

Centro de Estudos Gerais

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Neuroimunologia

**ROXANA MAMANI ANCCASI**

**MORTE CELULAR INDUZIDA PELO ATP  
NAS CÉLULAS DE RETINA EMBRIONÁRIA  
DE GALINHA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Marques Ventura

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ROXANA MAMANI ANCCASI**

**MORTE CELULAR INDUZIDA PELO ATP NAS  
CÉLULAS DE RETINA EMBRIONÁRIA DE  
GALINHA**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica do  
Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Federal Fluminense como  
requisito parcial para obtenção de grau  
de Mestre em Neuroimunologia.

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Marques Ventura

Niterói

2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica, do Programa de Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob orientação de Ana Lúcia Marques Ventura e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Ancasi, Roxana Mamani

**MORTE CELULAR INDUZIDA PELO ATP NAS CÉLULAS DE RETINA  
EMBRIONARIA DE GALINHA, Niterói, UFF, Instituto de Biologia, 2008**

Tese: Mestre em Neuroimunologia

1. ATP. 2. Morte celular. 3. P2X7. 4. Desenvolvimento embrionário

- I. Universidade Federal Fluminense
- II. Título

*Dedico este trabalho de tese, a meus maravilhosos pais Abdón e Valeria. E a meus preciosos irmãos Maria Luisa e John, pois tudo o que faço é por eles.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço, com todo meu coração a DEUS, por esta conquista. Que este trabalho seja para honra e glória de seu nome!*

*A Ana, pela grande ajuda que sempre me proporciona, não somente como orientadora, pois ela mais que isso. Muito obrigada Ana, eu desejo continuar aprendendo com você.*

*A Telmo, “O AMOR DA MINHA VIDA” você é tudo para mim. Agradeço por tudo que sempre faz por mim.*

*A meus colegas de laboratório, pois todos eles me ajudaram muito neste trabalho: A Isis, Liana, Rodrigo, Guilherme, Rhalene, Thayane e Erick. Gosto muito de todos vocês.*

*Aos professores Roberto, Bethy, e todos os colegas da pós-graduação, que colaboraram de alguma forma.*

*E finalmente, obrigada por me acolherem neste país com todo esse carinho!!!.*

# SUMÁRIO

	Página
<b>Abreviaturas</b>	<b>i</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>01</b>
1. A retina.....	01
1.1. A retina como modelo experimental.....	01
1.2. Estrutura e características neuroquímicas da retina.....	01
1.3. Desenvolvimento e neurogênese da retina.....	03
2. ATP.....	06
2.1. ATP como neurotransmissor .....	06
2.2. Receptores do ATP.....	09
2.2.1. Receptores P2X.....	09
2.2.2. Receptores P2Y.....	12
3. Morte.....	14
3.1. Aspectos gerais.....	14
3.2. Morte celular no desenvolvimento da retina.....	19
3.3. Morte celular e ATP.....	22
3.4. P2X <sub>7</sub> : Receptor de morte celular .....	24
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>32</b>
3.1. Culturas mistas de células de retina embrionária de galinha.....	32
3.2. Culturas purificadas de glia.....	32
3.3. Culturas purificadas de neurônios.....	32

3.4. Culturas enriquecidas em glia.....	33
3.5. Culturas enriquecidas em neurônios .....	33
3.6. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	33
3.7. Avaliação de morte celular pelo LDH.....	34
3.8. Fragmentação de DNA.....	34
3.9. Imunofluorescência para caspase-3 clivada.....	35
3.10. Ensaio de permeabilização celular.....	35
3.11. Morfologia nuclear com DAPI.....	35
<b>4. Resultados.....</b>	<b>36</b>
4.1. ATP induz morte nas culturas de retina de embrião de galinha.....	36
4.2. Tipo de morte induzida por ATP 3 mM em culturas de retina de embrião de galinha.....	44
4.3. Tipo de receptor envolvido na morte celular induzido por ATP.....	51
<b>5. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>

# SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
Esquema da histologia da retina de galinha.....	02
Histogênese da retina de galinha.....	04
Receptores purinérgicos ligados ao ATP extracelular.....	08
Estrutura molecular das subunidades da família de receptores P2X.....	11
Estrutura molecular de receptores P2Y.....	12
Modelo do duplo papel de receptores P2Y e P2X.....	13
Representação esquemática dos tipos de morte.....	15
Vias clássicas de ativação da apoptose.....	17
Caspase-12 envolvida na apoptose ativada por estresse do RE.....	18
Representação esquemática do curso temporal da morte celular durante o desenvolvimento da retina de embrião de galinha.....	20
Estrutura molecular da subunidade do receptor P2X <sub>7</sub> .....	24
Modelo resumido das duas subpopulações de receptores P2X <sub>7</sub> .....	25
Hipóteses da formação do poro associado ao canal do receptor P2X <sub>7</sub> .....	27
Ilustração esquemática para a hipótese corrente explicando a abertura do poro e liberação de citocinas.....	28
Efeito de ATP extracelular sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de galinha em E7C2.....	38
Visualização por microscopia de contraste de fase de culturas mistas de retina embrionária de galinha em E7C2 tratadas ou não com ATP.....	39
Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de pinto em função do tempo de cultivo.....	41
Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de pinto em função da idade do embrião.....	42
Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas purificadas de neurônios (E7C2), purificadas de glia (E7C14.) e de culturas mistas (E7C2) de retina embrionária de galinha.....	43
Liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) de culturas mistas de retina embrionária de pinto em E7C2 estimuladas com ATP extracelular.....	46

Fragmentação de DNA induzida por ATP ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em culturas de retina embrionária de pinto em E7C2.....	47
Aumento no número de células marcadas para caspase-3 clivada em Culturas tratadas com ATP.....	48
Imunofluorescência para caspase-3 clivada em culturas tratadas com ATP.....	49
Condensação de cromatina em culturas mistas de retina de pinto em E7C2.....	50
Efeito de BzATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina de galinha em E7C2.....	54
Visualização por microscopia de contraste de fase de culturas mistas de retina em E7C2.....	55
Efeito de KN-62 sobre a diminuição na viabilidade celular induzida por ATP.....	56
Indução de apoptose por BzATP em culturas mistas em E7C2.....	57
Permeabilização celular induzida por BzATP em culturas em E7C2.....	58
Efeito do antagonista de receptores P2X <sub>7</sub> BBG sobre a permeabilização induzida por ATP.....	59
Permeabilização induzida por ATP em culturas enriquecidas em Neurônios.....	60
Permeabilização induzida por ATP em culturas enriquecidas em glia.....	61

# ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato  
AIF: fator indutor de apoptose  
AKT-PKB: proteína cinase B  
AMP: adenosina monofosfato  
ATP: adenosina trifosfato  
BBG: blue brilliant G  
BDNF: fator de crescimento derivado de cérebro  
BME: Meio Básico de Eagle  
BzATP: Benzoil-benzoil-ATP  
Ca<sup>+2</sup>: cálcio  
CCG: camada de células ganglionares  
CF: camada fibroblástica  
ChAT: Acetil colinesterasa  
CNE: camada nuclear externa  
CNI: camada nuclear interna  
CPE: camada plexiforme externa  
CPI: camada plexiforme interna  
COOH: região carboxi  
Da: dalton  
DAG: diacilglicerol  
dATP: desoxi adenosin trifosfato  
DISC: complexo de sinalização de morte  
DD: domínio de morte  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
E3: terceiro dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E4: quarto dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E5: quinto dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E6: sexto dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E7: sétimo dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E8: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E9: nono dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E10: décimo dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E11: onzeavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E12: dozeavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
E14: décimo quarto dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
Ecto 5'-NT: ecto 5' nucleotidase  
EGF: fator de crescimento epidermal  
EP: epitélio pigmentar  
ERKs: cinases reguladas extracelularmente  
FGFb: Fator de crescimento de fibroblasto básico  
GABA: ácido γ-amino butírico  
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial  
IL-1 β: interleucina 1 β  
IP3: Inositol trifosfato  
KCl: cloreto de potássio  
KN-62: 1-[N,O-bis(1,5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazine  
KDa: kilodalton

LDH: lactato deidrogenase  
MAP: proteina ativada por mitogenio  
MAPK: cinase da proteina ativada por mitogenio  
mM: milimolar  
MMP: permeabilização de membrana mitocondrial  
mRNA: acido ribonucléico mensageiro  
MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro: tetrazol  
NGF: fator de crescimento do nervo  
NH2: região amino  
NPY: neuropeptideo Y  
NO: oxido nitrico  
NT-3: neurotrofina 3  
NT-4: neurotrofina 4  
PARP: poli-ADP ribosa polimerase  
PBS: buffer fosfato salino  
P2: receptor P2  
P2X7: receptor família P2X subtipo 7  
PCD: morte celular programada  
PI3 K: Fosfoinositídeo-3-cinase  
PKC: proteína cinase C  
PLC: fosfolipase C  
p75: receptor p75  
P1: receptor P1  
RE: reticulo endoplásmico  
ROCK1: cinase I associada a RhoA  
Shh: sonic hedhog  
SNA: Sistema nervoso autônomo  
SNC: sistema nervoso central  
SNP: sistema nervoso periférico  
TGFb: Fator de crescimento transformante beta  
TM1: transmembrana 1  
TM2: transmembrana 2  
TNF: fator de necrose tumoral  
UDP; uridin difosfato  
UTP: uridina trifosfato  
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular  
VIP: peptídeo intestinal vasoativo

## Resumo

ATP é uma molécula de sinalização extracelular que tem efeitos tanto sobre células neuronais quanto gliais, através de sua ligação em receptores P2Y ou P2X. Recentemente, demonstramos que o ATP, via ativação de receptores P2Y, induz proliferação celular em culturas de retina. Entretanto, o efeito deste nucleotídeo sobre outros fenômenos do desenvolvimento deste tecido ainda permanece pouco explorado. Neste trabalho, investigamos o efeito de ATP sobre a morte celular em culturas mistas de células de retina de embrião de galinha. Nestas culturas, obtidas de embrião de galinha com 7 dias (E7) e mantidas por 2 dias “in vitro” (E7C2), a adição de ATP induziu uma diminuição na viabilidade celular avaliada pelo método do MTT que foi dose- e tempo-dependente. Uma diminuição máxima de ~30% (n=3) foi observada incubando-se as células por 3 h com 3 mM de ATP. Já a incubação das culturas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM, por 5 h, diminuiu a viabilidade celular em ~70% (n=3). A morte celular induzida por este nucleotídeo foi observada apenas num período equivalente do desenvolvimento deste tecido compreendido entre os estágios de E8 e E14, sendo o nível máximo de morte celular observado nos estágios de E9 e E10. Além disto, este efeito foi observado apenas em culturas mistas, contendo neurônios e células gliais, mas não em culturas purificadas de neurônios ou enriquecidas em glia. Um aumento no número de células marcadas para caspase-3 clivada, assim como um padrão de fragmentação de DNA característico e também um aumento no número de células que apresentam condensação de cromatina foram observados quando as culturas foram incubadas com 3 mM de ATP. Além disto, em contraste com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que induziu uma liberação de LDH (lactato desidrogenase) significativa, a liberação desta enzima induzida por ATP foi bastante reduzida. Estes dados sugerem que a apoptose seja o tipo de morte celular preferencialmente induzida por este nucleotídeo em nossas culturas. Uma diminuição na viabilidade celular semelhante aquela observada com ATP também foi observada incubando-se as culturas com 100 μM de BzATP, um agonista específico para receptores P2X<sub>7</sub>, sugerindo que este seja o subtipo de receptor purinérgico envolvido na morte celular induzida por ATP em nossas culturas. Esta idéia foi reforçada por outros experimentos que mostraram que KN-62, um potente antagonista de receptores P2X<sub>7</sub> foi capaz de atenuar a diminuição na viabilidade celular induzida por ATP em nossas culturas. Além disto, tanto ATP quanto BzATP foram capazes de aumentar a permeabilidade do corante brometo de etídeo nas células de retina em cultura, um efeito que foi bloqueado por BBG, um outro antagonista específico para receptores P2X<sub>7</sub>.

Os dados deste trabalho sugerem que ATP seja capaz de induzir apoptose em uma população de células de retina de embrião de galinha em cultura através da ativação de receptores do tipo P2X<sub>7</sub>.

## Abstract

ATP is a signaling molecule that affects neurons as well as glial cells through its binding to P2Y or P2X receptors. Recently, we have shown that ATP, via activation of P2Y receptors, induces cell proliferation in retinal cultures. However, the effect of this nucleotide on other phenomena during the development of this tissue is still poorly explored. In the present work, we investigated the effect of ATP on cell death in mixed cultures of chick embryo retina cells. In these cultures, obtained from retinas of 7-day-old chick embryos (E7) and cultured for 2 days (E7C2) ATP induced a decrease in cell viability characterized by the MTT method that was dose- and time-dependent. A maximal decrease of ~30% (n=3) was observed by incubating the cells with 3 mM ATP, for 3 h. Moreover, the incubation of cells with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for 5 h, decreased cell viability by ~70% (n=3). Cell death induced by ATP was observed only in a period of development of this tissue that ranged from E8 to E14, the maximal level of cell death being observed by embryonic days 9 and 10. Moreover, this effect was only observed in mixed cultures, containing both neurons and glial cells, but not in purified cultures of neurons or enriched glial cultures. An increase in cleaved caspase-3 labeled cells, as well as a characteristic DNA fragmentation pattern and an increase in cells showing condensed chromatin were observed when cultures were incubated with 3 mM ATP. In contrast to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that induced a significant release of LDH, the release of this enzyme induced by ATP was very low. These data suggest that apoptosis is the type of cell death that is preferentially induced by this nucleotide in our cultures. A decrease in cell viability similar to the one observed with ATP was obtained by incubating the cultures with 100 μM BzATP, a specific agonist for P2X<sub>7</sub> receptors, suggesting that this is the receptor subtype involved in ATP induced cell death in our cultures. This idea is reinforced by other experiments showing that KN-62, a potent antagonist for P2X<sub>7</sub> receptors, attenuated the decrease in cell viability induced by ATP in the cultures. Moreover, both ATP as well as BzATP were able to increase ethidium bromide permeability in the cultured retinal cells, an effect that was blocked by BBG, another P2X<sub>7</sub> receptor antagonist. Thus, the results presented in the present work suggest that ATP induces apoptosis in a population of chick embryo retinal cells in culture through activation of P2X<sub>7</sub> purinergic receptors.

## **1. Introdução**

### **1. A retina**

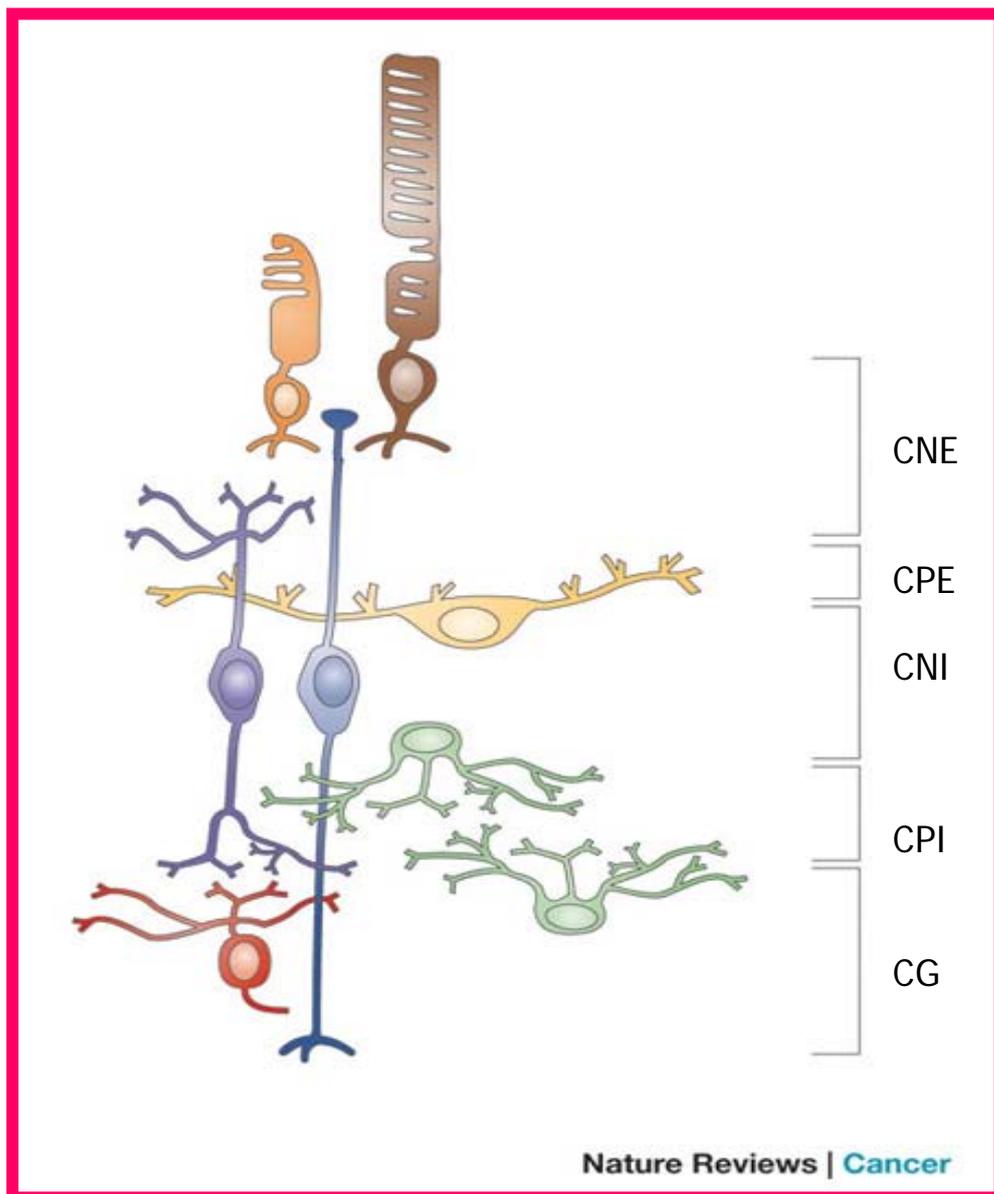
#### **1.1. A retina como modelo experimental**

A retina constitui um modelo experimental bastante útil para estudos na área de neurociências devido ao fato de ser uma parte do sistema nervoso central (SNC) que compartilha a mesma origem embrionária e segue os mesmos padrões de desenvolvimento do cérebro, incluindo a etapa inicial de independência e de posterior dependência de fatores tróficos .

Por encontrar-se no interior do olho naturalmente exposto ao meio externo, a retina é de fácil acesso e uma vez isolada, mantém grande parte de suas propriedades físico-químicas e de funcionalidade. Do ponto de vista morfológico, o tecido retiniano parece ser mais simples do que o resto do sistema nervoso central, já que apresenta uma quantidade relativamente pequena de tipos neuronais estruturalmente distribuídos em camadas facilmente reconhecíveis.

#### **1.2. Estrutura e características neuroquímicas da retina**

A retina apresenta cinco camadas, três contendo corpos celulares e duas onde ocorrem as sinapses. As primeiras distribuem-se da seguinte forma: A camada nuclear externa (CNE), formada pelos corpos celulares dos bastonetes e cones; em seguida encontra-se a camada nuclear interna (CNI) com os corpos das células horizontais, bipolares e amácrinas, além do principal tipo celular glial da retina, a célula de Müller; e por último a camada de células ganglionares (CCG) que contém as células ganglionares e amácrinas deslocadas (Kolb, 1991). Entre as camadas nucleares, temos as camadas sinápticas da retina: a camada plexiforme externa (CPE), onde ocorrem sinapses entre fotorreceptores, células bipolares e horizontais e a camada plexiforme interna (CPI), contendo os contatos sinápticos entre amácrinas, bipolares e células ganglionares (Figura 1) (Kolb, 1991).



**Figura 1. Esquema da histologia da retina de galinha, mostrando os tipos celulares e disposição das camadas do tecido.** CNE, Camada Nuclear Externa; CPE, Camada Plexiforme Externa; CNI, Camada Nuclear Interna; CPI, Camada Plexiforme Interna; CG, Camada de Células Ganglionares. (Michael A. Dyer & Rod Bremner, 2005).

O tecido retiniano utiliza os mesmos neurotransmissores e neuromoduladores encontrados no cérebro e em grande parte do SNC. O principal neurotransmissor utilizado na via transversal envolvendo os fotorreceptores, as bipolares e as ganglionares desse tecido é o glutamato. As populações heterogêneas de células amácrinas empregam um amplo espectro de neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo a substância P, a

dopamina, encefalinas, o glucagon, a somastatina, a serotonina, a acetilcolina, a neurotensina, o neuropeptídeo Y, o glutamato, o GABA, entre outros (Mey e Thanos, 2000).

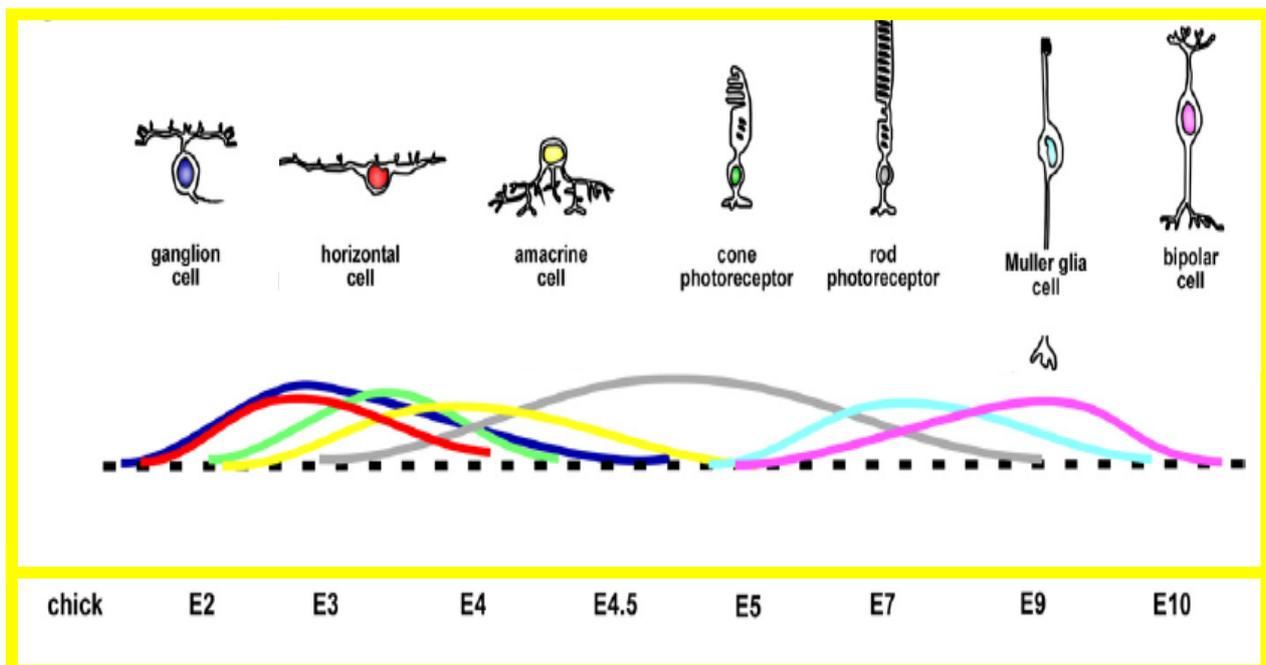
Recentemente, tem sido verificado que o ATP também possui um papel na neurotransmissão retiniana. Foi verificado, por exemplo, que a estimulação de células gliais retinianas “in situ” é capaz de provocar um aumento na concentração de ATP extracelular, acompanhado por um aumento na amplitude das ondas de cálcio entre células gliais adjacentes. Além disto, preparações de culturas primárias de retina possibilitaram identificar neurônios colinérgicos, células ganglionares (CGRs), astrócitos e células de Müller como alvos celulares do ATP extracelular neste tecido. Por outro lado, em um estudo sobre a expressão e distribuição dos diferentes tipos de receptores de nucleotídeos na retina, ficou evidenciado que membros de ambos os grupos de receptores P2X e P2Y são expressos em tipos celulares da retina adulta, identificados como células bipolares, células de Müller e células ganglionares (Innocenti et al., 2004).

### **1.3. Desenvolvimento e neurogênese da retina**

O padrão básico de mitose, migração celular transversal e diferenciação relembram o processo encontrado no tubo neural precoce. Em cortes de retina neural de pinto de 5 dias, se observam dois extratos distinguíveis, a zona ventricular e a camada neuroblástica. A zona ventricular adjacente ao futuro epitélio pigmentar contém principalmente células em mitose (Mey e Thanos, 2000). Depois de sofrer mitose, os progenitores migram para o lado vitreal, dentro da chamada camada neuroblástica. Inicialmente, estes precursores neurais experimentam um período de rápida divisão celular, o qual permite a expansão do estoque de progenitores celulares da retina. Seus núcleos migram transversalmente pela camada neuroblástica durante o ciclo celular. Enquanto a fase S do ciclo celular ocorre na região mais próxima ao vítreo, a divisão celular ocorre na camada mais próxima ao epitélio pigmentar (EP). Este processo de migração dos núcleos entre as 2 regiões da camada neuroblástica foi denominado de Movimento Nuclear Intercinético (Martins e Pearson, 2007)

O ambiente extracelular experimenta mudanças dramáticas com a saída das células progenitoras do ciclo celular (Martins e Pearson, 2007). À medida

que mais células se tornam pós-mitóticas, a retina passa da fase de proliferação para a de diferenciação. Os neuroblastos retinianos saem do ciclo celular numa ordem específica com respeito ao seu tipo celular (Figura 2). As primeiras células a se diferenciarem são as células ganglionares (~10% são pós-mitóticas em E2), seguidas pelas amácrinas e horizontais (~2%- 3% são pós-mitóticas em E4), fotorreceptores (~7% são pós-mitóticas em E5). As células de Müller começam a sair do ciclo ao mesmo tempo que os fotorreceptores, em torno de E4. Já as células bipolares são as últimas células a sair do ciclo celular (~4% são pós-mitóticas em E6) (Prada et al., 1991). À medida que o desenvolvimento avança, a quantidade de células pós-mitóticas aumenta consideravelmente na retina. Por exemplo, a saída do ciclo celular dos precursores dos fotorreceptores alcança 50% em E7 e 100% em E10. Já 50% das células de Müller são também pós-mitóticas em E8 e 100% em E12. As células bipolares alcançam sua gênese em E7 (35%), alcançando 50% em E8 e 100% em E12 (Prada, et al., 1991) (Figura 2).



