

JULIETA SCHACHTER

Dois mecanismos de transporte transmembrana
associados à ativação do receptor P2X₇
em macrófagos

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Julieta Schachter

DOIS MECANISMOS DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANA ASSOCIADOS À
ATIVAÇÃO DO RECEPTOR P2X₇ EM MACRÓFAGOS

Volume Único

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)

SCHACHTER, JULIETA

**DOIS MECANISMOS DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANA
ASSOCIADOS À ATIVAÇÃO DO RECEPTOR
P2X₇ EM MACRÓFAGOS**

xxiii, 280 fls

Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) –
Universidade Federal de Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, 2008.

Orientador: Pedro Muanis Persechini

1 . Receptores P2. 2. P2X₇. 3. Poro Z 4. HEK-P2X₇. 5. Macrófagos
- Teses I. Pedro Muanis Persechini (Orient.) II. Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título

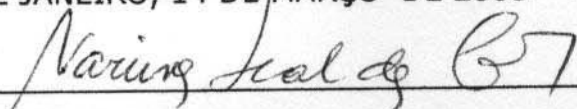
"DOIS MECANISMOS DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANA
ASSOCIADOS À ATIVAÇÃO DO RECEPTOR P2X₇
EM MACRÓFAGOS".

JULIETA SCHACHTER

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

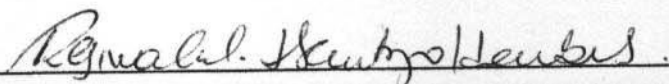
RIO DE JANEIRO, 14 DE MARÇO DE 2008



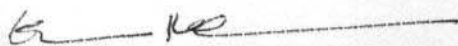
DRA. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



DR. PEDRO MUANIS PERSECHINI (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR



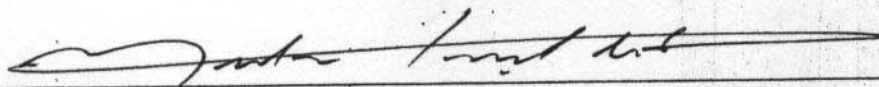
DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR - UFRJ) - REVISORA



DRA. ELEONORA KURTENBACH (DOUTOR - UFRJ)



DR. MARCELA DE FREITAS LOPES (DOUTOR - UFRJ)



DR. NEWTON GONÇALVES DE CASTRO (DOUTOR - UFRJ)

Dedico esta tese a todos aqueles que acreditam que a verdadeira pesquisa científica, aquela que produz conhecimentos acessíveis para toda a sociedade, somente poderá ser feita em um mundo mais justo.

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao povo brasileiro, que pagando impostos faz possível a pesquisa científica financiada pelo Estado e que nestes 5 anos me ensinou a olhar o mundo de outra maneira.

Agradeço ao meu orientador, Professor Pedro Muanis Persechini, quem deu um lugar no seu laboratório a uma argentina bastante estranha e que, além de ser um orientador bastante estranho também, é uma pessoa extraordinária que sempre estive disposto a me ajudar e me deu todo seu apoio nos momentos difíceis.

Agradeço ao Professor Robson Coutinho-Silva, quem se mostrou sempre disposto a escutar, discutir sobre ciência e me ajudar, com paciência e carinho, ao longo destes anos.

Agradeço à Professora Marília Guimarães, quem me ensinou a transfectar células e se transformou em uma grande colaboradora e amiga.

Agradeço às minhas alunas de Iniciação Científica, Andressa e Aline, que me ensinaram muito mais do que eu ensinei a elas, principalmente a ser mais paciente.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Imunobiofísica e do Laboratório de Imunofisiologia: Camila, Flavinha, Flavia, Carol, Gladys, Júlia, Vândir e Hércules, que me ensinaram a falar português e construíram um clima familiar no qual dá gosto trabalhar, me fazendo sentir em casa.

Agradeço aos professores e alunos dos laboratórios do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho por terem aberto as portas e permitido fazer uso dos equipamentos, em muitos casos doando tempo para me ensinar a utilizá-los. Em especial agradeço à equipe dos professores Regina Coeli dos Santos Goldenberg,

Fernando de Mello, Newton G. Casto, Bartira R. Bergmann, Rosália M. Otero e Marcelo Santiago.

Agradeço aos meus amigos do Caju e da Maré, que me ensinaram que dentro da cidade do Rio de Janeiro existem muitas cidades, falam-se muitos idiomas e vive-se sob leis muito diferentes.

Agradeço aos meus amigos, companheiros de luta, irmãos do coração que tive a sorte de encontrar nesta cidade: Alexandre Dias, Elida Mascoto, Fabiana Benvenuto e Mariluci Nascimento, que estiveram do meu lado em todos os momentos e que constroem um mundo melhor todos os dias.

Agradeço ao meu namorado, Rogério Brunelli, quem caminha ao meu lado sempre, com amor e paciência.

Agradeço aos meus pais e às minhas irmãs, que me apoiaram ao longo de todos estes anos, com tanto amor e tantos cuidados que qualquer palavra de agradecimento ficará pequena.

RESUMO

Os macrófagos expressam o receptor P2X₇ e outros receptores para nucleotídeos (receptores P2), apresentando o fenômeno de permeabilização da membrana plasmática dependente de P2X₇ ativado por ATP extracelular (ATPe), que acontece por um mecanismo ainda pouco conhecido. Utilizamos a técnica de *patch-clamp*, medições de Ca²⁺ intracelular e ensaios de captação de corantes fluorescentes para comparar o fenômeno de transporte associado ao receptor P2X₇ em macrófagos e em células HEK-293 transfectadas com o receptor P2X₇ (células HEK-P2X₇). Ambos os tipos celulares apresentaram correntes catiônicas de entrada, aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular livre e captação de corantes catiônicos após o tratamento com ATPe, como já descrito. Porém, contrário ao observado em macrófagos, as células HEK-P2X₇ não apresentaram captação de corantes fluorescentes aniônicos nem o canal de 440 pS (poros Z) nos registros eletrofisiológicos realizados na configuração *cell-attached*. Além disso, o mecanismo de transporte de corantes aniônicos presente nos macrófagos apresentou efluxo do corante e, uma vez ativado à 37 °C, permaneceu ativo a 4 °C, enquanto que a entrada de corantes catiônicos mostrou-se dependente da temperatura e unidirecional. Nossos resultados indicam que o mecanismo de captação de corantes induzido pelo ATPe, habitualmente chamado “fenômeno de permeabilização” e identificado como um “poro de permeabilização” pode estar relacionado ao menos com dois mecanismos distintos em macrófagos: uma via difusional, possivelmente associada com o poro Z de 440 pS e um mecanismo de captação de corantes catiônicos que não é difusional e acontece através de um mecanismo de transporte ainda não identificado.

ABSTRACT

Macrophages express P2X₇ and other nucleotide (P2) receptors, and display the phenomenon of extracellular ATP (ATPe) -induced P2X₇-dependent membrane permeabilization which occurs through a poorly understood mechanism. We used patch-clamp recordings, intracellular Ca²⁺ measurements and fluorescent dye uptake assays to compare P2X₇-associated transport phenomena of macrophages and HEK 293 cells transfected with P2X₇ receptors (HEK-X₇ cells). Both cells presented inward currents, increase of free intracellular Ca²⁺ concentration and uptake of cationic dyes upon exposure to ATPe, as previously described. However, contrary to macrophages, HEK-X₇ cells did not uptake anionic dyes and did not display the 440 pS channels (Z pores) under cell-attached patch-clamping configuration. In addition the transport mechanism of anionic dyes displayed by macrophages can also support dye efflux and, once activated at 37 °C, it remains active at 4 °C, while cationic dyes follow a temperature-dependent unidirectional uptake pathway. Our results indicate that the mechanism of ATPe-induced dye uptake, usually called “permeabilization phenomenon” and identified with a “permeabilization pore” can be ascribed to at least two distinct mechanisms in macrophages: a diffusional pathway, possibly associated with the 440 pS Z pores, and a cation uptake mechanism that is not diffusional and should be ascribed to a yet non-identified transport mechanism

ÍNDICE

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>XXIV</u>
1.1	O ATP E OUTROS NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES	25
1.1.1	EFEITOS DOS NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS EXTRACELULARES	25
1.1.2	SECREÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	28
1.1.3	ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	33
1.2	RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS	37
1.2.1	OS RECEPTORES P1	37
1.2.2	OS RECEPTORES P2Y	39
1.2.3	OS RECEPTORES P2X	42
1.2.4	DIÁLOGO CRUZADO ENTRE OS RECEPTORES P2Y E OS RECEPTORES P2X	48
1.3	O RECEPTOR P2X₇	49
1.3.1	PARTICULARIDADES DO RECEPTOR P2X ₇	50
1.3.2	O PAPEL DO RECEPTOR P2X ₇ NO SISTEMA IMUNE	52
1.3.3	ESTRUTURA DO RECEPTOR P2X ₇	55
1.3.4	FARMACOLOGIA DO RECEPTOR P2X ₇	58
1.3.5	PROPRIEDADES ELETROFISIOLÓGICAS	61
1.3.6	PROPRIEDADES DO PORO ASSOCIADO AO FENÔMENO DE PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA	69
1.4	SINALIZAÇÃO INTRACELULAR	75
1.5	UMA QUESTÃO AINDA SEM RESPOSTA	79
2	<u>OBJETIVOS</u>	<u>80</u>
2.1	OBJETIVO GERAL	81

2.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
3	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	82
3.1	MATERIAIS	83
3.1.1	REAGENTES E DROGAS UTILIZADAS	83
3.1.2	ANIMAIS UTILIZADOS	84
3.1.3	CÉLULAS UTILIZADAS	84
3.2	MÉTODOS	85
3.2.1	OBTENÇÃO MACRÓFAGOS DE INTRAPERITONEAIS MURINOS	85
3.2.2	CULTURA DE MACRÓFAGOS	85
3.2.3	TRANSFEÇÃO ESTÁVEL DE CÉLULAS HEK-293-P2X ₇	86
3.2.4	CULTURA DE CÉLULAS HEK-293	87
3.2.5	ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES	87
3.2.6	MEDIÇÃO DAS VARIAÇÕES DO CÁLCIO CITOPLASMÁTICO	89
3.2.7	LISE CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	90
3.2.8	ELETROFORESE SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	91
3.2.9	ELETROFISIOLOGIA	91
3.2.10	SOLUÇÕES UTILIZADAS	93
3.2.11	MEDIÇÃO DOS PARÂMETROS DESCRITIVOS DO CANAL UNITÁRIO	94
3.2.12	ANÁLISE DAS IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	94
3.2.13	ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE ÍONS LIVRES NAS SOLUÇÕES UTILIZADAS	95
3.2.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
4	<u>RESULTADOS</u>	96

4.1 FENÔMENOS TÍPICAMENTE ASSOCIADOS AO RECEPTOR P2X₇ EM RESPOSTA AO ATP_E	97
4.1.1 REGISTRO DAS CORRENTES ELÉTRICAS CARACTERISTICAMENTE ASSOCIADAS AO RECEPTOR P2X ₇	98
4.1.2 AUMENTO DE CÁLCIO CITOPLASMÁTICO EM RESPOSTA AO ATP	103
4.1.3 CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES ASSOCIADA AO RECEPTOR P2X ₇ EM RESPOSTA AO ATP _E	106
4.2 CORRELAÇÕES E DIFERENÇAS ENTRE AS DIFERENTES ABORDAGENS AO FENÔMENO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X₇ EM MACRÓFAGOS	110
4.2.1 EFEITO DOS ÍONS EXTRACELULARES SOBRE AS CORRENTES ELÉTRICAS ASSOCIADAS AO RECEPTOR P2X ₇	110
SOLUÇÃO EXTERNA	113
4.2.2 EFEITO DOS ÍONS EXTRACELULARES NA CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDA PELO ATP	113
4.2.3 PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR NO FENÔMENO DE CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDO POR ATP	118
4.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK-293 COM O RECEPTOR P2X₇	126
4.3.1 REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS HEK-P2X ₇	126
4.3.2 AUMENTO DO CÁLCIO CITOPLASMÁTICO EM RESPOSTA AO ATP NAS CÉLULAS HEK-P2X ₇	131
4.3.3 ENTRADA DE CORANTES FLUORESCENTES NAS CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM P2X ₇	133
4.4 OUTRAS LINHAGENS CELULARES TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR P2X₇	143
4.5 BUSCANDO UMA EXPLICAÇÃO PARA AS DIFERENÇAS OBSERVADAS ENTRE OS MACRÓFAGOS E AS CÉLULAS HEK-P2X₇	145

4.6	O PROBLEMA DA ENTRADA DOS CORANTES FLUORESCENTES CATIÔNICOS	153
5	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>158</u>
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	159
5.2	O Poro Z	160
5.3	EFEITOS DOS ÍONS EXTRACELULARES NOS FENÔMENOS ASSOCIADOS AO RECEPTOR P2X₇	165
5.4	A MOVIMENTAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR E OS PROCESSOS MEDIADOS PELO RECEPTOR P2X₇	174
5.5	DUAS VIAS DE ENTRADA PARA OS CORANTES FLUORESCENTES: UMA PARA CÁTIONS E OUTRA PARA ÂNIONS	180
5.5.1	ENTRADA DE ÂNIONS: A HIPÓTESE DA PANEXINA	181
5.5.2	QUAL É O MECANISMO DE ENTRADA DOS CORANTES FLUORESCENTES CATIÔNICOS?	186
5.6	MODELO PROPOSTO PARA A CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDA PELO ATPe VIA RECEPTOR P2X₇	190
6	<u>CONCLUSÕES</u>	<u>193</u>
7	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>196</u>
8	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>199</u>
9	<u>ANEXO</u>	<u>228</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Nucleosídeos e nucleotídeos na ativação e desativação do sistema imune inato.	27
Figura 2 Diversas células do sistema linfo-hematopoiético que liberam ATP e algumas das funções desta substância.....	29
Figura 3 Esquema que resume os possíveis transportadores de ATP desde o interior da célula até o meio extracelular.....	32
Figura 4 Jogo cruzado entre as enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares e os diferentes receptores para esses nucleotídeos (P2X, P2Y e P1).....	35
Figura 5 Estrutura dos receptores P1.....	38
Figura 6 Estrutura do receptor P2Y ₁	39
Figura 7 Estrutura predita para os receptores P2X.	42
Figura 8 Cinética de ativação e desativação dos receptores P2X.....	46
Figura 9 A combinação de dois sinais extracelulares é necessária para a ativação do inflamossoma e conseqüente processamento e liberação de IL-18 e IL-1β.	53
Figura 10 O receptor P2X ₇ forma um complexo com outras proteínas.	55
Figura 11 Modelo proposto para a estrutura de P2X ₇	57
Figura 12 Os dois tipos de correntes associadas ao receptor P2X ₇ em macrófagos murinos.....	62
Figura 13 Esquema que representa uma hipótese sobre a regulação da permeabilização através do receptor P2X ₇	63
Figura 14 Esquema que representa as duas hipóteses sobre a identidade molecular responsável pelas correntes associadas ao receptor P2X ₇	64
Figura 15 Estrutura prevista para as conexinas e para as panexinas.	68
Figura 16 Estruturas dos diferentes cátions orgânicos e de alguns corantes fluorescentes utilizados para testar a abertura do poro associado ao receptor P2X ₇	71

