Ambas as amostras eram submetidas à dosagem protéica pelo método de Bradford, seguido por adição de tampão de amostra cinco vezes concentrado (60 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol pH 6,8) e aquecidas por 5 minutos a 98°C para subsequente separação por eletroforese SDS-PAGE.

C.8 – Eletroforese SDS-PAGE e *western blotting*

Macrófagos foram cultivados e submetidos ou não aos protocolos de fracionamento como descrito acima. Entre 20 – 40 µg de proteína total das amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE de 10% de acrilamida conforme descrito em (Monteiro-da-Cruz *et al* 2006). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com o auxílio de um aparato de transferência (Bio Rad) a 90mA por 75 minutos. A membrana contendo as proteínas foi tratada com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em solução de Tris-HCl 20 mM, Tween20 0,05%, pH7,4 [TBS-T]) por 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Foram utilizados anticorpos contra as diversas isoenzimas da PKC (Santa Cruz Biotechnology, CA-USA), P2X₇ (Alomone, Jerusalém-Israel), PPAR (Cayman, MI-USA) e PPAR (Santa Cruz, CA-USA) nas diluições recomendadas pelos fabricantes. Ao término desta incubação a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS-T de 10 a 30 minutos a temperatura ambiente e incubada por 2 horas com anticorpo secundário específico conjugados à peroxidase diluído 1:2000 em TBS-T (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, a membrana foi lavada conforme descrito acima sem o leite e tratada para revelação por quimioluminescência com o kit ECL Plus (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) de acordo com instruções do fabricante. A aquisição da imagem final da revelação foi feita pela utilização do *scanner* para luminescência de géis STORM860 e o software ImageQuant versão 5.2 (Molecular Dynamics).

C.9 – Ensaio de *Tunnel*

Macrófagos de camundongos *Swiss-Webster* foram plaqueados em lamínulas de 13 mm na concentração de 10^6 células por lamínula, mantidos em cultura com meio RPMI 1640 completo, conforme descrito acima por 96 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após o período de cultura, as células foram pré-tratadas com 1 ou 10 μM de cloreto de queleritina (Quel) por 20 minutos, lavadas e expostas a 5 mM de ATP por 20 minutos. Ao término da fase de indução de morte, o meio das lamínulas foi substituído por meio completo sem ATP ou Quel e incubadas por 6 horas em estufa umidecida a 37°C e 5% de CO_2 . Ao final do experimento as lamínulas foram lavadas e tratadas com o kit de *tunnel FragEL* da Oncogene/Merk (Darmstadt, Alemanha) para a detecção de células apoptóticas. Foram contados um total de 200 células positivas para a marcação com dihidroclorato de 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI), dentro de 3 a 5 campos. O percentual de células positivas para o tunnel foi determinado contando-se as células marcadas dentro dos campos acima determinados.

C.10 – Normalizações e Teste estatístico

Os gráficos consistem da representação das médias dos experimentos em triplicata com o erro padrão. As normalizações foram realizadas com a subtração das médias dos controles experimentais de cada condição experimental, os valores adotados como 100% foram os obtidos com o 5 mM de ATP e os demais foram calculados percentualmente em cima do 100%.

As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas por teste *Student't* não pareado, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente diferentes, utilizando-se o software Prism versão 4.

C.12 – Reagentes

RPMI 1640, soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina foram obtidos com Gibco/BRL (São Paulo, RJ, Brasil); 1-acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (LPA) foi obtido com Avanti (Alabaster, AL, USA); 3-[1-(para-Chlorobenzyl)-5-(isopropyl)-3-t-butylthioindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid (MK-886), nordihydroguaiaretic Acid (NDGA), arachidonyltrifluoromethyl ketone (AACOCF₃), palmitoyl trifluoromethyl ketone (PACOCF₃), U-73122, Rotlerina (rot), Cloreto de queleritina, SB202190 e SB203580 foram obtidos com Calbiochem (San Diego, CA, USA); Thioglycollate medium obtido com Difco (Detroit, MI, USA). NaCl, MgCl₂, CaCl₂, KCl e Butanol-1 foram obtidos com Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); Cyclosporin A e antiIgG de coelho conjugada com peroxidase obtido da Amersham Pharmacia Biotech (São Paulo, SP, Brasil); 4-bromophenyl bromide (pBPB) , Mepacrina, Adenosine-5-Triphosphate (ATP), Acetyl salicylic Acid (AAS) Triton-X 100, Arachidonic Acid , Lyso-phosphatidilcholine (LPC) 2-bromo-enol-lactone (BEL), EGTA, ATP, ADP, UTP, 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP), periodate-oxidized ATP (oATP), ethidium bromide, HEPES, Brillhant Blue G (BBG), dimethyl sulfoxide (DMSO) e phosphate buffered saline (PBS) comprados junto com Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); BAPTA obtido com Molecular Probes (Eugene, OR, USA); leite em pó sem gordura foi obtido com Molico (Rio de Janeiro, Brasil); Dantrolene Sódico doado por Prof. Roberto Takashi Sudo (UFRJ, Brasil); anticorpos anti-PPAR e os anti-PKC foram obtidos com Santa Cruz (Califórnia, USA); anticorpo anti-PPAR obtido com Cayman (Michigan, USA).

D. RESULTADOS

“A verdadeira ciência descobre Deus à espera atrás de cada porta.”

Papa Pio XII

Neste trabalho procuramos investigar os mecanismos pelos quais o ATPe transduz sinais que estejam relacionados com a ativação do programa de morte celular. A dependência do receptor P2X₇ na morte celular provocada pelo ATPe, principalmente em macrófagos, só foi comprovada definitivamente com a utilização de animais P2X₇^{-/-} (*Le Feuvre et al 2003; Coutinho-Silva et al 2003*). Contudo, os mecanismos de sinalização envolvidos na indução de morte celular são poucos conhecidos.

A maioria dos trabalhos que estudam a morte celular induzida por ATPe/P2X₇, utilizam um protocolo de adição de ATPe em culturas de células, no qual este é mantido até o final do tempo de incubação, quando então, a morte é avaliada. Este protocolo é eficiente na indução de morte, mas a presença do ATPe por longos períodos em cultura além de acarretar na metabolização do mesmo por ectonucleotidases e na ativação de outros receptores P2 e P1, mantém o receptor P2X₇ ativado por tempo indeterminado, dificultando uma análise precisa dos mecanismos de indução de morte celular.

Para melhor estudar as vias de transdução de sinal ativadas por ATPe no processo de indução de morte celular, nosso protocolo possui uma fase inicial de indução de 20 minutos na presença de ATP. Seguido de uma fase efetora de 6 horas na sua ausência (*Bisaggio 2001*). Após lavagem os poros associados ao P2X₇ se fecham (*Bisaggio 2001*), permitindo o re-equilíbrio do meio interno da célula.

Assim, observamos na presente tese que o ATPe é capaz de induzir morte celular por lise e apoptose, que esta morte é dependente de P2X₇ e que este receptor junto com o ATPe induzem a morte celular de forma dependente de iPLA2 e PKC . Nesta tese mostramos ainda os primeiros indícios do envolvimento dos receptores P2 com os receptores nucleares PPAR.

D.1 – ATPe Induz Apoptose e Liberação de LDH de Forma Dependente de P2X₇

Ao longo da tese utilizaremos dois tipos de macrófagos intraperitoneais murinos; o primeiro são células em suspensão, pois se tratam dos macrófagos recém tirados da lavagem peritoneal, sendo utilizados logo após de sua obtenção. O segundo tipo de macrófago utilizado será chamado de células aderidas, pois estas células foram mantidas por 96 horas em cultura sob condições assépticas. O primeiro passo em nosso trabalho foi determinar se ambas as células respondiam da mesma maneira ao estímulo indutor de morte por ATPe. Como podemos ob

em macrófagos, e não os demais nucleotídeos e nucleosídeos. Esta afirmação não descarta a possibilidade destes participarem na modulação da morte celular por ATPe/P2X₇, fato já demonstrado por Bisaggio em seu trabalho de 2001, onde o autor demonstrou que o UTPe era capaz de reduzir as doses efetivas de ATPe para indução de apoptose e lise celular (*Bisaggio 2001*).

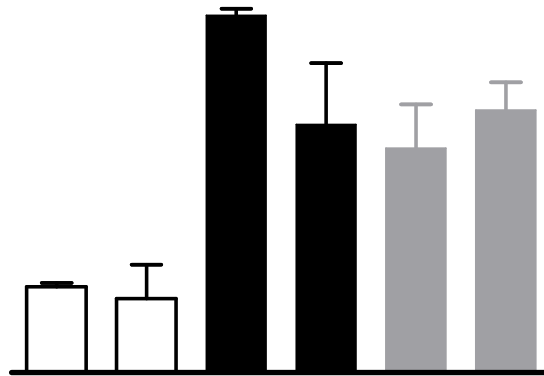


Figura 16: Indução de morte por nucleotídeo extracelular. Macrófagos em suspensão ou aderidos tratados com 5 mM de ATPe por 20 minutos, em seguida lavados e incubados por 6 horas na ausência de ATPe. O eixo y representa o percentual de células mortas segundo a análise indicada na legenda ao lado (barras pretas: apoptose; barras cinzas: liberação de LDH), com o referido tratamento no eixo x. O gráfico representa a média de 3 experimentos em triplicata isolados. A apoptose foi avaliada pela quantificação dos núcleos hipodiplóides por citometria de fluxo e a necrose por método colorimétrico da liberação de LDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparados com seus controles e *** $p < 0,001$.

Na Figura 17 estudamos alguns mecanismos já descritos capazes de inibir as ações do ATPe, nesta figura mostramos que 1 mM de Mg^{2+} inibe a apoptose em aproximadamente 25%, enquanto que 10 mM foi capaz de inibir 80% da apoptose causada por ATPe, sem o Mg^{2+} apresentar qualquer efeito citotóxico aos macrófagos (Fig. 17A). Na Figura 17B, o BBG a partir da concentração de 10 μ M inibiu a apoptose induzida por ATPe nestas condições em 60% do controle com ATPe, quando as células eram pré-tratadas com a dose de 50 μ M essa inibição chegou a 75%, e semelhante ao Mg^{2+} , o BBG não foi citotóxico aos macrófagos (Fig. 17B). O BBG e o Mg^{2+} são capazes de inibir tanto o fenômeno de permeabilização quanto as correntes de influxo de Ca^{2+} associadas com o $P2X_7$ (dados do laboratório) (*Bisaggio 2001; Monteiro-da-Cruz et al 2006; Gomes 2006*), indicando que sua ação anti-apoptótica seja pela inibição deste receptor.

No entanto, tem sido relatado que a inibição por BBG nas concentrações utilizadas nesta tese seria capaz de inibir também o receptor $P2X_4$ (*Sugiyama et al 2005*), e que o Mg^{2+} pode atuar em outros receptores P2 (*Virginio et al 1997; Coddou et al 2002*). Desta forma, os efeitos observados aqui poderiam refletir não só a inibição do próprio $P2X_7$, mas também um efeito conjunto da inibição de dois ou mais receptores, principalmente o receptor $P2X_4$, cuja presença já foi descrita em macrófagos (*Coutinho-Silva et al 2005*).

Independente da existência de co-receptores que poderiam agir conjuntamente com $P2X_7$, este receptor parecer ser o principal membro da família dos P2 envolvido na indução de morte por ATPe. Uma vez que em macrófagos de animais $P2X_7^{-/-}$ o ATPe e o BzATP não são capazes de induzir apoptose (*Le Feuvre et al 2003; Coutinho-Silva et al 2003*). Na Figura 18 confirmamos estes dados utilizando macrófagos em suspensão obtidos de animais $P2X_7^{-/-}$ e de animais C57/Bl6 selvagens.

Como podemos observar, em valores absolutos, que apenas os animais selvagens (barras cinzas) entram em apoptose com 5 mM de ATPe, enquanto os animais P2X₇^{-/-} (barras pretas) não mostraram-se sensíveis a indução de morte por ATPe.

Os dados até o momento apresentados corroboraram os existentes na literatura, apresentando-nos à conclusão de que o receptor P2X₇ é o principal responsável por ativar a morte celular por ATPe, não descartando a participação de co-receptores neste processo.

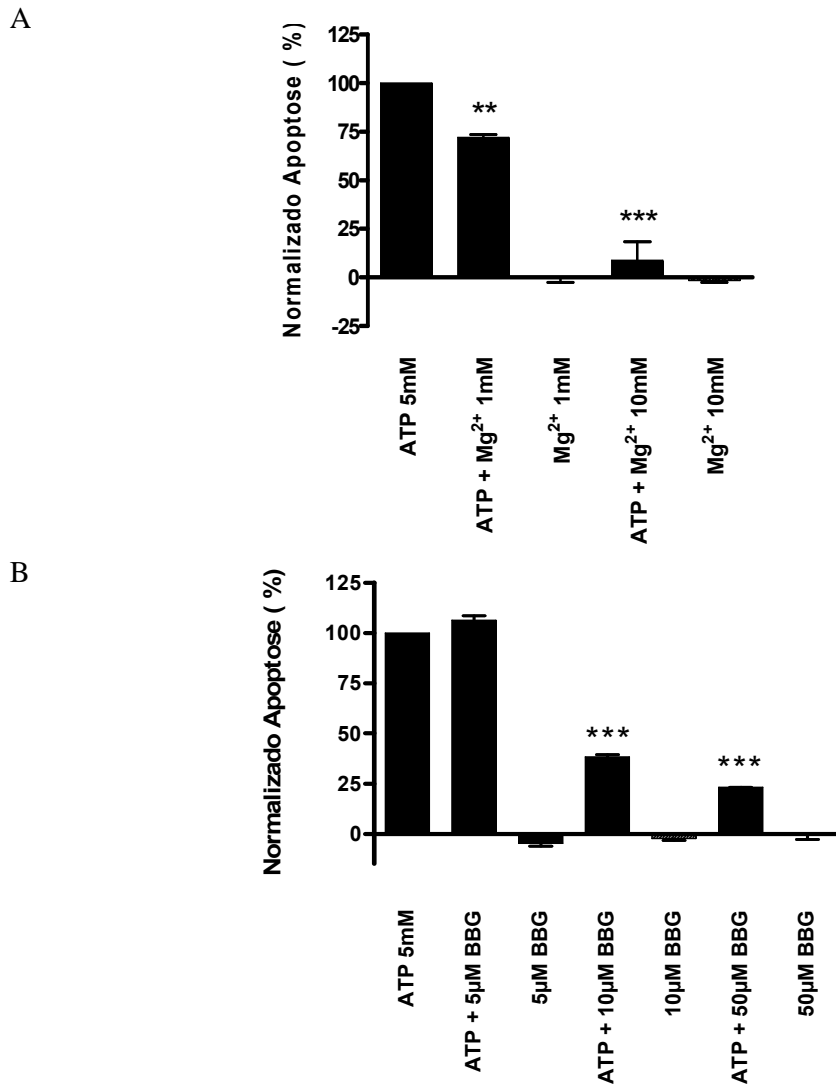


Figura 17: Ação do Mg²⁺ e do BBG na apoptose induzida por P2X₇. Macrófagos em suspensão pré-tratados com diferentes concentrações de Mg²⁺ (A) ou BBG (B) por 20 minutos, seguido de 5 mM de ATPe por 20 minutos, e lavados e incubados por 6 horas na ausência de ATPe e presença dos inibidores. O eixo y representa o percentual de apoptose avaliado por fragmentação de DNA em citometria de fluxo, com o referido tratamento no eixo x. O gráfico representa a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** p < 0,01, *** p < 0,001 comparados com os respectivos controles de 5 mM de ATPe.

Figura 18: Dependência do receptor P2X₇ na apoptose induzida por ATPe. Macrófagos em suspensão de animais selvagens (barra cinza) e P2X₇^{-/-} (barra preta) tratados com doses crescentes de ATPe por 20 minutos. No eixo x está representado cada célula com a correspondente dose de ATPe, enquanto o eixo y o percentual de apoptose avaliado

D.2 – Independência de Ca^{2+} na Fase de Indução

A ativação dos receptores P2X por ATPe acarreta a abertura de canais e influxo de Ca^{2+} , e a ativação do P2X₇ leva também à abertura do poro de permeabilidade, aumentando ainda mais o influxo de Ca^{2+} . Esse influxo tem sido apontado como um dos possíveis mecanismos de sinalização para apoptose, possivelmente através da mitocôndria, levando à perda do potencial mitocondrial, à abertura do poro de permeabilidade transiente (PTP – *permeability transition pore*) e à liberação de citocromo C, seguida da ativação da caspase 9 (Orrenius et al 2003). Além da mitocôndria, o Ca^{2+} poderia levar ao aumento de espécies reativas de oxigênio e ao estresse do retículo endoplasmático (RE) (Orrenius et al 2003). O RE por sua vez pode induzir a liberação do citocromo C e ativação de caspase 9 ou ainda ativar a caspase 12 em células de roedores acarretando na apoptose da célula (Walter e Hajnóczky 2005).

Para verificarmos se esse mecanismo poderia atuar na indução de morte celular via ATPe/P2X₇, pré-incubamos macrófagos em suspensão com doses crescentes de BAPTA-AM na presença de 1 mM de EGTA por 20 minutos. Testamos apenas a dependência de Ca^{2+} na fase indutora de nosso protocolo, uma vez que a ausência total de Ca^{2+} durante a fase efetora do protocolo de indução de morte acarreta em uma apoptose espontânea muito alta, inviabilizando o experimento. Como podemos observar na Figura 19, a ausência de Ca^{2+} tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular, durante os primeiros 20 minutos não levou a uma inibição da apoptose induzida pelo ATPe, a efetividade do tratamento com EGTA e BAPTA-AM no controle da concentração de Ca^{2+} foi confirmada por fluorescência em microscópio sensível a variação de Ca^{2+} na célula (Monteiro-da-Cruz et al 2006).

Este resultado nos leva à possibilidade, até então não percebida de que, em uma fase inicial, o P2X₇ inicia uma sinalização que acarretará na morte do macrófago de forma independente de Ca²⁺. Contudo, este resultado não exclui a participação deste íon no processo, pois durante as 6 horas da fase efetora do prsa ide deta d çgo

fos Ca

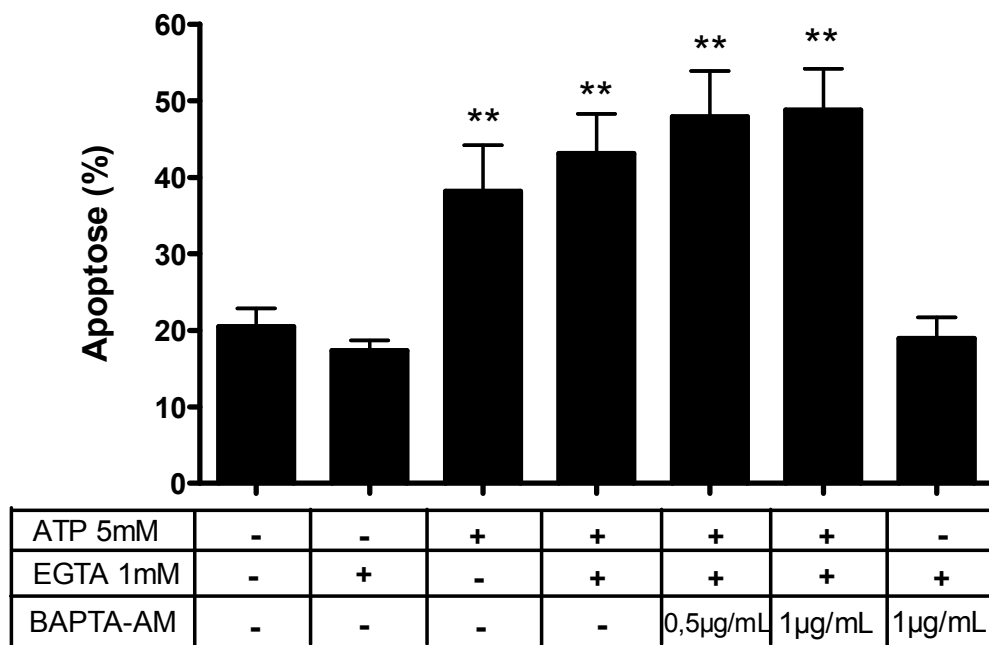


Figura 19: BAPTA-AM não é capaz de inibir a apoptose gerada pelo ATPe. Macrófagos em suspensão foram tratados com 0,5 µg/mL ou 1 µg/mL de BAPTA-AM na presença ou ausência de 1 mM de EGTA por 20 minutos, seguido da incubação com 5 mM de ATPe por 20 minutos. As células foram lavadas e incubadas 6 horas na ausência do ATPe, EGTA e BAPTA-AM. No eixo x temos a representação de cada um dos tratamentos dados as células em conjunto com o eixo y que representa os valores percentuais da apoptose por avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** p<0,01 comparado com controle sem 5 mM de ATP.