**Figura 2. Histogênese da retina de galinha.** Tempos e seqüências da neurogênese dos diversos tipos celulares durante o desenvolvimento da retina de galinha. Note as células ganglionares como as primeiras em aparecer num embrião de 2 dias, no entanto as células bipolares seriam as ultimas em aparecer num embrião de 10 dias (Retirado de Martins e Pearson, 2007).

Em sequência à saída do ciclo celular, mas nem sempre de forma imediata, as células da retina se diferenciam tanto morfológica quanto bioquimicamente. Na retina de pinto, por exemplo, as células amácrinas dopaminérgicas nascem entre os estágios de E3 e E7 e passam a expressar a tirosina hidroxilase após o estágio de E12, diferenciando-se morfológica em E14 (Hokoç et al., 1990). Já as enzimas relacionadas à síntese e degradação de acetilcolina, como a colina acetiltransferase (ChAT) e a acetilcolinesterase (AchE), encontram-se nas células amácrinas colinérgicas antes da sinaptogênese (Spira, et al., 1987). O transmissor inibitório GABA, por outro lado, é encontrado tanto em células amácrinas (Wulle e Wagner, 1990), quanto horizontais e ganglionares já no estágio de E6 (Hokoç et al., 1990).

De forma semelhante a outros tipos de astrócitos de outras partes do SNC, as células de Müller expressam a proteína fibrilar acídica glial (GFAP) nos estágios precoces da retina embrionária (Ikeda et al., 1980). Willbold e Layer (1998) sugerem que os precursores imaturos das células de Müller servem como um sistema de referência para migração celular e de suporte para a sinaptogênese. No entanto, a enzima glutamina sintetase, cuja função mais importante é a reciclagem sináptica do glutamato, aparece apenas em células gliais de Müller já diferenciadas de retinas mais amadurecidas (Willbold e Layer, 1998).

Um grande número de moléculas de sinalização secretadas, tais como fatores de crescimento, neurotrofinas e neurotransmissores têm sido implicados na regulação da proliferação celular da retina em desenvolvimento. Fatores de crescimento como VEGF ( fator de crescimento endotelial vascular) e TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformante  $\beta$  ) têm sido implicados no controle da proliferação de células progenitoras retinianas de camundongo (Close et al., 2005; Hashimoto et al., 2006). Outros fatores ainda como o sonic hedgehog (Shh), também têm sido mostrados como importantes reguladores (Wang et al., 2005). Além disto, progenitores por si mesmos podem ser capazes de sintetizar e liberar certos neurotransmissores envolvidos no controle da proliferação celular neste tecido (Martins e Pearson, 2007).

Dentre os diversos fatores que influenciam a proliferação celular durante o desenvolvimento da retina, os nucleotídeos têm sido fortes candidatos a desempenhar o papel de indutores de proliferação de precursores, uma vez

que a resposta da retina à estimulação purinérgica mostrou ser predominante no período proliferativo deste tecido (Pearson et al., 2002; Sakaki et al., 1996; Sugioka et al., 1996). Na retina embrionária de galinha, por exemplo, entre os dias embrionários 3 e 6, a ativação de receptores P2Y2/4 por ATP exógeno ou UTP induz a proliferação celular de progenitores retinianos. Muito provavelmente, estes precursores darão origem a fotorreceptores, células amácrinas, ganglionares ou horizontais (Pearson et al., 2005; Pearson et al., 2002; Sugioka et al., 1999). Dois ou três dias depois, entre E6 e E8, a ativação de receptores P2Y1 por ATP exógeno ou ADP induz proliferação de progenitores de desenvolvimento tardio tais como progenitores de células gliais e/ou bipolares (Sanches et al., 2002; França et al., 2007). Esta resposta é mediada pela ativação da PLC, PKC e MAP cinases (Nunes et al., 2007; Sanches et al., 2002).

## **2. ATP**

### **2.1. ATP como neurotransmissor**

Adenosina-5'-trifosfato (ATP) é um composto amplamente reconhecido como uma fonte de energia intracelular. Entretanto, inúmeras evidências consideram este nucleotídeo como uma molécula importante na sinalização extracelular (Burnstock, 2006). De maneira geral, o ATP funcionaria como um fator de crescimento, participando na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, além de modular a excitabilidade neuronal e a liberação de outros neurotransmissores. No entanto, este nucleotídeo também pode atuar como um agente tóxico, mediando a degeneração e morte celular (Illes e Ribeiro, 2004; Franke e Illes, 2006). O ATP também foi implicado no controle do sistema Nervoso Periférico (SNP), no tônus dos vasos sanguíneos, na angiogênese, na dor, nas interações glia-neurônio, entre outros fenômenos (Burnstock, 2006).

Tem sido evidenciado que a liberação vesicular de ATP pode ocorrer juntamente com a liberação de transmissores clássicos tais como acetilcolina, noradrenalina, GABA, dopamina, ou glutamato no sistema nervoso central, levantando a possibilidade de que fibras nervosas sintetizem, armazenem e liberem mais de um transmissor (Franke e Illes, 2006). Adicionalmente, foi mostrada a co-localização de ATP com peptídeos tais como o neuropeptídeo Y

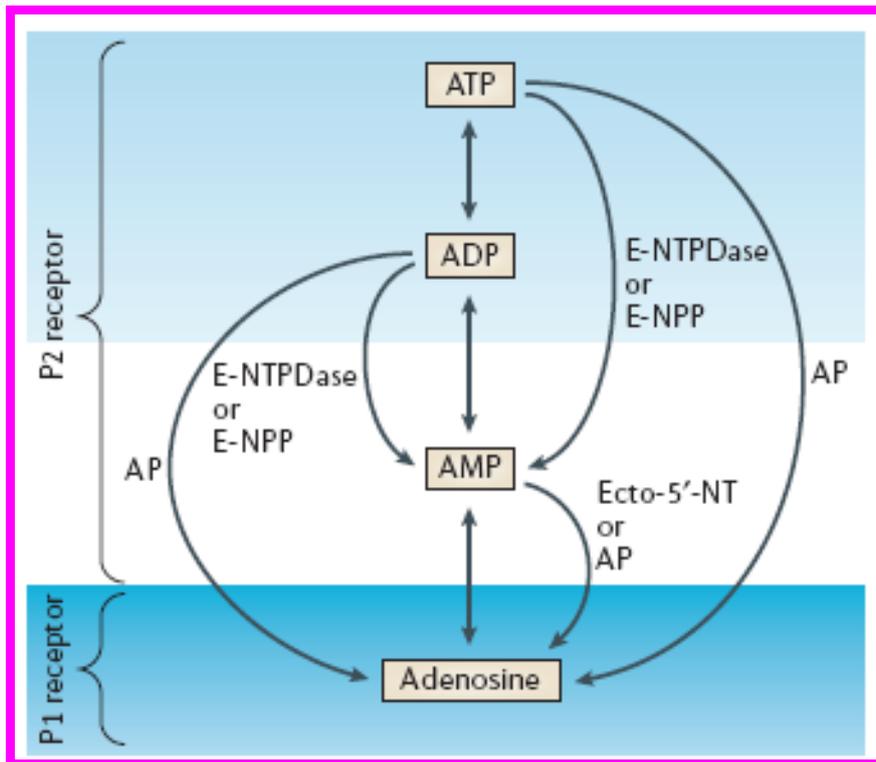
(NPY), o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), a substância P (SP), assim como o óxido nítrico (NO), o que sugere poder ocorrer uma modulação na liberação dessas substâncias por este nucleotídeo (Burnstock, 2004).

ATP pode ser liberado por outros mecanismos: 1) por ruptura da membrana celular em células lesadas ou injuriadas; 2) pela membrana celular intacta usando transportadores de membrana plasmática ou canais formados por conexinas (Cx43) (Cotrina et al., 2000), ou através de transportadores ligados a canais aniônicos; 3) pela exocitose de vesículas sinápticas (neurônios) ou grânulos intracelulares (células não neuronais), através da fusão de vesículas dependente de  $Ca^{2+}$  à membrana (Franke e Illes, 2006). Outras evidências ainda sugerem um mecanismo onde o ATP seria liberado de astrócitos através de canais de membrana contendo um poro de grande diâmetro, tal como o receptor P2X<sub>7</sub> (Fields e Burnstock, 2006).

Embora alguns efeitos do ATP sobre a neurotransmissão retiniana tenham sido identificados, a regulação da liberação deste nucleotídeo neste modelo experimental ainda não foi totalmente elucidada. Deste modo, Santos et al. (1999), estudando culturas de retina enriquecidas em células amácrinas, observaram a liberação de ATP com a despolarização após células com KCl ou com a ativação de receptores de glutamato do tipo AMPA.

As ecto-ATPases, ectoapyrases e ectonucleotidases são enzimas que degradam o ATP liberado de neurônios e de células não neuronais, limitando as ações extracelulares deste nucleotídeo (Dunwiddie et al., 1997). Alguns exemplos de famílias destas enzimas são: ectonucleotidase trifosfato di-fosfohidrolase (E-NTPDases), ectonucleotídeo pirofosfatases (E-NPP), fosfatases alcalinas, ecto-5'-nucleotidase, ectonucleotidase di-fosfo-kinase (E-NDPK).

Enquanto a NTPDase1 hidrolisa o ATP diretamente para AMP e o UTP para UDP, a NTPDase2 hidrolisa o ATP para ADP e a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP para adenosina. A perda da atividade de ecto-ATPases produz o acúmulo do ATP extracelular em certas condições patológicas como injúria vascular (Zimmermann, 1996; Robson et al., 1997). (Figura 3).



**Figura 3. Receptores purinérgicos ligados ao ATP extracelular e os produtos de reação que resultam da hidrólise enzimática deste nucleotídeo por ectonucleotidasas.** Note que receptores P2 se ligam a ATP e ADP. No entanto, receptores P1 se ligam a adenosina. Os níveis de ATP são regulados por várias ectonucleotidasas, incluindo membros da família E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase). Ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT) e fosfatase alcalina (AP) catalisam a degradação do nucleotídeo para adenosina (Fields e Burnstock, 2006).

## 2.2. Receptores de ATP

Os receptores para ATP extracelular tem sido descritos em muitos tipos celulares, incluindo células endócrinas, hepáticas, macrófagos, plaquetas, fibroblastos e epitélio. No sistema nervoso, os receptores purinérgicos são encontrados em neurônios, astrócitos microglia, oligodendrócitos e células de Schwann (Fields e Stevens, 2000). Estes receptores são agrupados em ionotrópicos (P2X, canais ativados por ligante) e metabotrópicos (P2Y, receptores acoplados à proteína G) (Abbracchio e Burnstock, 1994). Até hoje, são conhecidos 7 subtipos de receptores P2X (P2X1–7) e 8 subtipos de P2Y (P2Y1,2,4,6,11–14), que foram clonados e caracterizados quanto à sua sensibilidade a agonistas e antagonistas (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock e Knight, 2004) (Tabela 1).

**TABELA 1. Distribuição, farmacologia e mecanismos de transdução dos diferentes subtipos de receptores P2X e P2Y.** Os receptores P2X basicamente são ionotrópicos tendo um canal catiônico intrínseco, a diferença dos receptores P2Y, os quais são acoplados a proteínas G (Fields and Burnstock, 2006).

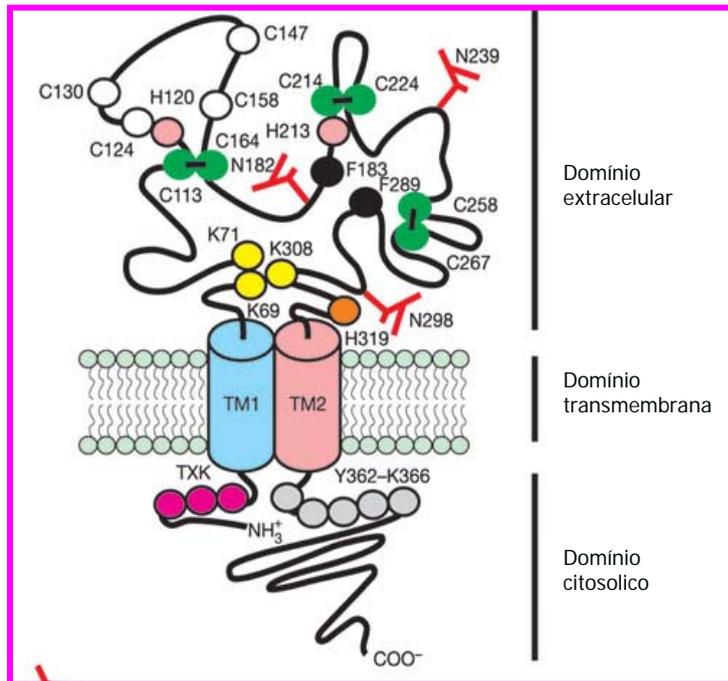
Receptor	Distribuição Principal	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transdução
P2X1	Músculo esquelético, plaquetas, cerebelo,	$\alpha, \beta$ -meATP = ATP = 2-meSATP	TNP-ATP, IP5I	Canal catiônico intrínseco ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Na}^+$ )
P2X2	Musculatura lisa, CNS, retina, células cromafines,	$\alpha, \beta$ -meATP (pH e sensível a zinco)	Suramina, isoPPADS, RB2	Canal catiônico intrínseco ( $\text{Ca}^{2+}$ )
P2X3	Neurônios sensoriais, neurônios do simpático	2-MeSATP $\geq$ ATP $\geq$ $\alpha, \beta$ -meATP $\geq$ Ap4A	TNP-ATP, PPADS A317491,	Canal catiônico intrínseco
P2X4	CNS, testículo, colon	$\alpha, \beta$ -meATP, CTP,	TNP-ATP, BBG	Canal catiônico intrínseco ( $\text{Ca}^{2+}$ )
P2X5	Células proliferantes em pele, intestino, bexiga, timo, cordão espinal	$\alpha, \beta$ -meATP, ATP $\gamma$ S	Suramina, PPADS, BBG	Canal catiônico intrínseco
P2X6	CNS, cordão espinal em neurônios motoras	-(não funciona como homomultímero)	-	Canal catiônico intrínseco
P2X7	Células apoptóticas: células imunes, pâncreas, pele	$\alpha, \beta$ -meATP	KN62, KN04, MRS2427, BBG	Canal catiônico intrínseco e poro
P2Y1	Células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células imunes, osteoclastos	2-MeSADP > 2-meSATP = ADP > ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500	Gq/G11; PLC- $\beta$
P2Y2	Células imunes, células epiteliais e endoteliais, plaquetas, rim	UTP = ATP, UTP $\gamma$ S,	Suramina > RB2	Gq/G11 e possível Gi; PLC- $\beta$ ativação
P2Y4	Células endoteliais	UTP $\geq$ ATP, UTP $\gamma$ S	RB2 > suramina	Gq/G11 e possível Gi; PLC- $\beta$ ativação
P2Y6	Algumas células epiteliais, placenta, células T, timo	ATP, UDP $\beta$ S	MRS2578	Gq/G11; PLC- $\beta$ ativação
P2Y11	Bazo, intestino, granulocitos	ARC67085 > BzATP $\geq$ ATP $\gamma$ S > ATP	Suramina > RB2, NF157	Gq/G11 e GS; PLC- $\beta$ ativação
P2Y12	Plaquetas, células gliais	ATP	CT50547, ARC69931MX,	Gi (Go); inibição de adenil ciclase
P2Y13	Bazo, cérebro, nodos linfóides, medula osea	ATP e 2-meSATP	MRS2211	Gi/Go
P2Y14	Placenta, tecido adiposo, estomago, intestino, regiões discretas do cérebro	UDP glucosa = UDP-galactosa	-	Gq/G11

### 2.2.1- Receptores P2X

Receptores P2X são uma família de canais ativados por ATP compostos de 7 subtipos de receptor (Ralevic and Burnstock, 1998; North, 2002). Cada subunidade que compõe os receptores P2X é composta por um domínio NH2 e um domínio COOH terminal intracelular citosólico, este último contendo um sítio de ligação consenso para proteínas cinases. Entre estes dois domínios, encontram-se 2 regiões transmembrana, sendo a primeira (TM1) envolvida na ativação do canal e a segunda (TM2) envolvida na formação do poro iônico. Nestes receptores encontra-se ainda uma grande alça extracelular com 10 resíduos de cistina conservados e formando uma série de pontes dissulfeto, uma região H5 hidrofóbica próxima ao poro, envolvida numa possível modulação do canal/receptor de cátions, e um sítio de ligação para o ATP nas regiões da alça extracelular adjacentes à TM1 e TM2 (Fields e Stevens, 2000) (Figura 4).

Evidências bioquímicas indicam que os receptores podem formar trímeros ou hexâmeros (Nicke et al., 1998). Agregados hetero-multiméricos de P2X2/P2X3, P2X4/P2X6 e P2X1/P2X5 têm sido descritos (Illes e Ribeiro, 2004). No entanto, o receptor P2X7 não parece se associar com nenhum outro receptor (Torres et al., 1999).

Os receptores P2X no SNC parecem ser predominantemente dos tipos P2X2, P2X4 ou P2X4/P2X6. Os receptores P2X permitem a passagem rápida e não seletiva de cátions através da membrana celular, resultando em um incremento na concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) e despolarização da membrana celular (North, 2002).



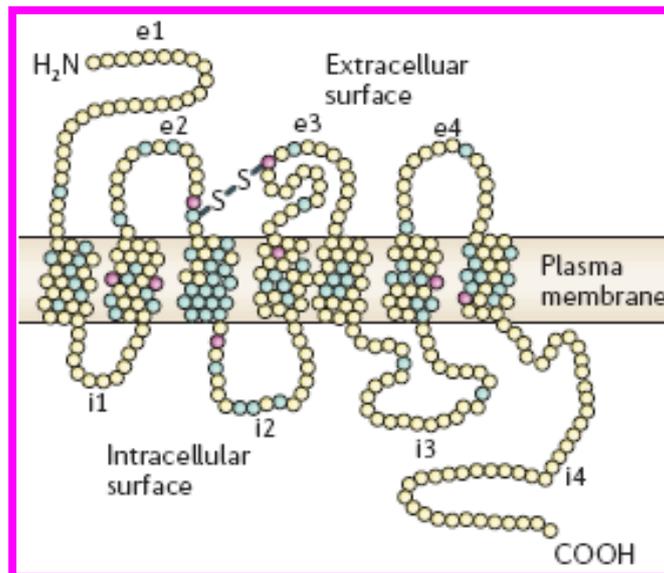
**Figura 4. Estrutura molecular das subunidades da família de receptores P2X.** Cada subunidade que compõe os receptores P2X é composta por um domínio NH<sub>2</sub> e um domínio COOH terminal intracelular citosólico. Entre estes dois domínios, encontram-se 2 regiões transmembrana, sendo a primeira (TM1) envolvida na ativação do canal e a segunda (TM2) envolvida na formação do poro iônico (Baljit et al., 2006).

A expressão de mRNA para os subtipos P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> foi detectada na retina de rato adulto (Brändle et al., 1998; Jabs et al., 2000), assim como as proteínas de receptores P2X foram confirmadas nas retinas de ratos adultos, macacos e humanos (Puthussery et al., 2004; Ishii et al., 2003; Pannicke et al., 2000).

### 2.2.2- Receptores P2Y

Os subtipos de receptores P2Y contêm a seguinte estrutura: uma região NH<sub>2</sub> extracelular, uma região COOH terminal intracelular contendo sítios de ligação consenso para proteína cinases e 7 regiões transmembrana (TM) (Figura 5). As alças intracelulares e o C-terminal apresentam uma diversidade estrutural entre os subtipos P2Y, o que influencia no grau de acoplamento com as proteínas Gq/11, Gs e Gi (Fields e Stevens, 2000). Em certas condições, os receptores P2Y podem formar agregados homo- ou hetero-multimérico e

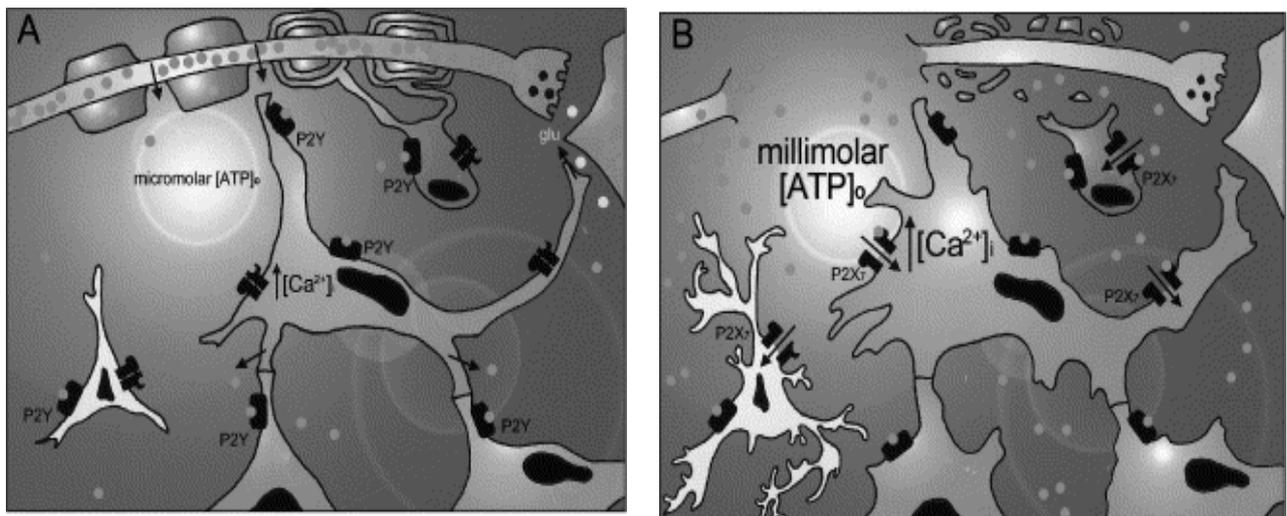
muitos tecidos expressam vários subtipos de receptores P2Y. P2Y1, P2Y12 e P2Y13 são ativados principalmente por nucleotídeos difosfatados. Já receptores P2Y2, P2Y4 e P2Y6 são ativados por nucleotídeos de purinas e pirimidinas. Receptores P2Y1, 2, 4, 6 e P2Y11 são acoplados através de proteínas Gq/11 à estimulação de fosfolipase C e subsequente formação de diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)-trisfosfato, o qual induz a mobilização de cálcio intracelular (Burnstock, 2006) (Tabela 1). Nosso grupo vem trabalhando com o receptor P2Y1, sendo caracterizado mecanismos de transdução intracelular tais como as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK), moléculas chaves na regulação da proliferação celular na retina (Nunes et al., 2007; Sanches et al., 2002), a fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K) que medeia processos como apoptose celular, sobrevivência celular e proliferação e a serina treonina cinase AKT que promove a sobrevivência e inibição da apoptose celular.



**Figura 5. Estrutura molecular de receptores P2Y.** Cada subunidade apresenta uma região NH<sub>2</sub> extracelular, uma região COOH terminal intracelular contendo sítios de ligação consenso para proteína cinases e 7 regiões transmembrana (TM) (Figura 5). (Fields e Stevens, 2000).

Em células de Müller, mRNAs para receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 (Fries, et al., 2005) e receptores P2X3, P2X4, P2X5 e P2X7 (Jabs, et al., 2000; Pannicke, et al., 2000) têm sido relatados, sugerindo que células gliais respondam a nucleotídeos no tecido retiniano.

Uma diferença bastante importante entre as famílias de receptores P2Y e P2X (pelo menos em relação ao receptor P2X<sub>7</sub>) refere-se às concentrações de nucleotídeos necessárias para sua ativação. De maneira geral, receptores P2Y são ativados por concentrações menores do que as concentrações que ativam plenamente os receptores P2X. Desta forma, foi mostrado que baixas e altas concentrações de ATP evocam 2 respostas distintas de Ca<sup>2+</sup> na glia do nervo óptico, o que seria uma evidência relacionada com o tipo de receptor P2Y ou P2X ativado. O aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> glial mediado por receptores P2Y é dependente da liberação de estoques intracelulares que diminuem durante a exposição ao ATP. Por outro lado, James e Butt, (2002), mostraram que receptores P2X somente evocam influxos grandes de Ca<sup>2+</sup> em concentrações altas de ATP, sugerindo que eles teriam um papel específico mas não exclusivo na patologia celular glial. Esta possibilidade tem suporte na observação de astrócitos reativos que apresentam um relativo decréscimo de receptores P2Y e uma “up-regulation” de receptores P2X (Figura 6).



**Figura 6. Modelo do duplo papel de receptores P2Y e P2X na fisiologia e patologia de células gliais do SNC.** A) Astrócitos com baixas concentrações de ATP (microMolar) B) astrócitos incubados com altas concentrações de ATP (miliMolar). Os receptores P2X somente evocam influxos grandes de Ca<sup>2+</sup> em concentrações altas de ATP, sugerindo que eles teriam um papel específico mas não exclusivo na patologia celular glial (James e Butt, 2002).