Figura 17 Vias de sinalização associadas ao receptor P2X ₇	75
Figura 18 Proteínas quinases ativadas por fatores mitogênicos (MAPKs).....	77
Figura 19 Esquema que mostra a estrutura do pcDNA6/V5-His A, utilizado na clonagem de células HEK-293-P2X ₇	86
Figura 20 Esquemas da configuração <i>cell-attached</i>	92
Figura 21 Esquemas da configuração <i>whole-cell</i>	93
Figura 22 Resposta eletrofisiológica típica de macrófagos intraperitoneais murinos ao ATP extracelular na conformação <i>whole-cell</i>	99
Figura 23 Registros do poro Z associado ao receptor P2X ₇ em macrófagos murinos utilizando a conformação <i>cell-attached</i>	101
Figura 24 Dependência da voltagem apresentada pelo poro Z associado ao receptor P2X ₇ . Registros <i>cell-attached</i> de macrófagos intraperitoneais murinos.....	102
Figura 25 Variações do cálcio citoplasmático em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe.....	105
Figura 26 Dependência da temperatura na captação de corantes em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe.....	108
Figura 27 Dependência da temperatura na captação de corantes em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe, quantificação da fluorescência.....	109
Figura 28 Efeito da ausência de cátions divalentes no meio externo no registro do poro Z associado ao receptor P2X ₇ em macrófagos intraperitoneais murinos utilizando a conformação <i>cell-attached</i> em solução externa com EDTA.....	111
Figura 29 Efeito da ausência de sódio no registro do poro Z associado ao receptor P2X ₇ em macrófagos intraperitoneais murinos utilizando a conformação <i>cell-attached</i> em solução externa com baixas concentrações de sódio.....	112
Figura 30 Efeitos da composição iônica do meio externo na captação de corantes fluorescentes induzida pelo ATPe.....	115
Figura 31 Quantificação dos efeitos da composição iônica do meio externo na captação de corantes fluorescentes induzida pelo ATPe.....	116

Figura 32 Efeito dos íons extracelulares na captação de etídeo induzida por ATP 3 mM em macrófagos.....	117
Figura 33 Registros das variações do cálcio intracelular dos macrófagos murinos em resposta ao tratamento com ATP 5 mM em diferentes condições	120
Figura 34 A ausência de cálcio intracelular inibe a entrada de LúCIFer Yellow mas não a entrada de etídeo e de sulfo-rodamina B estimulada pelo ATPe em macrófagos murinos	122
Figura 36 Quantificação da fluorescência dos ensaios de captação de corantes induzida por ATP em ausência de cálcio	123
Figura 36 A entrada de etídeo induzida pelo ATPe acontece ainda em ausência de cálcio intracelular.....	125
Figura 37 Linhagem HEK-293 estavelmente transfectadas com o receptor P2X ₇ , expressão do receptor e resposta eletrofisiológica em <i>whole-cell</i>	128
Figura 38 O poro Z não é registrado nas células HEK-P2X ₇ . Ausência de registros do canal na conformação <i>cell-attached</i> na presença de ATPe.	130
Figura 39 Registros das variações do cálcio intracelular em resposta à perfusão com ATP em células HEK-293 transfectadas ou não com o receptor P2X ₇	132
Figura 40 As células HEK-P2X ₇ permitem a entrada de etídeo mas não de Lucifer Yellow em resposta ao tratamento com ATP extracelular.....	134
Figura 41 Os macrófagos de rato deixam entrar tanto Lucifer Yellow quanto etídeo em resposta ao tratamento com ATP extracelular.	136
Figura 42 As células HEK-P2X ₇ permitem a entrada de YO-PRO-1 mas não de carboxifluoresceína em resposta ao ATP extracelular.	137
Figura 43 Os macrófagos de camundongo e as células HEK-P2X ₇ deixam entrar MQAE em resposta ao tratamento com ATP extracelular.....	139
Figura 44 A entrada de Lucifer Yellow mas não a de etídeo é diminuída nos ensaios de captação de corantes em resposta ao tratamento com ATPe na solução com baixa concentração de cloreto.....	141

Figura 45 Quantificação da captação de corantes fluorescentes em macrófagos em resposta ao ATP extracelular em solução padrão e solução com baixa concentração de cloreto.....	142
Figura 46 O tratamento com ATPe nos astrocitomas 1321N1-P2X ₇ provoca entrada de etídeo mas não de Lucifer Yellow.	144
Figura 47 Ensaio de captação de corantes fluorescentes com tratamento com ATPe a 37 °C e entrada de etídeo, Lucifer Yellow e MQAE a 4 °C em macrófagos de camundongo.....	147
Figura 48 Ensaio de captação de corantes fluorescentes com tratamento com ATP a 37 °C e entrada de sulfo-rodamina B e carboxifluoresceína a 4 °C em macrófagos de camundongo.....	148
Figura 49 Experimentos de entrada e saída de Lucifer Yellow através do poro aberto pelo ATP associado ao receptor P2X ₇ em macrófagos de camundongo.	150
Figura 50 Ensaio de entrada e saída de sulfo-rodamina B através do poro aberto pelo ATP associado ao receptor P2X ₇ em macrófagos de camundongo.	152
Figura 51 Efeito do ATPe nas vesículas endocíticas formadas pela incubação dos macrófagos de camundongo com sulfo-rodamina B	155
Figura 52 O NDGA estimula entrada de etídeo nos macrófagos sem provocar entrada do cálcio extracelular.....	157
Figura 53 Contribuição dos receptores P2Y e P2X no aumento de cálcio citoplasmático observado no macrófago em resposta ao ATPe.....	176
Figura 54 Modelo proposto para explicar os efeitos do ATPe sobre o receptor P2X ₇ em macrófagos de camundongo.	192

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Receptores P2Y, seus principais agonistas e vias de sinalização.	40
Tabela 2 Principais agonistas e antagonistas dos receptores P2X.	44
Tabela 3 Alguns dos tipos celulares e os corantes fluorescentes utilizados em cada caso para testar abertura do poro associado ao receptor P2X7	74
Tabela 4 Corantes utilizados com a localização intracelular e os pesos moleculares	84
Tabela 5 Probabilidade de abertura e tempo médio de abertura do canal registrado na presença de ATP 1 mM em macrófagos intraperitoneais murinos.	113

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- **ABC** Domínio de união ao ATP (do inglês *ATP-binding cassette*)
- **ADO** Adenosina
- **ADP** Adenosina di-fosfato
- **AMP** Adenosina mono-fosfato
- **AMPc** Adenosina mono-fosfato cíclico
- **ATP** Adenosina tri-fosfato
- **ATPe** Adenosina tri-fosfato extracelular
- **ATPox** Adenosina tri-fosfato oxidado
- **BBG** Brillante azul G (do inglês *Brillant Blue G*)
- **BCR** Receptor da célula B
- **BzATP** 2'-3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP
- **CHO** Células de ovário de hamster chinês
- **CPP** Peptídeos penetrantes celulares (do inglês *cell-penetrating peptides*)
- **CFTR** Regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (do inglês, *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- **CRAC** Canais de cálcio dependentes de cálcio (do inglês *calcium-release activated channels*)
- **DAG** Diacilglicerol
- **EC₅₀** Concentração do agonista que produz o 50 % de estimulação
- **GPCR** Receptor acoplado à proteína G (do inglês *G-proteina coupled receptor*)
- **HEK-293** Células embrionárias de rim humano (do inglês *human*)

embryonary kidney)

- **HEK-P2X₇** Células HEK-293 transfectadas com o cDNA do receptor P2X₇
- **HEK-P2X₇-P2X₄** Células HEK-293 transfectadas com os cDNAs do receptor P2X₇ e do receptor P2X₄
- **IC₅₀** Concentração do antagonista que produz o 50 % de inibição
- **IL** Interleucina
- **IP₃** Inositol tri-fosfato
- **LDH** Lactato desidrogenase
- **LPS** Lipopolissacarídeo
- **MAPK** Proteínas quinases ativadas por fatores mitogênicos (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- **NAD** Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- **NMDG** N-metil-D-Glucamina
- **NO** Óxido nítrico
- **PIP₂** Fosfatidil-inositol 4-5-bifosfato
- **PKA** Proteína quinase A
- **PKC** Proteína quinase C
- **PLC** Fosfolipase C
- **PPADS** Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-di-sulfóxido
- **SR-B** Sulfo-rodamina B
- **TCR** Receptor da Célula T
- **TLR** Receptor do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptor*)
- **TNF** Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)
- **TNP-ATP** 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)- ATP

- **U. A.** Unidades arbitrárias
- **UDP** Uridina di-fosfato
- **UTP** Uridina tri-fosfato

1 Introdução

Oh tell me Lord how could it be,
That though our cells make ATP,
It's not all used for energy,
But sometimes is secreted free.
It puzzles you, it puzzles me,
While Geoffrey Burnstock smiles with glee
At the many roles of ATP.

Samuel Silvertein, 1989

1.1 O ATP E OUTROS NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES

1.1.1 EFEITOS DOS NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS EXTRACELULARES

Desde 1929, os estudos sobre as propriedades farmacológicas e imunológicas de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares têm atraído a atenção de pesquisadores pela capacidade dessas moléculas modularem diversos processos em diferentes tipos celulares.

Inicialmente os efeitos do ATP extracelular (ATPe) foram descritos no sistema cardiovascular (DRURY e SZENT-GYORGYI, 1929). Neste sistema hoje é reconhecida a participação do ATPe e de outros nucleotídeos e nucleosídeos em processos como vaso-dilatação, proliferação e migração das células musculares lisas e liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (BURNSTOCK, 1997; DUBYAK e EL-MOATASSIM, 1993; RALEVIC e BURNSTOCK, 2003). O ATPe também provoca a despolarização da membrana dos cardiomiócitos e por isso está relacionado com a indução de várias formas de arritmias (RALEVIC e BURNSTOCK, 2003). Devido aos efeitos dos nucleotídeos sobre as células musculares lisas estas substâncias também mostraram-se envolvidas na hipertensão e na hiperplasia vascular relacionada com a aterosclerose (SEYE e col., 2007).

No sistema nervoso, o ATP é estocado e liberado com outros neurotransmissores e pode agir tanto como neurotransmissor quanto como co-transmissor. Foi demonstrado que esta molécula regula várias funções neuronais, como a secreção de outros neurotransmissores (DUBYAK e EL-MOATASSIM, 1993). Tem sido indicada também a participação do ATPe na doença de Alzheimer e na dor neuropática (SPERLAGH e col., 2006; BURNSTOCK, 2007a). Dadas as diversas funções dos nucleotídeos no sistema nervoso periférico a sua participação está sendo atualmente estudada em patologias tão diferentes quanto doenças

renais, desordens gastrointestinais e disfunção erétil peniana (BURNSTOCK, 2007a).

No sistema endócrino, o ATPe estimula a liberação dos hormônios luteinizante e de prolactina pela hipófise, e controla a liberação de tirotrófina pela tireóide. Também funciona como secretagogo hormonal nas glândulas adrenais e no pâncreas (ABBRACCHIO e BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2007a).

1.1.1.1 Efeitos dos Nucleotídeos e Nucleosídeos no Sistema Imune

Em particular, no sistema imune, ATP, ADP, UTP, UDP e adenosina podem ser considerados um importante grupo de agentes imunomoduladores mediando efeitos tão diversos como secreção e maturação de IL-1 β , IL-6 e IL-18 (BULANOVA e col., 2005; CARACCIO e col., 2005; MEHTA e col., 2001; SOLLE e col., 2001; WARNY e col., 2001; WILKIN e col., 2002), secreção de leucotrienos (BALLERINI e col., 2005a; BALLERINI e col., 2005b; FISHER e col., 2003), indução de morte de parasitas intracelulares em macrófagos (COUTINHO-SILVA e col., 2003; SIKORA e col., 1999; STOBER e col., 2001), maturação de células dendríticas (LA SALA e col., 2002; MARTEAU e col., 2004; SCHNURR e col., 2003), morte celular em macrófagos e outras células (DI VIRGILIO, 2000; DUBYAK, 2000), hematopoiese (SAK e col., 2003; AUGER e col., 2005), coagulação de plaquetas e modulação de células endoteliais (INOUE, 2005; KUNAPULI e DANIEL, 1998), modulação da função de células NKT (ASWAD e DENNERT, 2006; KAWAMURA e col., 2006), modulação da apoptose, quimiotaxia e liberação de grânulos citotóxicos em neutrófilos (NAGAOKA e col., 2006; MACKENZIE e col., 2005). O ATPe também modula a diferenciação e migração de células dendríticas, propiciando o direcionamento da resposta para Th2 ou Th1, segundo o contexto (LA SALA e col., 2001; SCHNURR e col., 2003; DI

Introdução

VIRGILIO, 2007b). Na Figura 1 apresenta-se um resumo dos principais efeitos do ATPe e da adenosina induzidos pela entrada de patógenos no sistema imune inato.