D.3 – Ciclosporina A Inibe a Apoptose Induzida por ATPe:

Como diversos mecanismos de indução de apoptose são sensíveis a ciclosporina A (CSA), decidimos verificar seu efeito na morte celular induzida por ATPe em macrófagos. Classicamente descrita como atuante no nível do poro de permeabilidade transiente mitocondrial, por inibir um dos componentes formadores deste (Smaili, S. S. et al 2003; Boyce, M. e Yuan, J. 2006), atualmente esta ação tem sido questionada por trabalhos que não mostram a atividade acima referida (Forte, M. e Bernardi, P. 2005a). Por outro lado, a CSA tem sido associada com outras vias de ação, como a inibição da calmodulina, uma cinase Ca^{2+} dependente, acarretando na inibição da calcineurina e inibição da ativação do fator nuclear de ativação de células T (NFAT) (Macian, F. 2005).

Na Figura 20 mostramos que 1 μM de CSA bloqueia em aproximadamente 50% e 10 μM bloqueia aproximadamente 80% da apoptose induzida por ATPe, sem apresentar efeitos citotóxicos. Contudo, 10 μM de CSA não inibiu a liberação de LDH (Fig. 20).

A não inibição da liberação de LDH causou surpresa, uma vez que a ação da CSA via mitocôndria tem sido relatada como capaz de inibir tanto a apoptose quanto a necrose, por atuar em etapas iniciais destas vias de morte (Kim et al 2003). Este resultado nos encaminha a uma linha de raciocínio onde a CSA talvez não esteja atuando sobre o PTP mitocondrial, mas acreditamos que demonstre a participação de fenômenos dependentes de Ca^{2+} em etapas mais tardias da morte celular provocada por ATPe/P2X₇.

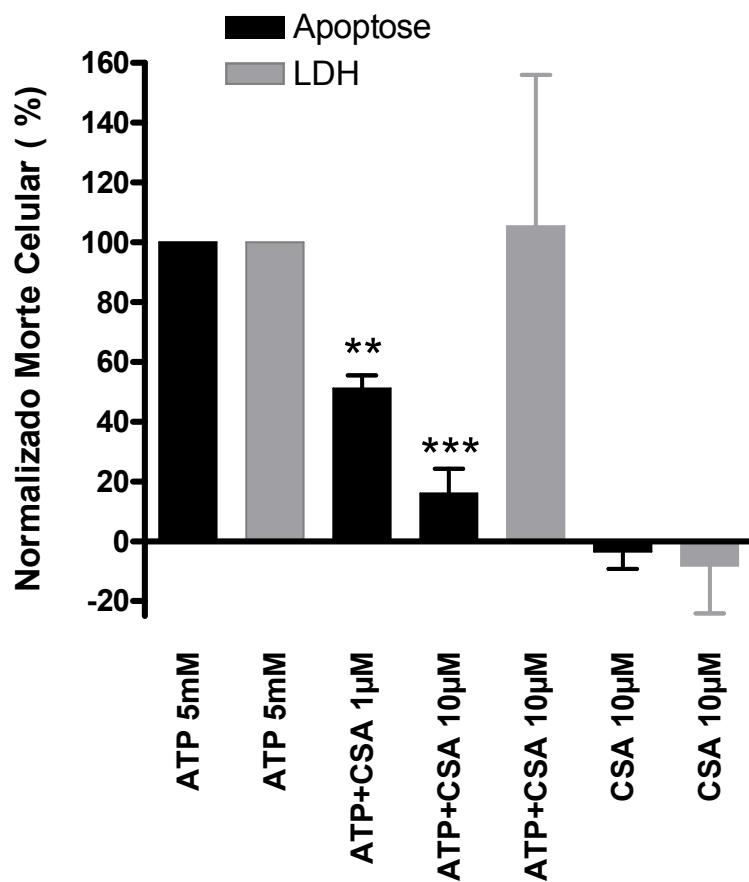


Figura 20: Ciclosporina A inibe a apoptose, mas não a liberação de LDH por ATPe/P2X₇. Macrófagos aderidos de cultura de 96 horas foram pré-incubados com concentrações de 1 ou 10 µM de CSA 20 minutos, em seguida foram incubados com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavados, permanecendo em cultura por 6 horas na ausência de ATPe e na presença de CSA. As barras pretas representam os valores percentuais normalizados da apoptose, as barras cinzas os valores percentuais normalizados da liberação de LDH, ambos no eixo y. No eixo x temos a representação de cada tratamento dado às células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado com os respectivos de 5 mM de ATPe.

D.4 – Apoptose Induzida por ATPe é Dependente de iPLA2

Os dados até aqui apresentados nos permitem afirmar que o ATPe via receptor P2X₇ é capaz de gerar apoptose e lise celular tanto em macrófagos em suspensão, quanto em macrófagos aderidos em cultura de 96 horas. Essa apoptose possui um componente Ca²⁺ independente nos primeiros 20 minutos e é sensível à CSA. Com isso, voltamos nossos esforços à procura de mecanismos Ca²⁺-independentes.

Em paralelo a esta tese, nos encontrávamos envolvidos com outra pesquisa que envolvia os mecanismos de citotoxicidade presente em linfócitos T citotóxicos (CTL) independentes dos mecanismos clássicos descritos (*Costa-Junior et al 2006*). Neste projeto, observamos a participação de uma sPLA2 produzida por CTLs e por células *LAK* ativadas por citocinas, induzindo apoptose independente de perforina, granzimas e receptores associados a indução de morte celular (*Costa-Junior et al 2006*).

Enquanto realizávamos este estudo, tomamos conhecimento de outros trabalhos relacionando P2X₇ com PLA2. Alzola e colaboradores demonstraram em 1998 que P2X₇ promovia a secreção de calicreína de células da glândula submandibular de forma dependente de iPLA2 (*Alzola et al 1998*), e em 2000, Chaïb e colaboradores demonstraram que a iPLA2 regula negativamente a abertura do poro promovida pelo P2X₇ em células acinares de glândulas submandibulares de ratos (*Chaib et al 2000*).

Valendo-nos de nossa prévia experiência e dos dados da literatura, voltamos nossa atenção ao possível papel das PLA2, na morte celular induzida por ATPe via P2X₇. Utilizando inibidores seletivos para 3 das 4 famílias de PLA2, a mepacrina (inibidor genérico de PLA2), o brometo de para-bromofenacila (pBPB – inibidor seletivo das sPLA2), o AACOO CF₃ (inibidor seletivo das cPLA2), e os PACOCF₃ e

BEL (inibidores seletivos para iPLA2). Sendo o BEL considerado como o mais seletivo para a iPLA2 (*Six e Dennis 2000; Capper e Marshal 2001*).

A mepacrina (Fig. 21A) na concentração de 10 μM foi capaz de inibir aproximadamente 60% da apoptose provocada por ATPe/P2X₇, mas aumentando a liberação de LDH (Fig. 21B). As células aderidas foram mais sensíveis à ação da mepacrina que as células em suspensão, mas as células em suspensão mostraram uma maior liberação de LDH. Este dado por si só já constitui um indicador da participação das PLA2 na apoptose por P2X₇, mas não esclarece qual grupo é participante. Por outro lado, Burnstock e colaboradores já haviam descrito que a mepacrina era capaz de se ligar ao ATP (*Bodin e Burnstock 2001*), e desta forma a mepacrina foi utilizada como um localizador de grânulos contendo o nucleotídeos em células nervosas. Se a mepacrina é capaz de interagir com o ATPe, parte da inibição por ela provocada pode ser devido a atuação no próprio ATPe e não nas PLA2.

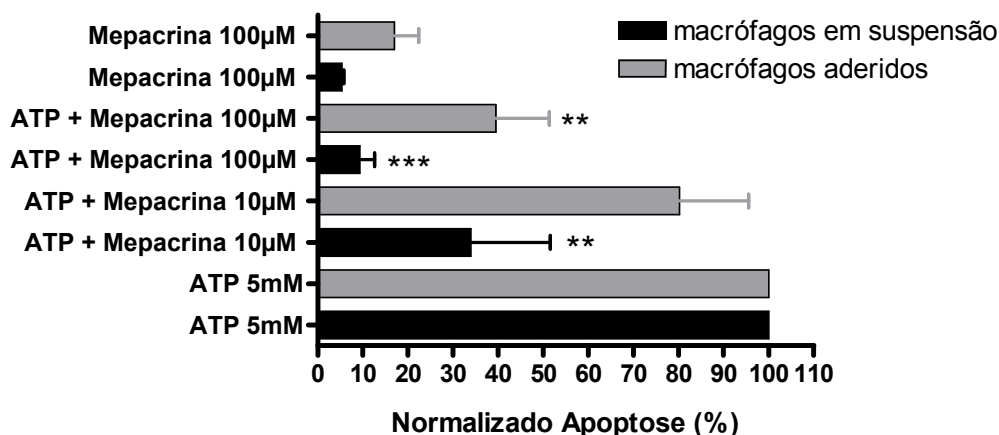
Ao contrário da mepacrina, o pBPB e o AACOO CF₃ não foram capazes de induzir inibição nem da apoptose, nem da liberação de LDH (Figs. 22 e 23, respectivamente). Desta forma, podemos assumir que as sPLA2 e cPLA2 não participariam da morte celular por P2X₇. Este fato colabora com o resultado da independência de Ca²⁺, pois a ação destas duas PLA2 são dependentes pEffris desa

à mepacrina, o PACOCF₃ também promoveu uma tendência ao aumento na liberação de LDH na concentração de 10 µM (Fig. 24B). Já o BEL, foi capaz de inibir 80% da apoptose com 10 µM em ambos os macrófagos (Fig. 25A). O BEL também provocou um aumento na liberação de LDH observado na Figura 25B.

Ao mesmo tempo que constatamos que os inibidores da iPLA2 bloqueavam a apoptose, observamos que os mesmos promoviam um aumento na liberação de LDH (Figs. 21B, 24B e 25B). Este resultado em conjunto ao resultado da independência de Ca²⁺ nos passos iniciais da apoptose, indicam que uma iPLA2 é grande candidata a participar dos processos que levam à apoptose da célula estimulada com ATPe, mas que sua inibição não acarreta na inibição das vias que levam à necrose, ou outras vias associadas à apoptose e que, permanecendo ativas levam ao rompimento final da membrana sem que haja fragmentação nuclear.

No resultado obtido com o BEL, observamos que não há diferença no efeito inibitório da apoptose entre as células em suspensão e as células aderidas, diferente do que observamos com a mepacrina, onde as células aderidas foram mais sensíveis a sua inibição. Pelo fato do BEL ser um inibidor mais confiável e específico, acreditamos que a diferença observada na Figura 21 com a mepacrina seja resultado de sua atuação em outros fatores, não representando uma diferença entre as células utilizadas.

A



B

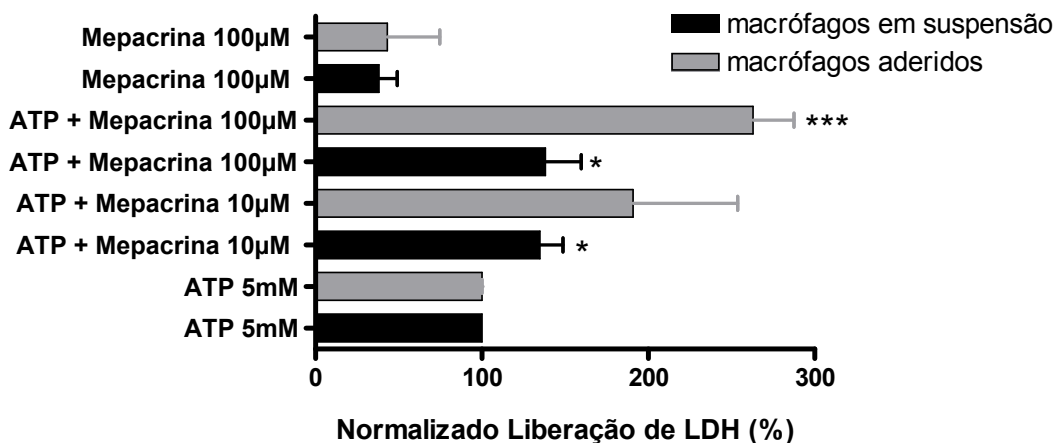
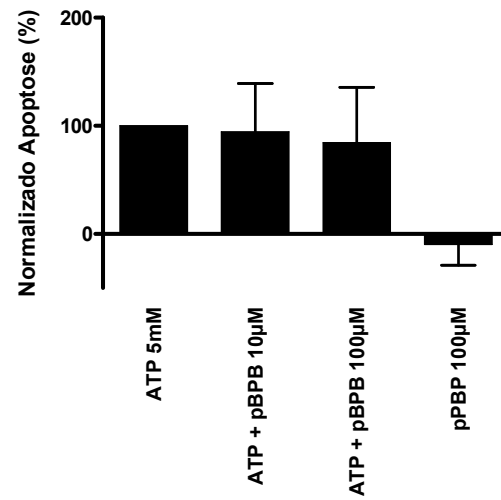


Figura 21: Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por mepacrina. Macrófagos aderidos de cultura de 96 horas (barras cinzas) ou em suspensão (barras pretas) foram pré-incubados com concentrações de 10 ou 100 µM de mepacrina por 20 minutos, seguido de 5 mM de ATPe por 20 minutos, e lavados e incubados por 6 horas na ausência de ATPe e presença de mepacrina. O eixo x representa o percentual normalizado de apoptose (A) e liberação de LDH (B). O eixo y temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com seus respectivos de 5 mM de ATPe.

A



B

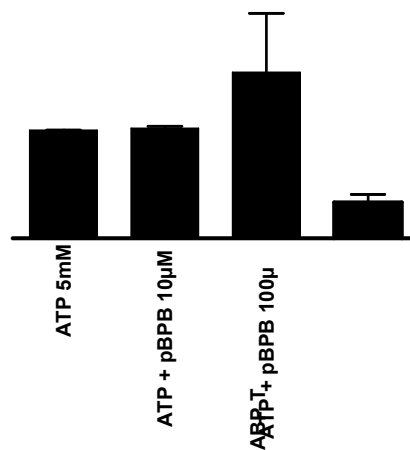
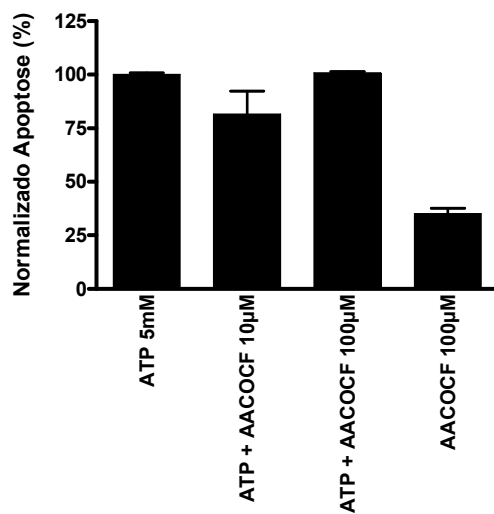


Figura 22: O pBPB não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH. Macrófagos em suspensão foram pré-incubados com concentrações de 10 ou 100 µM de pBPB por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de pBPB. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). O eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.

A



B

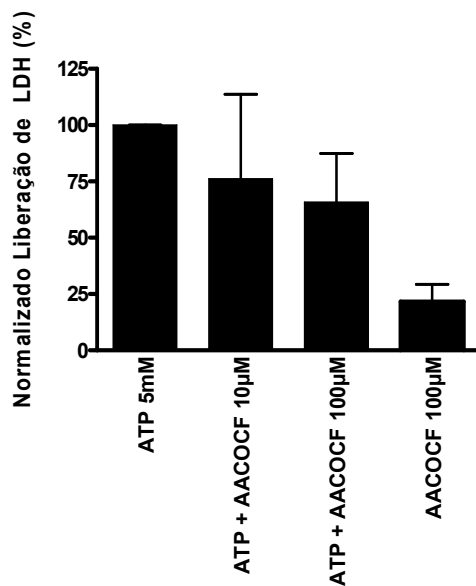


Figura 23: O AACOCF₃ não promove efeito na apoptose ou na liberação de LDH. Macrófagos em suspensão foram pré-incubados com concentrações de 10 ou 100 µM de AACOCF₃ por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de AACOCF₃. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). O eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.

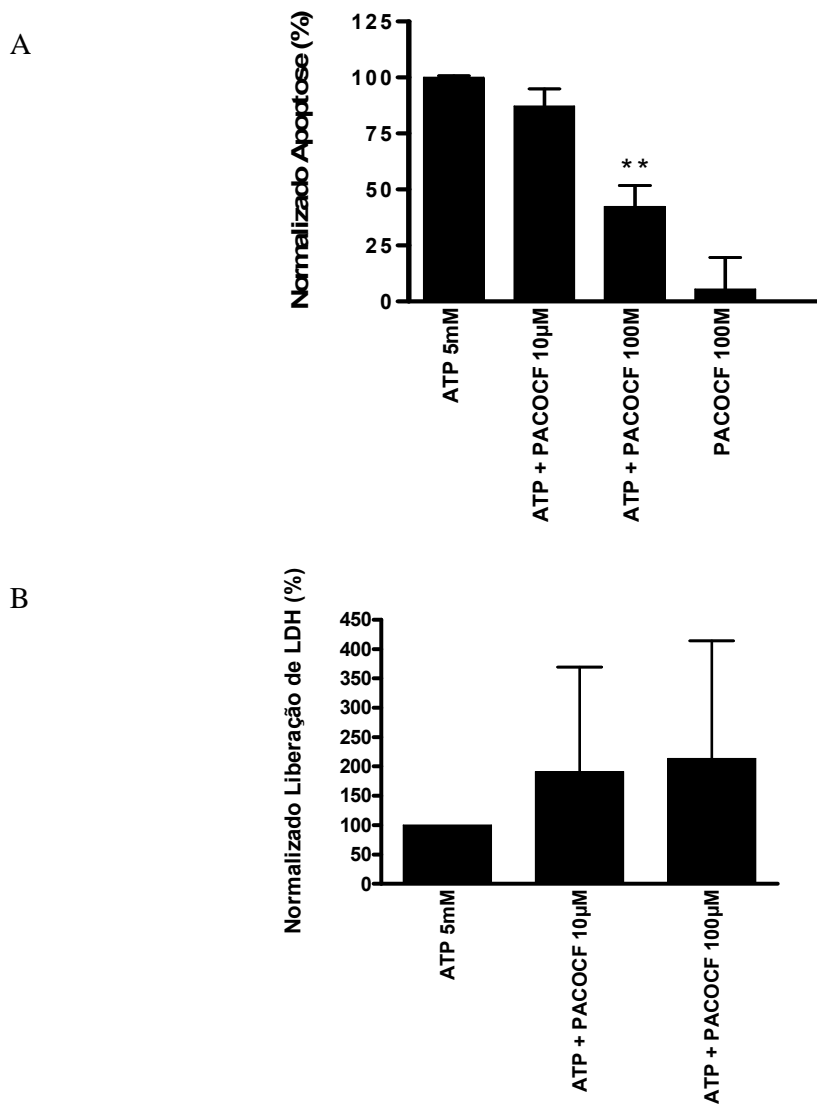


Figura 24: Inibição da apoptose por PACOCF₃. Macrófagos em suspensão foram pré-incubados com concentrações de 10 ou 100 µM de PACOCF₃ por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de PACOCF₃. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). O eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** p < 0,01 comparado com o controle de 5 mM de ATPe.