### **3. Morte Celular**

#### **3.1. Aspectos gerais**

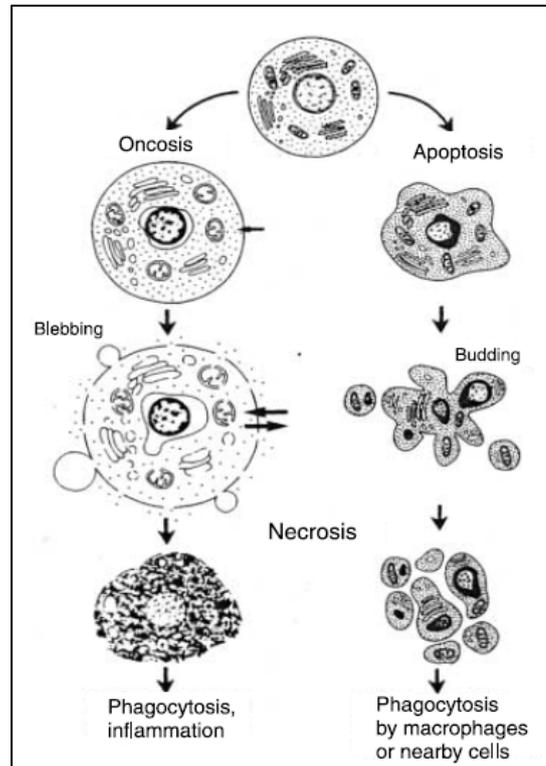
A morte celular programada é um fenômeno fisiológico conhecido por ter um papel na morfogênese associada com o desenvolvimento embrionário normal em vertebrados e invertebrados.

Na utilização de certos termos na morte celular, é bom fazer diferenças entre denominações tais como apoptose, oncose, necrose e morte celular programada. A apoptose é marcada pelo encolhimento celular, condensação e marginação da cromatina, além de alteração na membrana plasmática com eventual ruptura das células em corpos apoptóticos. Morte celular marcada por inchaço celular deveria ser chamada de oncose.

O termo morte celular refere-se à rota fixada e seguida por células que estão morrendo, com ou sem morfologia característica de apoptose (Cruchten e Broeck, 2002).

Schweichel e Merker, (1973) identificaram três tipos de morte celular. Tipo 1 é manifestada por condensação nuclear e picnose, volume citoplasmático reduzido, fragmentação celular tardia e fagocitose (identificada por Kerr, et.al., (1972), como apoptose). Tipo 2, ou degeneração autofágica é caracterizado por vacuolização autofágica no citoplasma. Tipo 3, ou morte celular citoplásmica, é caracterizado pela desintegração geral e deleção de organelos (necrose).

Clarke, (1990) distinguiu 2 subtipos de morte celular citoplasmática, tipo-3A de desintegração não lisosomal e tipo-3B citoplásmica (Yakovlev e Faden, 2004) (Figura 7).



**Figura 7. Representação esquemática dos tipos de morte celular já caracterizados e classificados.** Tipo 1 identificada por Kerr, et.al., (1972) como apoptose. Tipo 3, ou morte celular citoplásmica (necrose). A oncose é caracterizada por inchaço e seria uma característica inicial na morte celular (Van Cruchten e den Broeck 2002).

Kroemer et al., (2007), num trabalho de revisão, apresentam quatro tipos de morte: autofagia, catástrofe mitótica, necrose e apoptose. A autofagia envolveria a ativação explosiva de enzimas catabólicas permitindo a destruição de estruturas celulares e organelas. Este processo é um fenômeno lento, no qual partes do citoplasma são seqüestradas dentro de vacúolos de membrana dupla e que são ao final digeridas por hidrolases lisosomais (Kroemer e Jaattela, 2005).

A catástrofe mitótica representa um tipo de morte que ocorre durante a mitose celular e que é diferente de uma morte por apoptose que, na maioria dos casos, ocorre durante a intérfase. Este fenômeno envolve eventos de micronucleação e multinucleação que ocorrem antes da morte celular. Este tipo de morte resulta de uma combinação entre a passagem deficiente pelos pontos de checagem do ciclo celular e o dano celular (Castedo et al., 2004). Uma falha na parada do ciclo celular antes ou durante a mitose pode ativar uma segregação de cromossomos aberrantes, fenômeno que poderia culminar então na ativação das vias apoptóticas e finalmente na destruição celular.

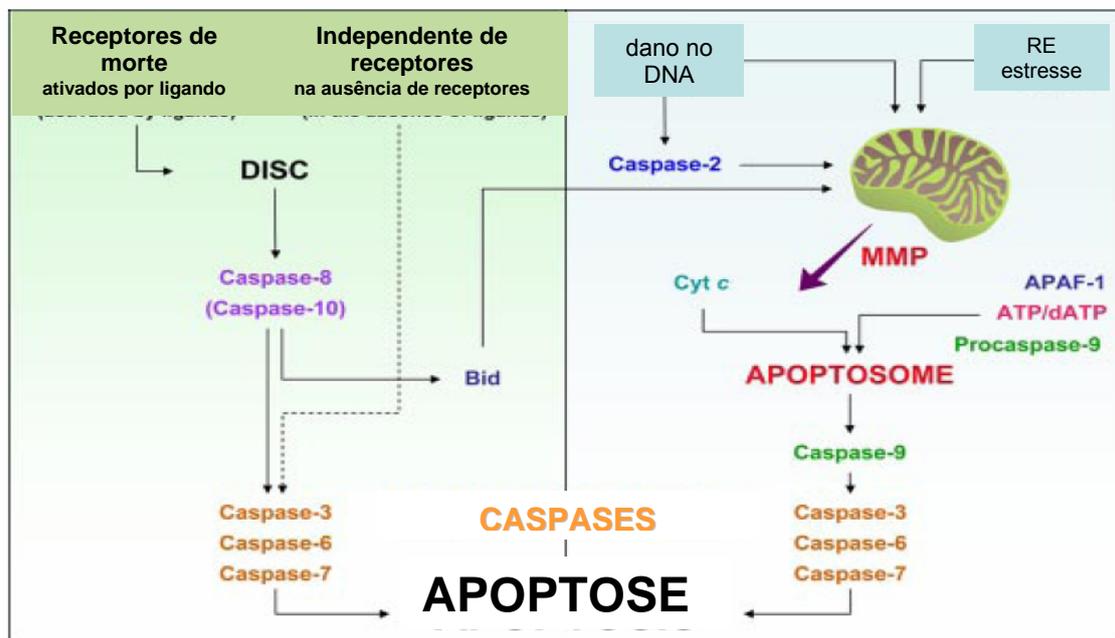
A decisão celular de morrer por necrose ou apoptose é determinada ao menos em parte pela abundância de estoques de energia intracelular. Enquanto a apoptose requer uma quantidade mínima de ATP intracelular, a necrose é geralmente acompanhada pela total depleção de ATP (Nicotera, 1998). A necrose não é geneticamente predeterminada e normalmente ocorre dentro de um período curto após a ativação da injúria (2–4 h). A necrose é considerada danosa por ser associada com perda celular patológica e porque as células necróticas promovem inflamação local que produz efeitos letais.

No processo apoptótico, são conhecidas três vias de ativação na apoptose:

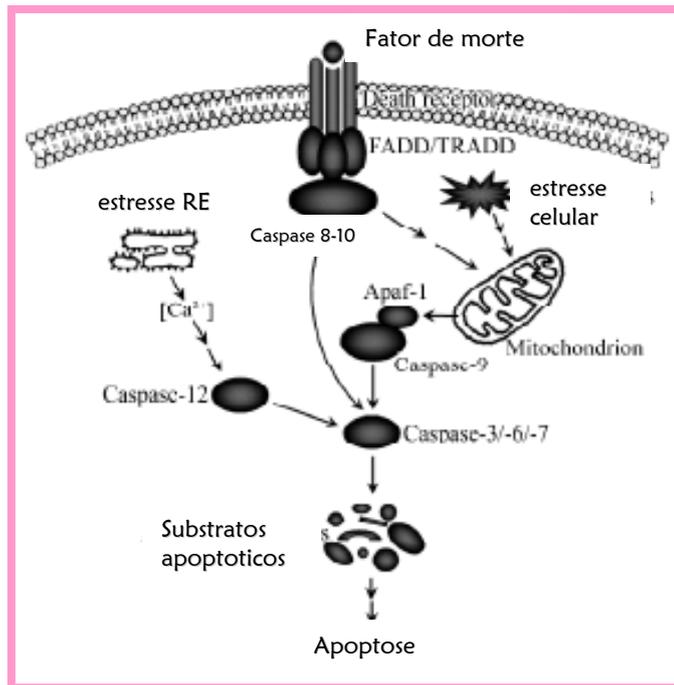
A) Via extrínseca, mediado pela interação ligante–receptor. Os ligantes unidos a receptores de morte pertencem à superfamília de citocinas TNF, incluindo TNF, Fas ligante (FasL) e TRAIL. Estes receptores unidos ao ligante são trimerizados e recrutam proteínas adaptadoras ao domínio de morte citosólico (DD). Assim os receptores Fas- e TRAIL se associam a proteínas de domínio de morte FADD e TRADD, respectivamente. Subsequentemente, as proteínas se ligam a caspase-8 e/ou 10 formando o complexo DISC, onde as caspases iniciadoras são ativadas (Kroemer, et.al., 2007). B) Via intrínseca, mediado pela via mitocondrial. A liberação de proteínas pró-apoptóticas pequenas normalmente localizadas no espaço intermembranar da mitocôndria, caracterizariam esta via. Uma vez no citosol, as proteínas pró-apoptóticas como a citocromo c, a smac/Diablo, o fator indutor de apoptose (AIF), e endonuclease G (endoG) ativariam vias dependentes ou independentes de caspases. Na via dependente o citocromo c se liga a Apaf-1 formando o apoptosoma, onde a procaspase-9 é recrutada e ativada na presença de ATP ou dATP. Após esta associação, a caspase-9 cliva a caspase-3 e/ou 7 atuando sobre a DNase ou PARP e permitindo a fragmentação de DNA (figura 8). Na via independente de caspase, o AIF se transloca ao núcleo onde induz fragmentação de DNA e condensação de cromatina, em conjunto com endoG que induz fragmentação de DNA internucleosomal (Kroemer et al., 2007). C) A terceira via envolve o retículo endoplasmático com a caspase-12 (figura 9). A caspase 12 localiza-se no reticulo endoplasmico e media apoptose baixo estresse do reticulo endoplasmico (RE). Esta caspase-3 tem um role importante em doenças do sistema nervosa, tais como doença de Alzheimer.

Estresse do RE é principalmente causado pela acumulação de proteínas, particularmente não plegadas no lúmen do RE e/ou a alteração da homeostase de cálcio.

Destes três mecanismos, a ativação de caspases é responsável pelas mudanças morfológicas observadas durante a apoptose (Cruchten e Broeck, 2002) (Figura 8). As cisteína-proteases chamadas caspases são responsáveis pelas fases da ativação da apoptose, a iniciadora e a executora. A caspase-3 é uma enzima executora responsável pelas mudanças morfológicas que incluem a contração celular, o “blebbing” da membrana e a desintegração nuclear (Coleman et.al., 2002).



**Figura. 8. Vias clássicas de ativação da apoptose.** Esquerda: Via extrínseca. A ativação induzida por ligante de receptores de morte induz o acoplamento do complexo de sinalização indutor de morte (DISC) sobre o lado citoplásmico da membrana plasmática. Este promove a ativação da caspase-8 (e possivelmente caspase-10), que é capaz para clivar caspases efetoras como -3, -6, e -7. Caspase-8 poderia também ativar Bid por proteólise que promoveria a permeabilização de membrana mitocondrial (MMP) e representaria a principal ligação entre as duas vias de ativação de apoptose. A via extrínseca inclui também uma via independente de receptores, que levariam uma sinal de morte na ausência de ligantes. Direita: Via intrínseca. Vários sinais intracelulares, incluindo dano de DNA e estresse do retículo endoplasmico (ER), convergem sobre a mitocôndria e induzem MMP, que causaria a liberação de fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranar (IMS). Entre estes, o citocromo c (cyt c), o fator ativador de protease de apoptose 1 (APAF-1) e o ATP/dATP formariam o apoptosoma, uma plataforma molecular que promoveria a maturação proteolítica da caspase-9. A caspase-9 ativa, por sua vez, clivaria e ativaria as caspases efetoras, que finalmente permitiriam observar o fenótipo apoptótico. O dano de DNA poderia também ser um sinal para a ativação de caspase-2, que atuaria upstream da mitocôndria favorecendo MMP (Kroemer, et.al., 2007).



**Figura. 9. Caspase-12 envolvida na apoptose ativada por estresse do RE.** Apaf-1, Fator-1 de ativação de protease apoptótica; ER, retículo endoplasmático; FADD, domínio de morte associada a Fas; TRADD, domínio de morte associado ao receptor do fator de necrose tumoral (Fan et al., 2005).

A contração dinâmica e o “blebbing” da membrana vistas nas células apoptóticas são dependentes da força intracelular gerada pelo citoesqueleto de actina-miosina. Estes eventos morfológicos são controlados pela efetor da Rho GTPase ROCK I, uma serine treonina cinase que tem um papel central na regulação das estruturas de actina do citoesqueleto (Croft et al., 2005).

O dano do DNA nuclear e a ligação dos receptores da membrana plasmática tem sido reconhecidos como ativadores iniciais da apoptose que induzem a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) e/ou ativação direta das caspases. Evidências acumuladas sugerem que outras organelas, como o retículo endoplasmático (RE), os lisosomas e o aparelho de Golgi, também são pontos de integração da sinalização pró-apoptótica e o sensor de dano (Ferri e Kroemer, 2001).

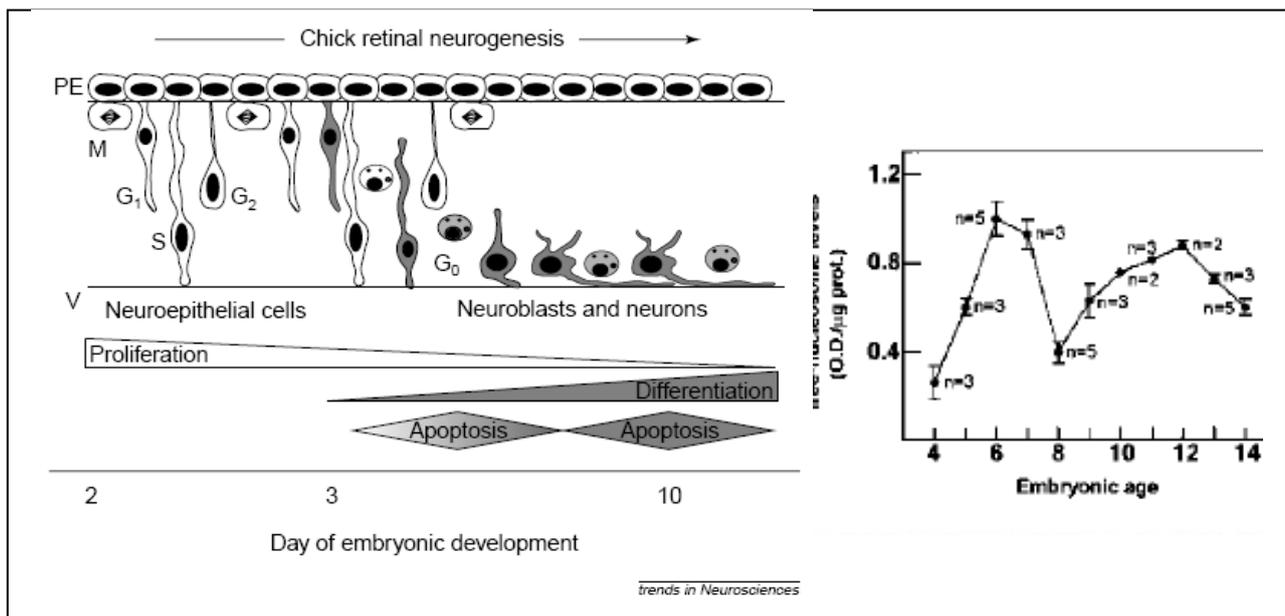
O RE detecta o estresse local através das chaperonas, proteínas ligadas ao  $Ca^{2+}$  e aos canais de liberação de  $Ca^{2+}$ , que podem transmitir as respostas

do  $\text{Ca}^{2+}$  do RE para a mitocôndria. O retículo endoplasmático também contém várias proteínas ligadas ao Bcl-2, proteína responsável por liberar parte do efeito citoprotetor dentro do RE. Já o aparelho de Golgi constitui um sítio privilegiado para a geração do gangliosídeo mediador pró-apoptótico GD3 envolvido na ativação da caspase-2 e que poderia servir como uma organela de armazenamento de receptores de morte latentes. A maioria das respostas específicas de morte das organelas finalmente permitiriam também a ativação da MMP ou a ativação de caspases, ambas podendo funcionar como integradores centrais de rotas de morte. Portanto, respostas por lisosomas, pelo Golgi ou pelo RE parecem ter uma rota comum (Ferri e Kroemer, 2001).

### **3.2. Morte Celular no desenvolvimento da retina**

A morte celular programada, chamada também morte celular natural, morte celular fisiológica ou apoptose (Oppenheim, 1985), tem um papel importante na regulação do número de neurônios no sistema nervoso em estágios precoces do desenvolvimento. Este fenômeno tem sido bastante analisado durante o desenvolvimento da retina de galinha, encontrando-se duas ondas de morte celular neste tecido (Cuadros e Rios, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Frade et al., 1996; Diaz et al., 1999; Mayordomo, et al., 2003).

A primeira onda toma lugar entre os estágios de E4 e E7 e é parcialmente sobreposto com o período de neurogênese e diferenciação de células ganglionares (Cuadros e Rios, 1988). A segunda onda ocorre entre os estágios de E10 e E14, quando as células ganglionares começam a ser dependentes do suporte trófico de seus alvos (Vecino, et al., 2004). Na CNI, células picnóticas aparecem durante o estágio embrionário de E8. No entanto, os maiores níveis de apoptose são observados nesta camada apenas em E11 (Cook, et al., 1998) (Figura 10).



**Figura 10. Representação esquemática do curso temporal da morte celular, proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento da retina de embrião de galinha.** Note que a morte celular é um processo que ocorre naturalmente durante a gênese precoce dos neurônios da retina embrionária de galinha. Neste tecido, ocorrem duas fases de apoptose: uma fase envolvendo a morte de precursores neurais de diversos tipos celulares (pico em E5) e uma segunda fase envolvendo a morte de células ganglionares e outros neurônios em diferenciação ou já diferenciados (pico em E10). PE, epitélio pigmentar; V, superfície vitreal (De la Rosa e De Pablo, 2000). Quadro inserido: ondas de morte avaliadas por níveis de DNA nucleosomal na retina embrionária de galinha (Frade, et.al., 1996)

Tem sido mostrado que neurotrofinas tais como o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4) apresentam um papel importante no desenvolvimento da retina embrionária de galinha (Vecino, et al., 2004) e que alguns destes fatores podem estar envolvidos na indução e regulação da morte celular neste tecido. Foi mostrado, por exemplo, que o NGF durante o desenvolvimento controla a morte celular programada de neuroblastos pós-mitóticos jovens através da sua ligação ao receptor p75, atuando, portanto, como um fator de morte que controlaria a provisão de novos neurônios gerados neste tecido (Frade, et al., 1996). Neste tecido ainda, a aplicação “in ovo” de BDNF previne a morte celular retiniana durante o período precoce de desenvolvimento (E5-7). Já a NT-3, cuja participação na morte celular não foi demonstrada, promoveria a diferenciação de células

neuroepiteliais para neurônios durante o desenvolvimento deste tecido (Frade, et al., 1999).

Além dos fatores citados acima, a pró-insulina endógena também tem sido apontada como um fator protetor na morte celular fisiológica que ocorre durante os estágios precoces do desenvolvimento da retina de galinha. A produção local deste hormônio seria através da ativação de via de sobrevivência mediada pela Akt (Díaz et al., 2000).

Por outro lado, o fator de crescimento transformante-beta (TGF-beta) e as proteínas morfogenéticas do osso (BMP) são moléculas extracelulares conhecidas por mediar a morte celular programada (PCD) na retina em desenvolvimento. Em culturas organotípicas de retina de galinha, Franke et al. (2006) demonstraram uma apoptose de células ganglionares aumentada quando as culturas eram incubadas com TGF-beta ou BMP4. Além disso, a incubação conjunta dos tecidos com os dois fatores induziu um aumento ainda maior na morte celular, sugerindo uma cooperação de vias pró-apoptóticas mediadas por estes dois fatores.

Em outro trabalho ainda, Valenciano et al. (2002), estudando a biotina (vitamina H), encontraram que esta substância reduziu a apoptose na retina sem afetar a taxa de proliferação celular neste tecido, sugerindo que um conteúdo adequado de biotina é necessário para a correta morfogênese do olho.

Em outros estudos com a finalidade de avaliar o papel de vários fatores de crescimento na morte celular que ocorre naturalmente no desenvolvimento da retina neural de galinha, Yokoyama et al. (1997) examinaram a morfologia nuclear e o conteúdo de DNA em culturas de retinas embrionárias de galinha. Estes autores verificaram que o fator de crescimento epidermal, o fator derivado de plaquetas, o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a dexametasona não tiveram efeito na morte celular nestas culturas. No entanto, um efeito na morte celular foi verificado com o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) que poderia então atuar como um fator letal induzindo apoptose durante o desenvolvimento da retina neural de galinha.

Finalmente, embora algumas evidências sugiram que a adenosina previna a morte celular por apoptose (Ferreira, et.al, 2001) o ATP parece

causar tanto apoptose como necrose (Di Virgilio et al., 1998). Além disto, apesar dos efeitos de morte induzidos pelo ATP serem relativamente bem caracterizados, pouco ou nada tem sido relatado sobre a sinalização ou os mecanismos bioquímicos ativados na apoptose ou necrose por este nucleotídeo. Os efeitos deste nucleotídeo na morte celular serão mais detalhados nos tópicos seguintes.

### **3.3. Morte celular e ATP**

ATP extracelular tem sido mostrado por ativar morte celular em diferentes populações celulares não neuronais (Di Virgilio et al., 1998). Receptores P2X compartilham uma estrutura relacionada com as “degenerinas” de *Caenorhabditis elegans* e canais de Na<sup>+</sup> sensíveis ao amiloride de mamíferos (ENaCs). Dependendo da dose do ATP, de tempo de estimulação e do subtipo de receptor ativado, tanto necrose quanto apoptose poderiam ser ativadas.

Amadio et al. (2002) demonstraram que a aplicação aguda de concentrações tóxicas de ATP induz mudanças morfológicas visíveis em culturas de células granulares de cerebelo. Estas mudanças têm características tanto apoptóticas como necróticas, caracterizadas por inchaço celular, formação de “blebs” na membrana plasmática e agregação da cromatina nuclear. Além disso, as células também apresentaram liberação extracelular de lactato desidrogenase citosólica, aparentemente induzida por altos níveis de glutamato. Os mesmos autores mostraram que receptores P2 dos tipos P2X1, P2X4, P2Y1 e P2Y4 eram fracamente expressos, mas que o receptor P2X7 estava marcadamente aumentado.

Uma interação consistente entre os sistemas mediados por ATP e por glutamato parece existir e por isso foi sugerido que a liberação de glutamato induzida por ATP poderia contribuir para os efeitos citotóxicos deste neurotransmissor (Choi, 1988). Tem sido mostrado que o próprio ATP pode ser um agente tóxico para culturas neuronais primárias, dissociadas ou organotípicas, de córtex cerebral, de striatum e de cerebelo (Amadio et al., 2002). Isto permitiu estabelecer que o ATP extracelular poderia ser um importante mediador de eventos neuropatológicos na injúria cerebral, sendo a concentração extracelular *in vivo* de purinas dependente de um balanço entre

sua liberação das células e sua recaptação e metabolismo extracelular (Franke e Illes, 2006). Os mecanismos purinérgicos podem ser correlacionados com a etiopatologia de muitas condições neurodegenerativas, especialmente na liberação massiva extracelular de ATP, adenosina e outros neurotransmissores na desordem/injúria aguda e crônica.

A inativação farmacológica de receptores P2 protege neurônios do SNC contra morte celular induzida, sugerindo um papel pró-apoptótico para a sinalização purinérgica. (Volonte e Merlo, 1996, Volonte et al., 1999). Por outro lado, a ativação de receptores P2X parece ter efeitos tanto pró- quanto anti-apoptóticos. Suzuki et al. (2004) mostraram que a ativação de receptores P2X<sub>7</sub> em microglia permite a produção de TNF que teria um efeito neuroprotetor contra a morte celular induzida por glutamato.

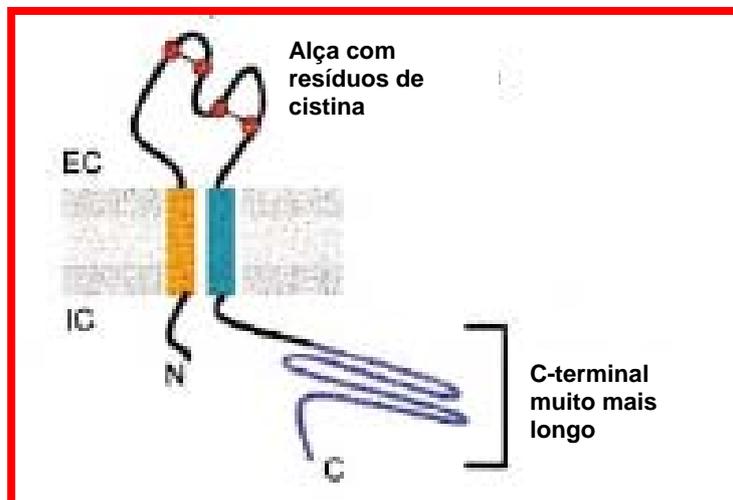
Resta et al. (2005) mostraram que células colinérgicas de retina de rato neonatal expressam receptores P2X<sub>7</sub>, podendo ser estas células a fonte de ATP endógeno neste tecido. Além disto, estes autores verificaram que aplicações de 1 mM de ATP nestes tecidos isolados rapidamente induziu um processo de morte de neurônios colinérgicos individuais. A morte destes neurônios foi caracterizada por “blebbing” da membrana, perda de integridade de membrana, exposição de fosfatidil-serina sobre a superfície externa da membrana celular e finalmente pela diminuição do tamanho celular. Foi sugerido então que o ATP extracelular, através da indução de morte celular, participaria do controle do número e da densidade de células amácrinas colinérgicas durante o desenvolvimento deste tecido.