Recentemente foi observado um papel para o ATPe na asma. Foi mostrado que o ATPe acumula-se em pacientes com asma alérgico e que diminuição nas quantidades desta substância nos pulmões evita as crises asmáticas (IDZKO e col., 2007)

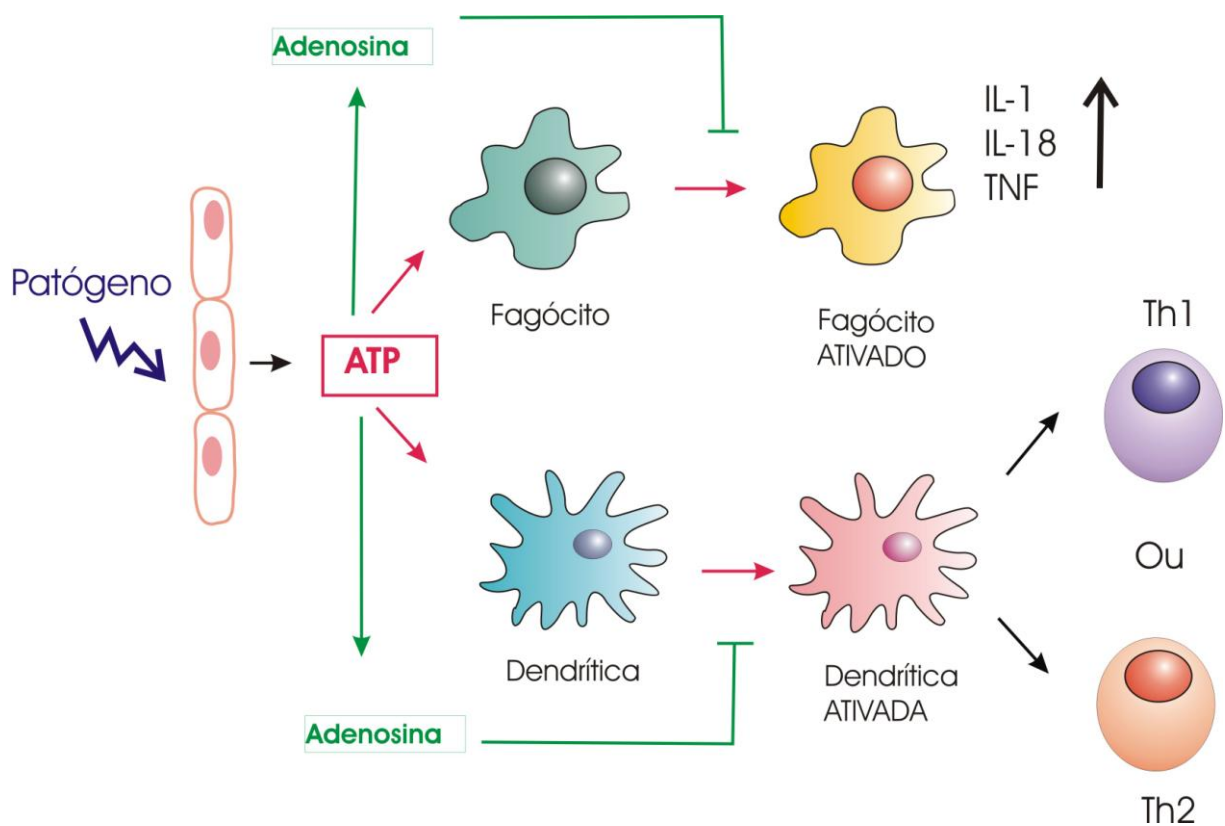


Figura 1 Nucleosídeos e nucleotídeos na ativação e desativação do sistema imune inato.

O patógeno induz liberação de ATP pelas células do hospedeiro. O ATP acumulado tem diversos efeitos pró-inflamatórios como por exemplo a ativação das células fagocíticas, estimulando a liberação de citocinas como IL-1 β , IL-18 e TNF- α . Nas células dendríticas, altas doses de ATP leva a uma resposta do tipo Th1, enquanto que a estimulação mantida com baixas doses de ATP leva a uma resposta do tipo Th2.

O ATP extracelular liberado pode ser transformado em adenosina, que possui efeitos anti-inflamatórios e diminuirá a resposta inflamatória. Adaptado de (DI VIRGILIO, 2007b).

1.1.2 SECREÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

Desde 1950, quando Stoner relatou que as concentrações de ATP e outros nucleotídeos encontrava-se aumentada no sangue de feridos durante a Segunda Guerra Mundial (STONER, 1950), ficou evidente que estas substâncias estão presentes no meio extracelular, pelo menos em algumas condições fisiológicas. Desde então, foram caracterizadas diversas fontes de nucleotídeos: células epiteliais, neurônios, células endoteliais, plaquetas, células musculares, macrófagos e células T citotóxicas, entre outras, liberam ATP em resposta a diferentes estímulos (Figura 2) (DI VIRGILIO e col., 2001).

Dada a multiplicidade de ações do ATPe em células do sistema imune e sua liberação em situações inflamatórias, o ATPe foi recentemente incluído no grupo de mediadores denominados sinais de perigo dos quais, entre outros, já fazem parte proteínas de choque térmico, reativos intermediários do oxigênio, produtos de quebra da matriz extracelular e neuro-mediadores (GALLUCCI e MATZINGER, 2001) .

No interior da célula o ATP encontra-se em concentrações superiores a 5 mM, porém, ainda é objeto de controversa como esta molécula sai da célula e alcança o meio extracelular.

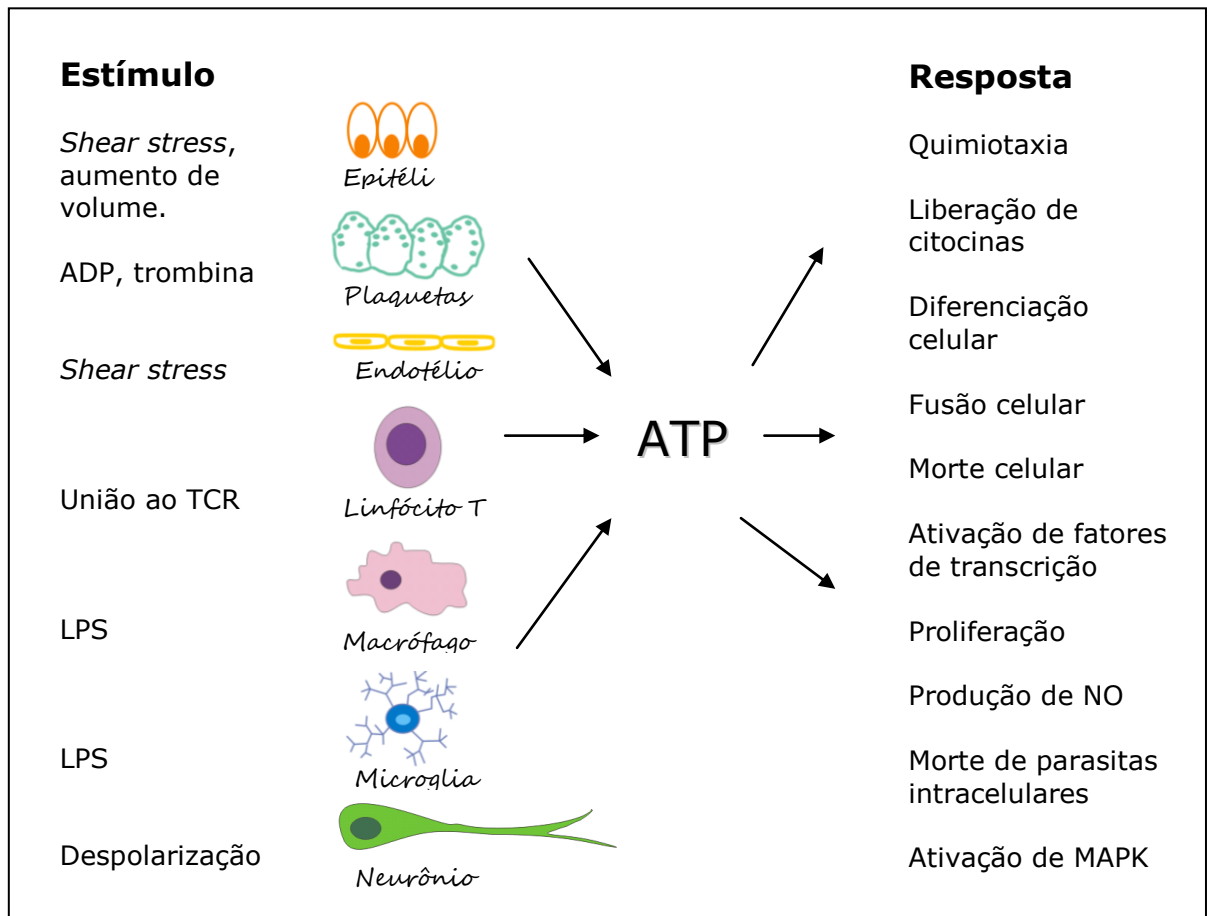


Figura 2 Diversas células do sistema linfo-hematopoiético que liberam ATP e algumas das funções desta substância.

Diferentes estímulos como estresse, ativação do TCR, presença de LPS e despolarização da membrana provocam a liberação do ATP intracelular de diferentes tipos celulares, como plaquetas, linfócitos, células endoteliais, macrófagos e células nervosas. Dependendo da concentração, do tipo celular e dos outros estímulos que a célula recebe o ATP pode ativar diferentes respostas, como fusão, proliferação e morte celular, produção de NO e ativação de cascatas intracelulares. Abreviaturas: TCR: Receptor das células T, LPS: lipopolissacarídeo. Adaptado a partir de DI VIRGILIO e col., 2001.

Aparentemente, as formas nas quais o ATP é liberado ao meio extracelular seriam várias, sendo algumas delas mais polêmicas que outras. Uma via de liberação do ATP citoplasmático, atualmente aceita pela maioria dos pesquisadores é o rompimento da membrana plasmática. Em condições de lesão celular o ATP, junto com outras substâncias intracelulares, é liberado. Mas esta forma “violenta” não seria a única. Tanto o *shear stress* como a hipóxia e o aumento do volume

Introdução

celular têm sido assinalados como estímulos que provocam a liberação do ATP e UTP intracelular em células endoteliais, epiteliais, músculo liso, células da glia, fibroblastos e hepatócitos, por vias não líticas (LAZAROWSKI e col., 2000). Substâncias que provocam variações nos níveis intracelulares de cálcio, como a trombina e a norepinefrina também liberariam ATP sem danos na integridade da membrana em diversas células (FORRESTER, 1990; PEARSON e CARTER, 1990; WESTFALL e col., 1990). Agora a pergunta é: por onde este nucleotídeo estaria saindo da célula nestes casos? A resposta ainda não está clara.

Existem alguns candidatos a transportadores para o ATP (Figura 3). Uma das moléculas propostas são conexinas, proteínas que formam uniões célula-célula conhecidas como *gap-junctions* e capazes também de formar hemi-canais na membrana plasmática. Esta hipótese surgiu pela observação de que células HeLa transfectadas com a conexina 43 exibiam um aumento na secreção de ATP (COTRINA e col., 1998). Posteriormente foi demonstrado que o ATP e outros nucleotídeos podem atravessar os canais formados pelas conexinas (GOLDBERG e col., 2002).

Os membros da família das conexinas têm características marcadamente diferentes: a condutância unitária dos canais comunicantes que formam varia de 10 até 300 pS, algumas delas são ligeiramente seletivas para ânions, como a conexina 32 (Cx32, o número refere-se ao peso molecular da proteína), enquanto outras são altamente seletivas para cátions, como a Cx45, e a seletividade pode variar quando a mesma conexina encontra-se formando uma união entre células ou formando um hemi-canal que comunica o citoplasma com o meio extracelular. Os hemi-canais formados pelas conexinas permitem a saída de moléculas tão diversas como ATP⁴⁻, glutamato, NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e prostaglandina E₂ (EVANS

Introdução

e col., 2006; MESE e col., 2007). As conexinas apresentam um perfil de permeabilidade e seletividade único, pois além da carga e o tamanho acredita-se que alguns determinantes na estrutura da molécula influenciam a passagem ou não de uma espécie através do poro formado pelas conexinas (MESE e col., 2007).

Alguns autores indicaram o regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR, do inglês, *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator*) como um possível canal para ATP (CANTIELLO e col., 1998; REISIN e col., 1994). O CFTR é um transportador que pertence à família de transportadores-ABC (do inglês *ATP-binding cassette*) e pela nova nomenclatura ele é nomeado como ABC-C7. Em diversos tipos celulares vários autores observaram liberação de ATP em ausência desta proteína (GRYGORCZYK e HANRAHAN, 1997; WATT e col., 1998), sugerindo que se este transportador é um caminho de saída para o ATP, com certeza não é o único.

Uma outra molécula proposta como transportador de ATP é a glicoproteína P (ABC-B1). Abraham e colaboradores observaram aumento na liberação de ATP superexpressando esta proteína em células CHO (ABRAHAM e col., 1993). Porém estes dados ainda não são conclusivos.

Recentemente, Sabirov e colaboradores propuseram os canais chamados de “maxi-ânions” como possíveis canais de ATP. Estes canais estão presentes na maioria das células e apresentam uma condutância entre 300 – 400 pS. A farmacologia destes canais é similar à da liberação de ATP induzida por mudanças no volume celular, indicando que pelo menos nesta situação os canais “maxi-ânions” seriam uma via de saída para o ATP intracelular (SABIROV e OKADA, 2005).

Por outro lado, Pellegatti e colaboradores propuseram que o receptor P2X₇ (ver mais adiante) seria uma via de liberação de ATP. Este receptor é ativado pelo ATPe

Introdução

e a proposta dos autores é que sua ativação levaria, entre outras coisas, a um aumento na liberação do ATP intracelular. Assim, em determinadas circunstâncias, este sistema amplificaria o sinal inflamatório dado pelo ATPe (PELLEGATTI e col., 2005).

Recentemente as panexinas têm sido propostas como moléculas formadoras de canais que mediarão a saída do ATP citoplasmático. As panexinas são uma família de proteínas caracterizadas em mamíferos a partir da homologia delas com as inexas de invertebrados, proteínas que formam as junções comunicantes nestes animais. Os canais formados pela panexina-1 são seletivos para ânions e apresentam uma condutância compatível com a passagem da molécula de ATP⁴⁻ (BAO e col., 2004). As panexinas serão abordadas com maiores detalhes na seção 1.3.5.2.