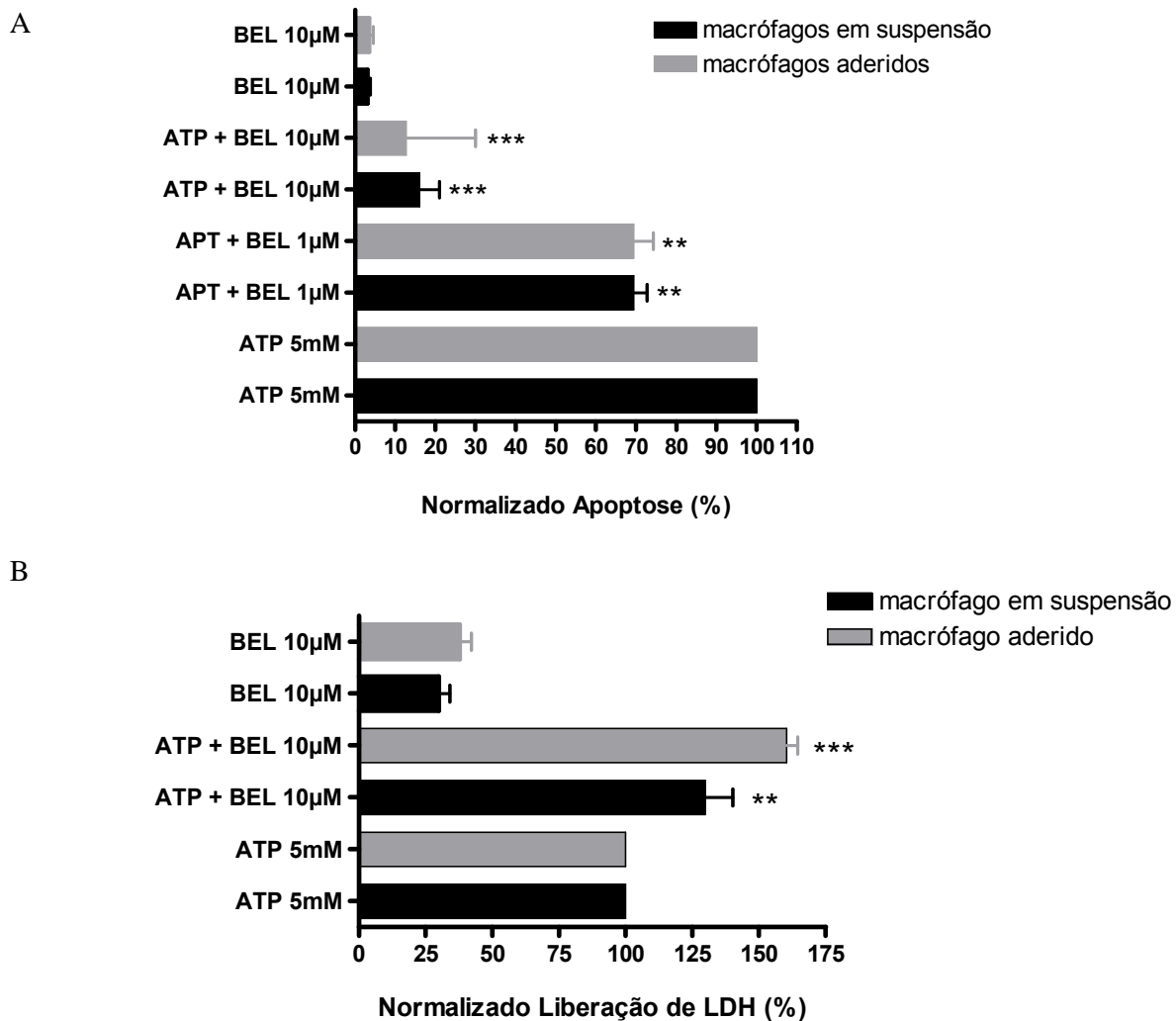


Figura 25: Inibição da apoptose e potencialização da liberação de LDH por BEL. Macrófagos aderidos de cultura de 96 horas (barras cinzas) ou em suspensão (barras pretas) foram pré-incubados com concentrações de 10 ou 100 µM de BEL por 20 minutos, seguido de 5 mM de ATPe por 20 minutos, e lavados e incubados por 6 horas na ausência de ATPe e presença de BEL. O eixo x representa os percentuais normalizados de apoptose (A) e liberação de LDH (B). O eixo y tem a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com seus respectivos de 5 mM de ATPe.

Dados da literatura indicam que o BEL pode também inibir a fosfatidato-fosfolipase dependente de Mg^{2+} (MgDPP) (Fuentes et al 2003), outra enzima envolvida no metabolismo lipídico. A MgDPP por sua vez é sensível à ação de propranolol em concentrações mM. Na Figura 26, mostramos que o propranolol não inibe a apoptose induzida por ATPe em macrófagos aderidos, sugerindo que a MgDPP não está envolvida nos processos e que o BEL deve estar exercendo seu efeito inibitório da apoptose via a iPLA2.

O fato dos inibidores das iPLA2 atuarem diminuindo a apoptose provocada por ATPe/P2X₇ está de acordo com a independência de Ca^{2+} anteriormente citada.

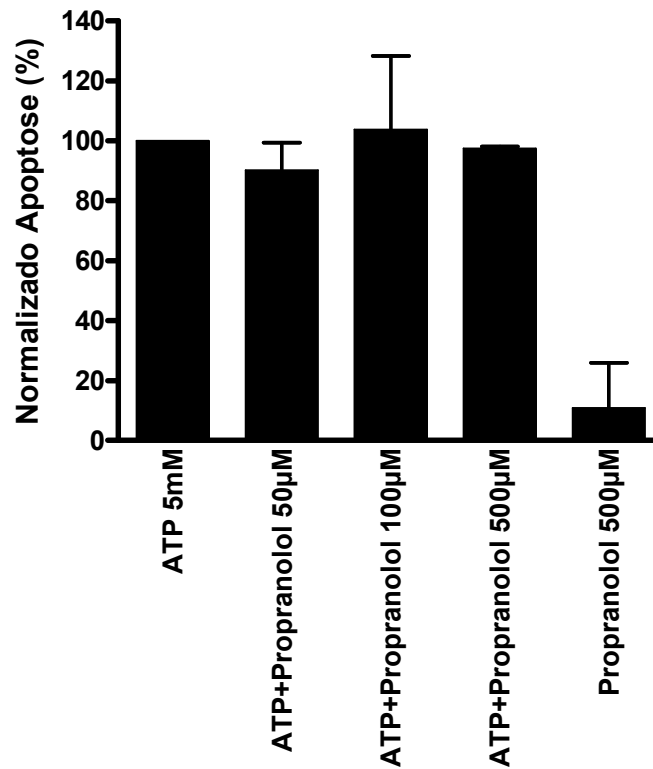


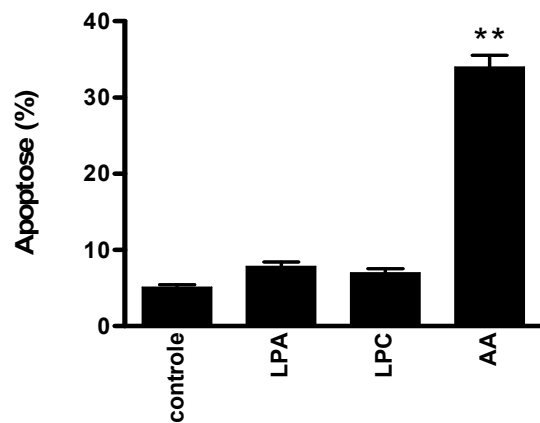
Figura 26: Efeito do propranolol na apoptose induzida por ATPe/P2X₇. Macrófagos aderidos pré-tratados com diferentes concentrações de propranolol por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de propranolol. No eixo x temos a representação de cada um dos tratamentos dados as células em conjunto com o eixo y que representa os valores percentuais da apoptose avaliada. Os gráficos constituem a média de 2 experimentos em triplicata isolados

D.5 – Ácido Araquidônico e as Vias Abaixo da iPLA2

Classicamente as PLA2 são associadas à resposta inflamatória, à geração principalmente de AA e ativação das vias de cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), principalmente pela ação das cPLA2 e sPLA2, e ao remodelamento de membranas celulares pelas iPLA2. A iPLA2 não possui especificidade para um tipo de ácido graxo, podendo liberar qualquer um da posição *sn-2* do fosfolípido.

Nós indagamos qual o efeito do AA em macrófagos antes de avaliar se essa iPLA2 estaria levando à ativação de COX e LOX. Existem vários relatos na literatura indicando que o AA é capaz de induzir apoptose em diversos tipos celulares (*Cummings et al 2000; Capper e Marshall 2001; Taketo e Sonoshita 2002*). Köller e colaboradores por exemplo, relataram que em concentrações próximas à encontrada em sítios inflamatórios (aproximadamente 10 μM) o AA é capaz de induzir apoptose em neutrófilos (*Koller et al 1997*). Tratamos os macrófagos em suspensão com 10 μM de AA, ácido-lisofosfatídico (LPA) e liso-fosfolina (LPC), dois outros possíveis metabólitos gerados pelas PLA2 em conjunto com o AA, por 20 minutos seguindo o mesmo protocolo usado para a indução de morte com ATPe. Observamos que apenas o AA foi capaz de induzir apoptose em nossas células (Fig. 27A), enquanto que o AA e LPC foram capazes de induzir liberação de LDH (Fig. 27B).

A



B

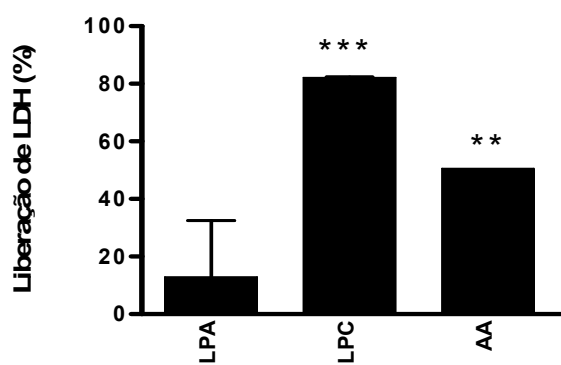


Figura 27: Indução de morte celular por metabólitos da PLA2. Macrófagos em suspensão foram tratados com 10 μ M de AA (AA), ácido liso-fosfatídico (LPA) e liso-fosfolina (LPC) por 6 horas. Em A, temos o gráfico da apoptose induzida por esses metabólitos com o eixo x representando os diferentes tratamentos e o eixo y a apoptose induzida. Em B, semelhante a Figura A, temos o gráfico da liberação de LDH. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. Em A, ** $p < 0,01$ comparado com o controle. Em B, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com controle.

A constatação de que o AA foi capaz de causar apoptose e lise celular em nosso sistema não significa que este seria o mecanismo utilizado pelo ATPe/P2X₇. Pois algumas das enzimas abaixo da via da iPLA2 são capazes não apenas de metabolizar o AA, mas também os demais ácidos graxos potencialmente liberados por esta. Como apresentaremos depois (Fig. 29), temos razões para crer que a indução de apoptose por AA segue uma via diferente da induzida por ATPe, indicando que este ácido graxo não é o principal mediador mobilizado pela iPLA2, como esperado pois não obtivemos indicação forte da ação da cPLA2, principal gerador de AA em macrófagos.

Como apresentado na introdução, os inibidores da via da 5-LOX sugerem fortemente o envolvimento da 5-LOX na via de sinalização mediada por ATPe/P2X₇. No entanto, quando utilizamos macrófagos derivados de animais 5-LOX^{-/-}, o ATPe na concentração de 5 mM induziu os mesmos níveis de apoptose e de liberação de LDH dos macrófagos selvagens (Fig. 28A e 28B, respectivamente). Este dado sugere que, na ausência da enzima 5-LOX, exista uma via compensatória na indução de morte celular, que poderia inclusive estar atuando paralelamente a via da 5-LOX nos animais selvagens, e compensada no animais 5-LOX^{-/-}. Alternativamente, embora pouco provável, os quatro inibidores de 5-LOX utilizados poderiam estar inibindo a apoptose atuando em outros alvos.

Para elucidar esta questão, testamos o efeito de 100µM de NDGA e 1µM de MK886 na apoptose induzida por ATPe/P2X₇ nos macrófagos derivados de animais selvagens e 5-LOX^{-/-}. Como podemos observar na Figura 29 em macrófagos obtido de camundongos 5-LOX^{-/-} nem NDGA, nem o MK886 bloquearam a apoptose induzida por ATPe, demonstrando assim que tanto NDGA quanto o MK886, estariam realmente agindo na inibição da 5-LOX e não de outros alvos. Quanto ao MK886,

mesmo podendo atuar na via dos PPAR, não foi incapaz de inibir a apoptose nos macrófagos 5-LOX^{-/-}, sugerindo que este não seja seu mecanismo de ação, ou que em animais deficientes na 5-LOX haja outros mecanismos compensatórios.

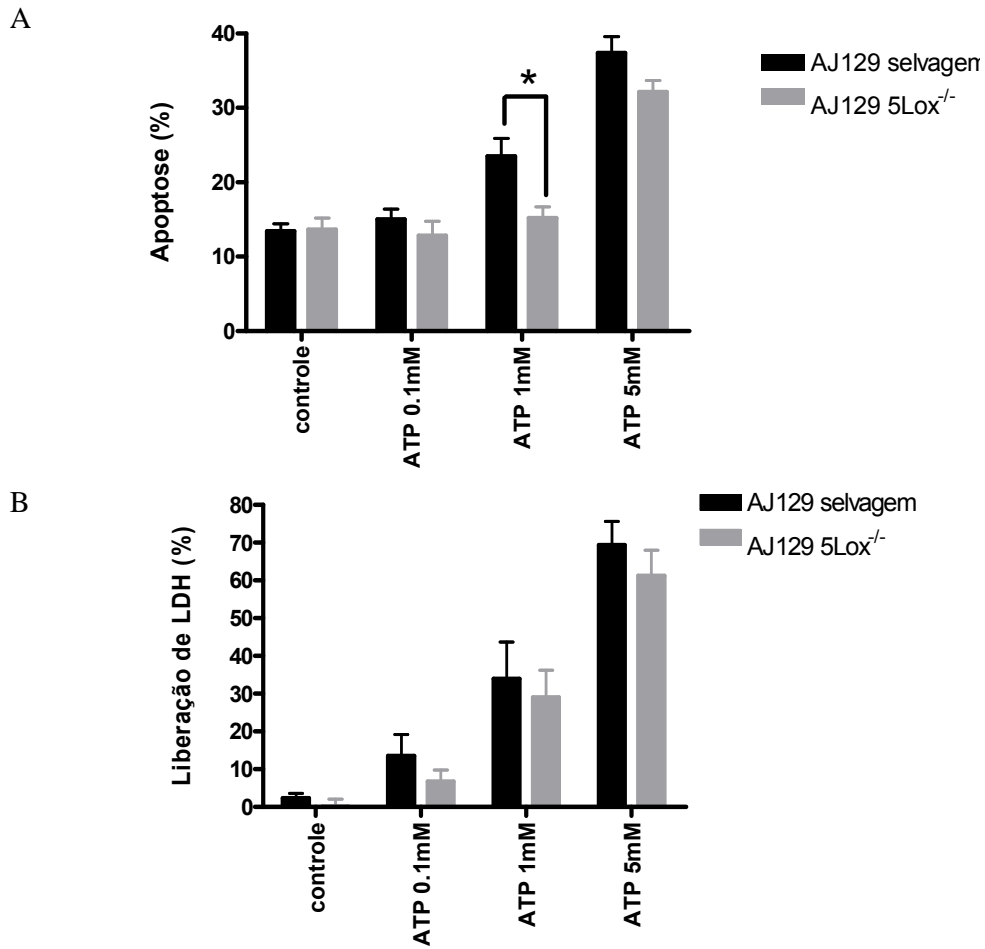


Figura 28: Efeito do ATPe nos animais 5-LOX^{-/-}. Macrófagos em suspensão de animais selvagens (barras pretas) ou 5-LOX^{-/-} (barras cinzas) foram tratados com diferentes concentrações de ATPe e a morte celular avaliada. Em A, a apoptose provocada pelas concentrações crescentes de ATPe. Em B, a liberação de LDH provocada pelo ATPe. No eixo x temos a representação das diferentes doses de ATPe e no eixo y os valores brutos da liberação de LDH. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. $p < 0,05$ comparado como indicado na figura.

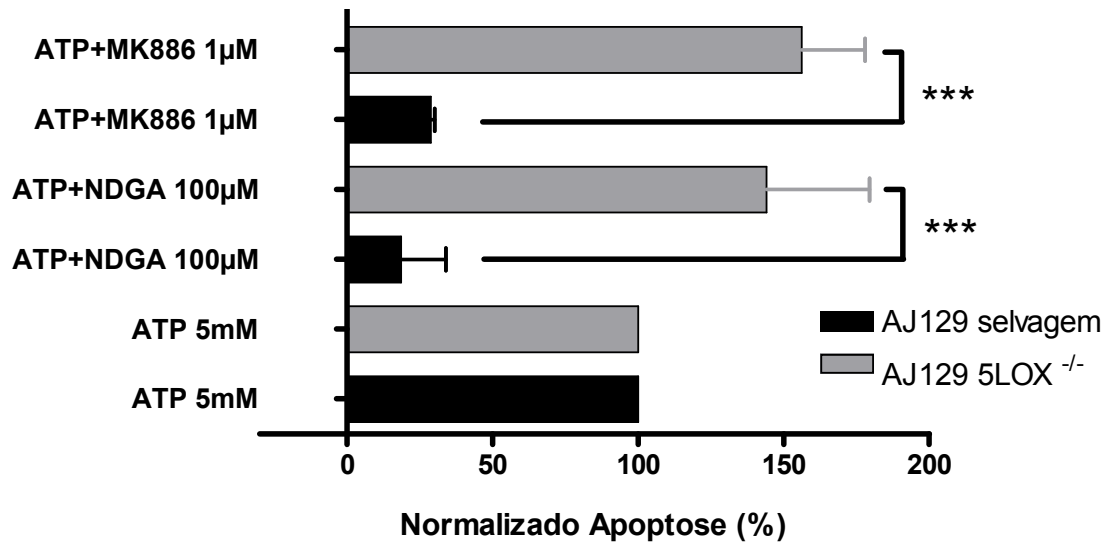


Figura 29: Inibidores da 5-LOX não inibem a apoptose nas células 5-LOX^{-/-}. Macrófagos aderidos oriundo de animais selvagens (barra preta) e 5-LOX^{-/-} (barra cinza) foram tratados com 100 µM de NDGA ou 1 µM de MK886 por 20 minutos, em seguida estimulados com 5 mM de ATPe, lavados e incubados na ausência de ATPe e na presença de NDGA e MK886. O eixo y representa os diferentes tratamentos dados as células e o eixo x os valores percentuais normalizados da apoptose. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. *** p < 0,001 comparado como indicado na figura.

Uma vez que tenhamos estabelecido o envolvimento de uma iPLA2 na apoptose provocada por ATPe/P2X₇, com a participação da 5-LOX e não das COX, voltamos nossa atenção para a via dos CYP450, uma via também capaz de metabolizar ácidos graxos em dois principais produtos, os EETs e os HETEs. Nossos dados iniciais com MS-PPOH, um inibidor da via da síntese de EET (*Gross et al 2005*), demonstram uma redução de aproximadamente 50% com 0.1 µM e de 60% com 100 µM de MS-PPOH nos níveis de apoptose, já a liberação de LDH sofreu uma inibição de 65% com 100 µM de MS-PPOH (Fig. 30A e 30B). O MS-PPOH não mostrou-se citotóxicos aos macrófagos.

Estes dados são um indicativo de que derivados de ácidos graxos pela via do CYP450 aparentam ser a via que, em conjunto com a das LOX, induz apoptose via ATPe/P2X₇ em macrófagos. Contudo, ao contrário do que foi observado com o BEL, onde apenas observamos a inibição da apoptose, o MS-PPOH inibiu tanto a apoptose quanto a liberação de LDH. Se o MS-PPOH atua em um ponto abaixo da iPLA2, e a inibição com agentes específicos para a iPLA2 só inibem a apoptose, temos aqui uma dicotomia na via, pois parece que algum dos CYP450 pode estar exercendo uma influência na lise celular, talvez de forma independente da ação da iPLA2. Mais estudos na compreensão desta via se fazem necessários para o melhor esclarecimento da real participação dos CYP450 na morte por ATPe/P2X₇.