#### **3.4. P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>: Receptor de Morte Celular**

Como relatado anteriormente, os receptores P2X são canais iônicos ativados por ATP. Existem sete subtipos diferentes nesta família de receptores que formam complexos de receptores funcionais contendo canais iônicos homo e/ou hetero-oligoméricos. O receptor P2X<sub>7</sub> parece funcionar somente na forma homo-oligomérica, sendo ativado por concentrações relativamente altas de ATP.

A subunidade do receptor P2X<sub>7</sub> é composta de 595 amino-ácidos, com 35 – 40% de homologia com os outros seis membros da família de receptores P2X (Surprenant et al., 1996). A estrutura do receptor apresenta 2 domínios

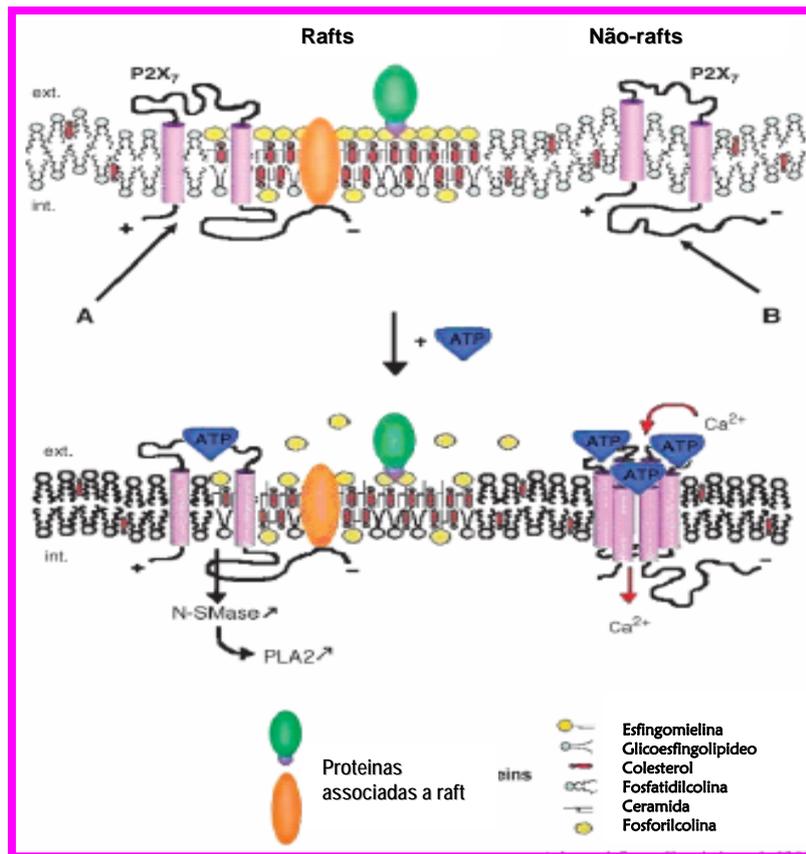
transmembrana (M1, M2) e uma grande alça extracelular, sendo esta última uma característica própria do receptor P2X<sub>7</sub>. O domínio intracelular carboxi-terminal é muito mais longo (239 aa) do que aquele das outras subunidades (27–129 aa) (Figura 11).



**Figura 11. Estrutura molecular da subunidade do receptor P2X<sub>7</sub>.** A estrutura do receptor apresenta 2 domínios transmembrana (M1, M2) e uma grande alça extracelular, sendo esta última uma característica própria do receptor P2X<sub>7</sub>. O domínio intracelular carboxi-terminal é muito mais longo (239 aa) do que aquele das outras subunidades (27–129 aa) (Baljit et al., 2006).

Barth et al. (2007) determinaram uma massa molecular de 80 kDa para o receptor P2X<sub>7</sub> da linhagem celular epitelial E10, consistente com a massa encontrada para a linhagem celular de epitélio alveolar R3/1. Duas populações do receptor purinérgico P2X<sub>7</sub> podem ser detectadas na membrana plasmática de células E10.

Uma população discreta associada com “rafts” lipídicos e uma outra população encontrada em membranas de alta densidade. Os receptores presentes em microdomínios de alta densidade são envolvidos na formação de um canal não seletivo que é independente da hidrólise de esfingomielinina e ativação da PLA2. Já os receptores presentes em “rafts” regulam a atividade de uma N-esfingomielinase, iniciando uma cascata que permite a ativação da PLA2 (Figura 12).



**Figura. 12. Modelo resumido das duas subpopulações de receptores P2X<sub>7</sub> na glândula submandibular de rato.** Painel acima: A membrana plasmática é heterogênea com microdomínios ricos em esfingolípídios e colesterol (rafts) dispersos em uma fase fluida contendo principalmente glicerofosfolípidios. A) Uma fração de receptores P2X<sub>7</sub> interatua com uma proteína localizada no rafts. Painel de embaixo: Os receptores são ativados de duas formas. Os receptores localizados na fração não "raft" (B) são associados com a formação de um canal não seletivo. Os receptores associados com "rafts" (A) são acoplados com a ativação de N-esfingomielinase e liberação de fosforilcolina e ceramidas de esfingolípídios dos rafts. A Fosfolipase A2 (PLA2) é ativada em resposta a estimulação de N-SMase. Ext, extracelular; int, intracelular. (García-Marcos, et al., 2003).

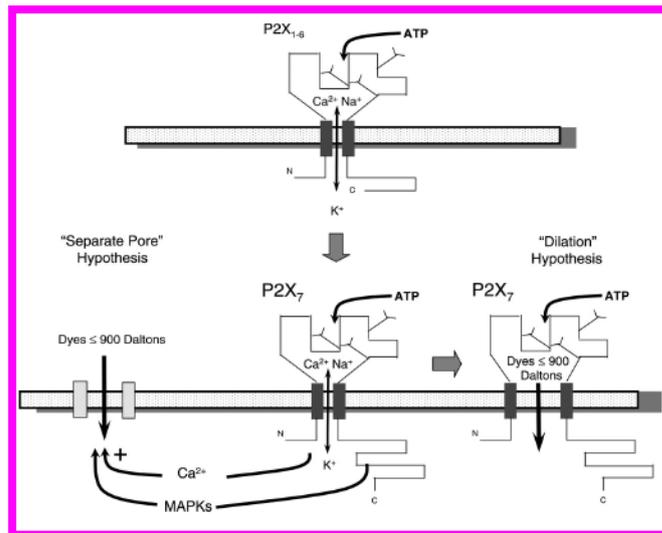
Inúmeros resultados confirmam que os receptores P2X<sub>7</sub> regulam muitas vias da função imune em células imunocompetentes (Di Virgilio et al., 2001). Foi mostrado, por exemplo, que estes receptores participam na regulação da expressão e secreção de citocinas e mediadores inflamatórios incluindo IL-1 $\beta$  (Gudipaty et al., 2003), IL-1ra (Wilson et al., 2004), IL-2 (Loomis et al., 2003), IL-4, IL-6, IL-13, IL-18 (Sluyter et al., 2004), TNF $\alpha$  (Bulanova et al., 2005), NO (Hu et al., 1998) e ânions superóxidos (Suh et al., 2001).

Adicionalmente, receptores P2X<sub>7</sub> também foram envolvidos na função efetora direta de células imunes, tais como formação de células gigantes

multinucleares (Falzoni et al., 1995) e morte de mycobacterium (Myers et al., 2005). Estes sítios também transmitem a sinalização da morte celular via permeabilização de membrana, reorganização de citoesqueleto (Pfeiffer et al., 2004) e ativação de caspase-1 (Bulanova et al., 2005; Donnelly-Roberts et al., 2004), além de promoverem a proliferação de células linfóides (Baricordi et al., 1996, 1999), dependendo da intensidade da estimulação do receptor.

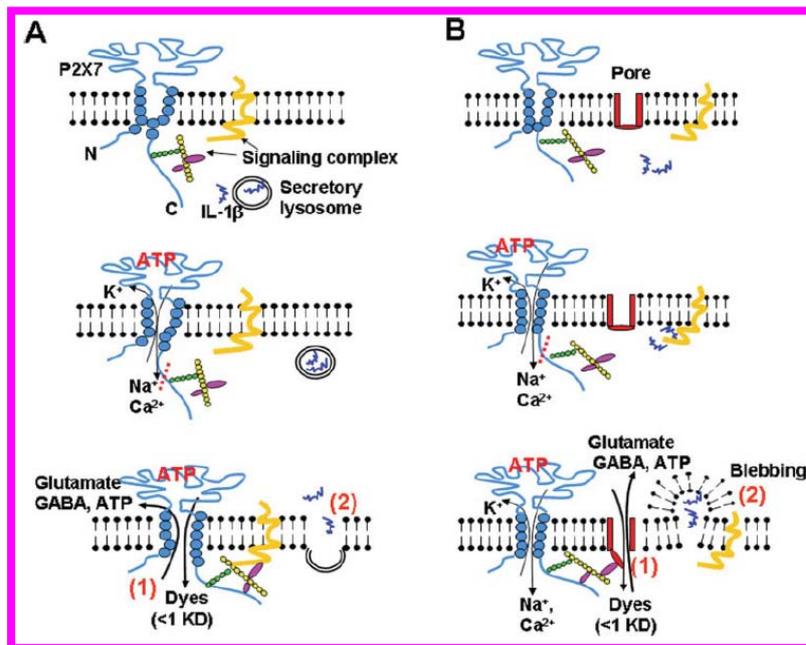
Além de possuir um canal seletivo para íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , os receptores  $\text{P2X}_7$  também estão associados com a abertura de um poro não seletivo que permite a passagem de moléculas de até 900 Da (Di Virgilio et al., 2001; Morelli et al., 2001). A formação deste poro, que parece ser dependente apenas do receptor  $\text{P2X}_7$ , não tem uma via de sinalização bem descrita. Entretanto, experimentos de “patch-clamp” realizados em macrófagos sugerem que a abertura do poro induzido pelo ATP requer um sinal intracelular (Faria, et.al., 2005).

Por outro lado, a seqüência de aminoácidos dos receptores  $\text{P2X}_7$  difere da seqüência de outros membros da família de receptores  $\text{P2X}$  pela presença de um carboxi-terminal maior, contendo aproximadamente 240 aminoácidos, os quais acredita-se estarem envolvidos na transdução de sinal deste receptor (Adriouch et al., 2002; Surprenant et al., 1996). Kim et al. (2001) mostraram que a defosforilação do resíduo 343Tyr do receptor  $\text{P2X}_7$  é requerida para a abertura do canal, levantando a possibilidade de que cinases e fosfatases poderiam estar envolvidas na formação do poro. De fato, a ativação de cinases como as ERKs 1 e 2 dependente de ativação de receptores  $\text{P2X}_7$  foi demonstrada em macrófagos (Cruz et al., 2006). Faria et al. (2005) afirmam que um sustentado aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  celular e ativação de MAP cinases são requeridos para observar a formação do poro não para a atividade do canal catiônico do receptor  $\text{P2X}_7$ . Amstrup e Novak (2003) mostrara que o  $\text{P2X}_7$  também ativa as ERK1 e ERK2. Também demonstraram que o carboxi-terminal é importante para a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como o NH2 terminal provavelmente estaria envolvido na ativação das ERKs (Liang e Schwiebert, 2005) (Figura 13).



**Figura 13. Hipóteses para a formação do poro associado ao canal do receptor P2X7.** Esquema superior. Topologia dos canais de receptores P2X, P2X1–6. Esquema inferior esquerdo: modelo favorecendo a transdução de sinal induzida pelo P2X7 para abrir uma proteína de membrana associada próxima e separada que serviria como um poro permeável a corantes (Liang e Schwiebert, 2005).

Duan e Neary (2006) revisaram duas hipóteses para a abertura do poro do receptor P2X<sub>7</sub> (Figura 13). A primeira hipótese estabelece uma “dilatação direta” do receptor para a formação do poro e a ativação de “lisossomas secretórios” para a liberação de citocinas. De acordo com esta hipótese, no início da ativação do receptor P2X<sub>7</sub>, este se comportaria como um canal catiônico permeável a pequenos cátions incluindo Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup>. Entretanto, a ativação sustentada do receptor resultaria na ativação de segundos mensageiros e no rearranjo de elementos do citoesqueleto (complexo de sinalização) associados com o C-terminal dos receptores P2X<sub>7</sub> para eventualmente induzir a formação do poro permeável a moléculas de até 900 Da e a exocitose de citocinas (IL-1 $\beta$ ) por lisossomas secretórios. A outra hipótese postula a existência de um “poro separado” e a formação de microvesículas ou de “blebs” de membrana para a liberação de citocinas. Nesta hipótese, a ativação do complexo de sinalização devido à ativação sustentada do receptor P2X<sub>7</sub> induziria a abertura de um poro ainda não identificado, não seletivo e permeável para moléculas grandes e o brotamento da membrana plasmática para formar microvesículas (blebbing) que eventualmente difundiriam as citocinas no espaço extracelular (Duan e Neary, 2006) (Figura 14).



**Figura. 14. Ilustração esquemática para a hipótese corrente explicando a abertura do poro e liberação de citocinas induzidas pela ativação de receptor P2X<sub>7</sub>.** A) Dilatação direta para a formação do poro e secreção do lisosoma secretório. B) Hipótese do poro separado para a abertura do poro e formação de “blebs” de membrana (microvesícula) (Duan e Neary, 2006).

A formação do poro é caracterizada pela captação de marcadores fluorescentes de alto peso molecular, tais como YO-PRO, Lucifer yellow, ou Brometo de Etideo, seguida pela reorganização do citoesqueleto, por “blebbing” da membrana plasmática (Virginio et al., 1997, 1999) e, eventualmente, pela morte das células imunes. Embora mais recentemente tenha sido evidenciado o fenômeno de permeabilização por outras subunidades tais como os receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>4</sub> (Khakh et al., 1999; Virginio et al., 1999), a propriedade de dilatação do poro é geralmente associada somente com receptores P2X<sub>7</sub>.

Locovei et al. (2006) postularam que a panexina-1 seria a proteína envolvida na permeabilização do poro (ou canal receptor de morte), uma vez que esta proteína é recrutada no complexo de sinalização de morte do receptor P2X<sub>7</sub>. A panexina-1 é uma proteína de membrana identificada recentemente que poderia atuar como um poro não seletivo permeável a corantes como brometo de etídeo. Pelegrin e Surprenant (2006) encontraram que a panexina-1 poderia ser um hemi-canal ativado pelo P2X<sub>7</sub> que promoveria a captação do

corante, assim como a sinalização subsequente e a liberação de interleucina - 1.

Uma das mudanças observadas na apoptose induzida pelo receptor P2X<sub>7</sub> é a formação de “blebs” na membrana plasmática por um mecanismo reversível (Morelli et al., 2003). O “blebbing” da membrana plasmática induzido por este receptor depende da ativação da proteína cinase serina/treonina ROCK I em células HEK293 que expressam este receptor. Além disto, estes receptores P2X<sub>7</sub> induzem depleção completa do K<sup>+</sup> intracelular, ativação da caspase-3, degradação da lamina nuclear, fragmentação de DNA, condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Morelli et al., 2003).

ATP ou BzATP induzem uma mudança marcante na aparência das células HEK293 transfectadas com o receptor P2X<sub>7</sub> de rato. Após 30s de aplicação contínua de BzATP (30 μM), a membrana plasmática começa a desenvolver “blebs”. Após 1 ou 2 minutos, estas alterações chegam a ser múltiplas e algumas vezes coalescem. O aparecimento do primeiro “bleb” pode ser retardado pela remoção de sódio extracelular. Os “blebs” da membrana desenvolvem grandes protusões da membrana plasmática, com diâmetros de 1 à 10 μm. Eles são precedidos pela presença de pequenas vesículas (1 μm de diâmetro) que podem chegar a ser numerosas. O “blebbing” da membrana plasmática e a microvesiculação que ocorrem após a ativação do receptor P2X<sub>7</sub> não têm sido relatados para outros membros da família de receptores P2X e parece provável refletirem mecanismos de sinalização subsequentes que não estão relacionados ao movimento de íons através da membrana (Morelli et al., 2003)..

Heather et al. (2002) mostraram que o domínio C-terminal do receptor P2X<sub>7</sub> é responsável pelo fenótipo do “blebbing” celular. Foi mostrado que a proteína denominada proteína-2 de membrana epitelial (EMP-2) é capaz de se associar com o domínio C-terminal do receptor P2X<sub>7</sub>. Este receptor também interage com outros membros da família de proteínas de membrana epitelial EMP-1, EMP-3 e PMP-22. Desta forma, a associação entre receptores P2X<sub>7</sub> e EMPs, poderia ter envolvimento em alguns dos mecanismos de sinalização subsequentes à ativação do receptor.

A expressão do receptor P2X<sub>7</sub> na retina foi mostrada em humanos (Pannicke et al., 2000), ratos (Brändle et al., 1998) e macacos (Ishii et al.,

2003). Brandle et al. (1998), estudando a retina de rato adulto, detectaram RNAm para os receptores P2X<sub>7</sub> neste tecido, sendo a presença destes sítios claramente visualizada na camada nuclear interna (INL) e na camada de células ganglionares (GCL), indicando que tanto RGCs quanto subpopulações de células amácrinas expressam este tipo de receptor.

## 2. Objetivos

A partir das evidências relatadas acima sobre morte celular e ATP na retina, resolvemos investigar as seguintes questões neste trabalho:

- Definir se o ATP é capaz de induzir a morte celular na retina de embrião de galinha no período embrionário de 7 dias através do método do MTT para viabilidade celular;

- Caracterizar o tipo de morte induzida pelo ATP, utilizando técnicas e marcadores específicos para a apoptose como: imunofluorescência para ativação de caspase-3, eletroforese horizontal para identificação de fragmentação de DNA, análise de condensação de cromatina por coloração com DAPI além de uma técnica marcadora para a necrose, a liberação de LDH.

- Caracterizar farmacologicamente o receptor P2X<sub>7</sub> como o provável receptor envolvido nesta resposta, utilizando o BzATP como agonista e os antagonistas específicos BBG e KN-62. Além disso, sabendo da característica de permeabilização induzida por estes receptores, resolvemos utilizar o corante fluorescente brometo de etídeo para determinar este fenômeno por microscopia de fluorescência em nossas culturas.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Culturas mistas de células de retina:**

Culturas de células de retina de embriões de pinto foram obtidas como descrito anteriormente (Paes de Carvalho e De Mello, 1982) usando embriões de 7 dias de incubação. As retinas dissecadas em solução salina estéril, livre de cálcio e magnésio, foram incubadas com tripsina 0.1 %, a 37°C, por 25 min. Em seguida, a tripsina foi retirada e a dissociação mecânica realizada em um tubo com 5 ml de meio MEM, suplementado com 2% de soro fetal bovino e antibióticos. A densidade de células foi estimada em câmara de Neubauer. Para os experimentos de MTT, LDH e extração de DNA foram semeadas  $5 \times 10^6$  células em cada placa de 35mm. A densidade de células semeada para os experimentos de permeabilização e imunocitoquímica foram de  $3 \times 10^6$  células/placa. Após 24 hrs, o meio das culturas foi trocado e as culturas mantidas em estufa à 37°C, em ambiente de 95% ar, 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

#### **3.2 Culturas purificadas de glia**

As culturas purificadas de glia foram obtidas usando o mesmo protocolo utilizado para a obtenção de culturas complexas. Nesse caso as culturas foram feitas com embriões de 7 dias e mantidas por cerca de duas semanas de cultivo. A densidade de células semeada foi de  $5,0 \times 10^6$  por placa de 35mm, sendo o meio trocado regularmente 2 vezes por semana. A viabilidade celular foi mensurada através da técnica de MTT.

#### **3.3. Culturas purificadas de neurônios**

Antes do início da cultura, as placas foram tratadas com solução de Poliornitina 0.25% por 24 h. Após este período, as placas foram lavadas 2 vezes com 1 ml de água milli-Q estéril e preenchidas com 1 ml de meio MEM contendo soro 2% + antibióticos e incubadas em estufa 37°C. A densidade de células semeadas foi de  $0.8 - 1 \times 10^6$  células/placa. O meio destas culturas não foi trocado até o dia do experimento normalmente realizado no segundo dia de cultivo. A viabilidade celular foi mensurada através da técnica de MTT.

### **3.4 Culturas enriquecidas em glia**

As culturas enriquecidas em glia foram obtidas usando o mesmo protocolo utilizado para a obtenção de culturas complexas. Nesse caso as culturas foram feitas com embriões de 11 dias e mantidas por 10 dias de cultivo. A densidade de células semeada foi de  $5,0 \times 10^6$  por placa de 35mm, sendo o meio trocado regularmente 2 vezes por semana. A permeabilização celular foi avaliada pela captação de brometo de etídeo  $5 \mu\text{M}$ .

### **3.5. Culturas enriquecidas em neurônios**

Antes do início da cultura, as placas foram tratadas com solução de Poli-ornitina 0.25% por 24 h. Após este período, as placas foram lavadas 2 vezes com 1 ml de água milli-Q estéril e preenchidas com 1 mL de meio MEM contendo soro 2% + antibióticos e incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ . Uma alteração no protocolo das culturas purificadas de neurônios foi que para a dissociação mecânica se utilizo uma pipeta Pasteur minimamente afilada. A densidade de células semeadas foi de  $0.8 - 1 \times 10^6$  células/placa. O meio destas culturas não foi trocado até o dia do experimento realizado no terceiro dia de cultivo. A permeabilização celular foi avaliada pela captação de brometo de etídeo  $5 \mu\text{M}$ .

### **3.6. Ensaio de viabilidade celular**

A morte celular foi estimada através do ensaio colorimétrico de viabilidade celular descrito por Mosmann (1983). Neste método, o reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: tetrazol) é reduzido para formazan púrpura pelas mitocôndrias de células vivas, uma vez que acontece somente quando a enzima reductase mitocondrial está ativa. Deste modo, a conversão do reagente MTT a formazan é diretamente relacionada ao número de células vivas e a efetividade do agente em causar a morte das células pode ser inferida através de uma curva dose resposta. MTT na concentração de 1.5 mg/mL foi adicionado às culturas de células de retina de embrião de galinha em E7C2 (7 dias de incubação, 2 dias de cultura). Após 4 horas de incubação, as culturas foram lavadas com solução salina completa (Hank's) a  $37^\circ\text{C}$  e a camada de células da placa contendo o formazan insolúvel foi dissolvida numa mistura de HCl 12 N e álcool isopropílico absoluto (6:1). Após este procedimento, a absorbância do material foi determinada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 650 nm.

### **3.7. Avaliação da morte celular necrótica por liberação de lactato desidrogenase (LDH)**

A integridade da membrana celular de culturas de retina de embrião de galinha ( $5 \times 10^6$  células/placa) estimuladas por agonistas de nucleotídeos foram avaliadas pela liberação de LDH para o meio de cultura. Alíquotas de 50  $\mu$ l do meio foram removidos das culturas nos tempos de estímulo estabelecidos. Para a estimativa do conteúdo de LDH intracelular, ao final dos experimentos as células foram lisadas com 1% (v/v) de Triton X-100. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada em mistura de reagentes contendo lactato (substrato), NAD, metassulfato de fenazina (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, contidos todos no kit de dosagem da Doles para análises clínicas. O procedimento foi adaptado para culturas celulares. Ao final da incubação com os reagentes, a presença de LDH foi estimada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 510 nm.

### **3.8. Fragmentação de DNA**

A fragmentação de DNA foi determinada pela técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5%. A extração de DNA foi realizada mediante o protocolo do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Depois que as culturas foram tratadas com as drogas, foi retirado o meio de cultura e colocado em um tubo eppendorf para ser centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos e o pellet reservado. Seguidamente, as células foram lisadas com Tampão de Digestão (600  $\mu$ L) [NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%] e o lisado colocado no eppendorf contendo o precipitado obtido da centrifugação anterior. Em seguida, foi incubado overnight a 53 °C e colocado em fenol/cloroformo/álcool isoamílico (25:24:1), em uma proporção de 1:1, centrifugado a 13 500 rpm por 10 minutos e precipitado com isopropanol (2.5 x). O DNA obtido foi secado e hidratado em TAE e as amostras submetidas a eletroforese em gel de agarose. O gel foi corado com brometo de etídeo (1  $\mu$ g/ml) e visualizado sob luz Ultra Violeta.

### **3.9. Imunofluorescência para caspase-3 clivada (Asp175)**

Culturas de retina de embrião de galinha em E7C2 com densidade de  $3 \times 10^6$  células/ placa foram tratadas com ATP 3 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM por 20 min.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.16 M, pH 7.6, por 30 min, seguido por 3 lavagens com PBS, por 5 min. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS/Triton 0.1% contendo NGS (soro normal de cabra) e BSA 5%, por 60 min. Em seguida, as placas foram incubadas com antisoro monoclonal anti-caspase 3 clivada (Cell Signaling), na diluição de 1:100, overnight, a 4°C. As culturas foram lavadas 3 x com PBS por 5 min. e depois incubadas com anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo Alexa-Fluor 568 (Molecular Probes), por 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram fotografadas num microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse 2000.

### **3.10. Ensaio de permeabilização celular**

Para os ensaios de permeabilização celular induzida por ATP ou BzATP, culturas de E7C2 foram expostas ao fluorocromo brometo de etídeo (5  $\mu$ M). Resumidamente, o meio das culturas foi trocado por solução salina de Hank's sem  $\text{Ca}^{2+}$  e sem  $\text{Mg}^{2+}$  e as culturas estimuladas por 15 min com ATP 3 mM ou BzATP 0.1 mM e simultaneamente tratadas com brometo de etídeo. Após este período, as placas de cultura foram lavadas 2 vezes com Hank's sem  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  e a fluorescência captada pelas células visualizada e fotografada num microscópio invertido Nikon Eclipse 2000, utilizando o filtro de fluorescência para rodamina.