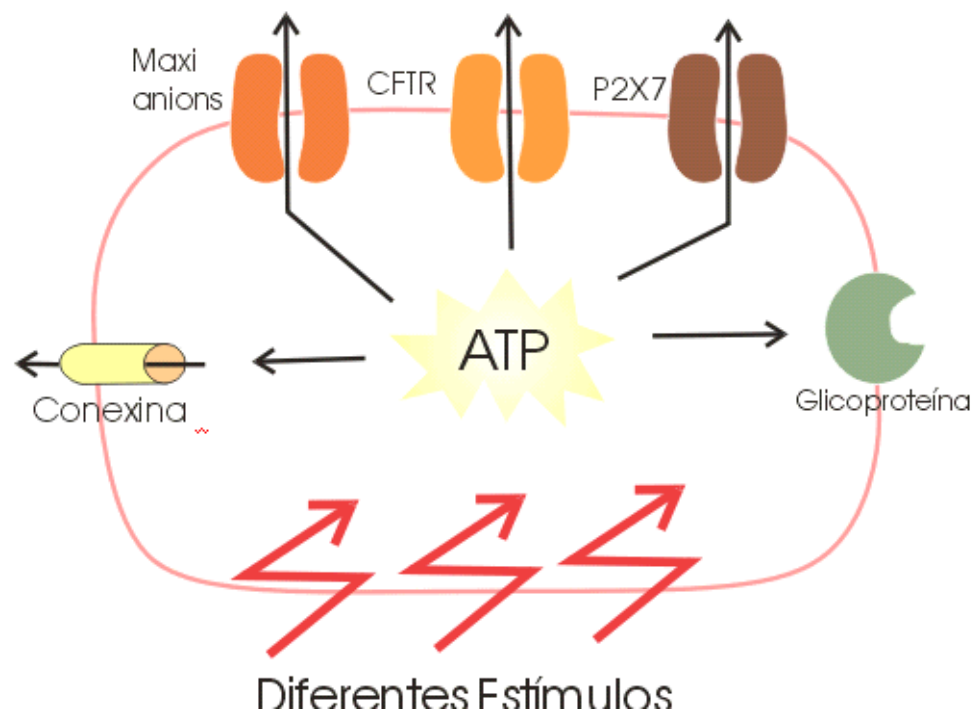


Figura 3 Esquema que resume os possíveis transportadores de ATP desde o interior da célula até o meio extracelular.

O ATP intracelular poderia alcançar o exterior da célula através de vários tipos de proteínas formadoras de canais. Abreviatura: CFTR: regulador da condutância transmembrana da fibrose cística. Adaptado de SABIROV e OKADA, 2005

Por último, alguns tipos celulares contêm grânulos que armazenam ATP em altas concentrações (em alguns casos até 150 mM) junto com outras moléculas. Este tipo de armazenagem de ATP ocorre em astrócitos, basófilos e mastócitos, entre outros tipos celulares (OSIPCHUK e CAHALAN, 1992).

Em astrócitos o ATP é armazenado junto com o peptídeo natriurético atrial (ANP) ou glutamato. A exocitose destes grânulos é dependente do aumento de cálcio citoplasmático e da presença de proteínas da família SNARE (BANKSTON e GUIDOTTI, 1996; PANGRSIC e col., 2007).

Em neurônios, o ATP em altas concentrações (100 mM) é armazenado em vesículas sinápticas adrenérgicas, colinérgicas ou NANC (não adrenérgicas nem colinérgicas, pelas siglas em inglês de *nonadrenergic, noncholinergic*) e a liberação do conteúdo destas vesículas pode ser provocada por diversos estímulos, como transmissão do impulso nervoso ou toque mecânico (BURNSTOCK, 2007a; PANKRATOV e col., 2006).

1.1.3 ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

Dado a multiplicidade de efeitos que o ATP e outros nucleotídeos tem sobre os diferentes tipos celulares, a vida média destas substâncias no meio extracelular está fortemente regulada. Estes nucleotídeos podem ser hidrolizados por uma grande variedade de enzimas que se encontram na superfície celular, nas membranas das organelas celulares e também solúveis no líquido intersticial. Estas enzimas foram organizadas para facilitar a nomenclatura em quatro famílias (ZIMMERMANN, 2001):

Introdução

- **E-NTPDase** (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase): esta é a família mais estudada. Estas enzimas hidrolisam tanto purinas como pirimidinas di- e trifosfato. Precisam de cálcio e magnésio para funcionar.
- **E-NPP** (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase): as enzimas desta família convertem, por exemplo, AMPc em AMP, ATP em AMP + PP_i e ADP em AMP + P_i. Usam tanto purinas como pirimidinas como substratos. Seu funcionamento também depende da presença de cátions divalentes.
- **Fosfatase alcalina**: Estas enzimas degradam nucleotídeos 5' tri, di e monofosfatos e também proteínas. Convertem, por exemplo, o ATP em adenosina.
- **Eco-5'-nucleotidase**: As enzimas desta família hidrolisam nucleotídeos monofosfatos. É de particular importância na formação de adenosina (ADO) a partir de AMP. Existem em uma forma associada à membrana plasmática e outra solúvel.
- **NDPK** (núcleosídeo difosfokinase): esta enzima interconverte nucleotídeos di e trifosfato. É capaz de gerar, por exemplo, UTP a partir de UDP + ATP. Esta enzima também precisa de cátions divalentes e sua atividade é inibida por EDTA.

Acredita-se que existe um balanço entre a liberação e a hidrólise de nucleotídeos, o que levaria a uma concentração estável no estado de equilíbrio (LAZAROWSKI e col., 2000).

A maioria destas enzimas encontra-se amplamente distribuída nos tecidos, tanto de mamíferos como de invertebrados e até de plantas e protozoários. A presença de várias destas enzimas numa mesma célula regularia o funcionamento

Introdução

dos diversos receptores de nucleotídeos extracelulares que se encontram na membrana celular (Figura 4).

Muitas destas ecto-enzimas que degradam nucleotídeos são expressas também em células do sistema imune. De fato, algumas delas foram originalmente descritas como marcadores de tipos celulares no sistema linfo-hematopoiético, como são os casos de CD73 e CD39, utilizadas como marcadores de linfócitos B e atualmente reconhecidas como uma ecto-5'-nucleotidase e uma E-NTPDase, respectivamente. Estas ecto-enzimas foram recentemente caracterizadas também em linfócitos T regulatórios, células dendríticas, monócitos e macrófagos (DWYER e col., 2007; BERCHTOLD e col., 1999), mostrando a relevância da regulação das quantidades e tipos de nucleotídeos no meio extracelular que rodeia estas células.

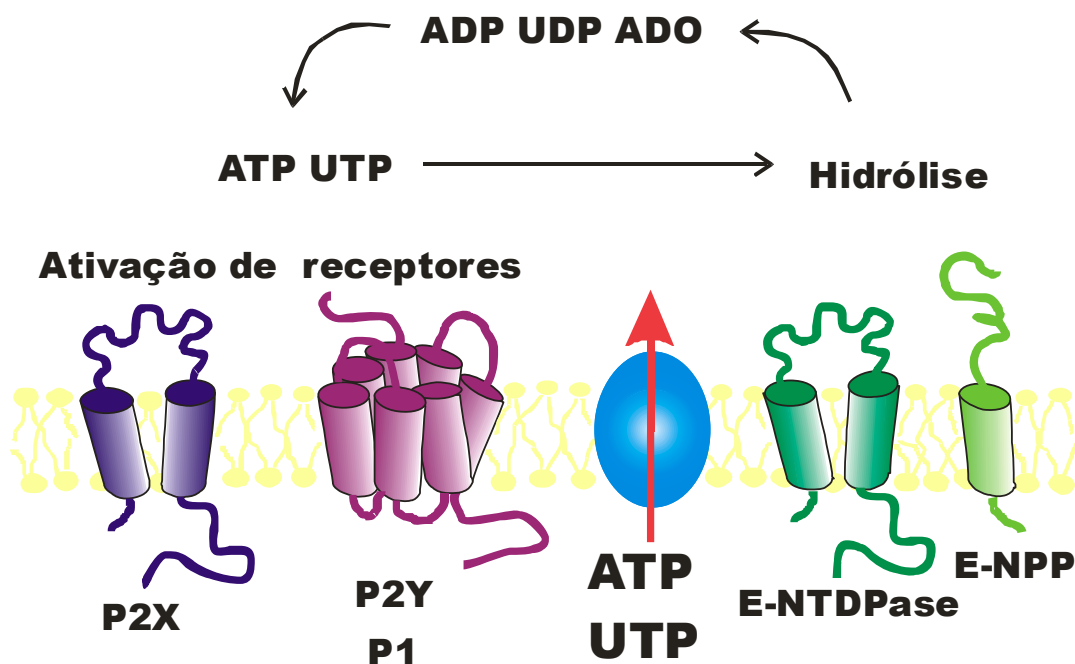


Figura 4 Jogo cruzado entre as enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares e os diferentes receptores para esses nucleotídeos (P2X, P2Y e P1).

O ATP liberado pela célula pode ativar os receptores para nucleotídeos (receptores P2) e também ser hidrolisado pelas ecto-enzimas e convertido em ADP ou ADO. ADO ativa os receptores P1. O UTP intracelular quando liberado ao meio extracelular pode ser transformado em UDP. Adaptado de LAZAROWSKI e col., 2003.

Introdução

A importância dos nucleotídeos extracelulares na imunorregulação evidencia-se também nas estratégias evolutivamente desenvolvidas por parasitas intracelulares. Muitos microrganismos como bactérias e protozoários possuem ectonucleotidasas na membrana ou do tipo secretório que regulam as quantidades de ATPe. Recentemente foi observado que a inibição da ecto-ATPase presente na superfície de *Trypanosoma cruzi* diminui tanto a adesão como a invasão deste parasita aos macrófagos (BISAGGIO e col., 2003), assinalando a importância dos nucleotídeos nos processos de infecção.

Algumas bactérias, como *Vibrio cholerae* (PUNJ e col., 2000), *Burkholderia cepacia* (MELNIKOV e col., 2000), *Mycobacterium bovis BCG* (ZABORINA e col., 1999a) e *Pseudomonas auruginosa* (ZABORINA e col., 1999b) secretam enzimas que modificam as concentrações extracelulares de ATP, afetando deste modo os mecanismos efetores do macrófago.

A presença de adenosina no meio extracelular também se encontra estritamente regulada. Esta regulação é feita pela enzima adenosina deaminase (ADA), que converte adenosina em inosina. O interesse nos efeitos da adenosina no sistema imune aumentou principalmente com o descobrimento de que a doença conhecida como síndrome de imunodeficiência severo (SCID, pelas siglas em inglês de *Severe Combined Immunodeficiency*) é provocada por deficiência hereditária na enzima ADA (GESSI e col., 2007).

A existência destas enzimas extracelulares sugere que os diferentes nucleotídeos e nucleosídeos formam na realidade uma rede, funcionando de maneira coordenada: podemos supor que às ações iniciais do ATP e do UTP, seguem os efeitos do ADP e UDP, e posteriormente da adenosina. Todas estas

moléculas agem através de receptores descritos a seguir. Até o momento não sabemos da existência de receptores para uridina.

1.2 RECEPTORES DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS

A maioria das ações que os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares exercem sobre as células é mediada por receptores presentes na membrana plasmática, chamados comumente de receptores purinérgicos, embora alguns deles possam ligar-se também a pirimidinas. Estes receptores são divididos em duas grandes famílias: os receptores P1, os quais são ativados por adenosina, e os receptores P2, os quais são ativados por nucleotídeos tri- e difosfato com eficiência diversa (BURNSTOCK, 1978). Os receptores P2 são divididos por sua vez em dois grupos: P2X e P2Y. Os receptores P2Y estão acoplados à proteína G e os P2X são canais iônicos ativados por agonista.

1.2.1 OS RECEPTORES P1

Existem quatro tipos de receptores P1: A1, A2a, A2b e A3, com diferenças estruturais e farmacológicas. Todos eles são receptores com sete domínios transmembrana (Figura 5) associados a proteínas G (GPCR, do inglês *G-protein coupled receptor*), com o domínio amino-terminal extracelular e o carboxi-terminal citosólico (FIELDS e BURNSTOCK, 2006).

O receptor A1 traduz o sinal através da proteína G_i , sua ativação inibe a adenilato ciclase e diminui os níveis de AMPc. O receptor A2a está associado à proteína G_e e a união com o ligante estimula a adenilato ciclase, aumentando os

Introdução

níveis de AMPc. A ativação do receptor A2b, associado às proteínas G_e e G_q , aumenta os níveis de AMPc e de IP_3 , através da ativação da fosfolipase C. Por último, o receptor A3 está associado às proteínas G_i e G_q e através delas a sua ativação inibe a adenilato ciclase e ativa a fosfolipase C (KLOTZ, 2000).

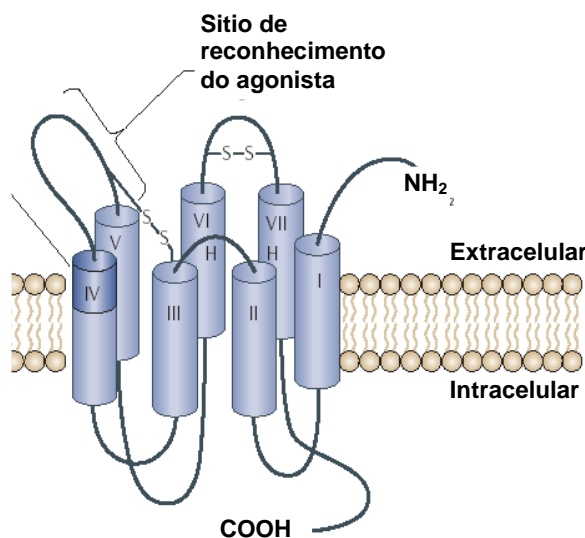


Figura 5 Estrutura dos receptores P1.

Os receptores P1 são receptores associados à proteína G com sete domínios transmembrana. Adaptado de STEINBERG e HIKEN, 2007.

1.2.1.1 Os Receptores P1 no Sistema Imune

Os receptores P1 encontram-se amplamente distribuídos, sendo já caracterizados em coração, pulmão, fígado, testículos, músculo, medula espinhal, baço, intestino e cérebro (revisado por BURNSTOCK, 2007a). No sistema imune, estes receptores estão presentes na maioria das células e medeiam os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios da adenosina (DI VIRGILIO, 2007b).

Nos linfócitos T, por exemplo, a adenosina antagoniza os efeitos da ativação do TCR, inibindo a liberação de IL-2, a exocitose de grânulos citotóxicos e o aumento na expressão de FasL, através da ativação dos receptores A2a. Nas células B, a ativação de NF- κ B pelo estímulo do BCR, também é inibida pela adenosina

(revisado por GESSI e col., 2007). Por não serem objeto de estudo desta tese de doutorado, não nos deteremos na revisão dos receptores P1.

1.2.2 OS RECEPTORES P2Y

A família dos receptores P2Y é formada por proteínas com sete domínios transmembrana, pertencentes à grande família dos GPCRs, com o domínio amino-terminal extracelular e o carboxi-terminal citoplasmático (Figura 6). Até o momento foram descritos oito receptores P2Y diferentes (P2Y_{1,2,4,6,11-14}), contendo entre 328 e 379 aminoácidos.