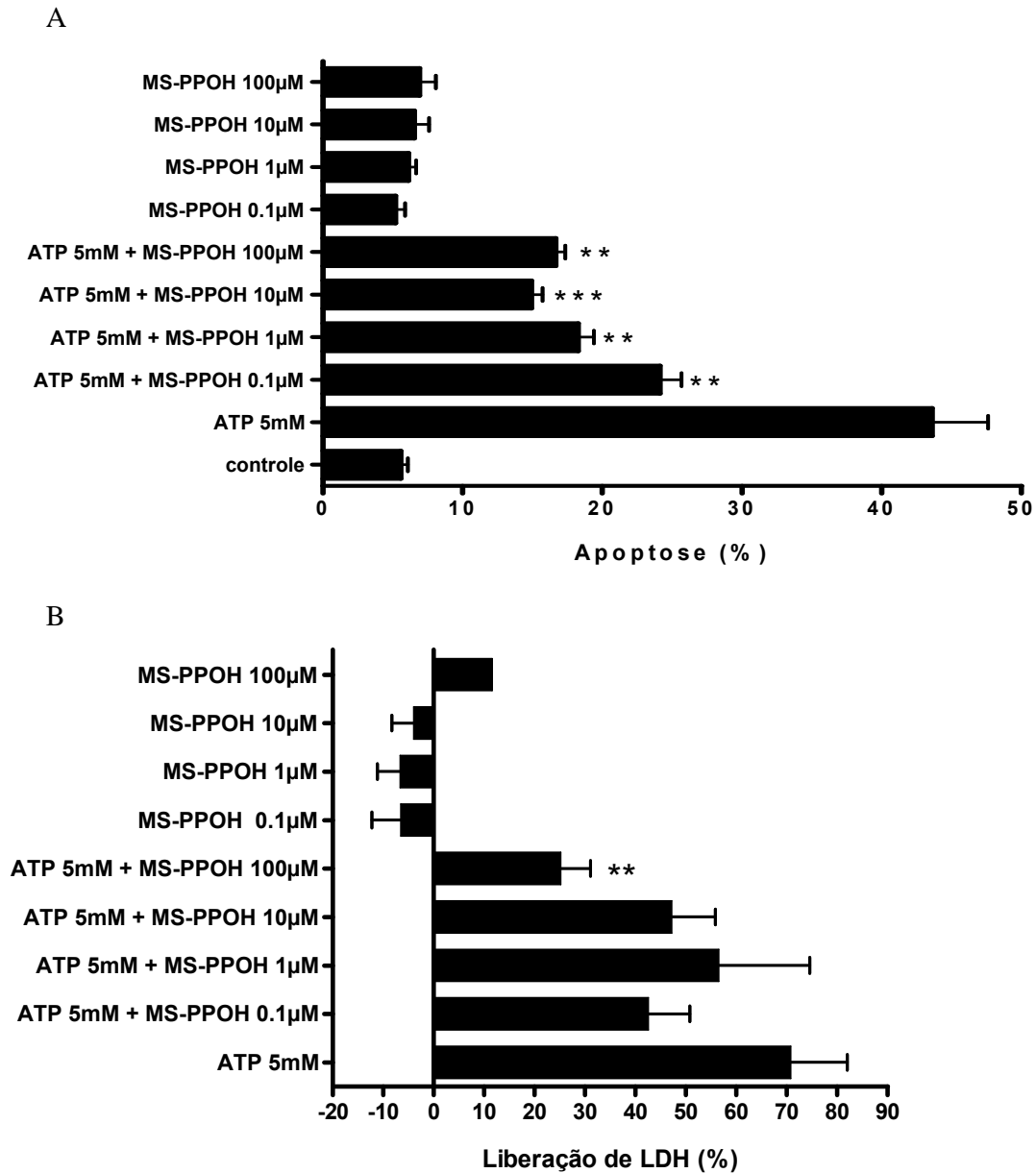


Figura 30: Efeito da inibição do citocromo P450 na morte celular provocada por ATPe/P2X₇. Macrófagos aderidos foram pré-incubados com concentrações crescentes de MS-PPOH por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de MS-PPOH. No eixo x temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). No eixo y temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado com o controle de 5 mM de ATPe.

Até o presente momento observamos que ao menos duas vias subsequentes a iPLA2 estão participando da indução de morte por ATPe/P2X₇. O fato da iPLA2 não possuir especificidade para a geração de AA, podendo gerar outros ácidos graxos como ácido linoléico e o oléico que também possuem atividade biológica e podem ser metabolizados por LOX e CYP450, cria uma lacuna importante para compreensão da via de sinalização aqui estudada.

Este pensamento nos levou a um questionamento simples, será que o ATPe induziria a apoptose com características farmacológicas semelhantes às de apoptose induzida por AA? Para elucidar esta questão, realizamos um último experimento ainda nesta linha, onde procuramos avaliar comparativamente as mortes induzidas por ATPe e AA, utilizando alguns agentes farmacológicos já testados. Os inibidores escolhidos foram: a) BEL, que por ser um inibidor da própria iPLA2 não deve atuar inibindo a morte do metabólito abaixo de seu ponto de ação, mas inibe a apoptose por ATPe; b) CSA, pois dados da literatura descrevem o AA como um agente capaz de promover a perda do potencial elétrico da mitocôndria e a abertura do PTP (*Forte e Bernardi 2005*), inibindo a morte causada por este, bem como a causada por ATPe/P2X₇ mostrada na presente tese; c) NDGA e d) MS-PPOH, ambos deveriam inibir a morte por AA pois atuariam prevenindo a conversão deste em outro possível metabólito, como sugerem nossos dados até então.

Na Figura 31, mostramos que em acordo com nossos dados anteriores, todos os inibidores utilizados foram capazes de inibir a apoptose induzida por ATPe/P2X₇, mas nenhum deles foi capaz de inibir a apoptose induzida por AA (Fig. 31). Este dado é um indicativo que a apoptose gerada pelo ATPe/P2X₇ difere da gerada pelo AA, não sendo um simples aumento nos níveis de AA o efeito promovido pelo P2X₇. Em adição, corroborando esta conclusão, mostramos recentemente que tanto a 5-LOX

quanto a 15-LOX, potencialmente envolvidas na utilização do AA, só são expressas no macrófago após a adição de ATPe (Mendes 2006)

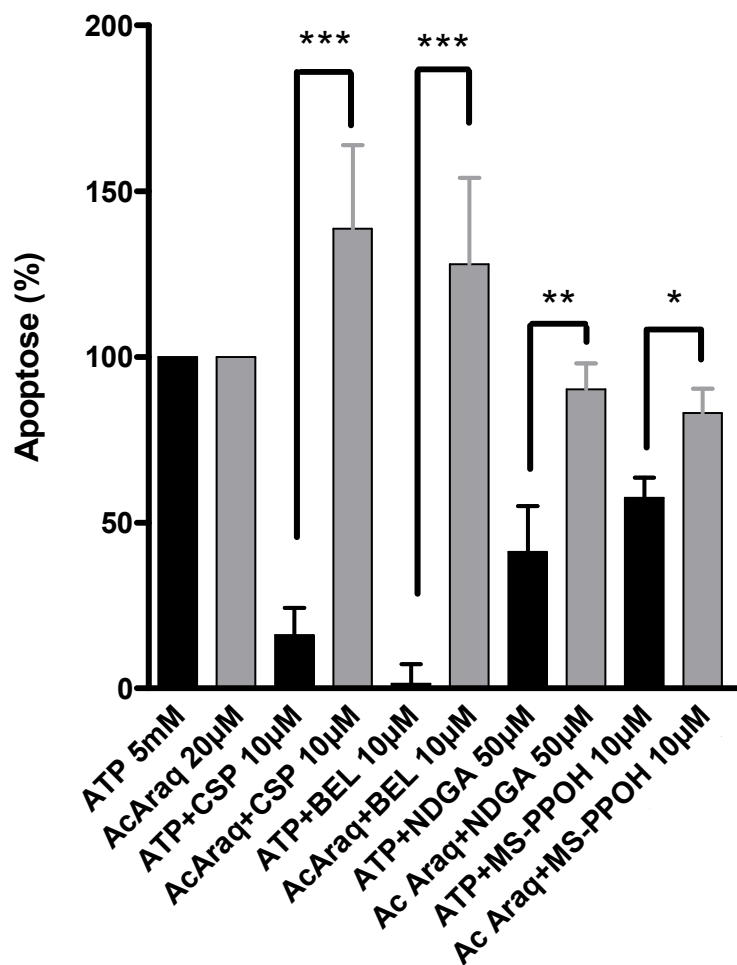


Figura 31: Comparação entre as apoptoses induzidas por ATPe e AA. Macrófagos aderidos foram estimulados com 5mM de ATPe (barras pretas) ou 20 µM de AA (barras cinzas) na presença ou ausência de 10 µM de CSA ou BEL ou MS-PPOH ou 50 µM de NDGA. No eixo y representamos os diversos tratamentos efetuados nas células, enquanto no eixo x temos os valores percentuais normalizados da apoptose. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. * p < 0,05 **; p < 0,01 e *** p < 0,001 comparados como indicado na figura.

D.6 – Participação da p38 na lise celular por ATPe/P2X₇

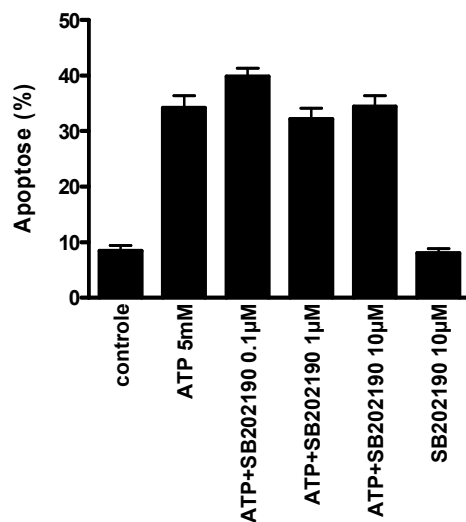
Os dados anteriores nos levaram a indagar a possibilidade de que outras vias também independentes de Ca²⁺ poderiam ser importantes na apoptose induzida por ATPe/P2X₇. Hide e colaboradores demonstraram em 2000 que microglia em resposta a 1 mM de ATPe liberava TNF (Hide et al 2000), e este levava à lise celular vista em casos de doença neurodegenerativa. Esta liberação de TNF por sua vez era mediada pela ativação da cinase p38 de forma independente do influxo de Ca²⁺, mas envolvido com o receptor P2X₇ (Hide et al 2000). Em 2003, Parvathenani e colaboradores demonstraram que o BzATP mediava o aumento da produção de superóxido em microglia, de forma dependente de p38, acarretando em lesões no modelo da doença de Alzheimer's (Parvathenani et al 2003a). A p38, induzida por ATPe, em conjunto com ROCK1 também foi associada à formação de bolhas de membranas em macrófagos RAW 264.1 via receptor P2X₇ (Pfeiffer et al 2004).

Em conjunto com estes dados da literatura, nosso laboratório mostrou na dissertação de mestrado de Cristiane Monteiro da Cruz (Monteiro-da-Cruz 2003), através do uso de inibidores específicos para tirosinas cinases (genisteína e tirfostina) e para a própria ERK (PD98059), que estas proteínas cinases não estariam envolvidas na apoptose e na liberação de LDH promovidos por ATPe/P2X₇ (Monteiro-da-Cruz 2003). Contudo, a participação da p38 não foi investigada.

Aqui, procuramos investigar a participação da p38 na morte celular promovida por ATPe/P2X₇ pela utilização dos inibidores farmacológicos SB202190 e SB203580. Nas Figuras 32A e 32B mostramos que não encontramos efeito do SB202190 nem na apoptose, nem na liberação de LDH. Por outro lado embora, o SB203580 também não tenha alterado os níveis de indução de apoptose (Fig. 33A), inibiu a liberação de LDH em até 50% (Fig. 33B). Este fármaco foi o único de todos os testados, capaz de inibir

seletivamente a lise celular, não afetando a apoptose de nossos macrófagos. A inibição da necrose pelo SB203580 sugere que a p38 possa ter um papel regulatório na lise celular e não na apoptose, dividindo o sinal indutor de morte celular gerado por ATPe/P2X₇ entre uma iPLA₂, indutora de apoptose, e a p38.

A



B

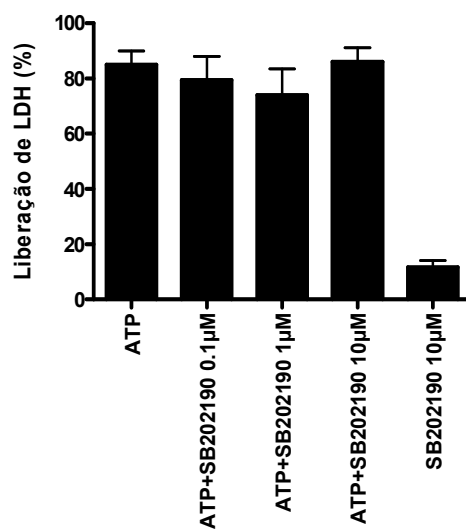


Figura 32: SB202190 não afeta a morte celular promovida por ATPe/P2X₇. Macrófagos aderidos foram pré-incubados com concentrações crescentes de SB202190 por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de SB202190. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). No eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.

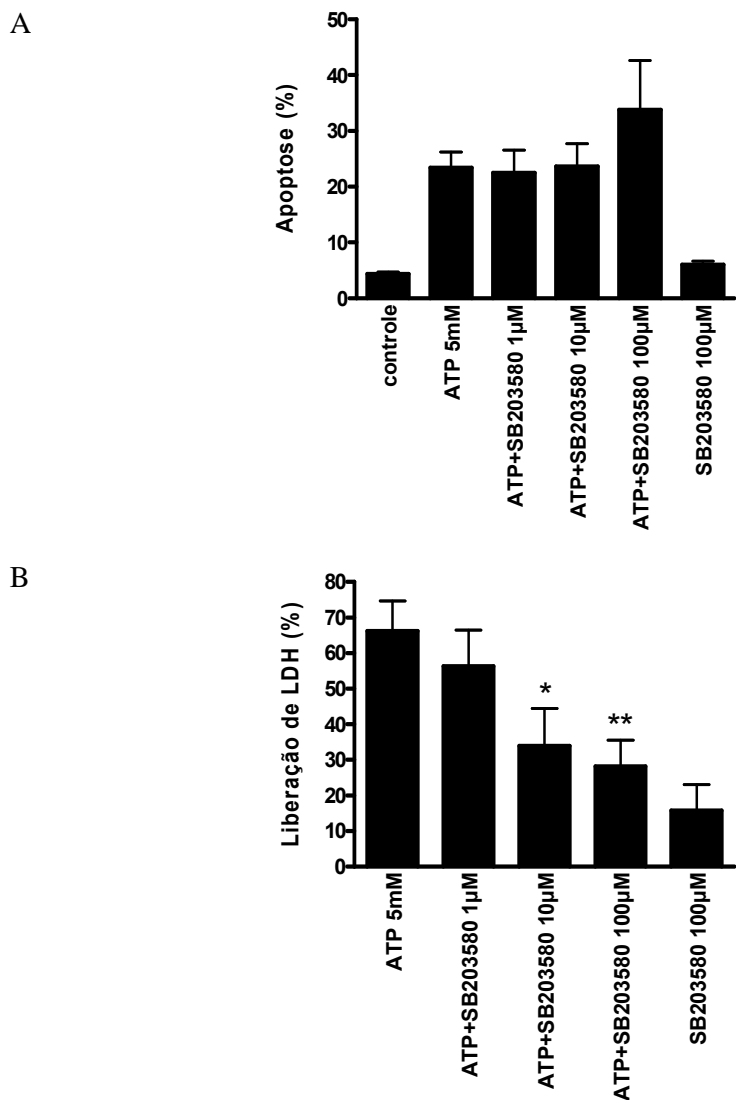


Figura 33: SB203580 não afeta a apoptose promovida por ATPe/P2X₇, mas inibe a liberação de LDH. Macrófagos aderidos foram pré-incubados com concentrações crescentes de SB203580 por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de SB203580. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). No eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.. * p < 0,05 e ** p < 0,01 comparados com o controle de 5 mM de ATPe.

D.7 – Morte Celular Induzida por ATPe/P2X₇ é Dependente de Proteína Cinase

C :

Conforme demonstrado no tópico acima e na dissertação de mestrado de Cristiane Monteiro da Cruz (*Monteiro-da-Cruz 2003*), as tirosinas cinases, as cinases ERK e p38 não participam da apoptose evocada por ATPe/P2X₇, mas a p38 está envolvida na indução de lise celular. Estes resultados não descartam a possibilidade de que outros tipos de cinases estejam envolvidos na via de sinalização iniciada por ATPe/P2X₇.

Alguns trabalhos relacionam receptores P2 com cinases do tipo PKC tanto dependentes, quanto independentes de Ca²⁺. Em células RBA-2 o receptor P2X₇ é capaz de promover a ativação de PKC Ca²⁺-dependente (*Hung et al 2005*); A PKC é capaz de ativar PLD em células RBA-2 e em células da glândula submandibular de ratos (*Sun et al 1999*; *Pochet et al 2003b*); e promove a liberação de IL-6 em células microglias (*Shigemoto-Mogami et al 2001*).

Visando investigar o possível envolvimento de PKC na morte celular induzida por ATPe/P2X₇ em macrófagos, estudamos inicialmente o efeito do cloreto de queleritrina, que possui um espectro amplo de ação, inibindo a maioria das isoenzimas de PKC. A avaliação da morte celular foi feita por fragmentação nuclear, *tunnel* e por liberação de LDH. Na Figura 34, observamos que o Quel 10 µM inibiu significativamente a apoptose medida pela análise da fragmentação nuclear (Fig. 34A) e por *tunnel* (Fig. 34B). No entanto, na liberação de LDH (Fig. 34C) esta dose de Quel induziu sozinha a liberação de LDH, o que compromete a interpretação destes resultados, pois inibição da apoptose por Quel poderia refletir simplesmente em uma menor oferta de células para a morte por apoptose, uma vez que estas estariam sofrendo uma lise celular provocada pelo Quel.

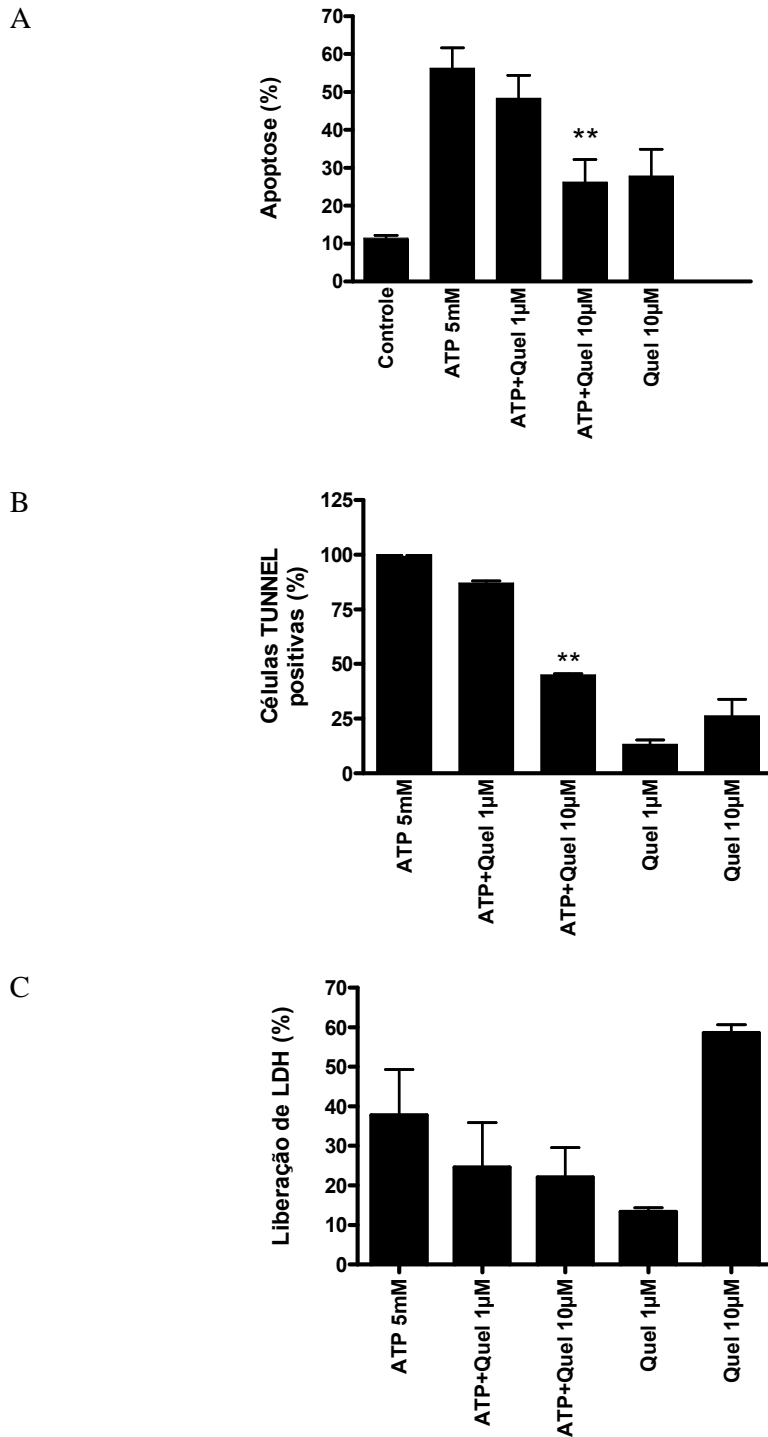


Figura 34: Inibidor genérico para PKCs inibe a apoptose, mas não a liberação de LDH provocada por ATPe/P2X₇. Macrófagos em suspensão foram pré-incubados com concentrações crescentes de cloreto de queleritrina por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de cloreto de queleritrina. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A), células *tunnel*

positivas (B) e da liberação de LDH (C). No eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados. ** $p < 0,01$ comparado com os controles de 5 mM de ATP.