### **3.11. Morfologia nuclear por DAPI**

Culturas de retina de embrião de galinha ( $3 \times 10^6$  células/placa) foram marcadas com DAPI para caracterizar a morfologia nuclear. Culturas tratadas ou não com ATP 3 mM, BzATP ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram fixadas com paraformaldeído 4% por 3 e 5 horas. e lavadas 3 vezes com PBS, pH 7.6. DAPI, na concentração de 1:1000 foi adicionado e as células incubadas por 30 segundos. As placas foram então imediatamente lavadas com PBS e fotografadas em microscópio de fluorescência.

## 4. Resultados

### 4.1. ATP INDUZ MORTE NAS CULTURAS DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA

A morte celular é essencial para a homeostase do número de células no organismo e é amplamente expandida no desenvolvimento do sistema nervoso. Um mecanismo conservado de morte celular pelo ATP extracelular (e-ATP) ativando receptores P2X7 foi descrito em células não neuronais (Falzoni et al., 1995; Girolomoni et al., 1993; Koshlukova et al., 1999). No entanto, Resta et.al. (2005) estudaram de que forma o ATP ativaria um mecanismo para o controle da morte dos neurônios colinérgicos retinianos durante o desenvolvimento normal de ratos. Com base nestes trabalhos, resolvemos estudar o efeito do ATP sobre a morte celular em culturas mistas de retina embrionária de galinha. Para isto, mediante o método do MTT de viabilidade celular, estabelecemos primeiramente a concentração e o tempo necessários para a estimulação deste mecanismo. Na figura 15A podemos observar que, utilizando um período de estimulação de 180 min, a viabilidade celular foi diminuída de forma dependente da concentração de ATP. Uma diminuição máxima de cerca de 25 a 30% foi observada em concentrações iguais ou maiores do que 1 mM do nucleotídeo. Este efeito foi mantido até pelo menos a dose de 5 mM. Já na figura 15B, podemos observar a cinética de tempo de indução de morte, sendo experimentados os períodos de 30, 60, 180, 360 e 480 min e uma concentração de ATP extracelular de 3 mM. Uma diminuição progressiva na viabilidade da cultura também foi observada nos primeiros 180 min de incubação das células com ATP. A partir deste tempo, uma morte máxima de 30% foi observada até pelo menos 480 min de incubação das células com 3 mM de ATP.

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um reconhecido agente indutor de morte celular tanto do tipo apoptótica quanto do tipo necrótica. Com o objetivo de checarmos o método de dosagem de morte celular em nossas culturas, resolvemos utilizar este agente como um controle positivo de morte celular. Utilizando concentrações de 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 e 1.5 mM e um período de incubação de 5 h, podemos observar que já na dose de 0.5 mM, um nível de aproximadamente 65% de morte celular foi alcançado (Figura 15A, quadro

inserido). Níveis de morte celular de aproximadamente 78 e 85% foram obtidos nas concentrações de 1.0 e 1.5 mM, respectivamente. Já a cinética de tempo (figura 15B, quadro inserido), utilizando os períodos de 60, 120, 360 e 480 minutos e uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0.5 mM, também revelou um decréscimo progressivo na viabilidade celular, sendo um nível de redução de 60.5% alcançado no tempo de 480 min. Estes dados, portanto, mostram que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma substância reativa de oxigênio (ROS) que causa estresse celular, é capaz de induzir morte em culturas de retina de embrião de pinto. A partir destes experimentos, incubações com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 0.5 mM por 5 horas foram utilizadas como controle positivo no restante deste trabalho.

Tendo em vista que a diminuição na viabilidade celular obtida com peróxido de hidrogênio chegou a ~60% e com ATP chegou somente a ~30%, resolvemos comparar a morfologia das culturas tratadas com estes 2 agentes na tentativa de investigar com mais detalhes os respectivos tipos de morte celular induzidas por estes compostos em nossas culturas. Nas figuras 16A, 16B e 16C, estão representadas a visualização por microscopia de fase (aumento de 400x), de culturas de retina de embrião de pinto tratadas ou não com 3 mM de ATP ou 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 e 5 horas, respectivamente. Podemos observar claramente tanto uma diferença na morfologia quanto um aumento na quantidade de células mortas birrefringentes nas culturas tratadas com ATP (figura 16B) ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 2C), quando comparado com culturas controle (figura 16A).

Frade, et.al., em 1997, estabeleceram a existência de pelo menos duas ondas distintas de morte celular durante a neurogênese da retina embrionária de pinto. A primeira onda de morte ocorreria entre os dias embrionários 5 e 7, um período onde a maioria dos neurônios da retina estariam sendo gerados e migrando para seus locais definitivos. Já a segunda onda corresponderia ao processo de morte de células ganglionares da retina após a inervação do tecto óptico e ocorreria principalmente entre os dias embrionários 10 e 14.

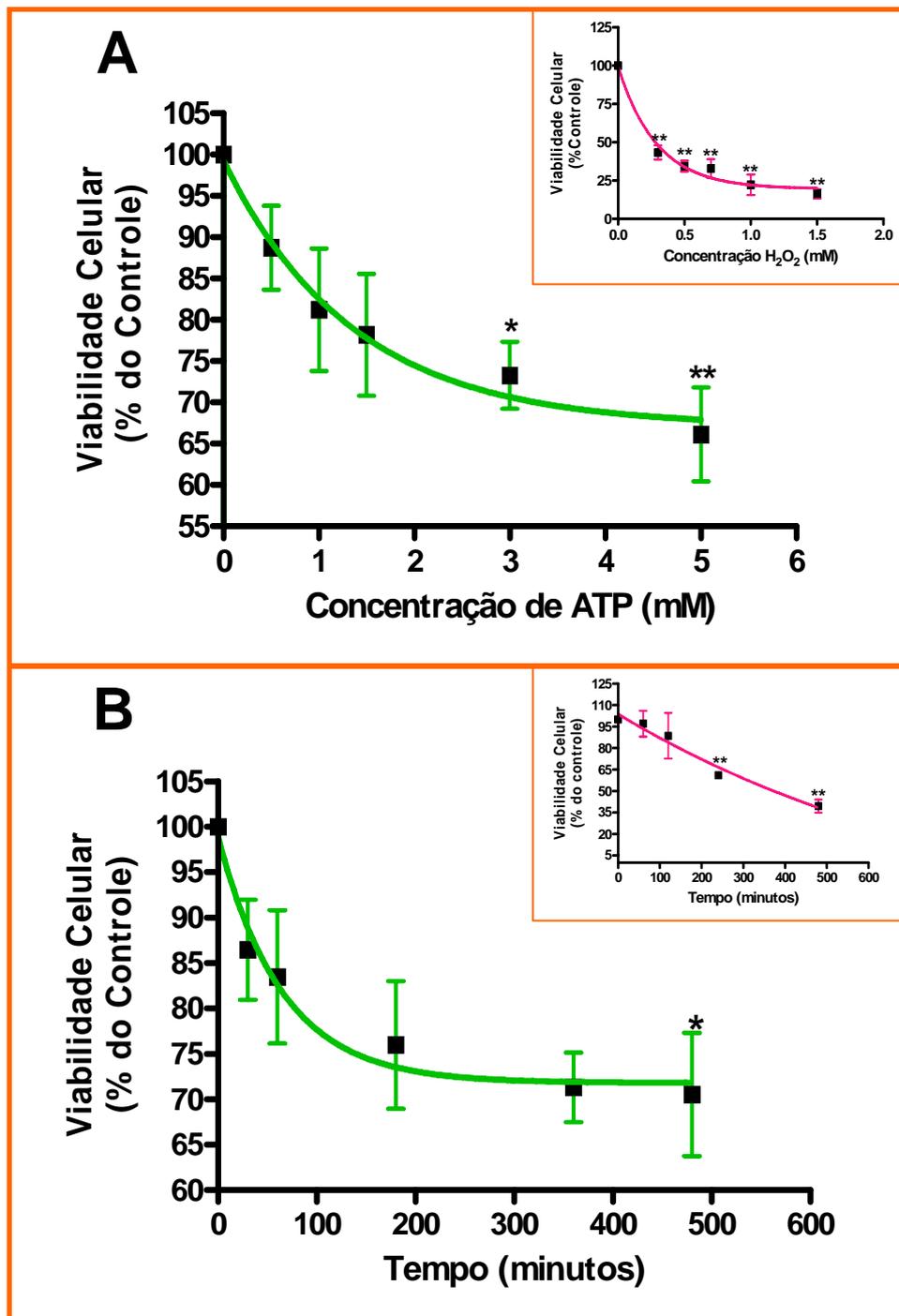
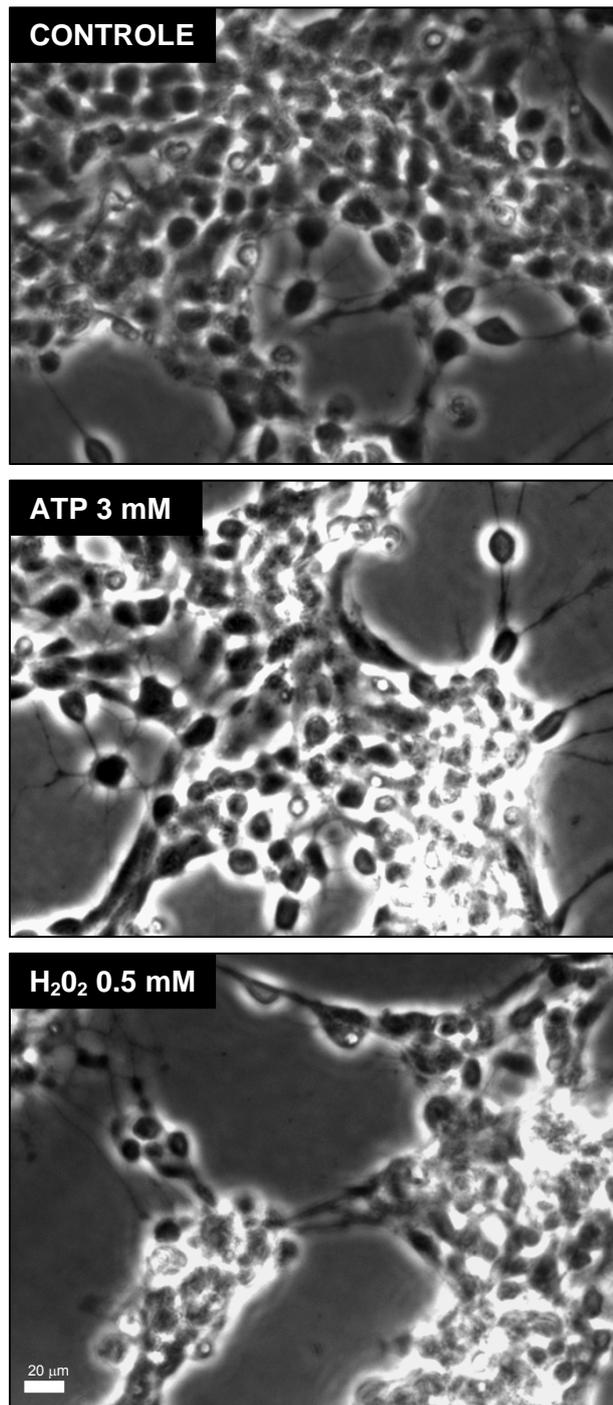


Figura 15. Efeito de ATP extracelular sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de galinha em E7C2. A) Curva de concentração do nucleotídeo. Culturas foram tratadas com concentrações crescentes de ATP por um período de 3 h. **Quadro inserido: Curva de concentração com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** B) Curva de tempo de incubação das culturas com 3 mM de ATP. **Quadro inserido: Curva de tempo de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Avaliação pelo método de MTT. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos realizados em quadruplicata. Significância é definida como  $p < 0.05$  (\*) e  $p < 0.001$  (\*\*) relacionada ao controle.



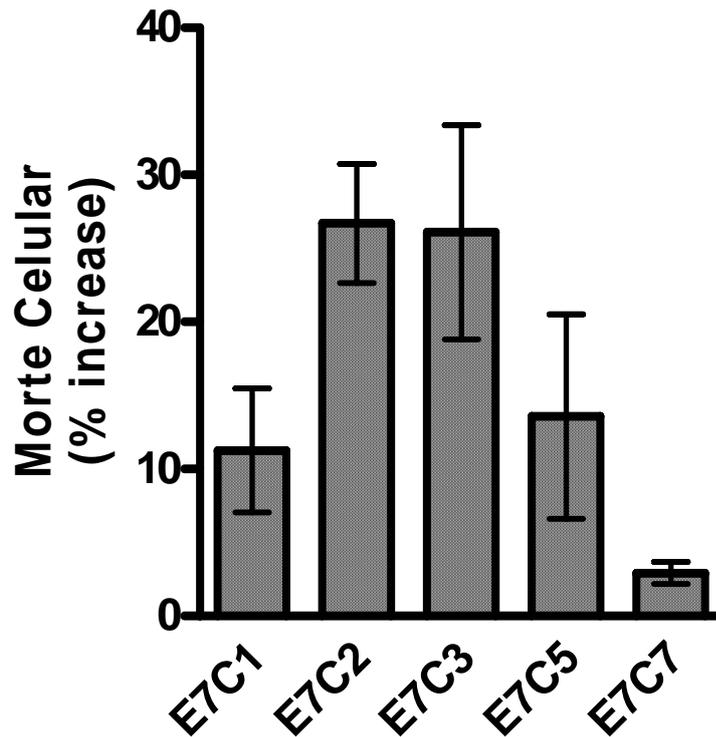
**Figura 16. Visualização por microscopia de contraste de fase de culturas mistas de retina embrionária de galinha em E7C2 tratadas ou não com ATP 3 mM, por 3 h e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM, por 5 h. Em todos os outros quadros o aumento é de 400x. Barra=20 μm. As imagens são representativas de 4 experimentos.**

Com base nestes achados, resolvemos investigar o efeito do ATP sobre a viabilidade celular em função da idade da cultura na tentativa de esclarecer se a morte celular dependente deste nucleotídeo seria induzida em um período de desenvolvimento embrionário definido. Para isto, analisamos o efeito de ATP extracelular sobre culturas obtidas de embriões com 7 dias cultivadas *in vitro* por diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 5 e 7 dias). Na figura 17, podemos observar que a incubação de culturas com ATPe 3 mM por 3 horas, resultou numa morte celular de cerca de 10% nas culturas de E7C1. Já em culturas de E7C2 e E7C3, um nível de morte maior, de cerca de 30%, foi observado. No entanto, nos períodos posteriores, entre o 5<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dia de cultivo, a percentagem de morte diminuiu consideravelmente. Em culturas de E7C5 e E7C7, foram observados níveis de morte celular de 13,56% e 2,93%, respectivamente.

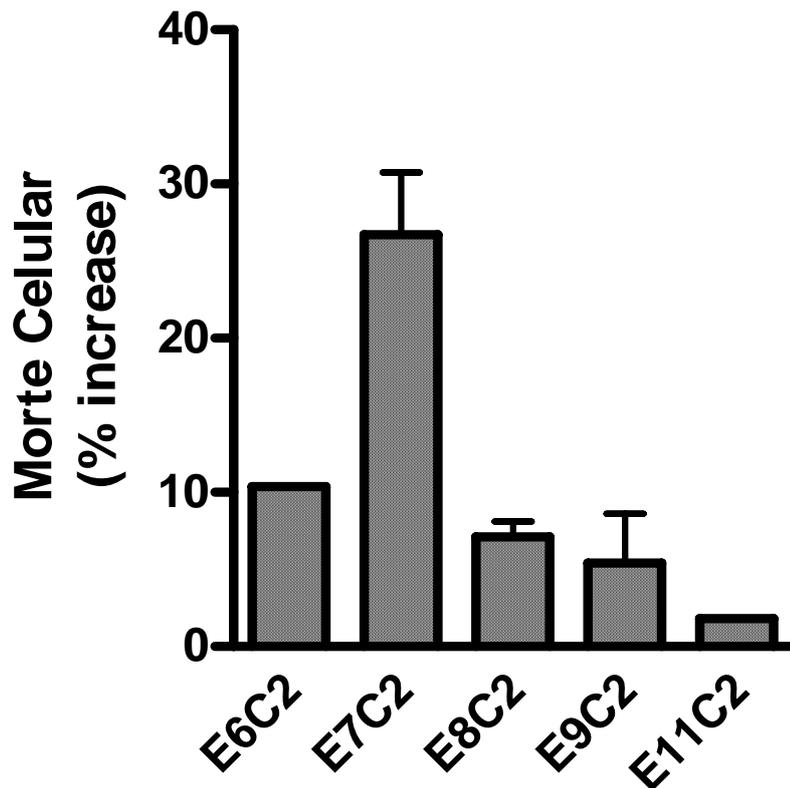
Além de variarem em função do tempo de cultivo das culturas obtidas de embriões com 7 dias, os níveis de morte celular variaram em função da idade do embrião utilizado na obtenção das culturas. Neste caso, retinas de embriões em diversos estágios de desenvolvimento foram dissecadas, as células semeadas e cultivadas por 2 dias. Após este período, as células foram tratadas com 3 mM de ATP extracelular, por 3 horas. Na figura 18, podemos observar os níveis de morte celular de culturas de retina de E6C2, E7C2, E8C2, E9C2, e E11C2. Os resultados mostram que apenas culturas de E7C2 apresentaram níveis de morte celular próximos de 30%. Em culturas obtidas a partir tanto de embriões mais jovens (E6) quando de embriões mais velhos (E8, E9 e E11) a percentagem de morte celular foi mais reduzida, não ultrapassando o nível de 10%.

A retina embrionária de pinto contém tanto neuroblastos quanto células gliais de Müller. Através de diferentes modificações no método de estabelecimento das culturas, é possível a obtenção de culturas purificadas de neuroblastos ou de células gliais, além das culturas mistas, contendo ambos os tipos celulares, utilizadas até o momento. Com o objetivo de investigar os tipos celulares afetados ou envolvidos na morte celular induzida por ATP extracelular, resolvemos analisar o efeito deste nucleotídeo sobre a viabilidade celular nestes 3 tipos de cultura. Nestes experimentos, tanto culturas mistas ou purificadas de neurônios de E7C2 quanto culturas enriquecidas em glia de

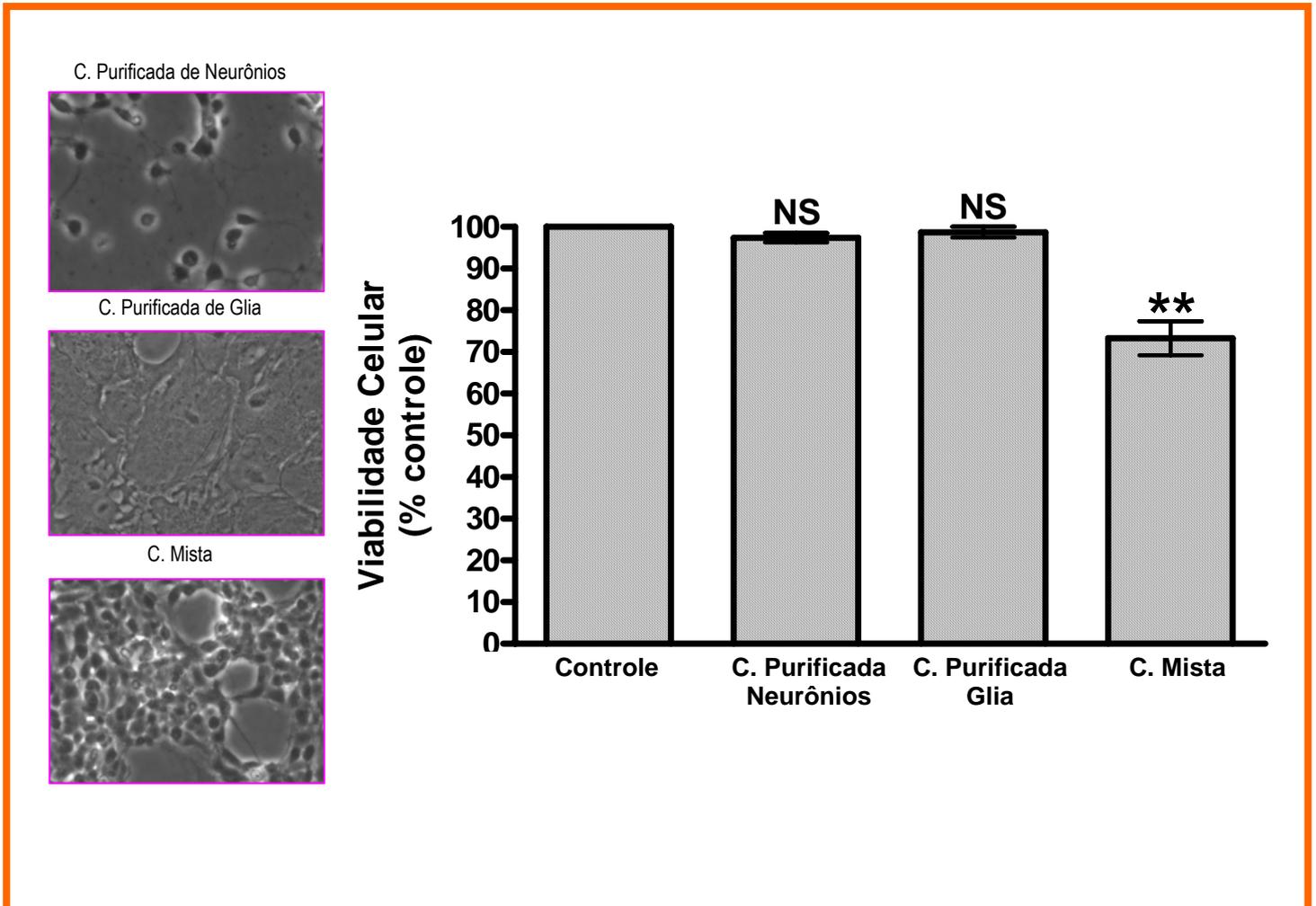
E7C14 foram tratadas com ATP 3 mM, por 3 horas. Os resultados destes experimentos (figura 19) revelaram que os níveis de morte celular tanto nas culturas purificadas de neurônios quanto nas culturas enriquecidas de glia foram bastante reduzidos (2.58% e 1.29%, respectivamente), quando comparados as culturas mistas contendo ambos os tipos celulares (26.71%).



**Figura 17. Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de pinto em função do tempo de cultivo.** Culturas de retinas de embriões em E7 foram tratadas com ATP extracelular 3 mM, por 3h nos estágios de cultivo indicados. Os dados representam a média  $\pm$  Desvio da média de 2 experimentos realizados em duplicatas.



**Figura 18.** Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina embrionária de pinto em função da idade do embrião que foram utilizados para a obtenção das culturas. As culturas nos estágios indicados foram tratadas com ATP extracelular 3 mM, por 3h. Os dados representam a média  $\pm$  DE de 2 experimentos realizados em duplicatas.



**Figura 19.** Efeito de ATP sobre a viabilidade celular de culturas enriquecidas em neurônios (E7C2), enriquecidas em glia (E7C14) ou de culturas mistas (E7C2) de retina embrionária de galinha. As culturas foram tratadas com ATP 3 mM, por 3 h e os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos realizados em quadriplicatas. Significância é definida como  $p < 0.001$  (\*\*) e NS (não significativa) relacionada ao controle.

#### **4.2. Tipo de morte induzida por ATP 3 mM em culturas mistas de retina de embrião de galinha**

A apoptose e a necrose têm sido distinguidas por vários critérios histológicos e bioquímicos. Deste modo, a necrose é caracterizada pela perda de integridade da membrana e pela ruptura celular, por dano de organelas, alteração lisosomal e uma lise celular descontrolada que comumente permite a inflamação do tecido. Em contraste, as características típicas de células apoptóticas incluem a integridade da membrana e encolhimento celular, a condensação nuclear e citoplásmica, e o “blebbing” da membrana plasmática. Nos estágios tardios da apoptose, as células se desintegram em corpos apoptóticos que são engolfados por células vizinhas. (Yakovlev et.al., 2004).

Com base nas observações relatadas acima, resolvemos utilizar marcadores tanto bioquímicos como moleculares para distinguir o tipo de morte que estaria sendo ativada pelo ATP extracelular nas culturas de retina de pinto. Inicialmente, experimentos foram realizados para determinar a liberação ou não do conteúdo citoplasmático celular como indicador de lise celular por necrose. O marcador usado foi a enzima lactato desidrogenase (LDH). Na figura 20, podemos ver claramente que tanto culturas controle como culturas tratadas com 3 mM de ATP apresentaram uma liberação de LDH correspondente a apenas 10% do conteúdo total de enzima encontrado nas células. Por outro lado, culturas incubadas com  $H_2O_2$  apresentaram o mesmo nível de cerca de 10% de liberação desta enzima quando foram tratadas com uma concentração de 0.5 mM deste composto (figura 6, quadro inserido). Já culturas tratadas com concentrações maiores deste agente apresentaram níveis de liberação de LDH bem maiores, chegando a 80% do conteúdo intracelular desta enzima na concentração de 10 mM.

Com base nos dados acima, é possível pensarmos que a morte celular observada com 0.5 mM de  $H_2O_2$  seja semelhante à morte celular induzida por ATP e ocorra através de um processo de apoptose. Já a morte celular observada com concentrações maiores seja distinta, por necrose. Para comprovar esta hipótese, utilizamos um marcador bastante conhecido na identificação de morte por apoptose, a fragmentação de DNA. Na figura 21 podemos observar a formação típica do “ladder” de DNA derivado da clivagem

do DNA nucleosomal nas culturas estimuladas tanto com ATP quanto com  $H_2O_2$ .