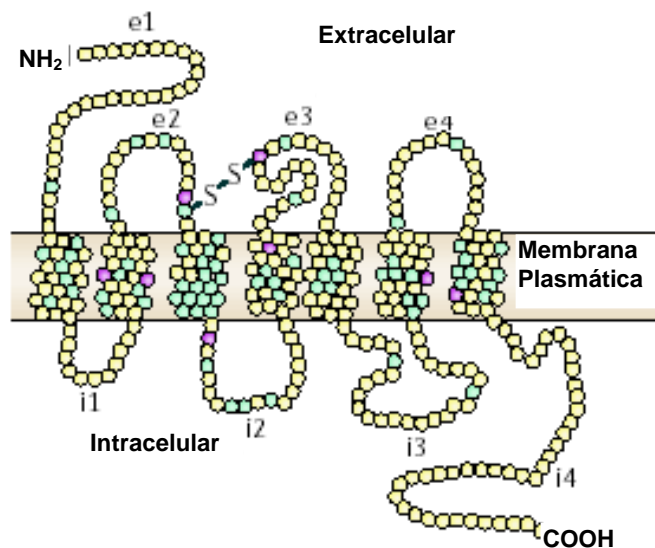


Figura 6 Estrutura do receptor P2Y₁.

Os receptores P2Y são membros da família dos GPCRs e possuem sete domínios transmembrana. Adaptado de FIELDS e BURNSTOCK, 2006.

Os diversos tipos de receptores P2Y estão associados a distintas proteínas G e a maioria deles induz um aumento do cálcio citoplasmático pela liberação de estoques intracelulares (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

As vias de sinalização e os agonistas variam entre os diferentes tipos dos receptores P2Y e estão resumidas na Tabela 1.

Introdução

Em geral, os receptores P2Y são ativados preferencialmente por ADP, UTP e UDP mas que por ATP. Entre os antagonistas mais utilizados encontram-se a suramina, o RB2 (reagente azul 2, pelas siglas em inglês de *reactive blue 2*) e vários compostos análogos à desoxiadenosina-di-fosfato, denominados MRS (Tabela 1) (CAMAIONI e col., 1998; FIELDS e BURNSTOCK, 2006).

Os receptores P2Y regulam a atividade de canais iônicos: algumas classes de canais de potássio e os canais de cálcio dependentes de voltagem são abertos ou fechados, segundo o tipo, em resposta à estimulação destes receptores (BURNSTOCK, 2007b).

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Sinalização
P2Y ₁	ADP, 2MeS-ATP > ATP	MRS2179, MRS2500, MRS2279	G _q /PLC/Ca ²⁺ + PKC
P2Y ₂	ATP, UTP	Suramina > RB2	G _q /PLC/Ca ²⁺ + PKC
P2Y ₄	UTP ≥ ATP	RB2 > suramina	G _q /PLC/Ca ²⁺ + PKC
P2Y ₆	UDP > UTP >> ATP	MRS2578	G _q /PLC/Ca ²⁺ + PKC
P2Y ₁₁	BzATP > ATPγS > ATP	Suramina > RB2	G _q /PLC/Ca ²⁺ + PKC e G _s /AC/ AMPc↑
P2Y ₁₂	2MeS-ADP ≥ ADP >> ATP	Suramina, RB2	G _i /AC/AMPc ↓
P2Y ₁₃	ADP, 2MeS-ADP >> ATP	Suramina, RB2 > MRS2179	G _i /AC/AMPc ↓
P2Y ₁₄	UDP-gliose, UDP-galactose	-----	G _i /AC/AMPc ↓

Tabela 1 Receptores P2Y, seus principais agonistas e vias de sinalização.

Abreviações: BzATP: 2'-3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP, MRS2179: N-6-metil-2'-deoxiadenosina-3',5'-bifosfato, MRS2279: 2-cloro-N-6-metil-(N)-metanocarba-2'-deoxiadenosina-3',5'-bifosfato, RB2: reactive blue 2. PLC: fosfolipase C, AC: adenilato ciclase, PKC: fosfoproteína quinase C. Adaptado de SAK e WEBB, 2002; FIELDS e BURNSTOCK, 2006; VON K, I, 2005.

1.2.2.1 Os Receptores P2Y no Sistema Imune

Os receptores P2Y foram encontrados em uma grande variedade de órgãos e tecidos: epitélio das vias aéreas, diferentes regiões do rim, no pâncreas, glândula adrenal, coração, endotélio vascular, pele, músculo e vários componentes do sistema nervoso, como córtex, hipocampo e cerebelo (revisado por (BURNSTOCK, 2006).

No sistema imune, os receptores P2Y estão presentes em vários tipos celulares e medeiam numerosos processos. P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ estão presentes nos neutrófilos humanos e participam da migração destas células ao local da inflamação em resposta ao ATPe liberado por plaquetas e outras células. Os eosinófilos expressam a maioria dos P2Y e estes medeiam diferentes efeitos dos nucleotídeos extracelulares, como produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), exocitose dos grânulos, quimiotaxia e liberação de IL-8. Em mastócitos, a ativação do receptor P2Y₂ aumenta a liberação de histamina produzida pela união dos receptores para IgE (revisado por MYRTEK e IDZKO, 2007).

Em macrófagos e monócitos detectou-se a presença de P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ (COUTINHO-SILVA e col., 2005). A ativação destes receptores foi relacionada com a liberação de IL-8 e a migração dos macrófagos. As células dendríticas expressam todos os receptores P2Y, participando principalmente dos processos de migração (MYRTEK e IDZKO, 2007).

Os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ são fundamentais na agregação e ativação das plaquetas, como demonstrado pela deficiência na formação do trombo plaquetário em pessoas com mutações nestes receptores (GACHET, 2006).

1.2.3 OS RECEPTORES P2X

Os receptores P2X são canais iônicos que em resposta ao ATPe permitem a entrada de Na^+ e Ca^{2+} e a saída de K^+ . Os sete membros da família P2X (P2X_{1-7}) apresentam uma homologia entre si de entre 30-50%, apresentando entre 384 (P2X_4) e 595 (P2X_7) aminoácidos. A região carboxi-terminal é a que apresenta maior variabilidade entre os diferentes tipos de P2X. A estrutura predita para estes receptores é de duas regiões hidrofóbicas que atravessariam a membrana (M1 e M2) com domínios amino e carboxi-terminais intracelulares e uma grande alça extracelular com uma região altamente conservada de 10 cisteínas (Figura 7). Na alça extracelular localizam-se se o sitio de união ao ligando e uma região hidrofóbica que seria importante na regulação destes receptores por magnésio, zinco e cobre (BRAKE e col., 1994; NORTH, 2002; ERB e col., 2006).

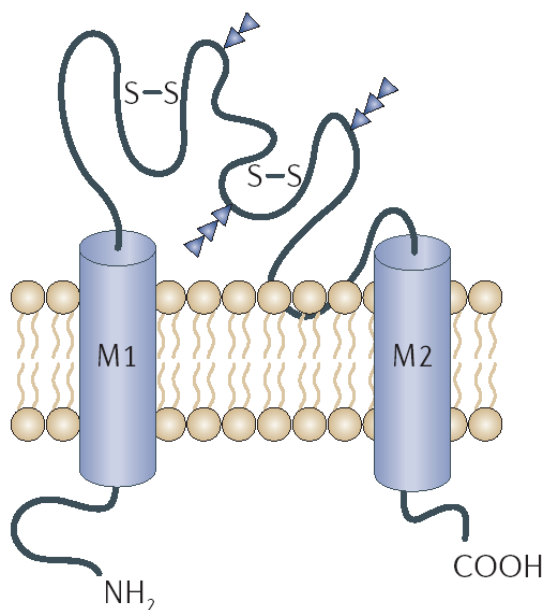


Figura 7 Estrutura predita para os receptores P2X.

Está constituída por dois domínios transmembrana, uma alça extracelular e domínios amino e carboxi terminais intracelulares. Abreviaturas: S-S: pontes dissulfeto; M1 e M2: domínios transmembrana. Os triângulos indicam sítios de glicosilação. Adaptado de FIELDS e BURNSTOCK, 2006.

O receptor P2X funcional está formado por três subunidades. Até pouco tempo atrás tinham sido caracterizados funcionalmente seis homo-trímeros (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇) e seis hetero-trímeros (P2X₁/P2X₂, P2X₁/P2X₄, P2X₂/P2X₆, P2X₂/P2X₃, P2X₄/P2X₆, P2X₁/P2X₅). A única exceção na formação de heterômeros parecia ser o receptor P2X₇. Recentemente, Gu e colaboradores publicaram dados bioquímicos e eletrofisiológicos que indicam a formação de um complexo P2X₇/P2X₄ (DUBYAK, 2007; GUO e col., 2007)

1.2.3.1 Farmacologia e Cinética dos Receptores P2X

Uma grande dificuldade no estudo dos receptores P2 é a inespecificidade de agonistas e antagonistas entre as diferentes classes destes receptores. Para tentar resolver este inconveniente e fazer uma farmacologia mais precisa é necessário observar os efeitos dos fármacos em sistemas heterólogos, pois a maioria das células expressa mais de um tipo de receptor P2, complicando ainda mais a caracterização farmacológica.

Todos os receptores P2X foram clonados, a partir de diferentes tecidos de rato, humano e camundongo, e os dados da farmacologia na maioria dos casos provem da expressão destes receptores em células HEK-293 ou em oócitos de *Xenopus*, os quais apresentam uma baixa ou nula expressão de receptores P2. A Tabela 2 apresenta os principais agonistas e antagonistas dos receptores P2X.

A afinidade pelo ATPe varia entre os diferentes tipos de receptores P2X. P2X₁ é o mais sensível, com um EC₅₀ de 60 nM, seguido pelo P2X₃ (EC₅₀ 340 nM), P2X₄ (EC₅₀ 500 nM) e P2X₅ (EC₅₀ 1 µM). No outro extremo encontra-se P2X₇, que precisa altas concentrações de ATPe para sua ativação, com um EC₅₀ de 800 µM. Além do ATPe, outros nucleotídeos ativam estes receptores. O ADP é capaz de ativar os

Introdução

receptores P2X₁ (EC₅₀ 10 μM) e P2X₆ (EC₅₀ 11 μM), enquanto que o UTP é capaz de ativar P2X₃ (EC₅₀ >100 μM) (JACOBSON e col., 2002).

Vale a pena destacar que estas concentrações de ativação média dos receptores P2X pelos agonistas foram obtidas a partir das medições das correntes de entrada registradas em células que expressam endogenamente os respectivos receptores.

Receptor	Agonistas	Antagonistas
P2X ₁	αβ-me-ATP, ATP, 2MeS-ATP	TNP-ATP, NF023, NF449
P2X ₂	ATP > ATPγS > 2MeS-ATP >> αβ-meATP	suramina, isoPPADS, RB2, F770, NF279
P2X ₃	2-MeS-ATP > ATP > αβ-meATP	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110
P2X ₄	ATP >> αβ-meATP	TNP-ATP, BBG
P2X ₅	ATP >>> αβ-meATP > ATPγS	suramin, PPADS, BBG
P2X ₆	Não funciona como homotrímero	---
P2X ₇	BzATP > ATP > 2-MeS- ATP >> αβ-meATP	KN62, KN04, MRS2427, ATPox, BBG
P2X ₂ /P2X ₃	ATP, αβ-meATP	---
P2X ₁ /P2X ₅	ADP > αβ-meATP > ATP	---
P2X ₄ /P2X ₆	αβ-meATP > ATP	---

Tabela 2 Principais agonistas e antagonistas dos receptores P2X.

Abreviações: ATPox: ATP oxidado, BBG: Brilliant Blue G, BzATP: 2'-3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP, PPADS: piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-di-sulfoxido, TNP-ATP: 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)- ATP. Adaptado de NORTH e SURPRENANT, 2000; BURNSTOCK, 2007b; FIELDS e BURNSTOCK, 2006.

Introdução

Muitos análogos sintéticos mostraram ser poderosos agonistas e muitas vezes são utilizados para identificar o tipo de receptor P2X presente em determinado tipo celular. Entre eles se destacam α,β -metil-ATP (ativa preferencialmente P2X₁ e P2X₃), ATP_γS (ativa preferencialmente P2X₃ e P2X₅) e 2',3'-(4-benzoil)-benzoil ATP (BzATP), o mais “poderoso” de todos. O BzATP, inicialmente tido como específico para o receptor P2X₇ (e por alguns autores ainda hoje), ativa todos os tipos de receptores P2X, com afinidades variáveis. A mais alta afinidade é para P2X₁ (EC₅₀= 2 nM) e a menor é para P2X₇ (EC₅₀=50 μM) (JACOBSON e col., 2002) (Tabela 2).

A cinética de ativação e inativação dos diferentes receptores P2X é altamente variável (Figura 8). Os receptores P2X₁ e P2X₃, como todos os receptores P2X, são rapidamente ativados na presença de ATPe mas estes dessensibilizam rapidamente (alguns milissegundos após a aplicação do agonista). Os receptores P2X₂ e P2X₄ apresentam uma dessensibilização lenta (demora segundos para se inativar na presença do agonista). Inicialmente o receptor P2X₅ foi descrito em rato como apresentando correntes muito pequenas. Porém, tempo depois se observou que em outras espécies este receptor apresenta correntes maiores. O receptor P2X₆ aparentemente é um receptor “silencioso”, sem uma corrente associada a sua ativação, o que torna especialmente difícil seu estudo. O receptor P2X₇ é o único receptor desta família que não apresenta dessensibilização (JACOBSON e col., 2002; NORTH, 2002).