Na continuação de nossos estudos realizamos uma varredura, em camundongos, das isoenzimas de PKC α , β , γ , δ , ϵ , ζ e η , existentes nestes. Na Figura 35, observamos que macrófagos intraperitoneais murinos elicitados com tioglicolato e cultivados por 96 horas, apresentam principalmente as isoenzimas α e β (cPKC) e δ (nPKC). As PKC α e β são membros da família das cPKC dependentes de Ca^{2+} . A PKC δ é membro das nPKC independente de Ca^{2+} . Ambas podem ser ativadas por lipídeos. A PKC δ , devido a sua independência de Ca^{2+} , foi considerado por nós como uma boa candidata a participar da morte induzida por ATPe/P2X₇.

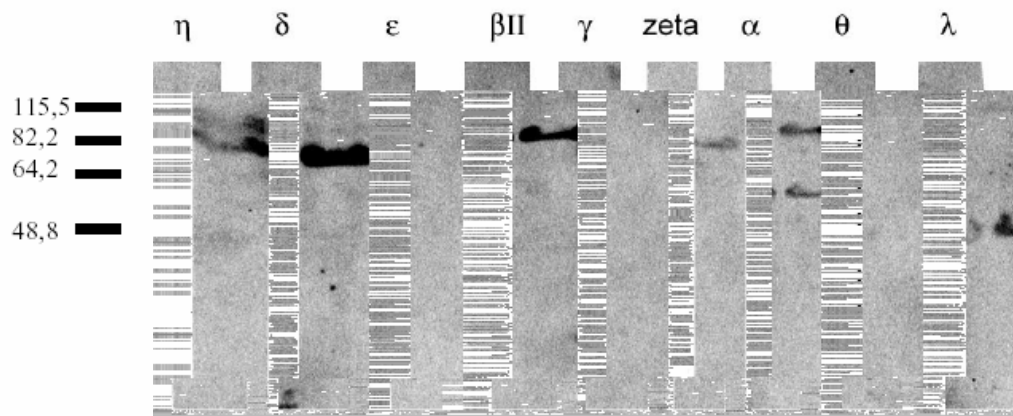


Figura 35: Expressão das isoenzimas de PKC em macrófagos aderidos. Macrófagos provenientes do lavado intraperitoneal de camundongos *Swiss-Webster* foram cultivado por 96 horas na densidade de 6×10^6 células por placa de 35 mm de diâmetro, foram lisados e a quantidade de proteína avaliada. Sendo aplicados 40 μ g em cada poço e realizado eletroforese SDS-PAGE, seguido de *western blotting* para as isoenzimas de PKC η , δ , ϵ , β II, γ , zeta, α , θ e λ , todas reveladas com anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado a peroxidase e kit de revelação ECL-plus em escaner de fluorescência. Dado representativo de 3 experimentos independentes.

Sabemos que, quando ativadas as PKC são reconhecida por RACK específicas, migrando ou translocando do citosol para as membranas. Valendo-nos dessa característica, realizamos os experimentos de fracionamento celular e *western blotting* para as PKC α e PKC β , acompanhando a ativação destas.

Na Figura 36, observamos que a PKC β encontra-se inicialmente tanto nas frações membranares (pellet) quanto no citosol (sobrenadante). Transferindo-se parcialmente para o citosol após 20 minutos de tratamento com ATPe. Por outro lado, a PKC α não se encontra normalmente em membranas (Fig. 37), mas é translocada para as frações membranares durante o tratamento com ATPe. O receptor P2X₇ foi utilizado em ambos os experimentos como controle do fracionamento celular e do carregamento dos géis de SDS-PAGE.

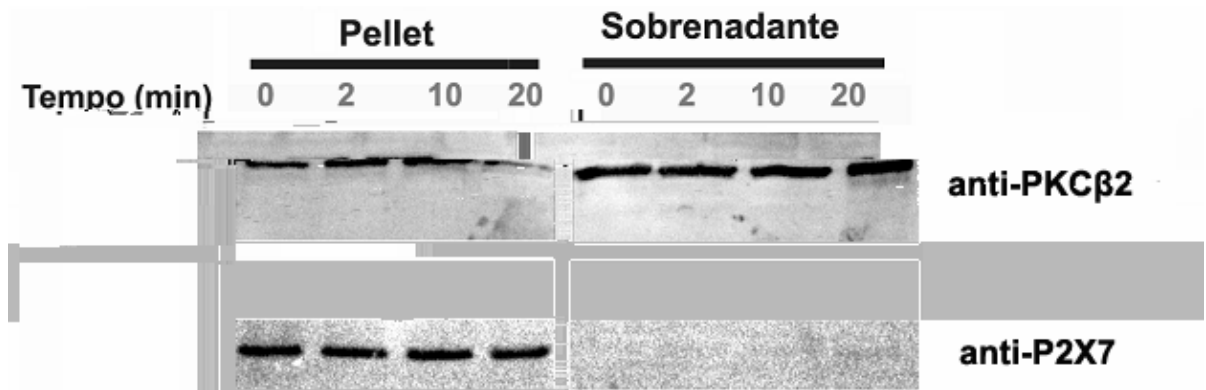


Figura 36: Translocação da PKC β 2 por ATPe. Macrófagos aderidos na concentração de 6×10^6 células por placa de 35 mm foram tratados com 5 mM de ATPe por 2, 10 ou 20 minutos, em seguida realizado os procedimentos descritos para o fracionamento celular, aplicando 30 μ g de proteína para separação por eletroforese e subsequente *western blotting* para avaliação da translocação da PKC β 2 do sobrenadante (citossol) para a pellet (fração membranar).

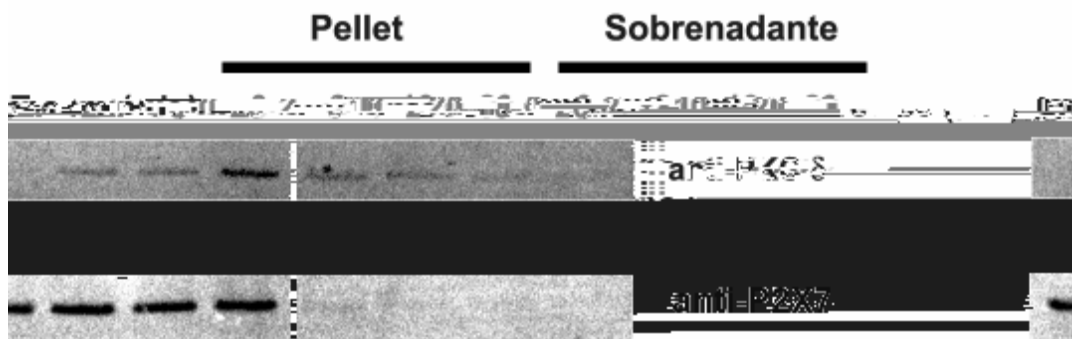
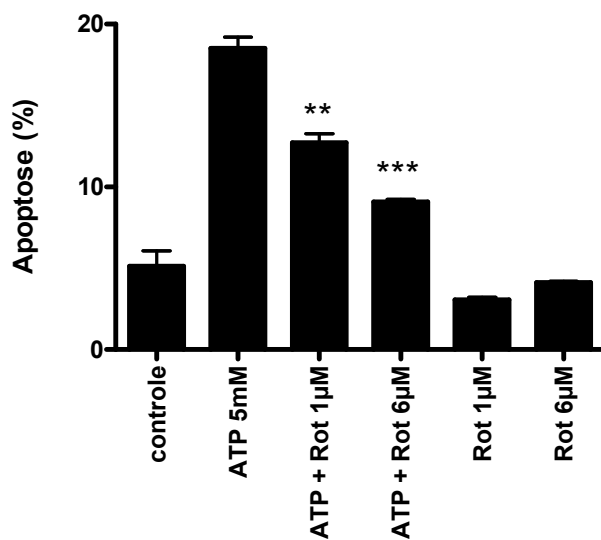


Figura 37: Translocação da PKC α por ATPe. Macrófagos aderidos na concentração de 6×10^6 células por placa de 35 mm foram tratados com 5 mM de ATPe por 2, 10 ou 20 minutos, em seguida realizado os procedimentos descritos para o fracionamento celular, aplicando 30 μ g de proteína para separação por eletroforese e subsequente *western blotting* para avaliação da translocação da PKC α do sobrenadante (citossol) para a pellet (fração membranar).

O experimento acima nos sugere que a PKC β participa da sinalização de morte por ATPe/P2X $_7$, sendo recrutada pelo tratamento com ATPe. Fortalecendo esta possibilidade, observamos que o pré-tratamento de macrófagos com rotlerina (rot), um inibidor seletivo para a PKC β até a concentração de 10 μ M. Em nossos experimentos utilizamos 1 e 6 μ M de rot, onde observamos que a concentração de 1 μ M foi capaz de inibir a apoptose em 35%, já a dose de 6 μ M inibiu 60% da apoptose provocada por ATPe/P2X $_7$ (Fig. 38A), a presença de rot sozinho não mostrou-se citotóxico para os macrófagos. Entretanto, o rot não foi capaz de inibir a liberação de LDH (Fig. 38B). Esta confluência de dados torna a PKC β uma peça importante no mecanismo de apoptose promovida pelo receptor P2X $_7$.

A



B

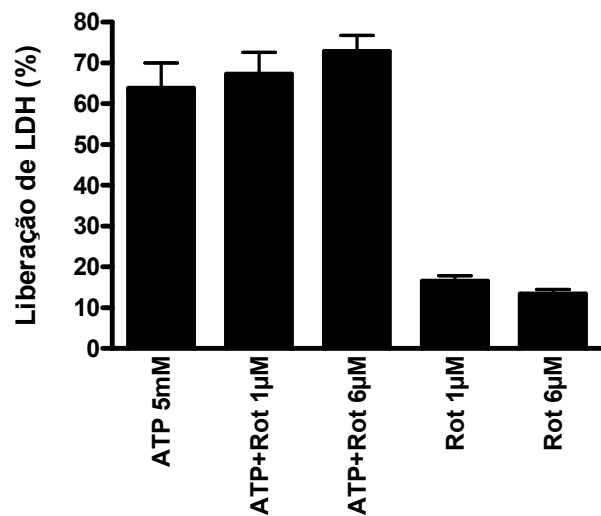
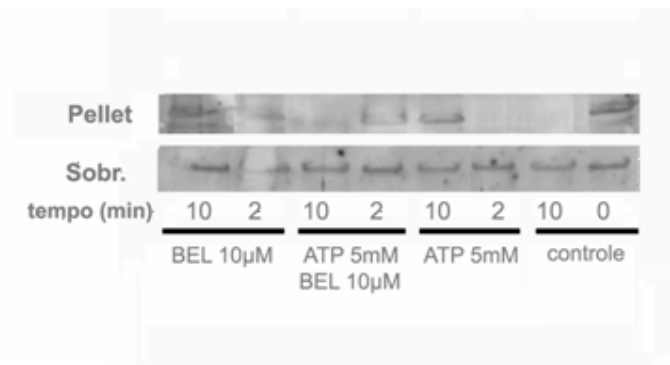


Figura 38: Inibidor específico para PKC bloqueia a apoptose provocada por ATPe/P2X₇. Macrófagos aderidos foram pré-incubados com concentrações crescentes de rotlerina por 20 minutos, seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de rotlerina. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). No eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o controle de 5 mM de ATPe.

Nossos dados até esse ponto indicam a participação de duas enzimas independentes de Ca^{2+} na indução de apoptose por ATPe/P2X₇ em macrófagos. Para melhor entender o papel destas duas enzimas, decidimos estudar o efeito de seus inibidores, BEL e rot, na translocação da PKC. Na Figura 39A, mostramos que o rot foi incapaz de prevenir a translocação da PKC para membrana e na Figura 39B, que o BEL foi capaz de inibir a translocação da PKC induzida por ATPe. Concluímos então que a ativação de iPLA2 por ATPe antecede e é necessária para a translocação/ativação da PKC, que nesta seqüência de eventos é importante para a indução de apoptose.

A



B

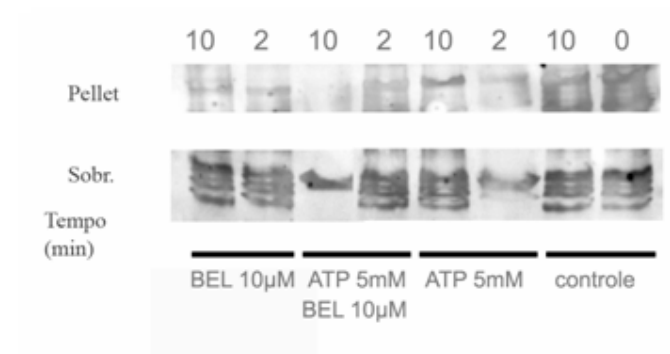


Figura 39: Ação dos inibidores da iPLA2 e PKC na translocação da PKC. Macrófagos aderidos na concentração de 6×10^6 células por placa de 35 mm foram tratados com 6 μM de rotlerina (A) ou 10 μM de BEL (B) e subsequentemente com 5 mM de ATPe por 10 minutos, em seguida realizados os procedimentos descritos para o fracionamento celular, foram aplicados 30 μg de proteína para separação por eletroforese e subsequente *western blotting* para avaliação da translocação da PKC do sobrenadante (citossol) para o pellet (fração membranar). Em A, dado representativo de 3 revelações de *western blotting* independentes da translocação da PKC, onde notamos que a presença da rot não foi capaz de inibir a translocação da PKC por ATPe. Em B, dado representativo de 2 revelações de *western blotting* independentes da translocação da PKC, onde notamos que a presença do BEL foi capaz de inibir a translocação da PKC por ATPe.

D.8 – Ativação de PPAR por ATPe/P2X₇

Além do envolvimento de uma iPLA2 e da PKC , nossos resultados apontam que a via das LOX e possivelmente dos CYP450 estão envolvidos na morte celular por ATPe/P2X₇ em macrófagos. Isso quer dizer que o ATPe promove, em macrófagos, um aumento do metabolismo lipídico, com a geração e conversão metabólica de derivados ainda desconhecidos de ácidos graxos, que poderiam estar atuando em diversas vias de sinalização.

Consideramos então a possibilidade de que os receptores nucleares PPAR pudessem também estar envolvidos. Nossa primeira suspeita nesta direção se deve, como já mencionado anteriormente, ao fato do MK886 possuir ação inibitória no PPAR (Kehrer et al 2001; Li et al 2006). Dos três tipos de PPAR descritos, voltamos nossa atenção apenas àqueles que tem sido descritos como indutores de morte celular: PPAR e PPAR (Clark 2002; Diradourian et al 2005). Na Figura 40, analisamos comparativamente os efeitos do MK886 e do GW9662 na apoptose e na lise celular induzida por ATPe. Ambos os reagentes inibiram a indução de apoptose (Fig. 40A), mas apenas o GW9662 foi capaz de inibir a lise celular (Fig. 40B).

Em seguida, investigamos a possibilidade do ATPe promover a ativação dos PPAR e PPAR , através da translocação destes do citosol da célula para o núcleo, fenômeno característico de sua ativação (Kota et al 2005). Na Figura 41, mostramos que após 10 minutos de tratamento com ATPe apenas o PPAR (Fig. 41A) apresentou indícios de translocação, enquanto que o PPAR não sofreu nenhuma alteração detectável (Fig.41B).

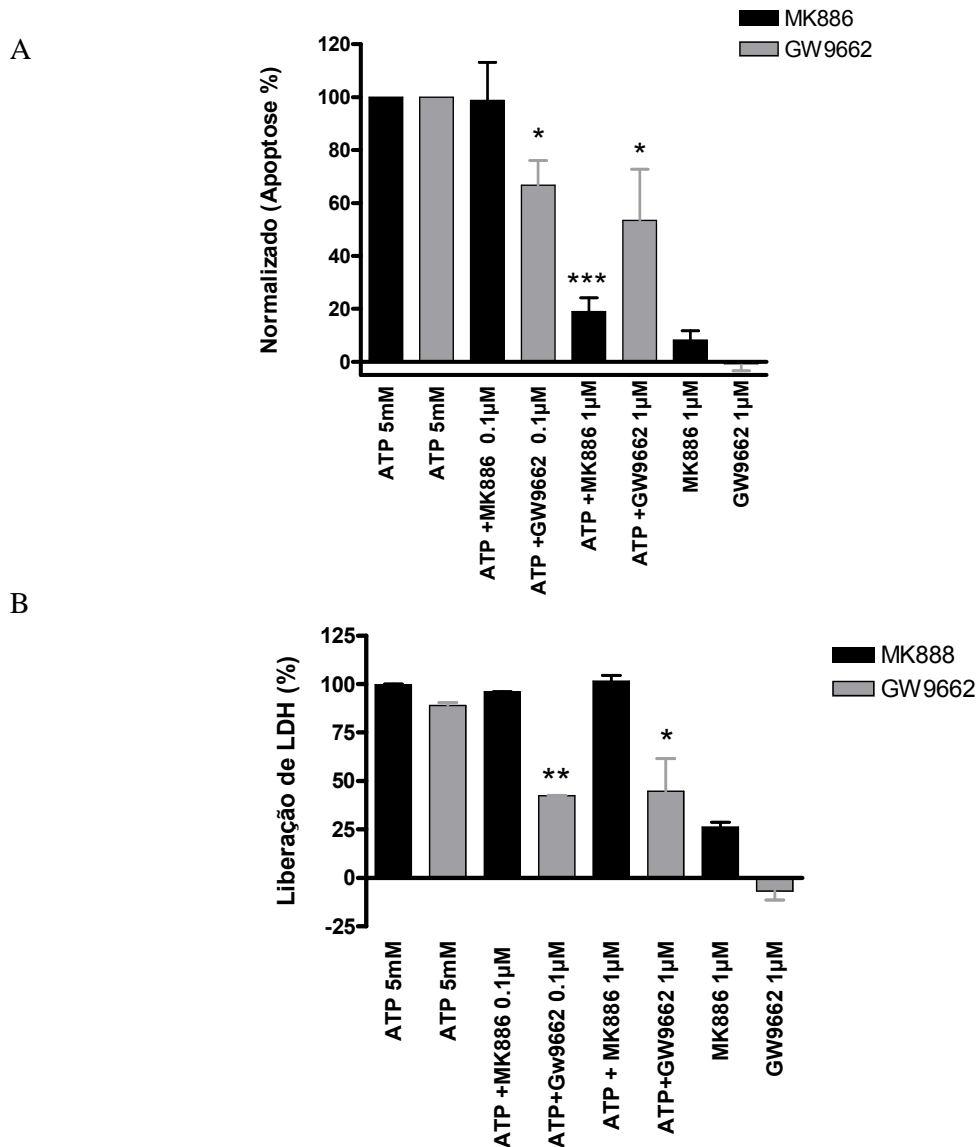
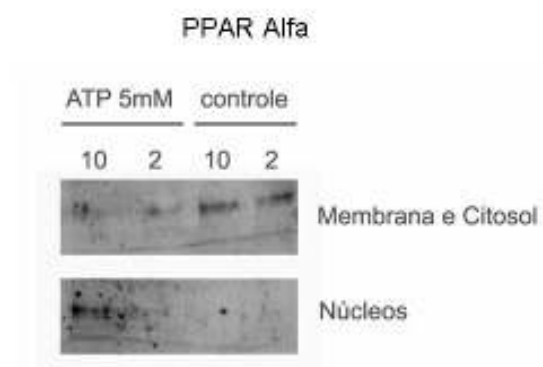


Figura 40: Possível envolvimento dos PPAR α e β na apoptose por ATPe. Macrófagos aderidos foram tratados com 0,1 ou 1 μ M de MK886 (barras pretas) ou GW9662 (barras cinzas), seguido do tratamento com 5 mM de ATPe por 20 minutos e lavagem com a incubação das células por 6 horas na ausência de ATPe e presença de MK886 ou GW9662. No eixo y temos os valores percentuais normalizados da apoptose (A) e da liberação de LDH (B). No eixo x temos a representação de cada tratamento dado as células. Os gráficos constituem a média de 3 experimentos em triplicata isolados.. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados com o controle de 5 mM de ATPe.