Para confirmar ainda mais que a morte celular induzida por ATP se trata de um processo de apoptose, resolvemos utilizar um outro marcador apoptótico, a caspase-3 ativada. Para tal, realizamos experimentos de imunofluorescência para a caspase-3 clivada (17 KDa) que é a forma ativa da caspase-3 de 31 kDa (Nicholson, 1995). Tentamos primeiramente estabelecer o tempo de ativação desta enzima realizando os estímulos com ATP 3mM nos tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos. Tendo verificado uma marcação maior no tempo de 20 minutos, realizamos contagens de células marcadas para caspase-3 em nossas culturas. Nossos dados mostraram um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de cerca de 54% no número de células marcadas para caspase 3 clivada nas culturas tratadas com ATP (Figura 22). Na figura 23, pode ser observado a marcação de caspase-3 clivada em culturas tratadas com ATP e  $H_2O_2$ , sendo evidente que as culturas tratadas apresentaram um número maior de células marcadas do que culturas controle.

Finalmente, num último grupo de experimentos, resolvemos verificar se o ATP poderia induzir a condensação dos núcleos nas células de nossas culturas tratadas. Utilizando o 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), um marcador de núcleo celular, conseguimos encontrar núcleos picnóticos bem característicos de apoptose, tanto em culturas tratadas com ATP quanto com  $H_2O_2$  (Figura 24).

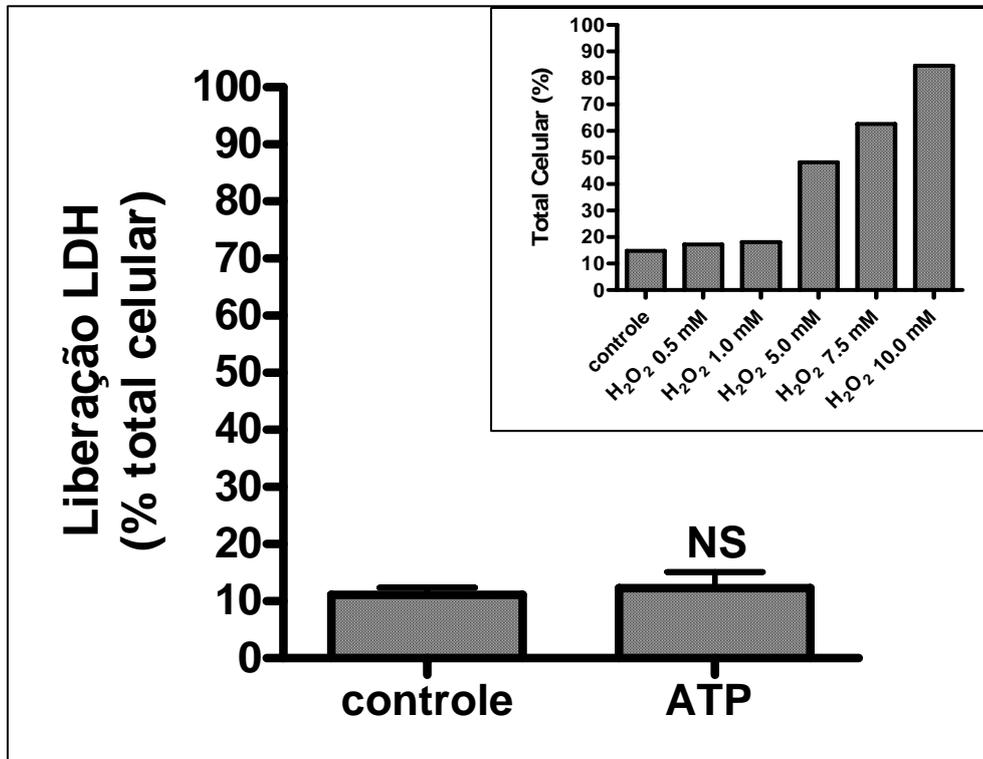
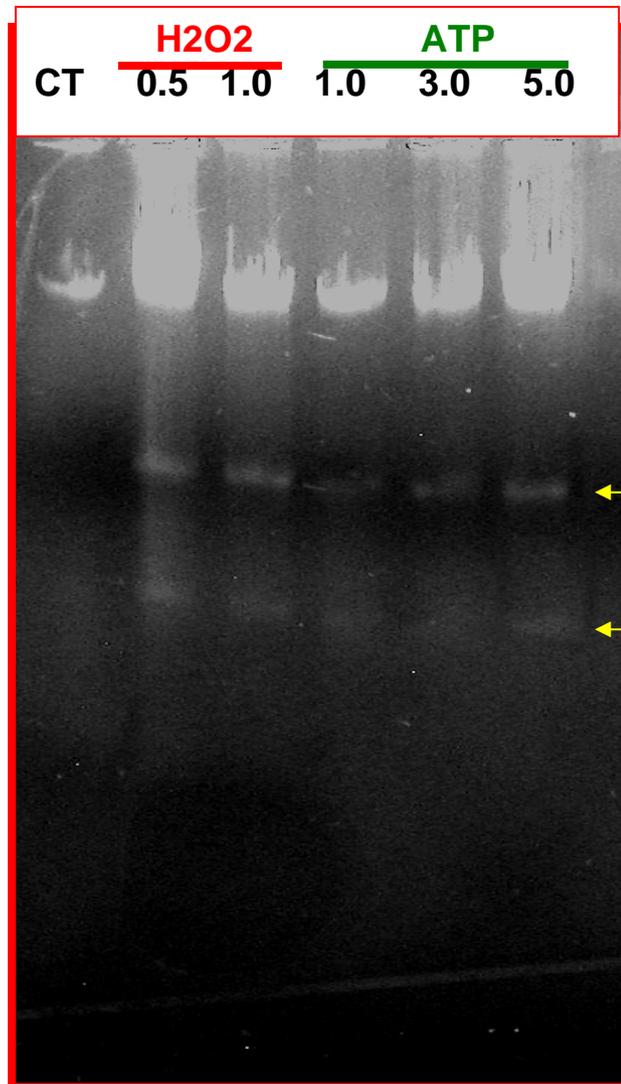
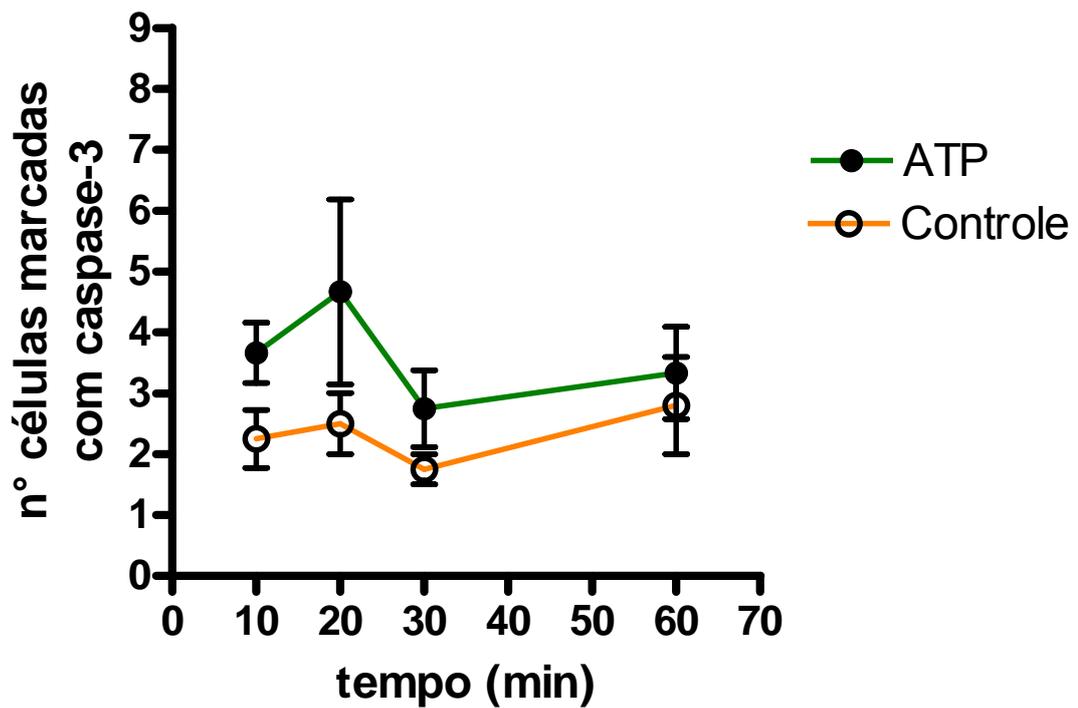


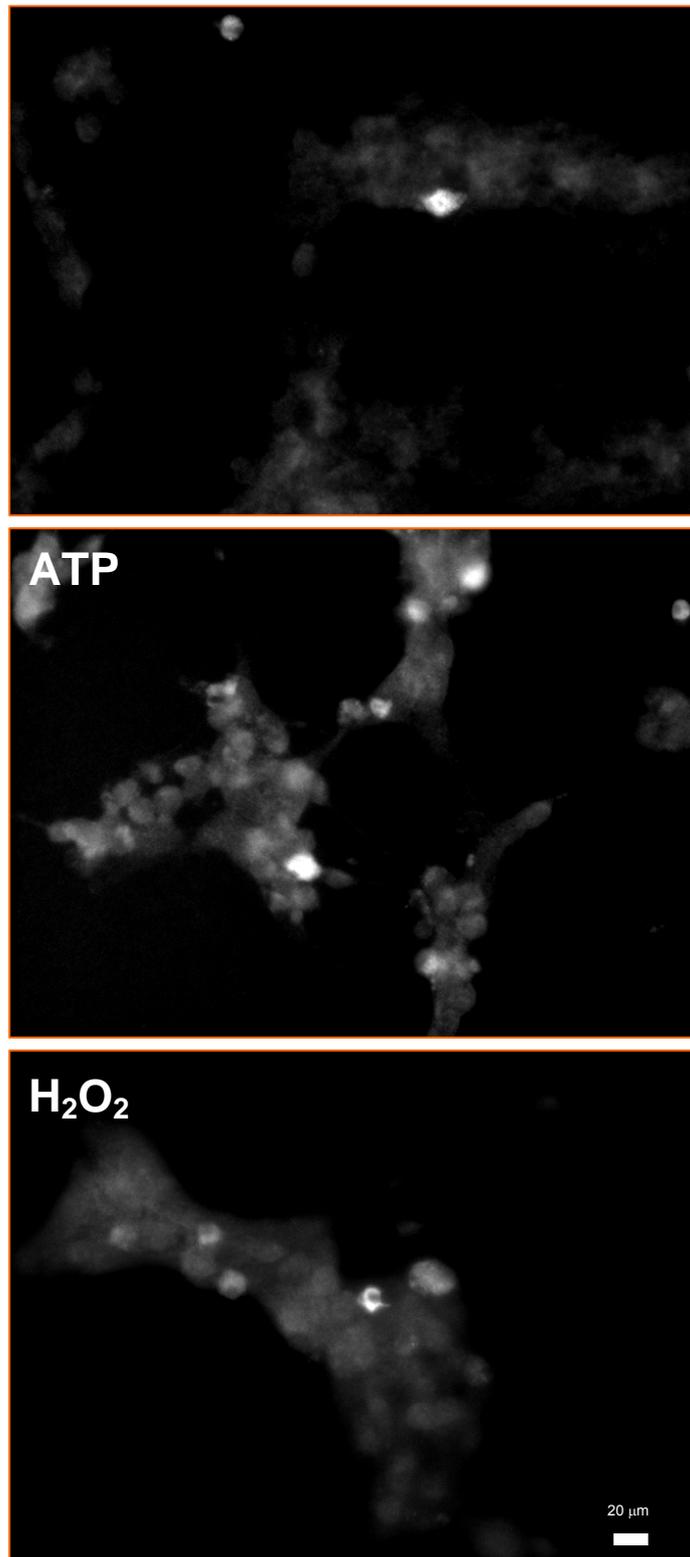
Figura 20. Liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) de culturas mistas de retina embrionária de pinto em E7C2 estimuladas com ATP extracelular 3 mM, por 3 h. Quadro inserido: Liberação de LDH induzida por concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no período de estimulação de 5 horas. Os dados representam a média ± E.P.M. de 3 experimentos realizados em duplicatas. Significância é definida como NS (não significativa) relacionada ao controle.



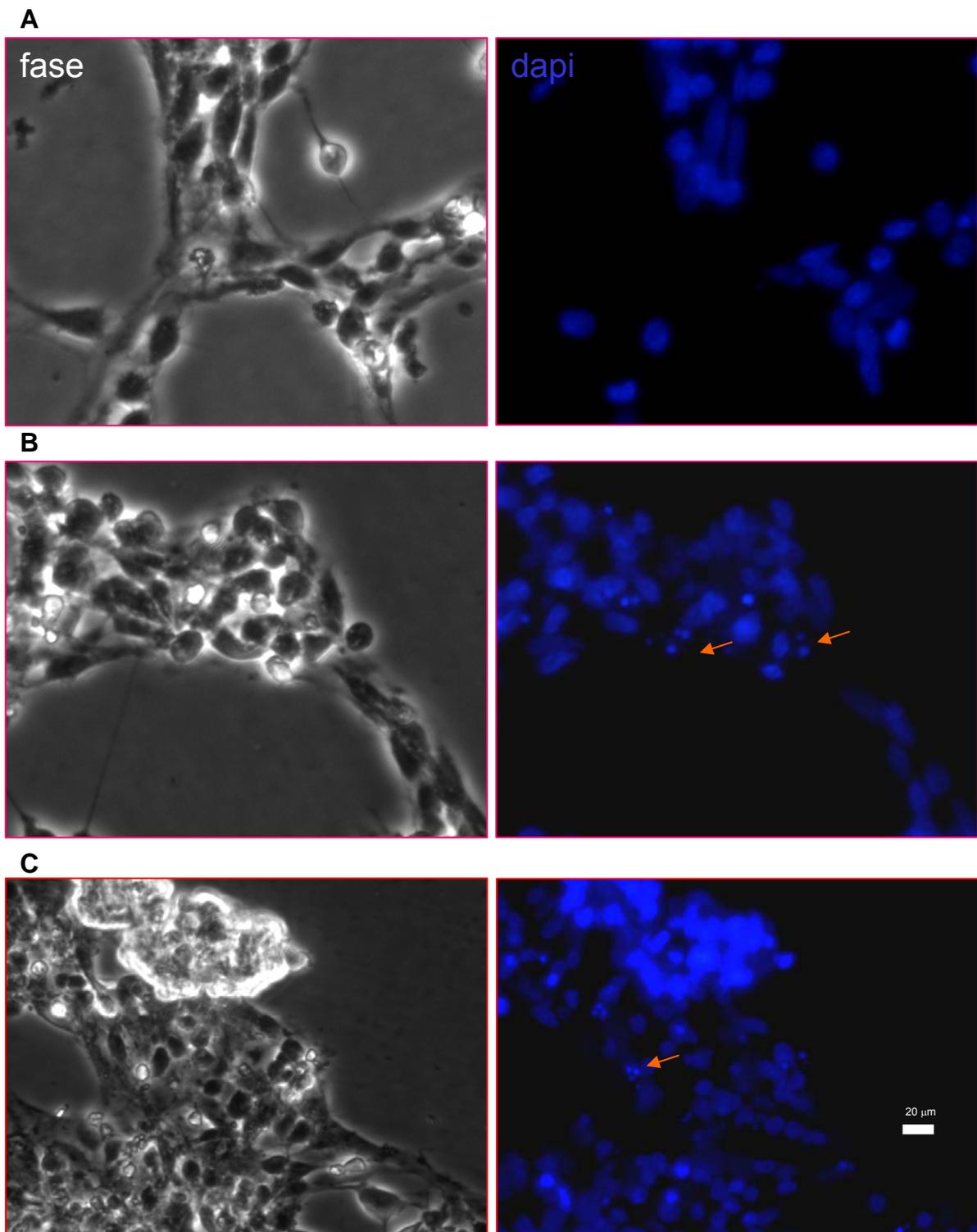
**Figura 21. Fragmentação de DNA induzida por ATP ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em culturas de retina embrionária de pinto em E7C2.** As culturas foram tratadas com ATP 3 mM por 3 h. ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM por 5 h. e processadas para a extração de DNA das células. As setas indicam as bandas de DNA nucleosomal. O gel é representativo 02 experimentos.



**Figura 22. Aumento no número de células marcadas para caspase-3 clivada em culturas tratadas com ATP 3 mM.** Culturas mistas de E7C2 foram tratadas por períodos variados de 10, 20, 30 e 60 min. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores obtidos de 1 experimento realizado.



**Figura 23. Imunofluorescência para caspase-3 clivada em culturas tratadas com ATP 3 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.** Culturas de E7C2 foram incubadas com os compostos por 20 min, fixadas e processadas para imunocitoquímica. As imagens são representativas de 2 experimentos.



**Figura 24. Condensação de cromatina em culturas mistas de retina de pinto em E7C2. A) controle; B) ATP extracelular 3 mM; C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM. As culturas foram tratadas por 3 e 5 horas respectivamente, fixadas e coradas com DAPI por 30 segundos. As imagens são representativas de 02 experimentos.**

#### **4. 3. Tipo de receptor envolvido na morte celular induzida por ATP**

Com o objetivo de verificar se o ATP extracelular induziria morte nas culturas de retina embrionária de galinha através deste receptor, resolvemos investigar o efeito de BzATP (Benzoyl-ATP), análogo de ATP que é um agonista específico para receptores P2X<sub>7</sub> e que não ativa receptores purinérgicos metabotrópicos do tipo P2Y. Na figura 25 está mostrado a viabilidade celular em função da concentração e do tempo de incubação das culturas com BzATP. Os dados revelaram que concentrações iguais ou maiores que 100 µM e períodos de incubação maiores do que 3 horas resultaram numa diminuição máxima de aproximadamente 30% na viabilidade das culturas. De modo semelhante ao encontrado com ATP, estes dados sugerem que este análogo estaria induzindo a morte de uma subpopulação específica de células em nossas culturas.

A visualização das culturas tratadas com BzATP 0.1 mM por microscopia de contraste de fase (figura 26), revelou um maior número de células refringentes e com morfologia alterada em culturas tratadas em comparação com culturas controle.

Para estabelecer se realmente o receptor P2X<sub>7</sub> estaria envolvido na morte induzida pelo ATP, resolvemos utilizar o inibidor KN-62 que, assim como os compostos BBG e ATPOx, é um reconhecido inibidor específico para este receptor. Concentrações de 100 e 300 nM de KN-62 foram utilizadas. Os dados da figura 27 mostram que este composto, apesar de não ter inibido completamente a diminuição na viabilidade celular induzida por ATP, foi capaz de atenuar em cerca de 60% o efeito do nucleotídeo quando usado na concentração de 300 nM.

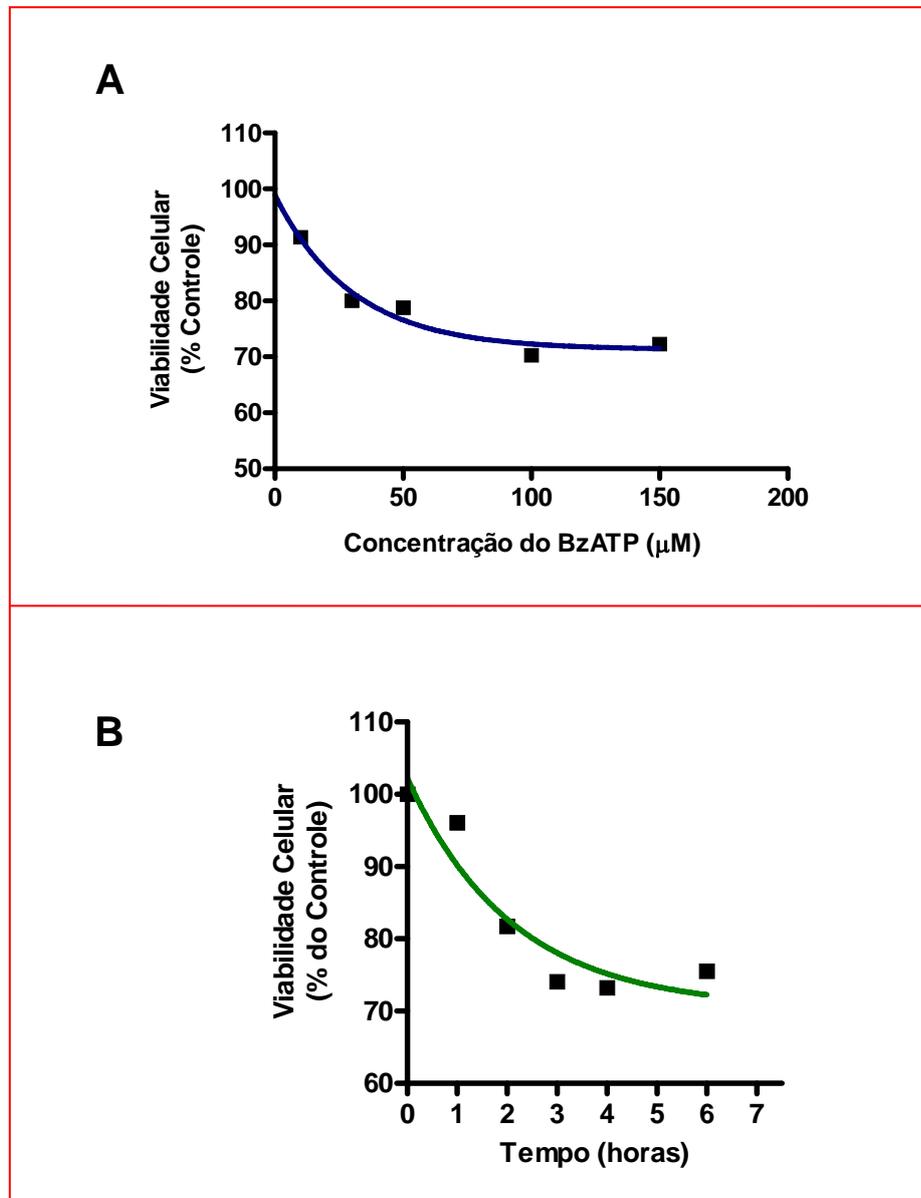
Utilizando marcadores de apoptose, tais como a ativação de caspase-3, a fragmentação de DNA e a condensação de cromatina pudemos então verificar que o BzATP 0.1 mM estaria de fato induzindo um processo de apoptose típico (figura 28). Estas observações em conjunto, nos permitem então sugerir que a retina embrionária de pinto, além de expressar este tipo de receptor, sofre processo de apoptose quando ativado por nucleotídeos.

Receptores P2X<sub>7</sub> são canais catiônicos não seletivos que podem formar grandes poros que, por sua vez, podem mediar a morte celular apoptótica. A pannexina-1 parece ser um substrato molecular para a montagem e

permeabilização do poro e recrutamento de complexos protéicos que permitiriam sinalização de morte através do receptor P2X<sub>7</sub> (Locovei, 2006). Uma das características mais importante deste poro é a de permitir o ingresso de moléculas >900 Da, como o corante fluorescente brometo de etídeo. Com o objetivo de investigar se os possíveis receptores P2X<sub>7</sub> da retina embrionária de pinto também apresentavam esta característica de formação de poros, resolvemos investigar a permeabilização induzida por nucleotídeos em células de retina em cultura, utilizando o brometo de etídeo (5 µM). Na figura 29, podemos observar um aumento na captação deste corante fluorescente em culturas de E7C2 tratadas com BzATP 0.1 mM por 15 min, em comparação com culturas controle. Podemos observar que este fluorocromo se localizou principalmente no núcleo celular, sendo uma marcação de baixa intensidade também observada no citoplasma das células.

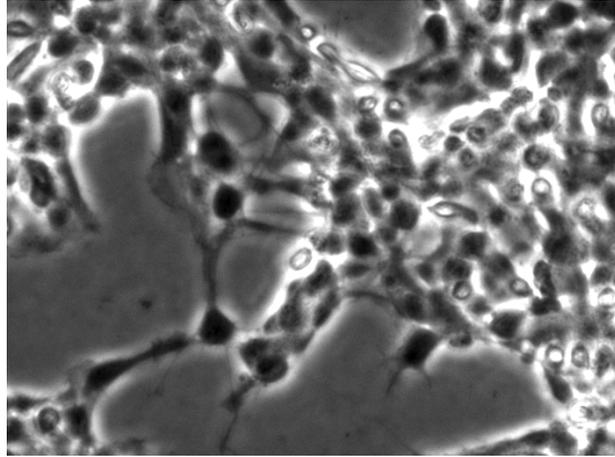
A natureza farmacológica dos receptores envolvidos no efeito de permeabilização induzida por BzATP em nossas culturas está representada na figura 29. Como pode ser observado, o composto BBG (Blue Brilliant G), um antagonista específico para receptores P2X<sub>7</sub>, na concentração de 10 µM, foi capaz de bloquear completamente a captação de brometo de etídeo induzida por ATP 3 mM, durante 15 min (Figura 30).

Conhecendo que a característica de permeabilização celular é peculiar do receptor P2X<sub>7</sub>, no próximo grupo de experimentos resolvemos investigar que tipo de célula da retina estaria apresentando este receptor nas culturas. Para isto, investigamos a permeabilização de brometo de etídeo em culturas enriquecidas em neurônios ou em glia. Na figura 31, podemos observar, por microscopia de fase e de fluorêscencia, culturas enriquecidas de neurônios de E7C3, tratadas com ATP 3 mM durante 15 min. Em contraste com a permeabilização observada em culturas mistas, onde diversas células coradas com brometo de etídeo pareciam neurônios, um número muito baixo de células permeabilizadas foi observado tanto na situação controle quanto na condição tratada com ATP nestas culturas. Já em culturas de E11C10 enriquecidas em glia, o tratamento com ATP 3 mM foi capaz de aumentar a quantidade de células marcadas com o fluorocromo na cultura (figura 32). Estas células permeabilizadas pareciam ser neurônios uma vez que se localizavam sobre a monocamada de células gliais.