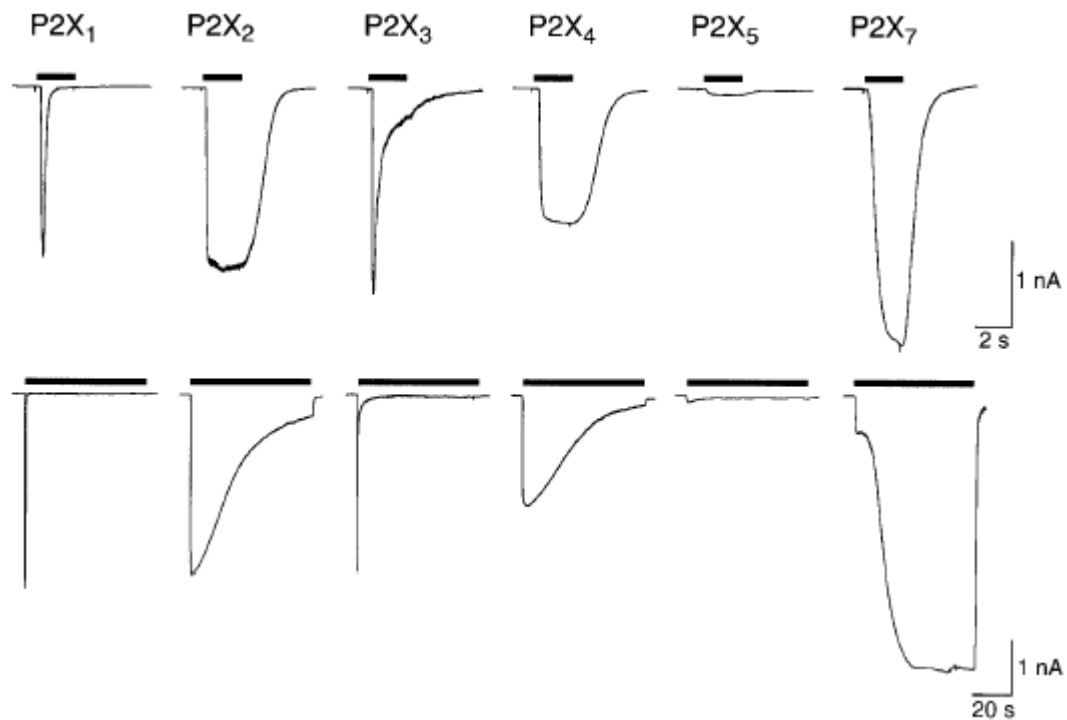


Figura 8 Cinética de ativação e desativação dos receptores P2X.

Dessensibilização rápida (acima) e lenta (abaixo) dos receptores P2X homoméricos de rato (cDNA de cada receptor transfectado em células HEK293). Aplicações de $30\mu\text{M}$ de ATP exceto P2X₇: 1 mM. Dessensibilização rápida: aplicações de 2s de duração, lenta: aplicações de 60s de duração (NORTH, 2002).

1.2.3.2 Permeabilidade dos Receptores P2X

Todos os receptores P2X são permeáveis a sódio, potássio e cálcio. Alguns deles também deixam passar cloreto. Além disso, em determinadas condições, alguns receptores P2X deixam passar cátions e ânions relativamente grandes, abrindo o que tem sido chamado de poro inespecífico (EGAN e col., 2006). Como esta tese de doutorado tentará aprofundar as questões sobre o poro associado ao receptor P2X₇ e como a bibliografia apresenta-se confusa sobre este assunto, compilarei aqui o que se sabe até hoje sobre a permeabilidade dos outros receptores P2X para depois detalhar os dados existentes sobre o nosso receptor de interesse.

Introdução

P2X₁: Este receptor apresenta uma baixa permeabilidade a cátions orgânicos, como Tris⁺ e NMDG⁺. A condutância da corrente unitária é de aproximadamente 18 pS e é inibida pela acidificação do meio externo (NORTH, 2002).

P2X₂: Estes canais são permeáveis a vários cátions: K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺ > Na⁺ > Li⁺, apresentam forte retificação *inward* e uma condutância unitária de aproximadamente 30 pS a -100 mV. Em células transfectadas com o receptor P2X₂ (como células HEK-293 e oócitos de *Xenopus*) foi observado um aumento da permeabilidade durante aplicações mantidas do agonista (ATP 30µM), permitindo a passagem de cátions orgânicos como NMDG⁺, Tris⁺ e TEA⁺. Segundo os autores que descrevem este fenômeno, a permeabilidade aumenta com o tempo, ficando as células inicialmente permeáveis a Tris⁺ (4 s) e depois também a NMDG⁺ (7 s) (VIRGINIO e col., 1999b). É importante ressaltar que nesse trabalho os autores relatam que a seletividade para cátions não se modifica, permitindo o canal a entrada de moléculas maiores mas não de moléculas carregadas negativamente. Quando a concentração de ATP é aumentada para 100 µM e mantida por 40 segundos observa-se entrada do corante fluorescente YO-PRO-1 (NORTH, 2002).

Posteriormente, foi observado que o receptor P2X₂ de camundongo não apresenta o mesmo aumento na permeabilidade. Estes autores sugerem que as diferenças na região carboxi-terminal citoplasmática do receptor poderiam ser a causa das diferenças observadas na permeabilidade (EICKHORST e col., 2002).

P2X₃: A forma homomérica deste receptor é permeável só a pequenos cátions inorgânicos, mas quando ele encontra-se formando heterómeros com P2X₂ também apresenta um aumento a permeabilidade e NMDG⁺ (VIRGINIO e col., 1998).

P2X₄: Este receptor é um canal seletivo para cátions com uma condutância unitária de aproximadamente 9 pS. O receptor P2X₄ apresenta um fenômeno parecido ao do receptor P2X₂, sua permeabilidade a cátions orgânicos grandes aumenta com uma exposição prolongada ao agonista, permitindo também a entrada de YO-PRO. A diferença parece ser que os canais de P2X₄ apresentam dois componentes: um impermeável a NMDG⁺, que dessensibiliza e outro componente tardio, permeável a NMDG⁺, que é inibido na presença de cálcio extracelular (KHAKH e col., 1999; NORTH, 2002). Da mesma maneira que o aumento na permeabilidade do receptor P2X₂, este fenômeno não é registrado em todas as células, indicando que depende em grande parte do sistema de expressão.

P2X₅: Este receptor apresenta correntes muito pequenas, exceto no caso da galinha. Diferente dos outros receptores P2X, o receptor P2X₅ de galinha expresso em HEK-293 ou oócitos de *Xenopus* é permeável a cloreto (NORTH, 2002; EGAN e col., 2006).

É importante destacar também que os receptores P2X provocam a entrada de cálcio na célula através de dois mecanismos: por um lado, eles próprios são permeáveis a cálcio, como já mencionado, e por outro lado, a despolarização da membrana provocada pela entrada de cargas positivas abre canais de cálcio dependentes de voltagem (EGAN e col., 2006).

1.2.4 DIÁLOGO CRUZADO ENTRE OS RECEPTORES P2Y E OS RECEPTORES P2X

É interessante destacar que, além de um mesmo agonista ativar vários tipos de receptores P2 ao mesmo tempo, existem evidências de que a atividade dos

receptores P2Y pode influenciar na atividade dos receptores P2X, e vice-versa. Foi relatado, por exemplo, que a ativação de P2Y₁ ou P2Y₂ co-expressados em oócitos de *Xenopus* junto com P2X₁ induz correntes neste último receptor (VIAL e col., 2004). Em retina de rato, tem sido observada prevenção da morte celular induzida pelo ATPe via receptor P2X₇ pela atividade do receptor P2Y₄ (SUGIYAMA e col., 2005). Outro exemplo é a recente observação de que em astrócitos de rato a estimulação do receptor P2X₇ aumenta a expressão do receptor P2Y₂, aparentemente mediante uma via de sinalização que envolve o influxo de cálcio e a cascata das MAPKs (proteínas quinases ativadas por fatores mitóticos, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (D'ALIMONTE e col., 2007).

1.3 O RECEPTOR P2X₇

Em 1979, Cockcroft e Gomperts relataram um fenômeno de permeabilização induzido por ATP em mastócitos de rato e chamaram o receptor responsável por este efeito receptor P2Z (COCKCROFT e GOMPERTS, 1979). Este receptor posteriormente foi clonado e incluído na família de receptores P2X, nomeado como receptor P2X₇. Como veremos ao longo desta tese de doutorado, nossa proposta é que os fenômenos inicialmente associados ao receptor P2Z são na verdade um conjunto de fenômenos distintos, e o receptor P2X₇ é responsável por apenas alguns deles. Tendo isto em mente, mais adiante retomaremos a nomenclatura de “poros Z”, nome que Coutinho-Silva e Persechini deram aos poros registrados na membrana de macrófagos expostos ao ATPe.

1.3.1 PARTICULARIDADES DO RECEPTOR P2X₇

O receptor P2X₇ tem merecido particular atenção por apresentar características únicas que o diferenciam dos outros receptores P2X:

- I. sua ativação requer grandes concentrações de ATPe. O EC₅₀ varia com a espécie e o tipo celular, mas em cada caso a quantidade de ATP necessária para ativar o receptor P2X₇ é maior que a requerida para ativar outros P2X no mesmo tipo celular: para humano EC₅₀ = 800 μM (JACOBSON e col., 2002), para camundongo EC₅₀ = 750 μM, para rato EC₅₀ = 220 μM (CHESSELL e col., 1998b),
- II. o agonista BzATP é entre 10 e 30 vezes mais potente na ativação do receptor do que o ATPe,
- III. o efeito do ATPe (e do BzATP) é potenciado em concentrações baixas tanto de cálcio como de magnésio extracelular,
- IV. considera-se que a presença prolongada do agonista (alguns minutos) leva à formação de um poro na membrana da célula que permite a passagem de moléculas de peso molecular de até 900 Da, podendo se tratar tanto de cátions como de ânions.

Cabe ressaltar que, com relação aos itens III e IV, as contribuições desta tese de doutorado mostraram que a visão presente na literatura é uma simplificação de um conjunto de fenômenos mais complexo do que acredita-se.

Os valores de EC₅₀ para a ativação do receptor P2X₇ pelo ATP indicados acima foram obtidos em concentrações dos íons extracelulares próximas às fisiológicas. Como veremos mais adiante, as concentrações destes íons, especialmente as de Ca²⁺ e Mg²⁺ modificam significativamente os EC₅₀ para o ATP. Outro ponto que

Introdução

desenvolveremos mais a frente é o fato de que estas concentrações são obtidas através de medições de diferentes fenômenos induzidos pelo receptor P2X₇ e a maioria das vezes o EC₅₀ para a ativação das correntes catiônicas é muito diferente daquele que corresponde à indução de entrada de corantes. Os valores citados acima referem-se às correntes catiônicas de entrada ativadas pelo receptor P2X₇.

A permeabilização da membrana plasmática é reversível se o ATPe é retirado em tempos curtos (menos de 20 minutos) e torna-se irreversível com exposições mais prolongadas, podendo levar à morte da célula por necrose e apoptose (BULANOVA e col., 2005; CHOW e col., 1997). Habitualmente esta permeabilização da membrana celular é medida pela entrada de corantes fluorescentes, como etídeo, YO-PRO-1, Lucifer Yellow, e etc.

O receptor P2X₇ está presente em diversos tipos celulares. No sistema nervoso este receptor já foi localizado em microglia, neurônios, células de Schwann e astrócitos (BRANDLE e col., 1998; COLOMAR e AMEED, 2001; DI VIRGILIO e col., 1999). Também existem evidências da presença do receptor P2X₇ nas células dos dutos pancreáticos, nas glândulas salivares e no músculo liso gastrointestinal (ALZOLA e col., 1998; LUO e col., 1999; UGUR e col., 1997; ZOU e col., 2001). No sistema imune o estudo do receptor P2X₇ tem merecido particular interesse. Ele está presente nas células dendríticas, células de Langerhans, mastócitos, linfócitos T e B, células epiteliais tímicas, timócitos, monócitos e macrófagos (DI VIRGILIO, 1995), células T regulatórias (TAYLOR e col., 2007), células NK (GU e col., 2000) e células NKT (COUTINHO-SILVA e col., 1999; DENNERT e ASWAD, 2006).

1.3.2 O PAPEL DO RECEPTOR P2X₇ NO SISTEMA IMUNE

Muitos dos efeitos associados à presença do ATPe no sistema imune são mediados pelo receptor P2X₇, estando a maioria deles associados ao desenvolvimento do processo inflamatório. A estimulação deste receptor ativa o fator de transcrição NF- κ B e a liberação de mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , óxido nítrico, IL-18, IL-6 e TNF- α em monócitos, macrófagos, células dendríticas e microglia (DENLINGER e col., 1996; FERRARI e col., 1997a; FERRARI e col., 1997b; PERREGAUX e col., 2000; SOLINI e col., 1999).

Vários autores mostraram que o receptor P2X₇ é central na ativação do complexo denominado “inflamossoma”, interagindo com receptores de padrões moleculares de patógenos (PAMPs), como os receptores do tipo Toll (TLRs, pelas siglas em inglês de *Toll-like receptors*) e do tipo NOD (NLRs, pelas siglas em inglês de *NOD-like receptors*), na indução de resposta imune inata mediada por macrófagos e células dendríticas (Figura 9) (KANNEGANTI e col., 2007; MARIATHASAN e MONACK, 2007). Além disso, a expressão deste receptor nas células do sistema imune é aumentada por citocinas como IFN- γ e TNF- α , assim como pela presença de LPS (Humphreys & Dubyak, 1996).

O receptor P2X₇ é o principal receptor responsável pela morte celular induzida pelo ATPe (YOON e col., 2007; TSUKIMOTO e col., 2006). No macrófago e outras células do sistema imune a morte celular induzida pelo ATPe envolve necrose e apoptose, com ativação das caspases 3, 8 e 9 (FERRARI e col., 1999; ADINOLFI e col., 2005).