A



B

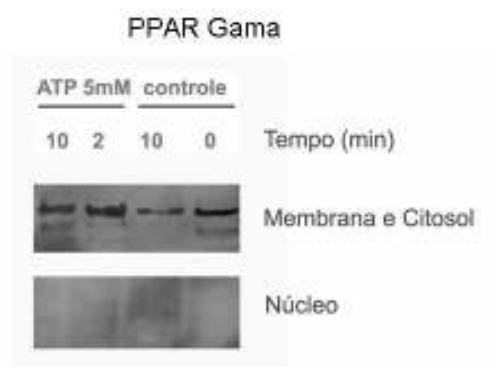


Figura 41: Indução da translocação nuclear dos PPAR α e PPAR γ por ATPe. Macrófagos aderidos na concentração de 6×10^6 células por placa de 35 mm de diâmetro foram tratados com 5 mM de ATPe por 2 ou 10 minutos, em seguida realizados os procedimentos descritos para o fracionamento celular, eletroforese e subsequente *western blotting* para avaliação da translocação dos PPAR α (A) e PPAR γ (B). Dado representativo de 3 revelações de *western blotting* independentes com 30 μ g de proteína.

E – Discussão

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.
O Trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada.”

Albert Einstein

O ATPe é capaz de ligar e ativar vários receptores P2 de membrana. Entre estes está o receptor P2X₇ associado à indução de um poro de permeabilização e à morte celular, dentre outros fenômenos. O receptor P2X₇ forma um homotrímero da proteína P2X₇, formando um canal seletivo para cátions em baixas concentrações de ATPe e em altas concentrações abre um poro na membrana permeável a moléculas de até 900 Da. Recentemente o receptor P2X₇ tem sido apontado como um receptor capaz de interagir com uma grande gama de proteínas, ativando um grande número de vias de sinalização, acarretando várias respostas celulares diferentes. Na presente tese investigamos algumas das vias ativadas por P2X₇ envolvidas na indução de morte celular, principalmente a apoptose por ATPe. Mostramos evidências de que esta apoptose é dependente de uma iPLA2 e de PKC e possui um componente dependente de PPAR.

A apoptose promovida pelo ATPe/P2X₇ já foi caracterizada por diversos autores (*Di Virgilio et al 1996; Chow et al 1997; Di Virgilio 2000; Adinolfi et al 2005*) e em nosso laboratório onde foi observada a condensação de cromatina por microscopia, a fragmentação do DNA tanto por avaliação de núcleos hipodiplóides por citometria de fluxo quanto pelo padrão de 200 kb visualizado em gel de agarose, alterações morfológicas pela observação em microscopia eletrônica e a externalização de PS (*Bisaggio 2001; Mendes 2006*). Por esse motivo, neste trabalho nos limitamos à avaliação da fragmentação de nuclear por citometria de fluxo indicadora de

apoptose, em paralelo com a avaliação da liberação de LDH, indicadora da lise celular ou necrose.

O que seria mais provável em um receptor capaz de induzir a abertura de um poro de 900 Da, ao exemplo de outros sistemas formadores de poros celulares como C9 do complemento e a perforina em linfócitos citotóxicos, é uma morte por lise colóide-osmótica com características necróticas. Entretanto, a abertura do poro do P2X₇ é um evento reversível nas condições utilizadas nesta tese, uma vez que após 15 minutos a lavagem do ATPe não se observa a captação de corante (dados de nosso laboratório). Se a morte promovida pelo ATPe/P2X₇ não é meramente uma lise celular, alguma via de sinalização deve ser ativada para dar início ao processo de morte celular. Quem inicia essa via logo após o engajamento do ATPe com o P2X₇, constitui um mistério, embora tenha sido muito estudado e, embora se saiba que a morte celular requeira a participação do receptor P2X₇, não se descarta a possibilidade do envolvimento de outro P2 como co-adjuvante no processo.

O ATPe, por intermédio do receptor P2X₇, é capaz de ativar tanto as caspases inicializadoras quanto as efetoras, além de ativar também a caspase 1 relacionada com a maturação de IL-1 e IL18. Essa ativação tem sido relacionada com a capacidade do P2X₇ aumentar a concentração de Ca²⁺ intracelular, levando a dano mitocondrial e a conseqüente liberação de citocromo C, formando o apoptossoma e ativando a caspase 9. Ao mesmo tempo que a caspase 9 ativaria a caspase 3, foi postulado que o próprio receptor P2X₇ pode possuir um domínio de morte (DD - *death domain*), semelhante ao existente nos receptores de morte, levando a ativação da caspase 8 e à ativação da caspase 3 (*Erb et al 2006a*). A ativação da caspase 3 por ATPe por sua vez acarreta na clivagem de PARP e de proteínas estruturais do núcleo. O P2X₇ também é capaz de promover alterações morfológicas profundas nas células ativadas por ATPe.

Conforme demonstrado por microscopia eletrônica de varredura na dissertação de mestrado de Anderson Nogueira Mendes (*Mendes 2006*), células tratadas com 5 mM de ATP apresentam a retração de seus pseudópodos, assumindo uma morfologia mais arredondada com bolhas na sua superfície. A formação de bolhas está associada a ativação de ROCK1 e p38 por ATPe/P2X₇ (*Verhoef et al 2003b*).

A contribuição desta tese para o entendimento das ações do ATPe/P2X₇ não se deve à caracterização da apoptose ou necrose causadas, mas sim pelo estudo e identificação das vias de sinalização possivelmente envolvidas no processo. Mesmo assim, um dos pontos relevantes em nosso trabalho é a confirmação da associação da morte celular com o P2X₇, pois o ATPe ativa os receptores P2 indiscriminadamente, mas a morte celular requer a presença do P2X₇. Para tanto de forma similar a outros autores (*Brough et al 2002; Le Feuvre et al 2003b*), observamos que em macrófagos derivados de animais P2X₇^{-/-} não ocorre apoptose nem a liberação de LDH.

Uma das primeiras hipóteses levantadas para o mecanismo de morte celular induzida por ATPe/P2X₇ foi baseada em uma possível auto-regulação de moléculas efetoras de morte, principalmente do TNF , através de uma ação parácrina ou autócrina. O primeiro a estudar a essa questão foi Di Virgilio, que em 1992 descreveu que o ATP era capaz de causar morte em células tanto sensíveis, quanto insensíveis a ação do TNF (*Pizzo et al 1992*). Dados de nosso laboratório estão de acordo com estes uma vez que animais deficientes no receptor TNFR1 e a utilização de receptores solúveis não bloquearam a morte celular (dados do laboratório, não publicados).

Seguindo outra linha de raciocínio, é natural pensarmos, que a abertura do poro associado por P2X₇ induza morte celular dependente do forte influxo de Ca²⁺ observado em nossa condição experimental (*Monteiro-da-Cruz et al 2006*). De fato, o aumento descontrolado das concentrações de Ca²⁺ tem sido considerado um forte

indutor de morte celular em outras células (*Orrenius et al 2003a*). No entanto, nenhum destes estudos foi feito em macrófagos.

Como ausência total e completa de Ca^{2+} no meio de cultura por longos períodos é capaz de causar a morte celular em macrófagos, como observado por outros em nosso laboratório, optamos por um protocolo experimental menos agressivo. Nosso protocolo base é dividido em duas fases distintas; uma inicial onde tratamos nossas células com o ATPe por 20 minutos, sendo esta chamada de fase indutora de ação do ATPe; seguida de uma fase efetora de até 6 horas onde sem a presença do ATPe a célula sofre as consequências da exposição anterior a altas concentrações deste nucleotídeo. Assim optamos por investigar os efeitos da ausência do Ca^{2+} apenas na fase indutora, o que nos permitiu avaliar a relevância do mesmo como segundo mensageiro inicial em um período após a ativação do receptor

Surpreendentemente, apesar do uso simultâneo de EGTA, no meio extracelular, e BAPTA, no meio intracelular, uma condição que elimina qualquer variação de Ca^{2+} ativado por ATPe em macrófagos (*Monteiro-da-Cruz et al 2006*), mostramos que ao menos na fase indutora, este íon não participa da sinalização pró-apoptótica. Mesmo não havendo a participação do Ca^{2+} nos momentos iniciais da sinalização não podemos descartar a participação de Ca^{2+} na fase efetora, já que após o período de estimulação com ATPe o meio era trocado por um contendo Ca^{2+} . Uma evidência disto é o resultado onde mostramos que a CSA foi capaz de inibir a apoptose por ATPe, mas não a liberação de LDH. A literatura descreve a CSA como sendo responsável por inibir eventos Ca^{2+} -dependentes, sendo a sua ação mitocondrial, como a inibição da abertura do PTP, a mais estudada. Em nosso caso, se a CSA inibe a apoptose a nível da mitocôndria, por que não inibiu a lise celular

também? Uma possibilidade é que, embora inibindo as vias mitocondriais, a CSA não inibiria outras vias diretamente ativadas pelo P2X₇.

Sabemos que a CSA possui outros sítios de ação além da mitocôndria, podendo inibir a calcineurina (*Macian 2005*) e que a calcineurina, via RE, é capaz de ativar BAD, que promove a liberação do citocromo C da mitocôndria. Com isso, poderíamos supor que a CSA em nosso sistema atuaria a nível do RE? No momento não temos resposta a essa questão, sendo esta uma questão para estudos futuros.

No estudo de possíveis vias de sinalização envolvidas na morte celular por ATPe/P2X₇, passamos a investigar o possível papel das PLA2. Em 1998, Alzola e colaboradores descreveram que o P2X₇ era capaz de ativar uma iPLA2 e que a secreção de calicreína em células da glândula submandibular de ratos dependia desta enzima (*Alzola et al 1998b*). Em seguida, Chaib demonstrou que a inibição da iPLA2 com BEL aumentava a permeabilização dependente de P2X₇ em células acinares de glândula submandibular de ratos (*Chaib et al 2000*). A existência de uma PLA2 Ca²⁺-independente modulando ou sendo modulada por P2X₇, nos chamou a atenção, uma vez que ao mesmo tempo em que trabalhávamos na questão da sinalização do P2X₇, nos encontrávamos envolvidos o estudo de mecanismos PLA2 dependentes de indução de morte por células CD8 citotóxicas murinas focando em um outro grupo de PLA2, as sPLA2. Resolvemos então estudar o envolvimento das PLA2 na sinalização de morte celular por ATPe/P2X₇ em macrófagos.

A mepacrina, um inibidor genérico das PLA2, que atua no nível do substrato, mascarando-o para a enzima (*Capper e Marshall 2001*) constituiu o primeiro passo neste estudo. Ela foi efetiva em inibir a apoptose induzida por ATPe/P2X₇ de forma significativa, mas não foi capaz de inibir a liberação de LDH. Ao invés disso, promoveu um aumento na liberação de LDH, condizente com a possibilidade de

inibição em um ponto da cascata de sinalização abaixo do ponto de comprometimento com a morte celular. A mepacrina apresenta um problema inerente ao seu uso em sistemas que envolvam a sinalização por ATP, pois ela é capaz de interagir com o mesmo, tendo sido utilizada como um traçador de grânulos contendo ATP (*Bodin e Burnstock 2001*). Isso permite questionar se a ação da mepacrina foi via inibição de PLA2 ou via interação com o ATP, mas como observamos ações distintas na apoptose e no LDH, esta última possibilidade não parece ser correta.

Em seguida, testamos um inibidor seletivo para as sPLA2, o pBPB, que age a nível de histidina reativas, encontradas apenas neste grupo. O pBPB não apresentou efeito algum na morte celular induzida por ATPe/P2X₇, descartando as sPLA2 do processo. Resultado semelhante foi encontrado com o análogo do ácido araquidônico, o AACOO CF₃, capaz de inibir as cPLA2.

Por fim utilizamos dois inibidores diferentes para as iPLA2, sendo o primeiro outro análogo do ácido araquidônico, o PACOCF₃, seletivo em baixas concentrações para a iPLA2, e o BEL atua no sítio catalítico das iPLA2 e não nas demais famílias de PLA2. Ambas foram capazes de inibir a apoptose e aumentar a liberação de LDH, como ocorrido com a mepacrina. O BEL, de todos os inibidores aqui utilizados, tem sido relatado como o mais seguro e específico para as iPLA2, não tendo sido descrita reação cruzada com as demais PLA2. O único problema potencial que encontramos na literatura foi o relato de que o BEL inibe a MgDDP. No entanto, como a apoptose não é sensível a propranolol, que tem sido descrito como um inibidor da MgDDP (*Fuentes et al 2003*), esta possibilidade parece remota.

Nossos dados são os primeiros a relacionar iPLA2 e morte celular por ATPe/P2X₇. A participação de iPLA2 em processos apoptóticos já era conhecida desde a proposta de Atsumi em 2000, que demonstrou que a caspase 3 a cliva e a

ativa, permitindo que ela gere uma desorganização assimétrica da membrana plasmática e aumento os níveis de ceramida (*Atsumi et al 2000*); ao mesmo tempo que também levaria à clivagem da cPLA2, inativando-a. Mais tarde a iPLA2 foi associada com o evento de encolhimento nuclear, não necessariamente com a condensação da cromatina (*Shinzawa e Tsujimoto 2003*) e com o metabolismo de lipídeos na membrana externa da mitocôndria (*Gadd et al 2006*).

Recentemente alguns autores têm discutido como uma iPLA2 poderia ser ativada em sistemas celulares. Duas vias principais são apontadas como candidatas: uma pela ação de Ca^{2+} /calmodulina e a fosforilação sítio específica da iPLA2 (*Akiba e Sato 2004*), e a outra por ação de uma nPKC (*Akiba e Sato 2004*).

O envolvimento de Ca^{2+} /calmodulina parece controverso se aplicado ao modelo apresentado nesta tese, pois como vimos, a ausência de Ca^{2+} nos momentos iniciais da sinalização não afetou a morte celular. Quanto à questão da nPKC ativando a iPLA2, o que se supõe é uma participação da PKC, como descrito em cardiomiócitos (*Steer et al 2002*). Entretanto, não detectamos a PKC em macrófagos. Ao contrário, em nosso sistema observamos que a translocação da PKC, uma das nPKC, é dependente de iPLA2. Um ponto de dúvida importante em nosso modelo é saber como esta iPLA2 é ativada por ATPe.

Apesar de iPLA2 não possuir especificidade para AA, este ácido graxo foi capaz de causar tanto apoptose quanto aumentar a liberação de LDH em macrófagos, e que o LPC, um possível metabólito gerado em conjunto com a AA, apenas causou o aumento da liberação de LDH. Morte celular causada por AA já havia sido descrita por outros autores (*Koller et al 1997*). A necrose induzida por LPC também não constitui um dado inovador (*Masamune et al 2001*). No entanto, nossos dados indicam que a morte celular induzida por AA utiliza vias distintas da induzida por

ATP_e/P2X₇, o que nos leva à possibilidade de que este receptor utilize outros ácidos graxos. De fato, a literatura indica que outros ácidos graxos são capazes de induzir morte celular em diversos tipos de células, como: conjugados do ácido linoléico que aumentam os níveis de BAK em células oncogênicas (*Miglietta et al 2006*); a metabolização do ácido linoléico por CYP450 acarret

participação da via das LOX é certa, pois utilizamos quatro inibidores de ações distintas; o NDGA, que além da ação anti-oxidante atua na inibição das 5-, 12- e 15-LOX; o zileuton que atua no seqüestro de Fe, que participa como co-fator da 5-LOX; o AA-861, que inibe o sitio catalítico da 5-LOX; e por último o MK-886, que possui duas funções distintas bem características, a primeira de inibir a FLAP, que é a enzima coadjuvante com a 5-LOX no metabolismo de AA e a segunda a inibição do PPAR (esta será abordada mais à frente na discussão).

No entanto, os experimentos com animais 5-LOX^{-/-} demonstraram que ao menos esta enzima não é absoluta, uma vez que morte celular observada nestes animais foi semelhante à observada nos selvagens. A ausência da 5-LOX trás à tona a possível participação das outras LOX na sinalização, pois é certo que sem ela o AA não é metabolizado a LTA₄, mas as 12- e 15-LOX continuam ativas e podendo metabolizar o próprio AA a lipoxinas ou o ácido linoléico a derivados de HODE (Zeldin 2001; Li et al 2004).

Durante o decorrer de nosso trabalho, imaginamos que o produto gerado pelas LOX seria o LT ou os cis-LT. Há relatos na literatura indicando que o P2X₇ pode ativar a via das LOX levando à síntese dos cis-LT e à resposta para seus receptores em quadros inflamatórios, mas não como indutores de morte celular (Capra et al 2005; Ballerini et al 2005). O papel de indutor de morte em geral sempre foi atribuído às prostaglandinas (Kunkel et al 1988; Linnemeyer e Pollack 1993). Nossos resultados indicam que o inverso estaria acontecendo para a morte ativada por ATPe/P2X₇, sendo a LOX e não a COX importante na morte celular. No entanto, o envolvimento de LOX independe da participação de receptores para LT.

Não podemos precisar a participação das 12- ou 15-LOX na indução de apoptose. No entanto, dados de nosso laboratório indicam que o ATPe é capaz de induzir a expressão tanto de 5-LOX quanto de 15-LOX (*Mendes 2006*).

Existe outra via que utiliza-se de ácido graxos que deve ser considerada além da LOX, a via de síntese de EET mediada por CYP450. Nossos dados mostram que um inibidor da epoxihidrolase de CYP450 promoveu tanto a inibição da apoptose quanto a liberação de LDH. A concomitância destas duas vias torna o processo de sinalização por ATPe/P2X₇ mais complexo, pois a iPLA2 estaria gerando ácidos graxos que seriam metabolizados pelas LOX e pelas CYP450, que ao menos parecem estar participando da morte celular com a geração de EET. Esta molécula tem sido considerada um importante agente pró-inflamatório e mediador de morte celular em cardiomiócitos (*Gross et al 2005*), bem como importante modulador de iPLA2 e PPAR (*Martinez e Moreno 2005; Gelman et al 2005*), o que indica a necessidade de estudarmos melhor o papel de CYP450 no futuro.

Nossos dados são os primeiros que sugerem o envolvimento de iPLA2, LOX e CYP450 na morte celular induzida por ATPe/P2X₇.

Dando continuidade à investigação das vias de transdução de sinal, fomos capazes de identificar nos macrófagos intraperitoneais a presença de quatro isoenzimas de PKC, as PKC α , PKC β , PKC γ e PKC δ . Observamos que o Quercetin, um inibidor inespecífico de PKC, foi capaz de inibir a apoptose, mas se mostrou citotóxico, aumentando a liberação de LDH a níveis acima do próprio ATPe. Esse fato não nos surpreendeu pois sabíamos que outro inibidor inespecífico de PKC, a estaurosporina, também induz morte celular em macrófagos.

A interação das PKC com P2X₇ vem sendo relatada desde 1999, mas apenas um trabalho co-relacionava uma isoenzima da PKC diretamente com o P2X₇. Hung e

colaboradores co-imunoprecipitaram P2X₇ com a PKC (*Hung et al 2005*), mostrando a interação entre eles de forma dependente de Ca²⁺. Outros trabalhos correlacionam as PKC com o P2X₇, mas não chegam a investigar quais das isoenzimas específicas estariam presentes nestas interações. A forma pela qual a PKC seria ativada pelo P2X₇ também constitui um ponto sem solução na literatura, existindo um trabalho que defende a idéia de que o receptor P2X₇ as ativaria de forma semelhante ao que faz o receptor M3 (*Bradford e Soltoff 2002*). Contudo, o receptor M3 é um receptor muscarínico do tipo de interação clássica com a PTN G, com 7 passagens

frações solúveis, na presença de ATPe. A importância fisiológica para a aparente diminuição da PKC β não foi explorada neste trabalho, mas de forma consistente com nossos dados, esta enzima tem sido associada com produção de citocinas e sinalização de sobrevivência celular (*Gutcher et al 2003; Becker e Hannun 2005*).