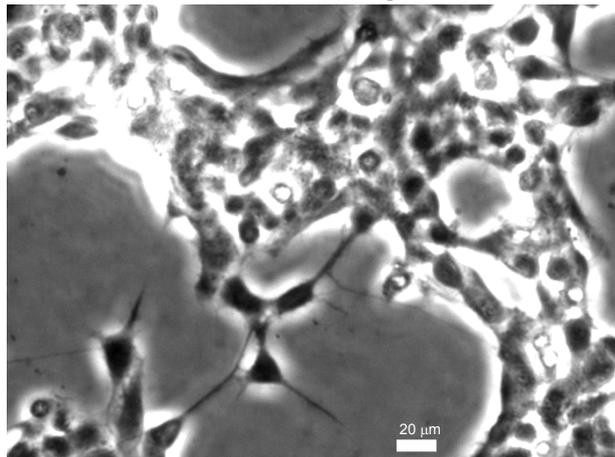


**Figura 25. Efeito de BzATP sobre a viabilidade celular de culturas mistas de retina de galinha em E7C2.** A) Efeito de concentrações crescentes de BzATP sobre a viabilidade celular. As culturas foram tratadas por 3 horas. B) Curva de tempo de incubação das culturas com 0.1 mM de BzATP. A viabilidade foi medida pelo método de MTT e os dados representam a média  $\pm$  DE de 2 experimentos realizados em quadriplicatas.

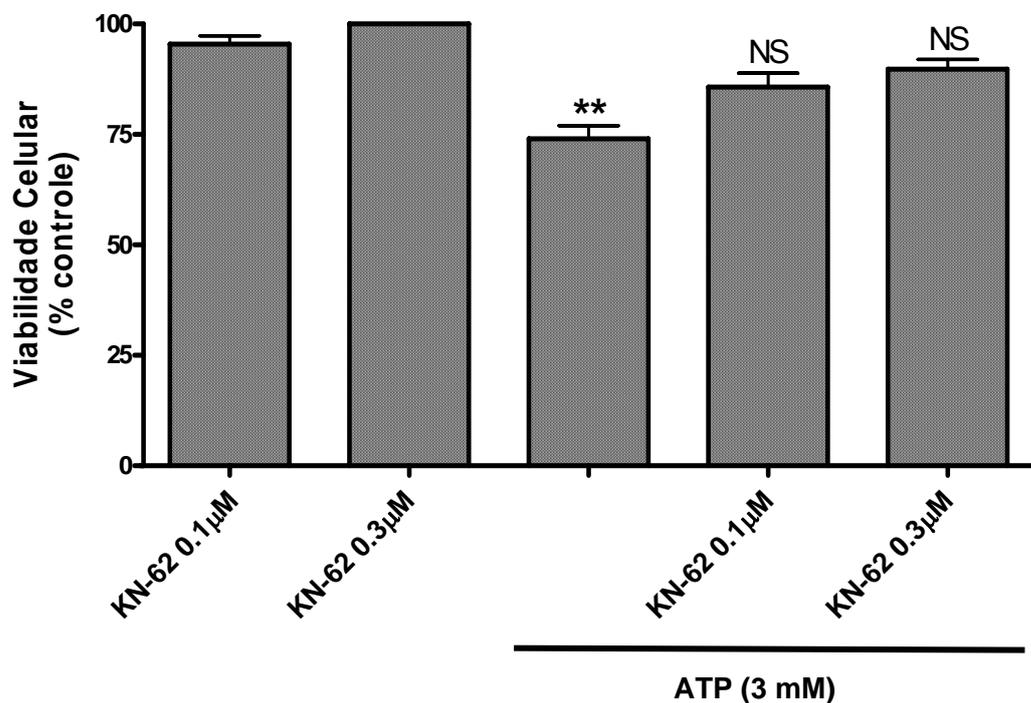
### CONTROLE



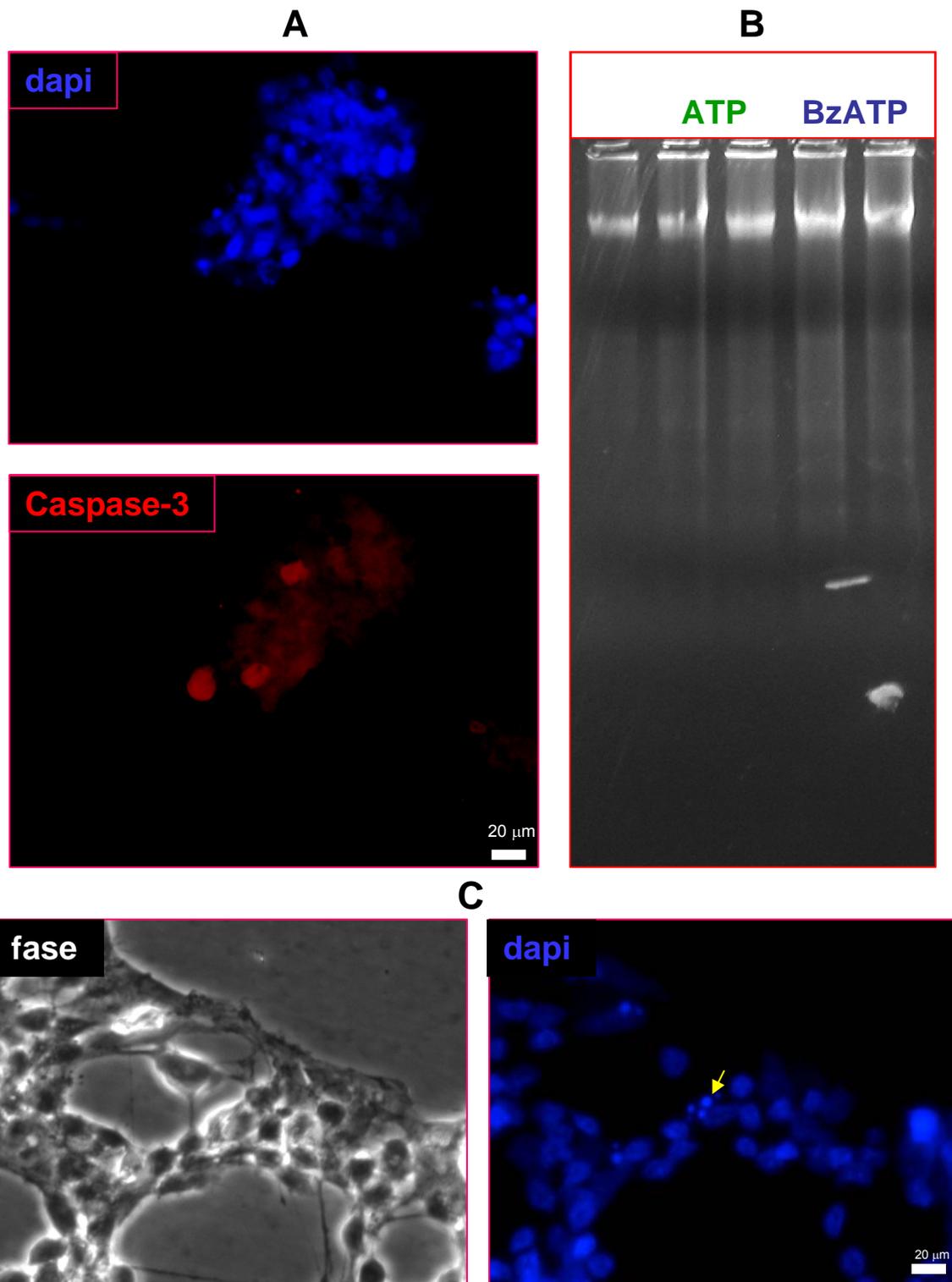
### BzATP 100 $\mu$ M



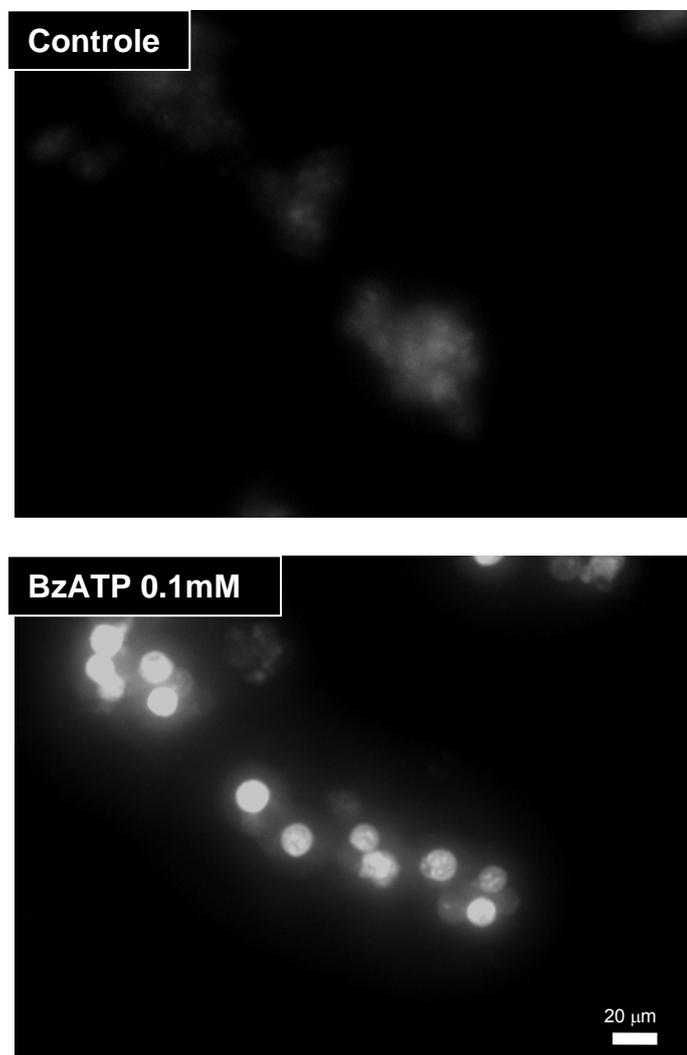
**Figura 26. Visualização por microscopia de contraste de fase de culturas mistas de retina em E7C2. Controle e BzATP 100  $\mu$ M, por 3 hrs. Em todas as fotomicrografias o aumento foi de 400 x e a barra representa 20  $\mu$ m. As imagens são representativas de 2 experimentos realizados.**



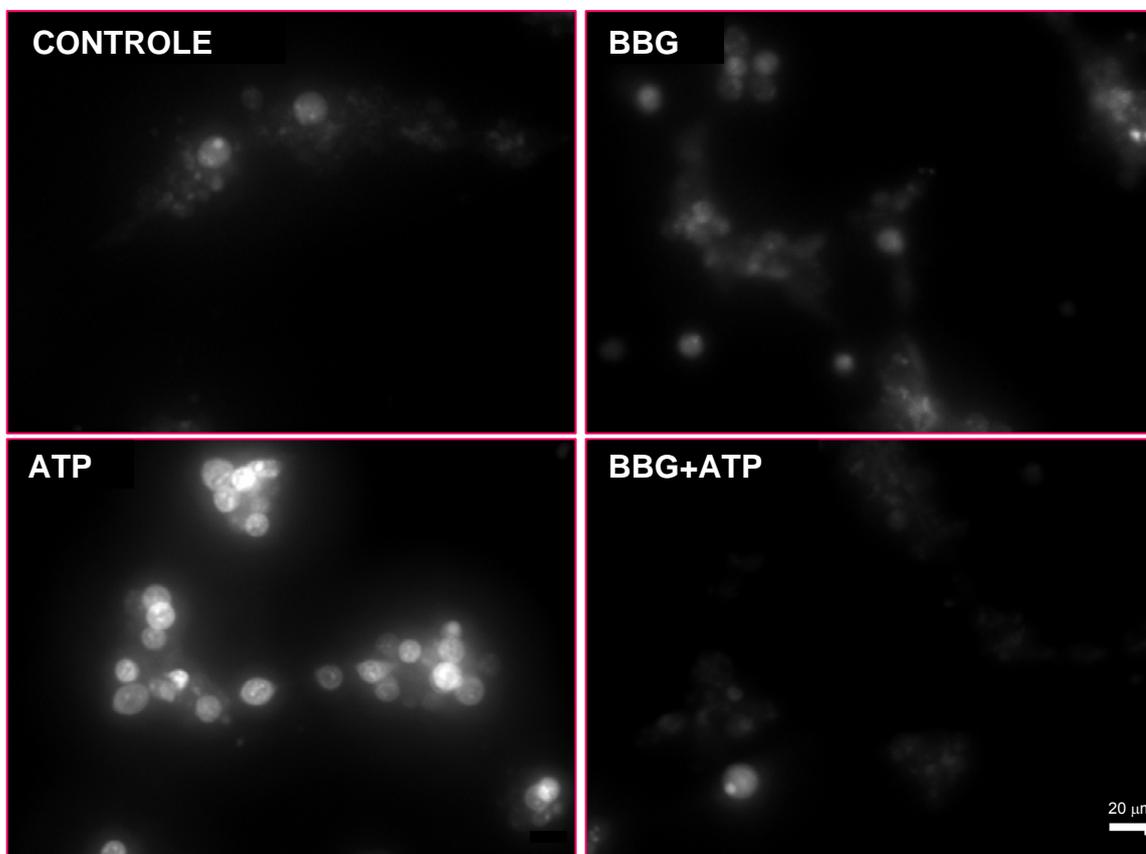
**Figura 27. Efeito de KN-62 sobre a diminuição na viabilidade celular induzida por ATP.** Culturas de retina em E7C2 foram tratadas, por 3 h, com ATP 3 mM na presença ou não de KN-62 nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 03 experimentos realizados em duplicata. Significância é definida como  $p < 0.001$  (\*\*) e NS (não significativa) relacionada ao controle.



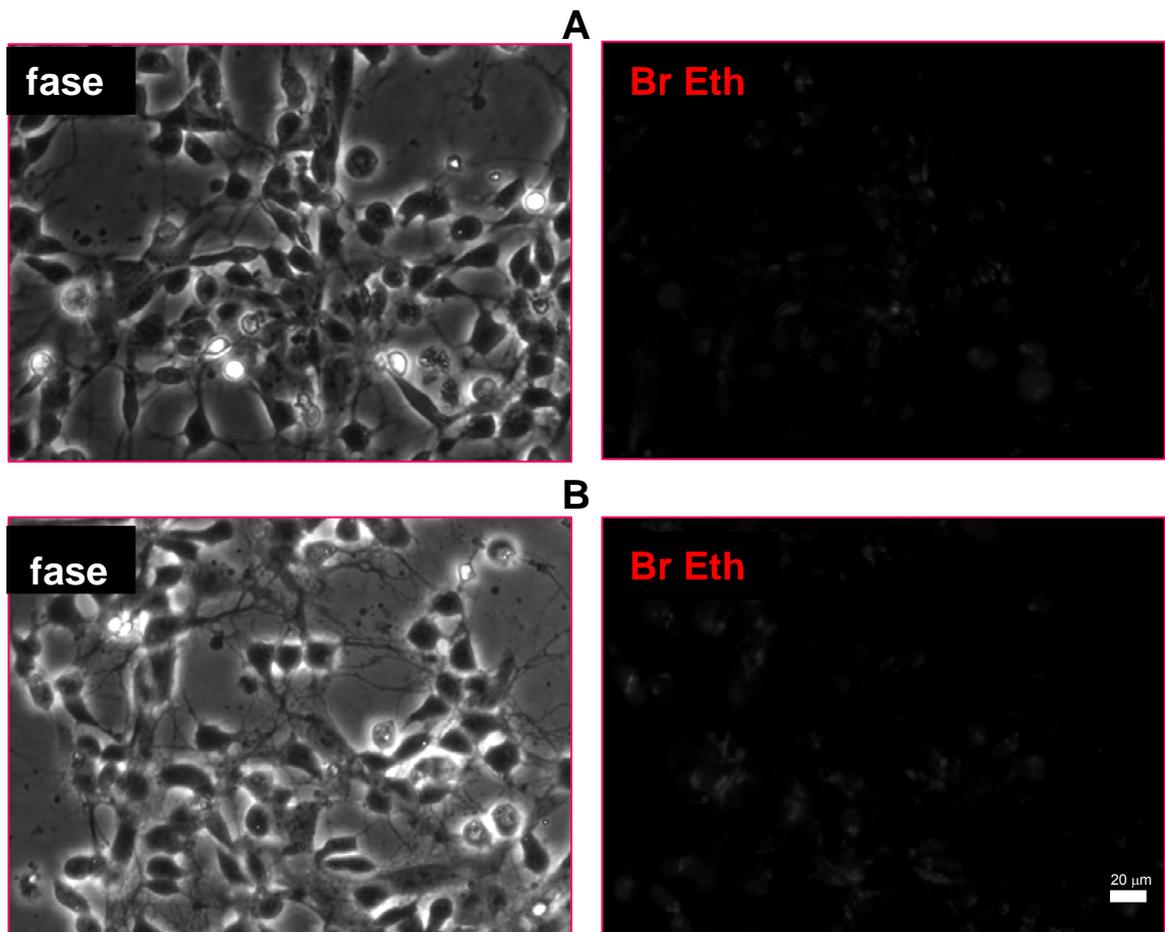
**Figura 28. Indução de apoptose por BzATP em culturas mistas em E7C2.** A) painel superior: marcação com DAPI; painel inferior: imunofluorescência para caspase-3 clivada; B) Fragmentação de DNA; C) Condensação de cromatina. Painel da esquerda: contraste de fase; painel da direita: marcação com DAPI. As imagens são representativas de 2 experimentos realizados.



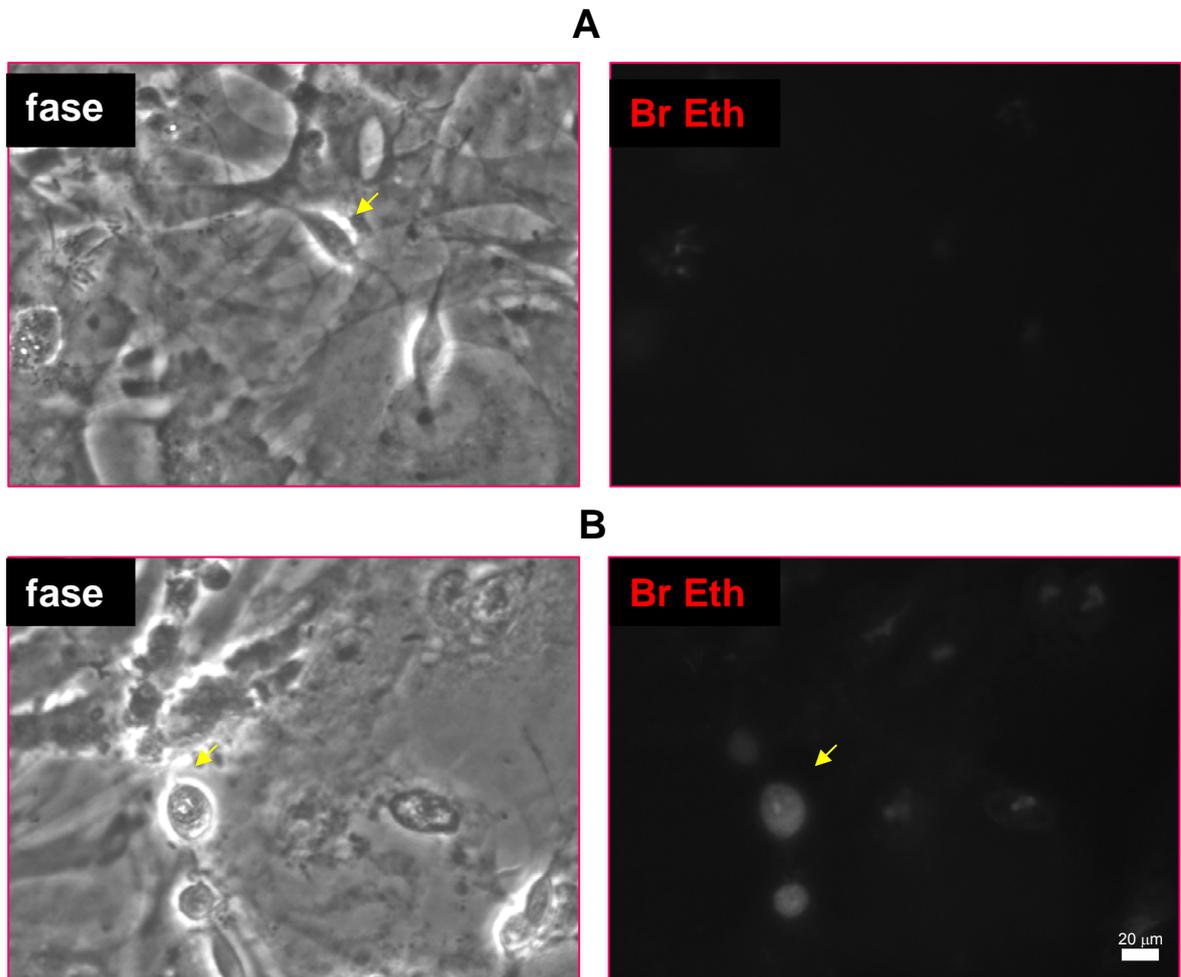
**Figura 29. Permeabilização celular induzida por BzATP em culturas em E7C2.** As culturas foram estimuladas com BzATP 0.1 mM, por 15 min. na presença de 5  $\mu$ M de brometo de etídeo. Após este procedimento, foram lavadas e fotografadas em microscópio de fluorescência. Em todas as fotomicrografias o aumento foi de 400 x e a barra representa 20  $\mu$ m. As imagens são representativas de 02 experimentos realizados.



**Figura 30. Efeito do antagonista de receptores P2X<sub>7</sub> BBG sobre a permeabilização induzida por ATP.** Culturas em E7C2 foram incubadas com ATP 3 mM e brometo de etídeo 5  $\mu$ M, na presença ou não de BBG 10  $\mu$ M, durante 15 min. Após esta incubação, as culturas foram lavadas e visualizadas por microscopia de fluorescência. As imagens são representativas de 02 experimentos realizados.



**Figura 31. Permeabilização induzida por ATP em culturas enriquecidas em neurônios. A) Controle; B) ATP.** Culturas em E7C3 foram incubadas com ATP 3 mM e brometo de etídeo 5  $\mu$ M por 15 minutos. Após esta incubação, as culturas foram lavadas e visualizadas por microscopia de fluorescência. As imagens são representativas de 02 experimentos realizados.



**Figura 32. Permeabilização induzida por ATP em culturas enriquecidas em glia. A) Controle; B) ATP.** Culturas em E11C10 foram incubadas com ATP 3 mM e brometo de etídeo 5  $\mu$ M por 15 minutos. Após esta incubação, as culturas foram lavadas e visualizadas por microscopia de fluorescência. As imagens são representativas de 02 experimentos realizados.

## 5. Discussão

A morte celular é um fenômeno proeminente no sistema nervoso em desenvolvimento que, juntamente com a proliferação celular, determina o tamanho das populações celulares encontradas no tecido adulto. Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que o ATP extracelular, através da ativação de receptores do tipo P2Y1, tem um papel importante na indução de proliferação celular durante o desenvolvimento da retina embrionária de pinto (Sanches, 2002, Nunes et al., 2007; França et al., 2007). Por outro lado, já é bastante conhecido que este nucleotídeo é capaz de desencadear o processo de morte celular em diversos sistemas biológicos e que o balanço entre a proliferação e a morte celular dependeria basicamente da estimulação e expressão diferencial dos diferentes tipos de receptores P2. Neste trabalho, investigamos o efeito de ATP sobre culturas mistas de retina embrionária de pinto, utilizando concentrações de 0.5 a 5 mM, uma vez que nesta faixa de concentração poderíamos ativar receptores distintos do receptor P2Y1, principalmente receptores do tipo P2X (Figura 1). Nossos dados utilizando o método do MTT para viabilidade celular revelaram que este nucleotídeo foi capaz de diminuir em até 30% e de maneira dependente da dose e do tempo de estimulação, a viabilidade de células de retina de embrião de pinto em cultura, sugerindo a existência de uma ou mais populações de células na retina embrionária que apresentam receptores purinérgicos P2 capazes de induzir morte celular quando estimulados com concentrações altas de ATP.

Em alguns experimentos, avaliamos a viabilidade celular em culturas estimuladas com 0.1 mM de ATP, uma concentração capaz de induzir maximalmente a proliferação celular. Entretanto, nestas condições, nenhuma diminuição na viabilidade celular foi observada (dados não mostrados), sugerindo que esta molécula não teria nenhum efeito de morte celular nesta concentração nas culturas de retina embrionária de galinha. Entretanto, Resta et al. (2005), utilizando 0.1 mM ou 1 mM de ATP, evidenciaram a indução de morte de células amácrinas colinérgicas em retinas intactas de ratos neonatos. Pelo menos duas hipóteses podem ser levantadas para explicar estas discrepâncias. A primeira seria a de que no rato, diferentemente do embrião de

galinha, outros subtipos de receptores P2 com maior afinidade pelo ATP seriam os receptores envolvidos no processo de morte das células amácrinas colinérgicas. Essa possibilidade, entretanto, não nos parece razoável, uma vez que a morte destas células também foi verificada utilizando-se concentrações de 0.5 a 1 mM de ATP. Uma segunda possibilidade seria a fato de termos utilizado culturas de células em monocamada enquanto Resta e colaboradores utilizaram retinas intactas, onde a estrutura do tecido é conservada. Tendo em vista que a incubação de retinas intactas com ATP é capaz de induzir a liberação de ATP de células gliais na retina (Newman, 2001), é possível que a incubação de retinas intactas com este nucleotídeo aumente consideravelmente a concentração de ATP que atinge as células amácrinas colinérgicas. Em culturas de monocamada como a utilizada por nós, é possível que este aumento de concentração de ATP não ocorra devido à sua difusão para o meio de cultura. Neste caso, apenas a adição de concentrações altas de ATP poderiam ser efetivas para a indução de morte das células em culturas na forma de monocamada. Investigar o efeito de concentrações menores de ATP sobre a morte celular em retinas intactas de embrião de galinha poderia, portanto, contribuir para esclarecer esta questão.