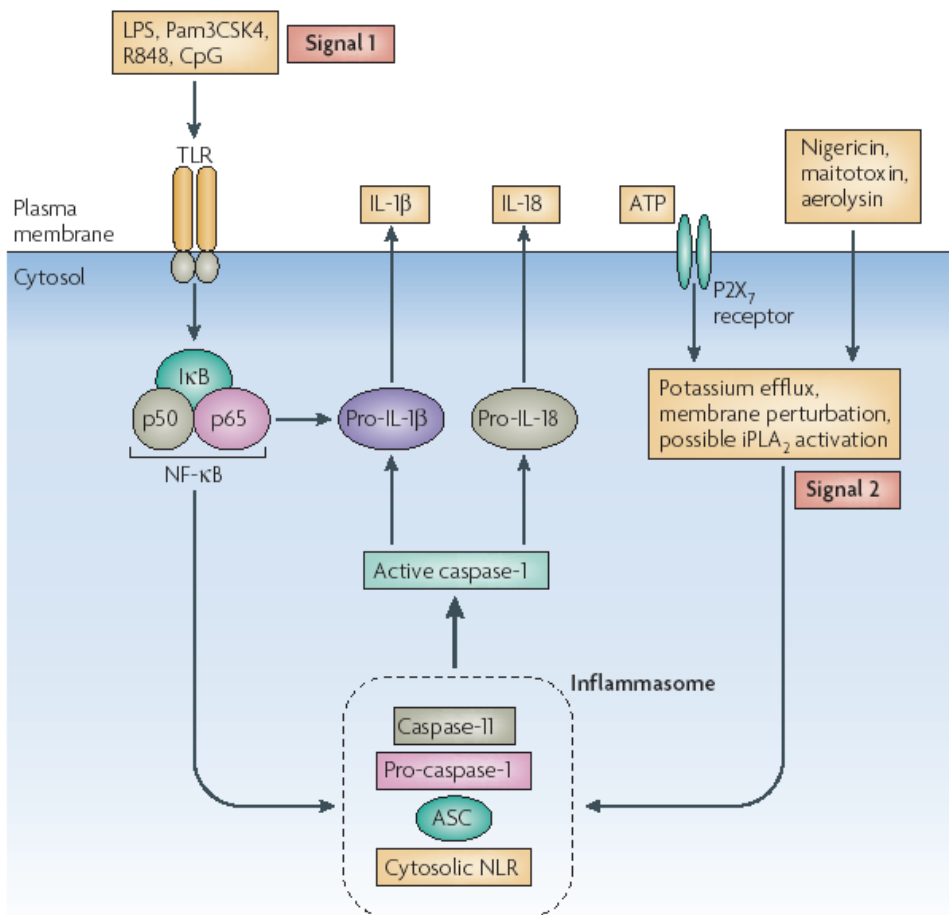


Figura 9 A combinação de dois sinais extracelulares é necessária para a ativação do inflammasoma e conseqüente processamento e liberação de IL-18 e IL-1 β .

Células do sistema imune inato, como macrófagos e dendríticas possuem TLRs que podem ser ativados por diferentes agonistas, isto constitui o primeiro sinal. O segundo sinal é dado pela ativação do receptor P2X₇. Adaptado de MARIATHASAN e MONACK, 2007.

Recentemente, nosso grupo identificou uma nova cascata de sinalização envolvida na indução de apoptose por ATP em macrófagos. Ao longo da sua tese de doutorado, Costa-Junior e colaboradores mostraram que uma fosfolipase A2 secretória de linfócitos T citotóxicos induz apoptose em macrófagos (COSTA-JUNIOR e col., 2006), sugerindo a possibilidade de que esta enzima esteja envolvida no processo de morte celular e/ou de permeabilização da membrana plasmática.

Introdução

Vários autores, inclusive membros de nosso laboratório, mostraram que o ATPe, atuando via receptores P2, pode ter importantes efeitos na infecção celular por diferentes parasitas intracelulares. O ATPe induz morte de macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, aparentemente através da ativação de P2X₇ e P2X₄. O tratamento com ATP poderia causar a morte tanto do macrófago quanto do parasita intracelular (LAMMAS e col., 1997; KUSNER e ADAMS, 2000), mas a morte de *M. tuberculosis* poderia acontecer independentemente da apoptose do macrófago (PLACIDO e col., 2007; SMITH e col., 2001).

Estudamos o efeito do ATPe na sobrevivência de bactérias intracelulares que invadem macrófagos. Nossos resultados mostraram que a infecção por *Chlamydia psittaci* inibe a apoptose de macrófagos dependente do receptor purinérgico P2X₇. Além disso, observou-se que macrófagos tratados com ATP apresentaram redução no seu grau de infecção por *Chlamydia* (COUTINHO-SILVA e col., 2003).

Dados preliminares de nosso laboratório também sugerem a participação dos receptores P2X₇ na infecção por *Leishmania*. Estes resultados mostram que a infecção por *Leishmania donovani* leva ao aumento da expressão dos receptores P2X₇ em macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (TORRES-SANTOS e col., 1999). Efeito semelhante foi observado com *Leishmania amazonensis* (não publicado). Estes resultados sugerem um envolvimento do receptor P2X₇ na resposta imune contra o agente infeccioso da Leishmaniose.

A infecção de macrófagos por *Trypanosoma cruzi* tem sido bastante estudada. A presença do parasita intracelular inibe o fenômeno de permeabilização da membrana induzido por ATP e mediado pelo receptor P2X₇ (Mantuano et al., 2000).

É importante destacar que alguns dos efeitos do ATPe no sistema imune, embora envolvam P2X₇, também contam com a participação de outros receptores

Introdução

P2 (LA SALA e col., 2001). A forma em que os diferentes receptores P2 presentes numa mesma célula participam de um fenômeno determinado ainda não é clara. Além disso, como já foi mencionado, acredita-se que as enzimas que degradam nucleotídeos extracelulares teriam um papel importante na ativação diferenciada dos diversos tipos de receptores P2.

1.3.3 ESTRUTURA DO RECEPTOR P2X₇

Acredita-se que o receptor P2X₇, na membrana plasmática, interage com pelo menos outras onze proteínas (Figura 10), tanto estruturais como de adesão, formando um grande complexo na superfície da célula (KIM e col., 2001a; KIM e col., 2001b; NICKE e col., 1998).

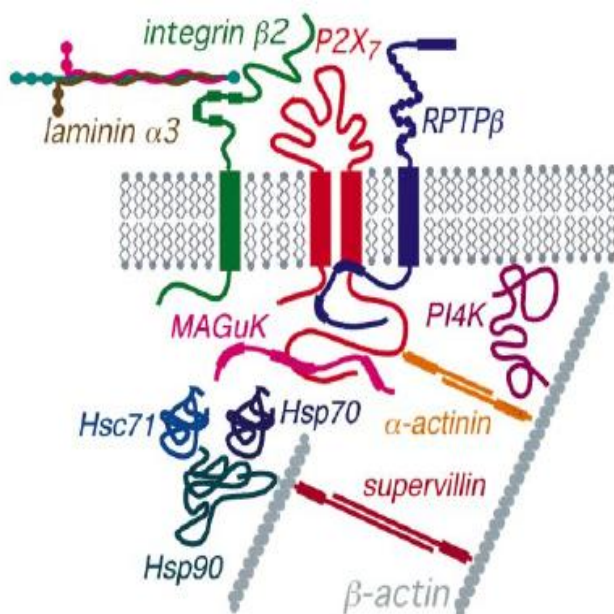


Figura 10 O receptor P2X₇ forma um complexo com outras proteínas.

O receptor P2X₇ interage com outras onze proteínas diferentes, formando um complexo na membrana plasmática. Adaptado de KIM e col., 2001a.

As particularidades funcionais do receptor P2X₇ parecem dever-se a uma diferença na estrutura deste receptor: o domínio intracelular carboxi-terminal do

Introdução

receptor P2X₇ é muito maior do que o resto dos receptores da família P2X (240 aminoácidos enquanto a média dos outros P2X é de 100 aminoácidos para esta região) e contem domínios que tem sido associados a diversas funções. Em 1996, Surprenant e colaboradores mostraram que o domínio carboxi-terminal é necessário para a permeabilização mediada pelo receptor, já que a eliminação desta parte da proteína inibe a entrada do corante fluorescente YO-PRO-1 induzida por ATPe (SURPRENANT e col., 1996).

Gu e colaboradores encontraram uma mutação da proteína P2X₇, presente em cerca de 20% da população humana e que leva à perda de algumas das funções do receptor, como a permeabilização da membrana plasmática e a entrada de Ca²⁺ em resposta ao ATPe. Estes indivíduos apresentam uma mutação que leva à troca do ácido glutâmico da posição 496 por uma alanina (polimorfismo 1513 A → C). Neste caso, a proteína estaria presente na membrana plasmática mas não seria funcional (GU e col., 2001). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores encontrou uma segunda mutação presente na população, esta vez em menor proporção (só 4%), que também levaria a uma proteína não funcional. A troca da isoleucina da posição 568 por uma asparagina (polimorfismo 1729 T → A) provocaria a não expressão do receptor na membrana. Experimentos de transfecção do cDNA mutado em células HEK-293 mostraram que a proteína é sintetizada mas existe uma falha no seu transporte até a membrana (WILEY e col., 2003). Esta mutação está dentro de um domínio que abarca os aminoácidos 551 a 581, identificado previamente como necessário para o correto funcionamento do receptor. Este fato levou aos pesquisadores a propor um modelo no qual existiria um domínio com duas regiões: uma delas participaria especificamente da formação do poro e a outra estaria

Introdução

envolvida no tráfico do receptor à membrana plasmática (Figura 11) (SMART e col., 2003).

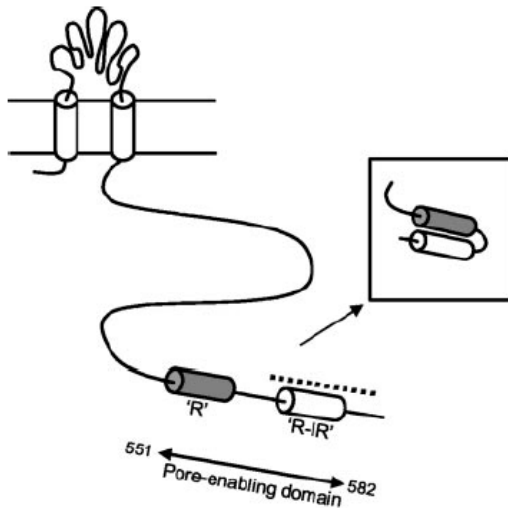


Figura 11 Modelo proposto para a estrutura de P2X₇.

Indicando os dois domínios: 'R' ou regiões de retenção, que impediriam o tráfico do receptor até a membrana e 'IR' ou região de inibição, que impediria a correta expressão do receptor na superfície celular. Adaptado de SMART e col., 2003.

Recentemente têm sido publicados dados que sugerem um processamento intracelular do receptor P2X₇. Feng e colaboradores mostraram que existem três formas do receptor P2X₇: uma forma funcional de 85 kDa presente majoritariamente na membrana celular e duas formas, uma de 65 kDa e outra de 18 kDa distribuídas tanto na membrana como no citosol. A ativação do receptor por ATPe ou BzATP leva a uma diminuição da forma de 85 kDa na membrana e a um aumento das outras duas isoformas no citosol, sugerindo internalização, degradação e reciclagem (FENG e col., 2005). Outros grupos, utilizando marcações com anticorpos para a porção extracelular de P2X₇, também têm observado o desaparecimento do receptor da superfície celular após a aplicação do ATPe (ADRIOUCH e col., 2005).

1.3.4 FARMACOLOGIA DO RECEPTOR P2X₇

Como já mencionado, uma das grandes dificuldades para o estudo dos receptores P2X é a ausência de agonistas e antagonistas específicos para cada tipo de receptor. Em geral, as drogas que ativam ou inibem o receptor P2X₇ têm um efeito similar sobre os outros receptores. Outro aspecto importante é que algumas drogas foram testadas na capacidade de induzir ou inibir permeabilização da membrana e outras foram experimentadas como elicitadoras ou inibidoras das correntes iônicas associadas ao receptor e/ou do sinal de cálcio. Até o momento faltam dados correlacionando os efeitos de cada agonista ou antagonista sobre a corrente iônica e sobre a captação dos diferentes tipos corantes fluorescentes.

1.3.4.1 Agonistas

O agonista mais potente é o BzATP ($EC_{50} = 50 \mu\text{M}$), seguido pelo α,β -metilATP ($EC_{50} = 100 \mu\text{M}$), e depois pelo ATP ($EC_{50} = 800 \mu\text{M}$) (JACOBSON e col., 2002). ADP e AMP são agonistas muito fracos para P2X₇. Porém, foi proposto que logo após uma breve exposição ao ATP, a afinidade pelo ADP e o AMP aumenta levemente (CHAKFE e col., 2002).

Em linfócitos T foi observado que o receptor P2X₇ pode ser ativado pela presença de NAD no meio extracelular. O NAD serviria como substrato para a ART2 (ADP-ribosil-transferase 2), que ativaria o receptor através de uma ADP-ribosilação. O EC_{50} para o NAD está perto de $2 \mu\text{M}$ (KAWAMURA e col., 2005; SEMAN e col., 2003).

1.3.4.2 Antagonistas

Os antagonistas do receptor P2X₇ podem ser divididos em três categorias principais. A primeira classe é a dos íons inorgânicos. Magnésio, cálcio, zinco, cobre e prótons bloqueiam, em ordem de efetividade decrescente, as correntes do receptor P2X₇ (os IC₅₀ respectivos são: 3 mM, 500 μM, 11 μM, 500 nM, 400 nM) (VIRGINIO e col., 1997). Dentro desta classe foi incluído recentemente o decanavadata, um óxido de vanádio (H₂V₁₀O⁻⁴₂₈) que funciona como um antagonista competitivo do receptor inibindo as correntes induzidas pelo ATPe quando utilizado em uma concentração de 10 μM (MICHEL e col., 2006).

A segunda classe está formada por inibidores genéricos de P2X. Entre eles, suramina (IC₅₀= 300 μM) e PPADS (IC₅₀= 50 μM) são pouco efetivos. O antagonista mais seletivo dentro desta categoria é o Brilliant Blue G (IC₅₀= 10 nM para o P2X₇ de rato e IC₅₀= 200 nM para P2X₇ de humano) (JIANG e col., 2001; NORTH, 2002). O ATP oxidado (ATPox) bloqueia irreversivelmente a corrente de P2X₇ e a permeabilização induzida pelo ATPe após 2 h de pré-incubação (IC₅₀ 30 μM) (MURGIA e col., 1993), mas seu modo de ação é controverso.

O ATPox é o agonista mais comumente utilizado para reconhecer a presença do receptor P2X₇ e merece considerações maiores. Esta droga era habitualmente utilizada para marcar os sítios de ligação a nucleotídeos das enzimas. O mecanismo pelo qual o ATPox bloqueia o efeito do ATPe não é claro ainda. Aparentemente, por tratar-se de um reagente formador de bases de Schiff, o ATPox forma ligações covalentes entre as lisinas do sítio de ligação do ATPe no receptor (MURGIA e col., 1993). Porém, em diferentes tipos celulares que não expressam o receptor P2X₇ foi observada uma inibição da secreção de interleucinas após incubação com ATPox, o que sugere que existiriam outros alvos para esta droga além do P2X₇ (BEIGI e col.,

Introdução

2003). Estes novos alvos poderiam ser outros receptores P2 ou não, já que foi proposto que o ATPox poderia atravessar a membrana plasmática e interferir em vias de sinalização intracelulares (DI VIRGILIO, 2003). Em nosso artigo publicado recentemente, observamos que breves exposições ao ATPox poderiam estar influenciando a atividade de outros receptores P2 ativados por ADP (P2Y₁, P2Y₁₁ e/ou P2Y₁₂) (MONTEIRO-DA-CRUZ e col., 2006).