Em retrospectiva nossos dados nos permitem propor um modelo em que a morte celular ativada por ATPe possui uma dependência do receptor P2X₇ que, uma vez este ativado haveria um mensageiro ainda desconhecido que ativa a iPLA, a qual entre outras possíveis ações pode atuar na mitocôndria. A iPLA geraria ácidos graxos livres que serviriam de substrato para as LOX e CYP450, ao mesmo tempo em que ativaria a PKC β . Desta forma temos quatro fortes componentes de sinalização atuando pela ativação de ATPe/P2X₇, culminando na morte do macrófago, a iPLA2, as LOX, CYP450 e a PKC β (Fig. 42)

A atuação conjunta da via das LOX e CYP450 com a ativação da PKC β encontra um alvo comum, os PPARs que são receptores ativados por lipídeos de diversas vias, inclusive das dependentes de PLA2, e possuem sítios de fosforilação para diversas cinases (*Gelman et al 2005; Diradourian et al 2005*). Nossa primeira suspeita da participação dos PPAR na via de morte por ATPe/P2X₇, veio da observação anteriormente citada que o MK-886 além de ser um conhecido inibidor da FLAP, atua também no PPAR γ (*Kehrer et al 2001*). Até o presente momento, é o único inibidor conhecido para esta isoforma de PPAR. Diferentemente dos outros inibidores de LOX utilizados, o MK-886 foi o único a inibir em mais de 50% a apoptose causada por ATPe/P2X₇, este fato nos levantou a suspeita da possibilidade de outras ações deste inibidor, servindo como ponto inicial para testarmos a hipótese de que ATPe estaria ativando PPAR em macrófagos.

Mostramos então que além do MK886, inibidor da FLAP e do PPAR α , o GW-9662, inibidor do PPAR γ , é capaz de inibir a apoptose causada por ATPe. Entretanto, o PPAR α parece se ativado por ATP. Contudo, dentre os ácidos graxos gerados pela iPLA2 e convertidos pelas LOX e CYP450 que são descritos como os ativadores naturais para os PPAR α e PPAR γ , apenas o AA e ácido linoléico ativam ambos (Kota *et al* 2005). Já a ação das PKC fosforilando os PPAR só foi descrita para o PPAR α , sendo o PPAR γ alvo apenas de MAPKs. Este raciocínio nos leva a supor que PPAR α seja o principal mediador da morte celular via ATPe/P2X $_7$, hipótese esta sustentada pelo fato de termos observado apenas a translocação do PPAR α , mas não do PPAR γ .

Entretanto, a literatura aponta o PPAR α como estando envolvido na indução de apoptose, principalmente em células neoplásicas (Wang *et al* 2006). O real envolvimento dos PPAR no processo de morte celular induzido por ATPe/P2X $_7$ ainda necessita de maiores estudos.

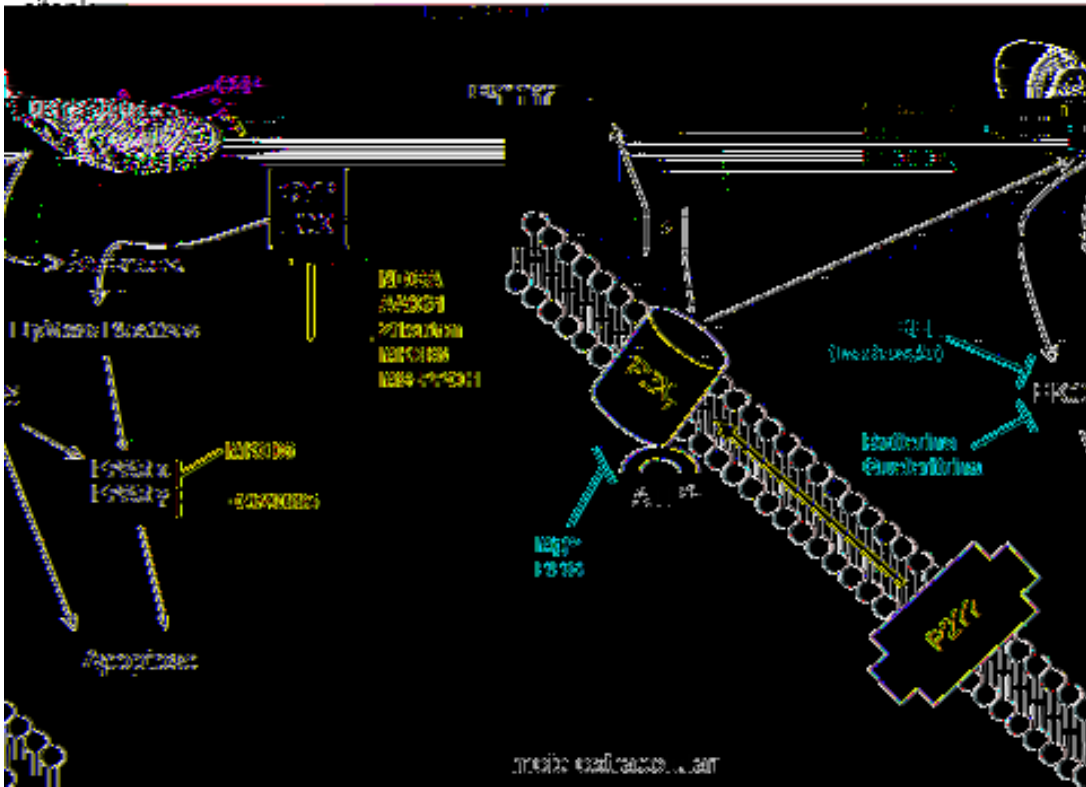


Figura 42: Modelo proposto da sinalização via ATPe/P2X7. Modelo proposto onde após o engajamento do ATPe com o P2X7, uma iPLA é ativada atuando em conjunto com a PLC, liberando Ca²⁺ e IP3, que ativam a PKC. A P2Y7 também atua na regulação do P2X7.

Em geral, tratamos nesta tese basicamente das vias de sinalização mediadas por ATPe/P2X₇ que culminam na morte celular, em especial na apoptose. Recentemente muitos avanços vêm sendo realizados nos estudos dos tipos de morte celular. A antiga divisão entre apoptose e necrose sofreu um grande avanço, com a descrição da autofagia e da oncosis entre outros (*Guimaraes e Linden 2004; Fink e Cookson 2005; Degterev et al 2005*). O conhecimento e entendimento da própria necrose evoluíram, deixando de se considerada consequência de eventos acidentais e cogitada a possibilidade de que em certas condições possa ser programada como a apoptose, principalmente em processos de morte independentes de caspases (*Degterev et al 2005*). Com a descrição da necrostatina-1, uma substância capaz de bloquear a necrose induzida por receptores de morte quando caspases encontram-se bloqueadas, abre-se uma nova perspectiva para o estudo da sinalização de morte celular.

Dentro deste contexto, observamos um fato importante, a sinalização de morte induzida por ATPe/P2X₇ em nosso sistema apresentou um possível ponto divisor. Uma possível via preferencial de morte por necrose passando pela p38 (Fig. 43). Diferentemente de todos os outros fármacos utilizados, que ao inibirem a apoptose, inibiam ou não a liberação de LDH, o SB203580, inibidor da p38, foi capaz de inibir a liberação de LDH, mas não a apoptose.

Atualmente não existe um consenso sobre a sinalização via MAPK por ATPe/P2X₇. Faria e colaboradores afirmam que o poro formado pelo P2X₇ é dependente de p38 e ERK1/2 (*Faria et al 2004*), sendo parcialmente apoiado por Parvathenani e colaboradores que mostram a participação da p38, mas não da ERK1/2 na formação do poro (*Parvathenani et al 2003*). Nosso laboratório defende a idéia de que a p38, juntamente com a ERK1/2, não participam do processo de formação do poro do P2X₇ (*Monteiro-da-Cruz et al 2006*).

Portanto este dado deve ser levado em consideração com cautela, requerendo um estudo mais aprofundado.

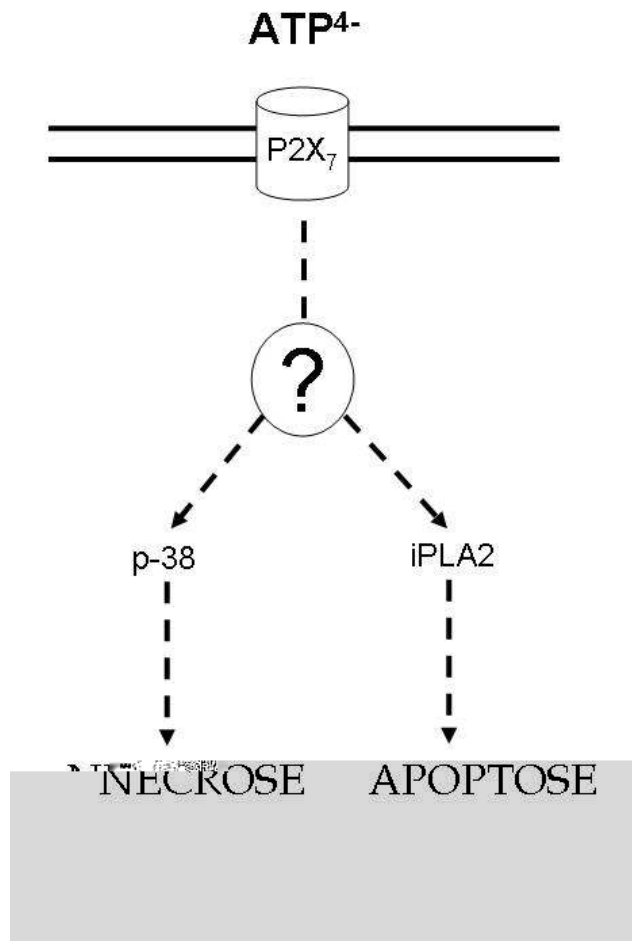


Figura 43: Provável ponto divisor entre as sinalizações apoptóticas e necróticas.

O ATPe é o ativador geral da família de receptores P2 e, como tratado na introdução, ele é rapidamente metabolizado a ADP (difosfato de adenosina) AMP (monofosfato de adenosina) adenosina, podendo exercer atividade não apenas nos P2, mas inclusive nos receptores de adenosina, tornando aceitável a participação de outros receptores nas ações tidas como exercidas pelo P2X₇. Nosso laboratório há algum tempo defende a participação de outros P2, principalmente dos receptores P2Y,

como receptores coadjuvantes na sinalização por ATPe. A tese de doutorado de Rodrigo Bisaggio relata que UTP adicionado em conjunto ao ATPe é capaz de diminuir o limiar de ativação para indução de apoptose de 5 mM para 1mM de ATPe, pela possível participação do P2Y1 ou P2Y2 (dados do laboratório), por um mecanismo não identificado. Por outro lado, o P2Y4 foi descrito como um receptor inibitório à permeabilização mediada por P2X₇ (Sugiyama, T. et al 2005).

Apoiando esta possibilidade, observamos que o inibidor U-73122, para PLC, classicamente descrito como envolvido na atividade de receptores associados a PTN G, como os P2Y1, P2Y2, P2Y6 e P2Y11, causa a diminuição da apoptose por ATPe/P2X₇.

Quanto à aplicação de nosso modelo em um sistema mais fisiológico do que a cultura de células e sua inserção nas múltiplas vias de sinalização por P2X₇, podemos citar o seguinte exemplo: imaginemos um quadro inflamatório promovido pela entrada de um corpo estranho no organismo. Em um primeiro momento células são lisadas liberando seu conteúdo intracelular e iniciando uma resposta inflamatória local. Com a progressão da inflamação, macrófagos são recrutados podendo encontrar um meio contendo ATP livre. Estes macrófagos, via receptor P2X₇ poderiam liberar para o meio citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, ajudando a regularizar o quadro inflamatório.

Contudo, com o passar do tempo a resposta pró-inflamatória necessita ser desmontada a fim de evitar danos ao próprio organismo, o efeito prolongado do ATPe poderia ser importante nesta etapa exercendo outras funções nos macrófagos locais, ativando a iPLA2, agora gera ácidos graxos que seriam metabolizados e em conjunto com a PKC podem ativar os PPARs. A própria PKC, é por sua vez é capaz de ativar a caspase efetora 3 (Basu 2003), que em uma alça de alimentação positiva

seria capaz de clivar a própria PKC e a iPLA2 (*Basu 2003; Atsumi et al 2000b*), aumentando as suas atividades. Por fim, o macrófago sofreria apoptose sendo fagocitado por seus vizinhos. A fagocitose dos corpos apoptóticos resultaria no dismantelamento do quadro inflamatório naquela região.

Sumarizando as informações presentes nesta tese, podemos defender a hipótese que o ATPe/P2X₇ ativa uma iPLA2, que por sua vez ativa especificamente a PKC acarretando na apoptose dos macrófagos. Esta via ainda possui a participação das enzimas LOX e CYP450, com a ativação dos receptores nucleares PPARs, em especial o PPAR γ , por um mecanismo que necessita ser melhor avalizado. Os dados aqui apresentado contribuem para uma melhor compreensão das vias de transdução de sinal ativadas por ATPe em macrófagos (Fig. 44).

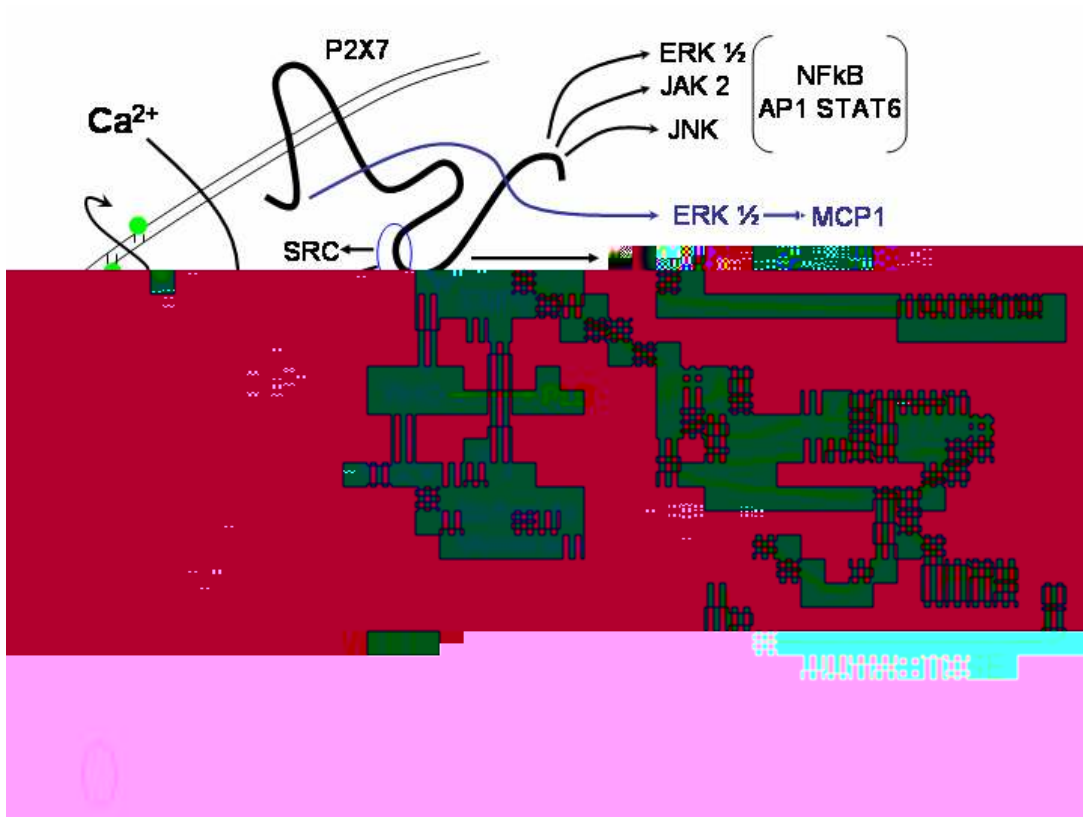


Figura 44: Modelo esquemático da multi-ativação de vias de sinalização por P2X₇. A Figura acima demonstra as principais vias de sinalização ativadas por P2X₇ e seus diferentes agonistas ao longo de 15 anos de estudos, as setas e termos em vermelho representam a nossa contribuição para o entendimento deste modelo.

E – Conclusões

“Excluído o impossível, o que restar, por mais improvável, deve ser verdade.”

Arthur Conan Doyle

- A indução de morte celular por ATPe em macrófagos por ATPe é dependente do P2X₇ e independente de Ca²⁺.
- Uma iPLA2 está envolvida na transdução de sinal para apoptose induzida por ATPe/P2X₇, ativando a PKC , e em paralelo, ativando as vias de 5-LOX e de síntese de EET por CYP450.
- Macrófagos intraperitoneais murinos ativados por tioglicolato e mantidos em cultura por 96 horas possuem como formas majoritárias de PKC as PKC , PKC 2, PKC e PKC .
- A PKC é ativada por ATPe, translocando para frações de membrana. A rotlerina, seu inibidor seletivo, é capaz de inibir sua atividade, vista pela inibição da apoptose por ATP/P2X₇, mas não é capaz de inibir sua translocação.
- A inibição da cinase p38 por SB203580 é capaz de inibir a lise celular provocada por ATPe/P2X₇, mas não a apoptose.
- Os receptores nucleares PPAR e PPAR estão envolvidos na apoptose induzida por ATPe/P2X₇, mas apenas o PPAR é translocado pela ação do ATPe.

G – Referências

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J Raff, M. Robert, K. Walter, P. Molecular Biology of The Cell (2002) New York, USA, Garland Science.