Muitos trabalhos têm evidenciado que a citotoxicidade mediada por ATP envolve a ativação de receptores da família P2X, principalmente o receptor P2X7. Este receptor é muito bem descrito e presente em diversos tecidos, sendo normalmente ativado na faixa mMolar de concentração de ATP. Entretanto, dentro da família P2X, Nagy, et.al., (2000) e Freedman, (1999) descreveram outros receptores relacionados com morte, os receptores P2X1 e P2X2, respectivamente. Estes receptores induzem morte de tímócitos, mas aparentemente só estariam presentes na regulação do sistema imune. A partir destas evidências, nós resolvemos investigar se a morte celular induzida pelo ATP estaria envolvendo o receptor P2X7. Nossos resultados (figura 11) mostraram que BzATP, um agonista específico para receptores P2X7, foi capaz de induzir ~30% de redução na viabilidade celular nas culturas de retina embrionária de pinto. Além disto, este agonista foi capaz de induzir a fragmentação de DNA, a ativação de caspase-3 e a condensação de cromatina em nossas culturas, sugerindo que a redução na viabilidade celular induzida

por este agonista seja devido a indução de apoptose nas culturas. Estes dados em conjunto nos permitem sugerir que BzATP esteja ativando receptores do tipo P2X7 e induzindo a morte por apoptose nas células de retina embrionária de galinha em cultura. Esta idéia é reforçada por outros experimentos que mostram que KN-62, um antagonista de receptores P2X7, foi capaz de atenuar a diminuição de viabilidade celular induzida por ATP em nossas culturas. Além disto, a permeabilização de células induzida por ATP em nossas culturas, um fenômeno reconhecidamente induzido pela ativação de receptores P2X7 foi completamente bloqueada por BBG, outro antagonista deste tipo de receptor.

Como mencionado anteriormente, a morte celular é um fenômeno bastante importante no desenvolvimento do sistema nervoso, afetando neurônios, células gliais e progenitores e fazendo ajustes apropriados entre os grupos interconectados de neurônios e de populações neuronais que inervam outros tecidos (Davies, 2003). Diversos trabalhos têm caracterizado o fenômeno de apoptose durante o desenvolvimento da retina de pinto (Cuadros e Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Frade et al., 1996; 1997; Díaz et al., 1999; 2000; Mayordomo et al., 2003). Duas ondas de morte celular programada ocorrem no desenvolvimento deste tecido. A primeira ocorre entre os estágios de E4 e E8 e se sobrepõe parcialmente com o período de neurogênese de diversos tipos celulares da retina. A segunda onda ocorre entre os estágios de E8 e E14, quando a neurogênese da retina já está praticamente terminada e as células ganglionares se tornam dependentes do suporte trófico de seus alvos. Neste trabalho, caracterizamos a morte induzida por 3 mM de ATP em diversos estágios de maturação da retina embrionária de pinto. Em um primeiro protocolo, avaliamos a morte celular em cultura de embriões de 7 dias cultivadas por 1, 2, 3, 5 e 7 dias. Num segundo protocolo, avaliamos a morte em culturas provenientes de embriões com 6, 7, 8, 9 e 11 dias e cultivadas por 2 dias. Nossos dados revelaram que em ambos os protocolos o efeito máximo do ATP em diminuir a viabilidade celular foi observado numa idade embrionária equivalente a 9 -10 dias, isto é em culturas de E7C2 - E7C3. Nas outras idades, tanto mais precoces quanto mais avançadas, a diminuição de viabilidade celular foi menor, sendo praticamente ausente em culturas mais amadurecidas de E7C7 ou E11C2. Estes dados em conjunto sugerem que a

morte celular na retina de embrião de pinto pode ser induzida por ATP apenas em um determinado período compreendido entre o 7o e o 14o dia do desenvolvimento embrionário, o nível máximo de morte ocorrendo em torno do 9o dia. Estas observações também sugerem que a expressão de receptores P2X7 envolvidos no fenômeno de morte celular ocorra apenas nesta “janela” do desenvolvimento, um intervalo temporal concomitante com a segunda onda de morte celular programada neste tecido. Além disto, tendo em vista que a neurogênese está praticamente terminada nesta fase do desenvolvimento da retina de galinha (Prada et al., 1991), nossos dados sugerem que ATP induza a morte de células pós-mitóticas neste tecido.

Resta et al. ((2005) evidenciaram que o bloqueio de receptores purinérgicos P2 com antagonistas é capaz de aumentar a densidade de células ganglionares e amácrinas colinérgicas na retina de ratos neonatos, uma observação que sugere que receptores P2 ativados por ATP endógeno induzam a morte destas células durante o desenvolvimento deste tecido. Estes autores também caracterizaram a presença de receptores do tipo P2X7, assim como o acúmulo de ATP em grânulos nestas células. Na presente tese, observamos que ATP é capaz de induzir morte celular num período equivalente compreendido entre os dias 7 e 14 do desenvolvimento da retina de embrião de galinha. Tendo em vista que este período do desenvolvimento da galinha é semelhante ao início do período pós-natal do rato, pelo menos em termos de neurogênese (Martins e Pearson, 2007), nossos dados levantam a possibilidade de que células amácrinas colinérgicas da retina de pinto que aparecem antes da sinaptogênese (Spira et al., 1987) também possam sofrer apoptose por ativação de receptores P2X7 durante o desenvolvimento deste animal. Experimentos utilizando marcadores para células colinérgicas como a acetiltransferase (ChAT) poderão esclarecer este ponto.

Vários trabalhos têm mostrado que o ATP extracelular induz preferencialmente morte celular por apoptose (Morelli et al., 2003; Bulanova et al., 2005; Resta et al., 2005; Zhang et al., 2005; Locovei et al., 2007). Entretanto, Schulze-Lohoff et al. (1998) mostraram que o ATP, em concentrações de 300  $\mu$ M até 5 mM em culturas de células mesangiais de rato, induz aumentos nos níveis de fragmentação de DNA, tendo uma resposta

máxima de núcleos positivos para TUNEL (~6 x) com 3 mM no tempo de 90 minutos. Além disso, observaram nestas culturas aproximadamente 63% de morte por necrose através da liberação de lactato desidrogenase (LDH) após 4 horas de estimulação com ATP 3 mM, sugerindo que o ATP possa iniciar simultaneamente rotas tanto para a apoptose quanto para a necrose nestas células. No presente trabalho, resolvemos estabelecer o tipo de morte ativada por ATP. Utilizamos marcadores para apoptose tais como fragmentação de DNA, imunofluorescência para caspase-3 e condensação de cromatina, assim como também para a necrose como a liberação de LDH. Nossos resultados mostraram um aumento em todos os marcadores de apoptose quando as culturas foram tratadas com 3 mM de ATP. Bandas de DNA fragmentado mais pronunciadas, maior número de células marcadas para caspase-3 clivada e maior quantidade de núcleos picnóticos foram encontrados nas culturas tratadas com ATP. Por outro lado, em contraste com o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que mostrou um aumento de até 80 %, a percentagem de LDH liberada nas culturas tratadas com ATP foi bastante baixa e não significativamente diferente daquela observada nas culturas controle ( controle =  $11.1 \pm 2.65$  %; ATP =  $12.2 \pm 2.9$  %) Estes dados em conjunto sugerem que este nucleotídeo esteja induzindo preferencialmente o fenômeno de apoptose celular em nossas culturas.

Uma ativação breve de receptores P2X7 com baixas concentrações de ATP ou BzATP resultam na elevação de cálcio intracelular (Ferrari et al., 1996). No entanto, a ativação sustentada deste receptor com altas concentrações de ATP resultam na formação de um poro que permite o influxo de cátions grandes como a N-methyl-D-glutamine (NMDG), além de captação de corantes fluorescentes e morte celular (Ferrari et al., 1997). O poro do P2X7 tem a característica de permeabilizar moléculas >900 Da (Virginio, 1999; North, 2002; Innocenti et al., 2004). O receptor P2X7 induz tanto permeabilização quanto apoptose em diversos sistemas, embora a relação entre ambos ainda não esteja totalmente esclarecida. Utilizando Brometo de Etídeo, um fluorocromo intercalante de DNA com 394.4 Da, resolvemos caracterizar o efeito de BzATP e ATP na permeabilização desta molécula em nossas culturas. Nossos dados revelaram a presença de inúmeras células coradas com brometo de etídeo

quando estimuladas com BzATP 0.1 mM ou ATP 3 mM. Nestas condições, as células em cultura mostraram as seguintes características: inchaço, ligeiramente isoladas e muitas vezes com uma disposição sobre células gliais, sugerindo que estas células marcadas seriam neurônios que caracteristicamente se localizam sobre as células gliais.

Em oposição a esta observação, Collo et al. (1997) mostraram que receptores P2X7 no cérebro eram expressos em microglia e células endoteliais, mas não em neurônios. Desta forma, acreditou-se que o receptor P2X7 seria o único receptor P2 que não seria expresso por neurônios. Entretanto, Brändle (1998), determinando a expressão e localização do receptor P2X7 na retina e na coróide de rato, observou a presença deste receptor tanto na camada nuclear interna quanto na camada celular ganglionar, sugerindo que diferentes tipos de células amácrinas e células ganglionares expressam este receptor. Esta última observação, portanto, está de acordo com a nossa idéia de que neurônios sejam as células permeabilizadas por estimulação de receptores P2X7 por ATP ou BzATP em nossas culturas.

Após caracterizar que a ativação de receptores P2X7 por 3 mM de ATP induz morte celular em nossas culturas mistas de retina embrionária de galinha, resolvemos investigar se este receptor estaria presente na glia, em neurônios ou em ambas as células. Utilizando culturas purificadas de neurônios (E7C2), culturas purificadas de glia (E7C14) ou culturas mistas, nossos dados revelaram que o ATP foi capaz de diminuir a viabilidade celular apenas em culturas mistas. Nenhuma diminuição na viabilidade celular foi observada em culturas purificadas de neurônios ou glia, sugerindo que uma associação entre neurônios e glia seria necessária para a indução de morte celular por ativação de receptores P2X7. Reforçando esta idéia estão nossos dados que mostram que nenhuma permeabilização para o corante brometo de etídeo foi observada em culturas enriquecidas de neurônios. Em culturas enriquecidas de glia, apenas alguns neurônios remanescentes apresentaram permeabilização para o corante, apresentando uma morfologia de inchaço muito clara. Portanto, estes dados em conjunto sugerem que os neurônios sejam o tipo celular que expressa o receptor P2X7 cuja ativação pode causar permeabilização de brometo de etídeo e morte celular. Por outro lado, nossos dados também

sugerem que para a indução destes dois fenômenos, a interação destes neurônios com células gliais seja necessária. A participação ou não de outras moléculas da glia que não o receptor P2X7 nos fenômenos de permeabilização e morte de neurônios induzida por ativação deste receptor merece ser investigada em experimentos futuros.

## **6. Conclusões**

- \* ATP extracelular em altas concentrações induz morte celular na retina embrionária de galinha. A morte celular seria no período compreendido entre E8 e E14, sendo os mais altos níveis de morte em E9.
- \* A morte celular induzida pelo ATP mostrou-se ser de tipo apoptótica.
- \* A indução de morte celular pelo ATP na retina embrionária de galinha ocorre pela ativação do receptor P2X<sub>7</sub>.
- \* Pelo menos parte dos receptores P2X<sub>7</sub> devem estar presentes em neurônios e a morte celular induzida por sua ativação provavelmente envolve a interação entre neurônios e glia neste tecido.

## 7. Referencias bibliograficas

Abbracchio M.P. Burnstock G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 64(3):445-75.

Adriouch S., Dox C., Welge V., Seman M., Koch-Nolte F., Haag F. (2002). Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol.* 169(8):4108-12.

Amadio, S., D'Ambrosi, N. , Cavaliere, F., Murra, B., Sancesario, G., Bernardi G., Burnstock, G, Volonte C. (2002). P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons *Neuropharmacol.* 42: 489–501.

Amstrup J and Novak I. (2003). P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J.* 374(Pt 1):51-61.

Baljit S. Khakh and R. Alan North. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.

Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F. (1996). An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood.* 15;87(2):682-90.

Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F. (1999). Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 274(47):33206-8.

Barth, K., K. Weinhold, A. Guenther, M. T. Young, H. Schnittler and M. Kasper. (2007). Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. *FEBS Journal* 274 3021–3033.

Brändle, U., Kohler, K., & Wheeler-Schilling, T. H. (1998). Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* 62(1), 106– 109.

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(7):3880-90.

Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter .*TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.27 No.3

Burnstock, G and Knight GE. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Intl. Ver. Cytol.*,240:31-304.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825–2837, 2004.

Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195–213.

Close, J.L., Gumuscu, B., Reh, T.A. (2005). Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* 132, 3015–3026.

Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623–634

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* (4):339-45.

Collo G., Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA and Buell G (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277–1283.

Cook, B., Portera-Cailliau, C. and Adler, R. (1998). Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J. Comp. Neurol.* 396: 12-19.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C., Nedergaard, M. (2000). ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20, 2835–2844.

Croft, Daniel R., Mathew L. Coleman, Shuixing Li, David Robertson, Teresa Sullivan, Colin L. Stewart, and Michael F. Olson. (2005). Actin-myosin–based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 168, No. 2, 245–255.

Cruchten, Van S and Van Den Broeck W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* (4):214-23.

Cruz M.C., Marques Ventura, A.L., Schachter, J., et.al. (2006) Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X7-associated pore or channel formation *British Journal of Pharmacology* 147, 324–334

Cuadros, M.A. & Ríos, A. ( 1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 178, 543– 551.

Da Cruz CM, Ventura AL, Schachter J, Costa-Junior HM, da 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*. 2006 147(3):324-34.

Davies, Alun M. (2003). Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *The EMBO Journal* Vol. 22 No. 11 pp. 2537-2545.

De la Rosa, Enrique J. and Flora de Pablo. 2000. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory *TINS* Vol. 23, No. 10, 1628-3.

Díaz, B., Pimentel, B., de Pablo, F. & de la Rosa, E.J. (1999) Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1624– 1632.

Díaz, B., Serna, J., de Pablo, F. & de la Rosa, E.J. ( 2000) In vivo regulation of cell death by embryonic (pro) insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development*, 127, 1641– 1649.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J. M., Venketaraman, V. and Baricordi, O. R. (1998). Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ.* (5): 191-199.

Di Virgilio F., Borea PA, Illes P. (2001). P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci.* (1):5-7.

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF. (2004). Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 308(3):1053-61.

Duan S, Neary JT. (2006). P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function. *Glia.* 54(7):738-46.

Dunwiddie T.V., Diao, L., Proctor W.R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci.* 17(20):7673-82.

Falzoni S, Munerati M, Ferrari D, Spisani S, Moretti S, Di Virgilio F. (1995). The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J Clin Invest.* 95(3):1207-16.

Fan, Ting-Jun, Li-Hui Han, Ri-Shan CONG, and Jin Liang. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 37(11): 719–727

Faria RX, Defarias FP, Alves LA. (2005). Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(2):260-71.

Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol.* 156(4):1531-9.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* 159(3):1451-8.

Ferreira J.M., Paes-de-Carvalho R. (2001). Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* 900(2):169-76.

Ferri, Karine F. and Guido Kroemer. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology.* Vol 3.

Fields, R. Douglas and Beth Steven. (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23, 625–633

Fields, R. Douglas and Geoffrey Burnstock. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia Interactions. *Nature Reviews. Neuroscience.* Vol. 7

Frade, J.M., Marti, E., Bovolenta, P., Rodriguez-Pena, M.A., Perez-Garcia, D., Rohrer, H., Edgar, D. and A. Rodríguez-Tébar. (1996). Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit, *Development* 122:2497–2506.

Frade, JM., Bovolenta P., Martínez-Morales, JR., Arribas A., Barbas, JA., and Rodríguez-Tébar, A. (1997). Control of early cell death by BDNF in the chick retina *Development,* 124: 3313-3320.

Frade, J.M., Bovolenta, P. and Rodríguez-Tebar, A. (1999). Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc. Res. Tech.* 45: 243-251.

França GR, Freitas RC, Ventura AL. (2007) ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. *Int J Dev Neurosci.* 25(5):283-91.

Franke, H., Krügel, U. and Illes Peter. (2006). P2 receptors and neuronal injury. *Eur J Physiol* 452: 622–644

Franke H and Illes P. (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & Therapeutics*, 109:297 – 324

Freedman BD, Liu QH, Gaulton G, Kotlikoff MI, Hescheler J, Fleischmann BK. 1999. ATP-evoked Ca<sup>2+</sup> transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect. *Eur J Immunol.* 29(5):1635-46.

Fries JE, Goczalik IM, Wheeler-Schilling TH et al (2005). Identification of P2Y receptor subtypes in human Müller glial cells by physiology, single cell RT-PCR, and immunohistochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3000-3007.

Garcia-Marcos, Mikel; Encarnación Pérez-Andrés, Séverine Tandel Unai Fontanils, Alain Kumps, Elie Kabre, Antonio Gómez-Muñoz, Aida Marino, Jean-Paul Dehaye, and Stephanie Pochet. (2003). Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *Journal of Lipid Research.* 47(2):286-99.

Girolomoni G, Santantonio ML, Pastore S, Bergstresser PR, Giannetti A, Cruz PD Jr. 1993. Epidermal Langerhans cells are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane ATPase. *J Invest Dermatol.*100(3):282-7.

Gudipaty L, Munetz J, Verhoef PA, Dubyak GR. (2003). Essential role for Ca<sup>2+</sup> in regulation of IL-1 $\beta$  secretion by P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HE. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(2):286-99.

Hashimoto, T., Zhang, X.M., Chen, B.Y., Yang, X.J. (2006). VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* 133, 2201–2210.

Hokoç J.N., Ventura A.L., Gardino P.F., De Mello F.G. (1990). Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain Res.*;532(1-2):197-202.

Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. (1998). Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.*273(42):27170-5.

Innocenti B., Pfeiffer S., Zrenner E., Kohler K., and Guenther E., (2004). ATP-Induced Non-Neuronal Cell Permeabilization in the Rat Inner Retina. *J. Neurosci.* 24(39):8577-8583.

Illes P. and Ribeiro J. A., (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.*, 483: 5– 17

Ishii, K., Kaneda, M., Li, H., Rockland, K. S., & Hashikawa, T. (2003). Neuron-specific distribution of P2X7 purinergic receptors in the monkey retina. *J Comp Neurol* 459(3), 267– 277.

Jabs R, Guenther E, Marquardt K et al. (2000). Evidence for P2X3, P2X4, P2X5 but not for P2X7 containing purinergic receptors in Müller cells of the rat retina. *Molecular Brain Research* 76:205-210.

James, Greg and Arthur M. Butt. (2002). P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology* 447 247– 260.

Kerr, JFR., Wyllie AH. and AR, Currie. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239-57

Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* 20(22):6347-58.

Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.* (4):322-30.

Kolb, H. (1991) The neural organization of the human retina. In "Principles and Practices of Clinical Electrophysiology of Vision" (Eds. Heckenlively, J.R. and Arden, G.B.) Mosby Year Book Inc. , St. Louis, pp. 25-52.

Koshlukova SE, Lloyd TL, Araujo MW, Edgerton M. 1999. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem.*;274(27):18872-9.

Kroemer G, Jaattela M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5: 886–897.

Kroemer, G., Lorenzo Galluzzi, And Catherine. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* 87: 99–163.

Liang L, Schwiebert EM. (2005). Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?". *Am J Physiol Cell Physiol*. 288(2):C240-2.

Locovei S, Wang J, Dahl G.(2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*. 580(1):239-44.

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*. 14;278(7):4590-6.

Martins R.A., Pearson R.A. (2007). Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res*. 4;1192

Mayordomo R., Valenciano A.I., de la Rosa EJ, Hallböök F. 2003. Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur J Neurosci*. (7):1744-50.

Mey, Jörg and Solon Thanos 2000. Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews* 3:343–379.

Morelli, A., Ferrari, D., Bolognesi, G., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F.(2001). Proapoptotic plasma membrane pore: P2X7 receptor. *Drug Dev. Res*. 52, 571–578.

Morelli, A., Chiozzi, P., Chiesa, A., Ferrari, D., Sanz, J. M., Falzoni, S., et al. (2003). Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol Biol Cell* 14(7), 2655–2664.

Mossman, 1983. T. Mossman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1983), pp. 55–63.

Myers AJ, Eilertson B, Fulton SA, Flynn JL, Canaday DH. (2005). The purinergic P2X7 receptor is not required for control of pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun*. 73(5):3192.

Nagy PV, Fehér T, Morga S, Matkó J. (2000). Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol Lett.* 72(1):23-30

Newman E.A. (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci.* 21(7):2215-23.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. 1995 Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.*376(6535):37-43.

Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 102–103: 139–142, 1998.

North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.

Nunes PH, Calaza Kda C, Albuquerque LM, Fragel-Madeira L, Sholl-Franco A, Ventura AL (2007). Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. *Int J Dev Neurosci* 25(8):499-508.

Paes de Carvalho R, de Mello FG. (1982). Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. *J Neurochem.* 38(2):493-500.

Paes-de-Carvalho R, Maia G.A, Ferreira J.M. (2003). Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. *Neurochem Res.* (10):1583-90.

Pannicke T, Fischer W, Biedermann B, Schadlich H, Grosche J, Faude F, Wiedemann P, Allgaier C, Illes P, Burnstock G, Reichenbach A (2000) P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina. *J Neurosci* 20: 5965-5972.

Pearson R.A., Catsicas M., Becker D. et al (2002). Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci* 22:7569-7579.

Pearson R.A., Dale N., Llaudet E. et al (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46:731-744.

Pelegrin P., Surprenant A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25(21):5071-82.

Pfeiffer Z.A., Aga M., Prabhu U, Watters J.J., Hall D.J., Bertics P.J. (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(6):1173-82.

Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L., R. López And G. Ramírez. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina, *Eur. J. Neurosci.* 3:559–569.

Puthussery, T., Peter Yee, Algis J. Vingrys and Erica L. Fletcher. (2006). Evidence for the involvement of purinergic P2X7 receptors in outer retinal processing. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 24, pp. 7–19, 2006.

Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines Vol. 50, Issue 3, 413-492.

Resta, V., Novelli E., Di Virgilio F. and Galli-Resta L.(2005) Neuronal death induced by endogenous extracellular ATP in retinal cholinergic neuron density control. *Development*, 132: 2873-2882.

Robson, S.C., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Candinas, D., Koziak, K., Millan, M., Hancock W.W., Bach, F.H. (1997). Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med.* 185(1):153-63.

Sakaki, Y., Fukuda, Y., Yamashita, M. (1996). Muscarinic and purinergic Ca<sup>2+</sup> mobilizations in the neural retina of early embryonic chick. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 691–699.

Sanches G, de Alencar LS, Ventura AL. (2002). ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int J Dev Neurosci.* 20(1):21-7.

Santos P.F., Caramelo O.I., Carvalho A., Duarte C.. (1999) Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons. *J Neurobiol.* 41 (3): 340-8.

Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, Sterzel RB. (1998). Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol.* 275(6 Pt 2):F962-71.

Schweichel, J.U., Merker H.J. (1973).The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253–266.

Sluyter R, Dalitz JG, Wiley JS. (2004). P2X7 receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes Immun.* 5(7):588-91.

Spira AW, Millar TJ, Ishimoto I, Epstein ML, Johnson CD, Dahl JL, Morgan IG. (1987) Localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the embryonic chick retina. *J Comp Neurol.* 260(4):526-38.

Sugioka, M., Fukuda, Y., Yamashita, M. (1996). Ca<sup>2+</sup> responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol.* 493:855-863.

Sugioka, W.L. Zhou, H.D. Hoffmann and M. Yamashita. (1999). Ca<sup>2+</sup> mobilization and capacitive Ca<sup>2+</sup> entry regulate DNA synthesis in cultured chick retinal neuroepithelial cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17(3) pp. 163–172.

Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha H, Kim KT. (2001). P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J Immunol.* 166(11):6754-63.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G.(1996). The cytosolic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272(5262), 735–738.

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):1-7.

Torres, G.E., Haines, W.R., Egan, T.M., Voigt, M.M. (1999). Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 54, 989–993.

Valenciano AI, Mayordomo R, de La Rosa EJ, Hallböök F. (2002). Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport.* 13(3):297-9.

Valera S., Hussy N., Evans R.J., Adami N., North R.A., Surprenant A, Buell G.(1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature.* 371(6497):516-9.

Vecino, E., María Hernández and Mónica García. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 965-974.

Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*.36(9):1285-94.

Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*. 2(4):315-21.

Volonté C and Merlo D. (1996). Selected P2 purinoceptor modulators prevent glutamate-evoked cytotoxicity in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 45(2):183.

Volonté C, Ciotti MT, D'Ambrosi N, Lockhart B, Spedding M. (1999). Neuroprotective effects of modulators of P2 receptors in primary culture of CNS neurones. *Neuropharmacology*. (9):1335-42.

Wang, Y., Dakubo, G.D., Thurig, S., Mazerolle, C.J., Wallace, V.A. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132, 5103–5113.

Willbold, P. and G. Layer. 1998. Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro, *Histol. Histopathol*. 13\_.531–552.

Wilson HL, Francis SE, Dower SK, Crossman DC. (2004). Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. *J Immunol*. 173(2):1202-8.

Wulle, I. H. and J. Wagner. (1990). GABA and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry reveal different patterns of colocalization in retinal neurons of various vertebrates, *J. Comp. Neurol*. 296\_.173–178.

Yakovlev, Alexander G. and Alan I. Faden. (2004). Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* Vol. 1, 5–16.

Yokoyama Y, Ozawa S, Seyama Y, Namiki H, Hayashi Y, Kaji K, Shirama K, Shioda M, Kano K. (1997). Enhancement of apoptosis in developing chick neural retina cells by basic fibroblast growth factor. *J Neurochem*. May;68(5):2212-5.

Zhang, Xiulan, Mei Zhang, Alan M. Laties, and Claire H. Mitchell. (2005). Stimulation of P2X7 Receptors Elevates Ca<sup>2+</sup> and Kills Retinal Ganglion Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 46, No. 6

Zimmermann H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49(6):589-618. Review.

# 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](#)