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24:52-5

Abbracchio MP, Burnstock G. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64:445-75

Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D. 2005. P2X₇ receptor: death or life? *Pur. Sigal.* 1:219-27

Akiba S, Sato T. 2004. Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1174-8

Alba-Loureiro TC, Martins EF, Landgraf RG, Jancar S, Curi R, Sannomiya P. 2006. Role of insulin on PGE₂ generation during LPS-induced lung inflammation in rats. *Life Sci.* 78:578-85

Alloisio S, Aiello R, Ferroni S, Nobile M. 2006. Potentiation of native and recombinant P2X₇-mediated calcium signaling by arachidonic acid in cultured cortical astrocytes and HEK293 cells. *Mol. Pharmacol.* in press

Alzola E, Perez-Etxebarria A, Kabre E, Fogarty DJ, Møtoui M, Chab N, Macarulla JM, Matute C, Dehaye JP, Marino A. 1998. Activation by P2X₇ agonists of two phospholipases A₂ (PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland. Coupling of the calcium-independent PLA₂ with kallikrein secretion. *J. Biol. Chem.* 273:30208-17

Amstrup J, Novak I. 2003. P2X₇ receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem. J.* 374:51-61

Apasov S, Koshiba M, Redegeld F, Sitkovsky MV. 1995. Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions. *Immunol. Rev.* 146:5-19

Armstrong JN, Brust TB, Lewis RG, MacVicar BA. 2002. Activation of presynaptic P2X₇-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 22:5938-45

Atsumi G, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I. 2000a. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂α inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. *J. Biol. Chem.*

- cultured astrocytes increases the biosynthetic release of cysteinyl leukotrienes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18:417-30
- Basu A. 2003. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell Mol. Med.* 7:341-50
- Becker KP, Hannun YA. 2005. Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1448-61
- Bergamo P, Luongo D, Rossi M. 2004. Conjugated linoleic acid--mediated apoptosis in Jurkat T cells involves the production of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem.* 14:57-64
- Bisaggio RC. 2001. Caracterização dos receptores P2 no sistema imune. Tese de doutorado defendida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* 26:959-69
- Boitier E, Gautier JC, Roberts R. 2003. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol.* 2:3
- Boyce M, Yuan J. 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death. Differ.* 13: 363-73
- Bradford MD, Soltoff SP. 2002. P2X7 receptors activate Protein Kinase D and p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) downstream of Protein Kinase C. *Biochem. J.* 366:745-55
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54
- Brodie C, Blumberg PM. 2003. Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis.* 8:19-27
- Brough D, Le Feuvre RA, Iwakura Y, Rothwell NJ. 2002. Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Mol. Cell Neurosci.* 19:272-80
- Bucheimer RE, Linden J. 2004. Purinergic regulation of epithelial transport. *J. Physiol. (London)* 555: 311-21
- Budagian V, Bulanova E, Brovko L, Orinska Z, Fayad R, Paus R, Bulfone-Paus S. 2003. Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 278:1549-60
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. 2005. Extracellular ATP Induces Cytokine Expression and Apoptosis through P2X7 Receptor in Murine Mast Cells. *J. Immunol.* 174:3880-90
- Burnstock G. 2004. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:793-803
- Burnstock G, Kennedy C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16:433-40
- Burnstock G, King BF. 1996. Numbering of cloned P2 purinoceptores. *Drug Dev. Res.* 38:67

- Burnstock G, Knight GE. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240:31-304.:31-304
- Capper EA, Marshall LA. 2001. Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog. Lipid Res.* 40:167-97
- Capra V, Ravasi S, Accomazzo MR, Citro S, Grimoldi M, Abbracchio MP, Rovati GE. 2005. CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation. *J. Cell Sci.* 118:5625-36
- Caraccio N, Monzani F, Santini E, Cuccato S, Ferrari D, Callegari MG, Gulinelli S, Pizzirani C, Di Virgilio F, Ferrannini E, Solini A. 2005. Extracellular ATP modulates interleukin-6 production by human thymocytes through functional purinergic P2 receptors. *Endocrinol.* 146: 3172-8:
- Caro AA, Cederbaum AI. 2006. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 40:364-75
- Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, Cuvelier C, Brouckaert P. 2003. Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat. Immunol.* 4:387-93
- Chaib N, Kabre E, Alzola E, Pochet S, Dehaye JP. 2000. Bromoenol lactone enhances the permeabilization of rat submandibular acinar cells by P2X7 agonists. *Br. J. Pharmacol.* 129:703-8
- Chhatriwala M, Ravi RG, Patel RI, Boyer JL, Jacobson KA, Harden TK. 2004. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analogue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 1038-43:
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49:497-505
- Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Falzoni S, Aleotti A, Buell GN, Collo G, Di Virgilio F. 1997. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. *J. Cell Biol.* 138:697-706
- Chow SC, Kass GE, Orrenius S. 1997. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacol.* 36:1149-56
- Cifone MG, Botti D, Festuccia C, Napolitano T, del Grosso E, Cavallo G, Chessa MA, Santoni A. 1993. Involvement of phospholipase A2 activation and arachidonic acid metabolism in the cytotoxic functions of rat NK cells. *Cell Immunol.* 148:247-58
- Cifone MG, Cironi L, Roncaioli P, Martinotti S, Toniato E, Cilenti L, Botti D, Solito R, Parente L, Santoni A. 1996. Phospholipase A2 activity and calpactin I levels in rat lymphokine-activated killer cells: correlation with the cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 170:274-82
- Clark RB. 2002. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc. Biol.* 71:388-400
- Coddou C, Villalobos C, Gonzalez J, Acuna-Castillo C, Loeb B, Huidobro-Toro JP. 2002. Formation of carnosine-Cu(II) complexes prevents and reverts the inhibitory action of copper in P2X4 and P2X7 receptors. *J. Neurochem.* 80:626-33
- Communi D, Boeynaems J-M. 1997. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* 18:83-6

Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. 2001. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* 276:41479-85

Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM. 1996. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222:303-8

Conigrave AD, Fernando KC, Gu B, Tasevski V, Zhang W, Luttrell BM, Wiley JS. 2001. P2Y(11)

- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. 2001. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97:587-600
- Di Virgilio F, Ferrari D, Falzoni S, Chiozzi P, Munerati M, Steinberg TH, Baricordi OR. 1996. P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Found. Symp.* 198:290-302
- Diaz BL, Arm JP. 2003. Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69:87-97
- Diradourian C, Girard J, Pegorier JP. 2005. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 87:33-8
- Dorsam RT, Kunapuli SP. 2004. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J. Clin. Invest.* 113:340-5
- Draper AJ, Hammock BD. 2000. Identification of CYP2C9 as a human liver microsomal linoleic acid epoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:199-205
- Egan TM, Cox JA, Voigt MM. 2004. Molecular structure of P2X receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:821-9
- Elliott JI, Higgins CF. 2004. Major histocompatibility complex class I shedding and programmed cell death stimulated through the proinflammatory P2X7 receptor: a candidate susceptibility gene for NOD diabetes. *Diabetes* 53:2012-7
- Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, Linton K, Alexander DR, Higgins CF. 2005. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat. Cell Biol.* 7:808-16
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452:552-62
- Erb L, Lustig KD, Sullivan DM, Turner JT, Weisman GA. 1993. Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2u purinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10449-53
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A. 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol. Pharmacol.* 48:178-83
- Faria RX, de Farias FP, Alves LA. 2004. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C260-C271
- Feng YH, Wang L, Wang Q, Li X, Zeng R, Gorodeski GI. 2005. ATP stimulates GRK-3 - phosphorylation and b-arrestin-2 - dependent internalization of the P2X7-receptor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: 1342-56.:
- Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. 2003. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ. Res.* 92:485-92
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F. 1997. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacol.* 36:1295-301
- Ferrari D, Munerati M, Melchiorri L, Hanau S, Di Virgilio F, Baricordi OR. 1994. Responses to extracellular ATP of lympho

- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176:3877-83
- Ferrari D, Stepczynska A, Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. 1998. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188:979-84
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73:1907-16
- Fisher CA, Manns JM, Young ED, Kannan S. 2003. Molecular mechanism of extracellular nucleotide-induced degranulation from human polymorphonuclear leukocytes: Role of leukotriene B4 and p38 MAP kinase as essential intermediates. *J. Biol. Chem.* :manuscrito
- Fleming I. 2004. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol. Res.* 49:525-33
- Fonteh AN, Marion CR, Barham BJ, Edens MB, Atsumi G, Samet JM, High KP, Chilton FH. 2001. Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. *J. Immunol.* 167:4161-71
- Forte M, Bernardi P. 2005. Genetic dissection of the permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:121-8
- Franke H, Gunther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R, Faber-Zuschratter H, Schneider D, Illes P. 2004. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63:686-99
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:364-74
- Fuentes L, Perez R, Nieto ML, Balsinde J, Balboa MA. 2003. Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 278:44683-90
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP. 2003. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43:218-03
- Gadd ME, Broekemeier KM, Crouser ED, Kumar J, Graff G, Pfeiffer DR. 2006. Mitochondrial iPLA2 activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition. *J. Biol. Chem.* 281: 6931-9
- Gaddi A, Cicero AF, Pedro EJ. 2004. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 38:201-12
- Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. 2005. Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:216-22
- Gomes FR, 2006. Estudo farmacológico dos receptores nucleotídicos em macrófagos murinos. Dissertação de mestrado defendida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- Gourine AV, Poputnikov DM, Zhernosek N, Melenchuk EV, Gerstberger R, Spyer KM, Gourine VN. 2005. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br. J. Pharmacol.* 146:139-45

- Gross GJ, Falck JR, Gross ER, Isbell M, Moore J, Nithipatikom K. 2005. Cytochrome P450 and arachidonic acid metabolites: role in myocardial ischemia/reperfusion injury revisited. *Cardiovasc. Res.* 68:18-25
- Guimaraes C.A., Linden R. 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271:1638-50
- Gutcher I, Webb PR, Anderson NG. 2003. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol. Life Sci.* 60:1061-70
- Haas HL, Selbach O. 2000. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:375-81
- Hedi H, Norbert G. 2004. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004:99-105
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. 2000. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J. Neurochem.* 75:965-72
- Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. 2004. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1168-73
- Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY, Hua KF. 2001. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276:28719-30
- Humphreys BD, Rice J, Kertesz SB, Dubyak GR. 2000. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 275:26792-8
- Hung AC, Chu YJ, Lin YH, Weng JY, Chen HB, Au YC, Sun SH. 2005. Roles of protein kinase C in regulation of P2X7 receptor-mediated calcium signalling of cultured type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal.* 17:1384-96
- Illes P, Klotz KN, Lohse MJ. 2000. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:295-8
- Inoue K. 2006. The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* 109: 210-26
- Iwase H, Takatori T, Aono K, Iwadata K, Takahashi M, Nakajima M, Nagao M. 1995. Establishment of a monoepoxide (leukotoxin and its isomer) producing system using a hydrogen peroxide-generating system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:483-8
- Jagroop IA, Burnstock G, Mikhailidis DP. 2003. Both the ADP receptors P2Y(1) and P2Y(12), play a role in controlling shape change in human platelets. *Platelets* 14:15-20
- Jala VR, Haribabu B. 2004. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators. *Trends Immunol.* 25:315-22
- Kahlenberg JM, Dubyak GR. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C1100-C1108
- Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, Dalpke AH, Heeg KM, Robaye B, Hanley PJ. 2005. "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 280:32459-67

Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD. 2003. Deletion of the P2X7

- Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. 2002. Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J. Biol. Chem.* 277:3210-8
- Le Feuvre RA, Brough D, Touzani O, Rothwell NJ. 2003. Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23:381-4
- Le Stunff H, Auger R, Kanellopoulos J, Raymond MN. 2004. The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 16918-26
- Li AC, Palinski W. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:1-39
- Li L, Prabhakaran K, Zhang X, Borowitz JL, Isom GE. 2006. PPAR{alpha}-Mediated Up-regulation of Uncoupling Protein-2 Switches Cyanide-Induced Apoptosis to Necrosis in Primary Cortical Cells. *Toxicol. Sci.* .:
- Li Q, Cheon YP, Kannan A, Shanker S, Bagchi IC, Bagchi MK. 2004. A novel pathway involving progesterone receptor, 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates implantation in mice. *J. Biol. Chem.* 279:11570-81
- Liming P, Wiley JS. 1999. Role of bivalent cations and choline in ATP-induced apoptosis of human lymphocytes with P2Z receptors. *Chin Med. Sci. J.* 14:23-30
- Linnemeyer PA, Pollack SB. 1993. Prostaglandin E₂-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *J. Immunol.* 150:3747-54
- Liu H, Ma Y, Pagliari LJ, Perlman H, Yu C, Lin A, Pope RM. 2004. TNF-alpha-induced apoptosis of macrophages following inhibition of NF-kappa B: a central role for disruption of mitochondria. *J. Immunol.* 172:1907-15
- Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG. 2003. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 278:4590-6
- Macian F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 5:472-84
- Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 280:33968-76
- Martinez J, Moreno JJ. 2005. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and cytochrome P-450 in store-operated calcium entry in 3T6 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 70:733-9
- Marty V, Medina C, Combe C, Parnet P, Amedee T. 2005. ATP binding cassette transporter ABC1 is required for the release of interleukin-1beta by P2X7-stimulated and lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells. *Glia* 49:511-9
- Masamune A, Sakai Y, Satoh A, Fujita M, Yoshida M, Shimosegawa T. 2001. Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells. *Pancreas* 22:75-83

- Melo AC, Moeller PD, Glasgow H, Burkholder JM, Ramsdell JS. 2001. Microfluorimetric analysis of a purinergic receptor (P2X7) in GH4C1 rat pituitary cells: effects of a bioactive substance produced by *Pfiesteria piscicida*. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 5:731-7
- Mendes AN, 2006. Papel das lipoxigenases na via de sinalização da apoptose induzida por ATP em macrófagos. Dissertação de mestrado defendida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- Meyer MC, Kell PJ, Creer MH, McHowat J. 2005. Calcium-independent phospholipase A2 is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C475-C482
- Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. 1999. Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359:102-9
- Michel AD, Kaur R, Chessell IP, Humphrey PP. 2000. Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br. J. Pharmacol.* 130:513-20
- Miglietta A, Bozzo F, Bocca C, Gabriel L, Trombetta A, Belotti S, Canuto RA. 2006. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signalling and mitochondrial pathway. *Cancer Lett.* 234:149-57
- Monteiro-da-Cruz C, Ventura AL, Schachter J, Costa-Junior HM, Silva-Souza HA, Gomes FR, Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Persechini PM. 2006. Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X7-associated pore or channel formation. *Br. J. Pharmacol.* 147:324-34
- Monteiro-da-Cruz C, 2003. Dissertação de mestrado defendida no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- Moon H, Na HY, Chong KH, Kim TJ. 2005. P2X(7) receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol. Lett.* 102: 98-105
- Moran JH, Weise R, Schnellmann RG, Freeman JP, Grant DF. 1997. Cytotoxicity of linoleic acid diols to renal proximal tubular cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146:53-9
- Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, Di Virgilio F. 1992. Characterization of the Cytotoxic Effect of Extracellular ATP in J774-Mouse Macrophages. *Biochem. J.* 288:897-901
- Murgo AJ, Sistare FD. 1992. K562 leukemia cells express P2T (adenosine diphosphate) purinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261:580-5
- Nagy PV, Feher T, Morga S, Matko J. 2000. Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol. Lett.* 72:23-30
- North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82:1013-67
- North RA, Surprenant A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:563-80
- Novak I. 2003. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol. Sci.* 18:12-7
- Nuttle LC, Dubyak GR. 1994. Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P-2Z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269:13988-96

- Nuttle LC, El-Moatassim C, Dubyak GR. 1993. Expression of the pore-forming P(2Z)-purinoreceptor in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)+ RNA from murine macrophages. *Mol. Pharmacol.* 44:93-101
- Ohno S, Nishizuka Y. 2002. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem. (Tokyo)*. 132:509-11
- Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH. 2004. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 24:7879-87
- Olah ME, Caldwell CC. 2003. Adenosine receptors and mammalian toll-like receptors: synergism in macrophages. *Mol. Interv.* 3:370-4
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:552-65
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. 1994. Cloning and expression of a human P2u nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3275-9
- Parvathenani LK, Tertshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278:13309-17
- Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22:153-83
- Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. 2000. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J. Immunol.* 165:4615-23
- Persechini PM, Bisaggio RC, Alves-Neto JL, Coutinho-Silva R. 1998. Extracellular ATP in the lymphohematopoietic system: P2Z purinoceptors and membrane permeabilization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:25-34
- Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* 174:589-94
- Petrin D, Turcotte S, Gilbert AK, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. 2006. The anti-apoptotic effect of leukotriene B4 in neutrophils: a role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1. *Cell Signal.* 18:479-87
- Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, Walsh JV Jr. 1997. P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett.* 411:339-45
- Pfeiffer ZA, Aga M, Prabhu U, Watters JJ, Hall DJ, Bertics PJ. 2004. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J. Leukoc. Biol.* 75:1173-82
- Pilane CM, LaBelle EF. 2002. Arachidonic acid release by cPLA2 may be causally related to NO-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* 191:191-7

- Pizzo P, Murgia M, Zambon A, Zanovello P, Bronte V, Pietrobon D, Di Virgilio F. 1992. Role of P(2z) purinergic receptors in ATP-mediated killing of tumor necrosis factor (TNF)-sensitive and TNF-resistant L929 fibroblasts. *J. Immunol.* 149:3372-8
- Pochet S, Gomez-Munoz A, Marino A, Dehaye JP. 2003. Regulation of phospholipase D by P2X7 receptors in submandibular ductal cells. *Cell Signal.* 15:927-35
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413-92
- Ralevic V, Burnstock G. 2003. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 16:133-40
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A. 1997a. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16:3446-54
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. 1997b. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 272:5482-6
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452: 486-500
- Ryer EJ, Sakakibara K, Wang C, Sarkar D, Fisher PB, Faries PL, Kent KC, Liu B. 2005. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280:35310-7
- Scase TJ, Heath MF, Allen JM, Sage SO, Evans RJ. 1998. Identification of a P-2X1 purinoceptor expressed on human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242:525-8
- Schechtman D, Mochly-Rosen D. 2001. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 20:6339-47
- Schiffirin EL. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288:H1037-H1043
- Schrier SM, Florea BI, Mulder GJ, Nagelkerke JF, Ijzerman AP. 2002. Apoptosis induced by extracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line N1E-115: studies on involvement of P2 receptors and adenosine. *Biochem. Pharmacol.* 63:1119-26
- Schulman ES, Glaum MC, Post T, Wang Y, Raible DG, Mohanty J, Butterfield JH, Pelleg A. 1999. ATP modulates anti-IgE-induced release of histamine from human lung mast cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20:530-7
- Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brune B, Sterzel RB. 1998. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am. J. Physiol.* 275:F962-F971
- Scrivens M, Dickenson JM. 2005. Functional expression of the P2Y(14) receptor in murine T-lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* 146:435-44
- Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Tsuda M, Ohsawa K, Kohsaka S, Inoue K. 2001. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J. Neurochem.* 78:1339-49
- Shinzawa K, Tsujimoto Y. 2003. PLA2 activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death. *J. Cell Biol.* 163:1219-30

- Shirai Y, Saito N. 2002. Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J. Biochem. (Tokyo)*. 132:663-8
- Shureiqi I, Jiang W, Zuo X, Wu Y, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Morris JS, Fan HZ, Fischer SM, Lippman SM. 2003. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:9968-73
- Sitkovsky MV. 1998. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 65:351-7
- Six DA, Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:1-19
- Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. 2003. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:183-90
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. 2001. Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors. *J. Biol. Chem.* 276:125-32
- Steer SA, Wirsig KC, Creer MH, Ford DA, McHowat J. 2002. Regulation of membrane-associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283:C1621-C1626
- Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. 1987. ATP⁴⁺ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* 262:8884-8
- Steinberg TH, Silverstein SC. 1987. Extracellular ATP⁴⁺ promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 262:3118-22
- Stojilkovic SS, Tomic M, He ML, Yan Z, Koshimizu TA, Zemkova H. 2005. Molecular Dissection of Purinergic P2X Receptor Channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1048:116-30
- Sugiyama T, Kawamura H, Yamanishi S, Kobayashi M, Katsumura K, Puro DG. 2005. Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C568-C576
- Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. 1999. ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *J. Neurochem.* 73:334-43
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24:1-7
- Taketo MM, Sonoshita M. 2002. Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585:72-6
- Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR. 2003. P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J. Immunol.* 170:5728-38
- Vieira FS, Persechini PM, Coutinho-Silva R. 2003. *V Congresso IberoAmericano de Biofísica*. Resumo 219:198 (Abstr.)
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacol.* 36:1285-94

- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2:315-21
- Viswanathan S, Hammock BD, Newman JW, Meerarani P, Toborek M, Hennig B. 2003. Involvement of CYP 2C9 in mediating the proinflammatory effects of linoleic acid in vascular endothelial cells. *J. Am. Coll. Nutr.* 22:502-10
- von K, I, Wetter A. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:310-23
- Walter L, Hajnóczky G. 2005. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37:191-206
- Wang CM, Chang YY, Sun SH. 2003. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cell Signal.* 15:1129-37
- Wang LS, Huang YW, Liu S, Chang HL, Ye W, Shu S, Sugimoto Y, Funk JA, Smeaks DD, Hill LN, Lin YC. 2006. Conjugated linoleic acid (CLA) modulates prostaglandin E2 (PGE2) signaling in canine mammary cells. *Anticancer Res.* 26:889-98
- Wang Q, Li X, Wang L, Feng YH, Zeng R, Gorodeski G. 2004. Anti-apoptotic effects of estrogen in normal and in cancer human cervical epithelial cells. *Endocrinol.* 142: 5568-79
- Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 58:1-14
- White PJ, Webb TE, Boarder MR. 2003. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol. Pharmacol.* 63:1356-63
- Wikstrom K, Juhas M, Sjolander A. 2003. The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochem. J.* 371:115-24
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, Taper J, Gallo J, Manoharan A. 2002. A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359:1114-9
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA. 2002. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C-terminus. *J. Biol. Chem.* 277:34017-23
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Pizzo P, Di Virgilio F. 1990. Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J. Immunol.* 145:1545-50
- Zeldin DC. 2001a. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 276:36059-62
- Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ, Jr. 2001. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* 276:8608-15
- Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Palmer K, Qiao X, Fan X, Yang S, Laz TM, Bayne M, Monsma F, Jr. 2002. P2Y(13): identification and characterization of a novel Gai-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:705-13

Zhang W, McQueen T, Schober W, Rassidakis G, Andreeff M, Konopleva M. 2005. Leukotriene B4 receptor inhibitor LY293111 induces cell cycle arrest and apoptosis in human anaplastic large-cell lymphoma cells via JNK phosphorylation. *Leukemia*. 19:1977-84

Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Lin YM,

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)