O terceiro grupo de bloqueadores está formado pelos grandes cátions orgânicos. Dentro desta categoria encontram-se o calmidazolium e o KN-62, dois inibidores da proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina. O calmidazolium (IC₅₀= 10 nM) bloqueia rápida e irreversivelmente a corrente associada a P2X₇ (VIRGINIO e col., 1997). KN-62 bloqueia a corrente de P2X₇ de humano (IC₅₀= 51 nM), mas é pouco efetivo para o receptor de rato (HUMPHREYS e col., 1998). Recentemente foram desenvolvidos outros antagonistas derivados do KN-62. O mais potente dentre eles é KN-63, com um IC₅₀=1,3 nM (BARALDI e col., 2003).

Devido à predominância dos receptores P2X₇ em quase todas as células do sistema imune, sua participação na inflamação e sua presença em células do sistema nervoso, vários autores tem relacionado este receptor com a dor neuropática (INOUE, 2007; HUGHES e col., 2007; MCGARAUGHTY e col., 2007). Como consequência disto, recentemente tem aumentado o interesse na procura de antagonistas específicos para este receptor. Esta constatação levou recentemente ao desenvolvimento de dois novos fármacos que inibem a liberação de IL-1 β em células em cultura (IC₅₀ ~ 40 nM) e diminuem a dor em ratos: A-740003 e A438079 (HONORE e col., 2006; NELSON e col., 2006).

1.3.5 PROPRIEDADES ELETROFISIOLÓGICAS

Estudos eletrofisiológicos realizados por Coutinho-Silva e Persechini em macrófagos intraperitoneais murinos revelaram a presença de dois tipos de correntes iônicas associadas ao receptor P2X₇ (Figura 12) (COUTINHO-SILVA e col., 1996; COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Uma delas, em resposta a concentrações micromolares de ATP, é ativada milissegundos após a presença do agonista perto da superfície celular, permite a entrada de pequenos cátions e é registrada na conformação *whole-cell*. O canal responsável por esta corrente tem uma condutância unitária de 5-8 pS que pode ser determinada utilizando a conformação *out-side-out* e sua ativação pode acontecer na faixa de temperaturas que vai desde os 20 °C até os 37 °C (COUTINHO-SILVA e col., 1996). A segunda corrente é ativada entre 30 – 60 segundos após da presença de quantidades milimolares de ATP na superfície celular, é inespecífica, permitindo o fluxo tanto de cátions como de ânions, apresenta uma condutância unitária de aproximadamente 409 pS e depende tanto da voltagem como da temperatura, sendo observada só a temperaturas maiores a 32 °C. Sua presença foi detectada apenas na configuração *cell-attached*, não podendo ser registrada até agora nas configurações *out-side-out* nem *whole-cell* (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997).

Poderiam se tratar então de dois canais diferentes. Um canal pequeno para cátions que permite a entrada de Na⁺ e Ca²⁺ na célula e um segundo canal inespecífico ou poro que permitiria a entrada de moléculas orgânicas de grande peso molecular. Inicialmente a entrada cátions ocasiona uma rápida despolarização da membrana plasmática. Imediatamente depois, a abertura dos canais de K⁺

Introdução

dependentes de Ca^{2+} presentes no macrófago hiperpolarizariam a membrana, devolvendo à célula a seu potencial de repouso (Figura 12).

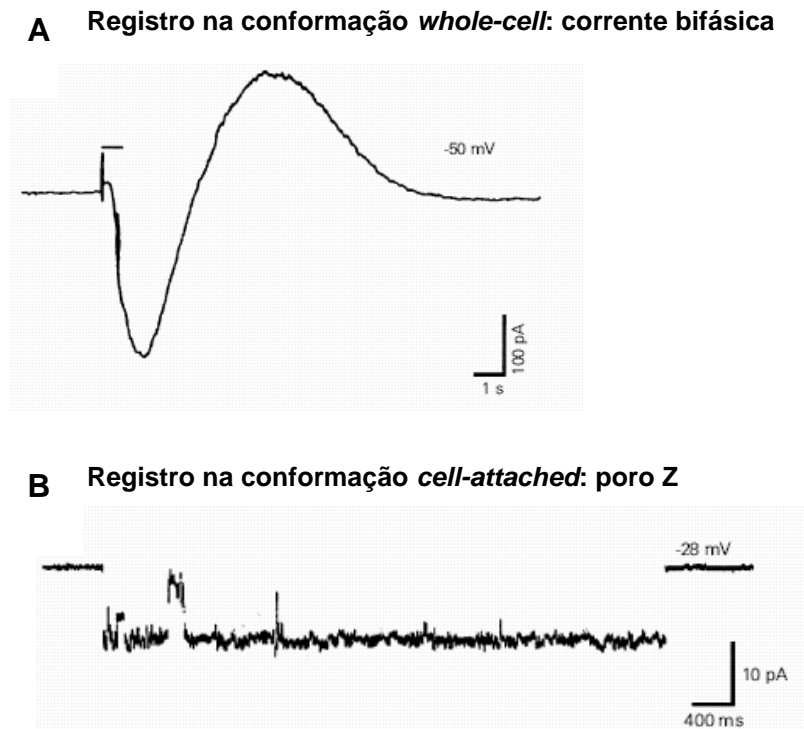


Figura 12 Os dois tipos de correntes associadas ao receptor P2X_7 em macrófagos murinos.

A: Corrente catiônica registrada em *whole-cell* a temperatura ambiente. **B:** Corrente inespecífica registrada em *cell-attached* a 37 °C. Adaptado de PERSECHINI e col., 1998.

O canal inespecífico, chamado de poro Z, seria o responsável pelo fenômeno de permeabilização da membrana plasmática induzido pelo ATP (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Se isto é verdade, o poro registrado na conformação *cell-attached* seria o poro através do qual corantes fluorescentes entram na célula. No entanto, enquanto eletrofisiologicamente foi testada a passagem de grandes cátions orgânicos como Tris^+ ou NMDG^+ , moléculas de peso molecular tão alto como brometo de etídeo ou Lucifer Yellow só foram testadas em ensaios de permeabilização. Resta saber se os dois fenômenos observados (entrada de

corantes fluorescentes e abertura do poro) são mediados pela mesma entidade molecular.

1.3.5.1 Um Mesmo Canal com Dois Estados de Permeabilidade ou Dois Canais?

A relação funcional entre as duas correntes permanece desconhecida. É possível que a despolarização provocada pela corrente catiônica ative de algum modo a corrente inespecífica, já que esta só ocorre em condições de despolarização (ver modelo da Figura 13) (PERSECHINI e col., 1998). Estas hipóteses não foram investigadas de forma conclusiva, como veremos mais adiante.

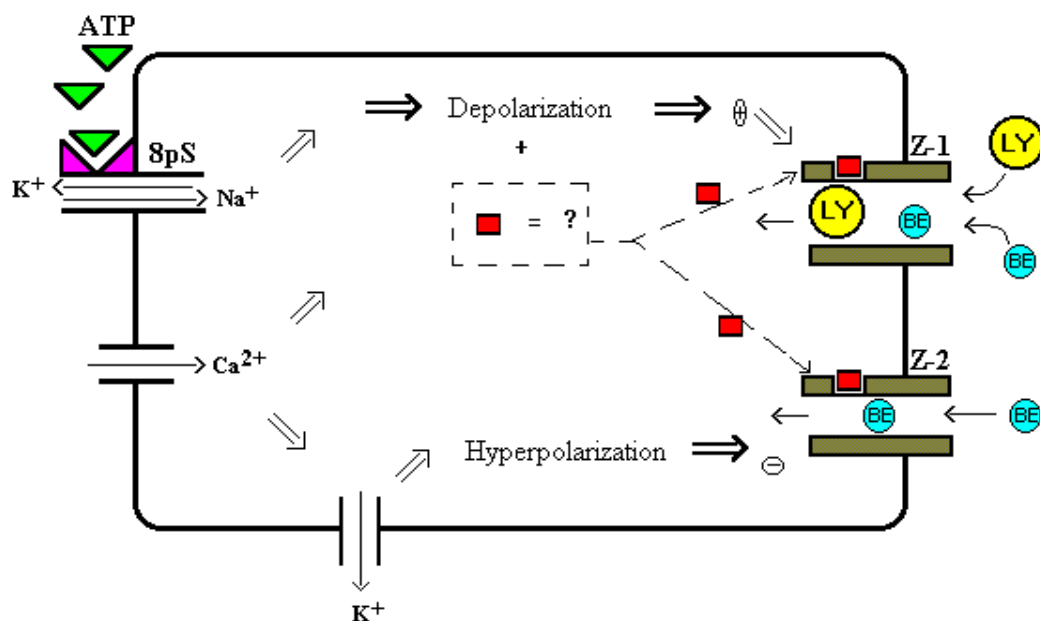


Figura 13 Esquema que representa uma hipótese sobre a regulação da permeabilização através do receptor P2X₇.

A despolarização causada pela abertura do canal catiônico de 8 pS provaria a abertura do canal inespecífico ou poro de 400 pS. A hiperpolarização fecharia este poro. Sugere-se também a participação de um segundo mensageiro no fenômeno de abertura do poro. Adaptado de PERSECHINI e col., 1998.

Introdução

A identidade molecular do canal responsável pela formação do poro Z e a entrada de corantes fluorescentes também é, em boa parte, desconhecida. Atualmente existem duas hipóteses ao respeito (Figura 14). A primeira hipótese supõe que as duas condutâncias observadas correspondem a uma única proteína-canal, que seria o próprio receptor P2X₇, que inicialmente apresenta permeabilidade só a cátions pequenos e logo, sob presença contínua do agonista, passa a permitir a entrada de moléculas maiores (Figura 14 A). A segunda hipótese sugere que se trata de duas proteínas diferentes, uma delas seria o receptor P2X₇ (responsável pela corrente catiônica) e existiria a participação de uma ou mais moléculas que formariam um canal ou poro de grande condutância, responsável pela corrente inespecífica (Figura 14 B) (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997; NORTH, 2002; PERSECHINI e col., 1998).

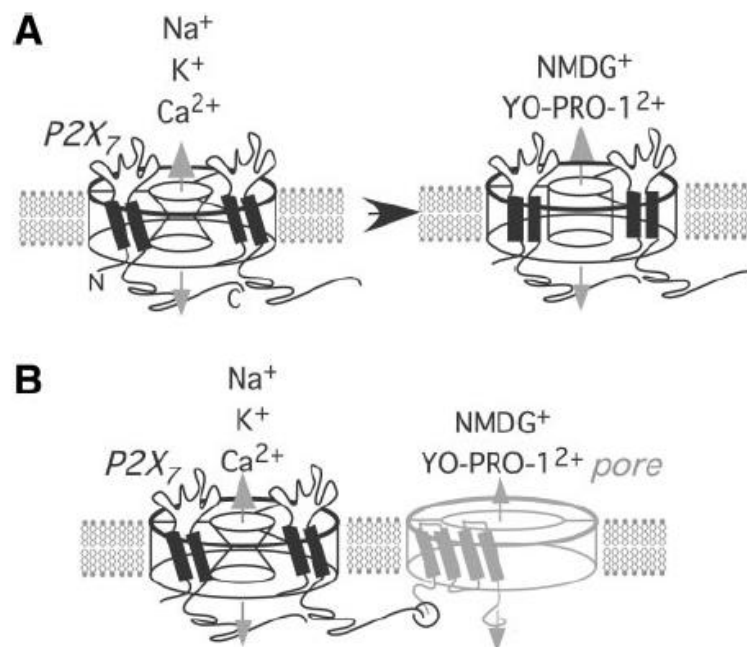


Figura 14 Esquema que representa as duas hipóteses sobre a identidade molecular responsável pelas correntes associadas ao receptor P2X₇.

A: tratar-se-ia de um mesmo canal que aumenta sua permeabilidade. **B:** seriam dois canais diferentes relacionados entre si. NORTH, 2002.

Existem evidências a favor das duas hipóteses. Em favor da primeira:

I. a permeabilização induzida por ATP foi observada em diferentes tipos celulares transfectados com P2X₇, como HEK293 (RASSENDREN e col., 1997), células COS e ovócitos (CARIO-TOUMANIANTZ e col., 1998), o que supõe que se existisse uma segunda molécula esta deveria ser ubíqua a uma grande variedade de tipos celulares (SURPRENANT e col., 1996);

II. a maioria dos fármacos que bloqueiam a corrente catiônica bloqueia também a entrada de corantes fluorescentes.

Por outro lado, existem evidências que apontam para segunda hipótese:

I. o calmidazolium é capaz de bloquear a corrente catiônica sem afetar a permeabilização a corantes como YO-PRO-1 (VIRGINIO e col., 1997);

II. a maitoxina é uma toxina que induz permeabilização com algumas características similares à induzida por P2X₇, mas este receptor não intervém no processo (SCHILLING e col., 1999a; SCHILLING e col., 1999b);

III. em alguns sistemas de expressão de P2X₇ em ovócitos a ativação do receptor resultou na abertura do canal catiônico, com ausência da corrente associada à permeabilização (PETROU e col., 1997) e

IV. na conformação *cell-attached* a adição do agonista fora do selo da pipeta provoca a abertura do poro de 400 pS dentro do selo, o que sugere a necessidade de um segundo mensageiro (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997).

Surprenant e colaboradores transfectaram células HEK-293 com uma proteína P2X₇ mutante, sem os últimos 418 aminoácidos. Nestas células o ATP elicitou a corrente catiônica mas não a entrada de corantes fluorescentes (SURPRENANT e col., 1996).

Introdução

Análises cinéticas da corrente registrada em *whole-cell* mostram que existem quatro sítios de ativação. Dois deles com alta sensibilidade ao ATP⁻⁴ (o verdadeiro ligante do receptor) e os outros dois com baixa sensibilidade ao ATP⁻⁴. Somente os sítios de baixa afinidade pelo ATP seriam regulados pelo extremo carboxi-terminal da proteína (KLAPPERSTUCK e col., 2001). Poderia se especular que estes sítios de baixa afinidade seriam os que provavelmente ativariam a abertura do poro inespecífico na presença de altas concentrações de ATP, logo que existiria um mecanismo diferente para a abertura do canal catiônico. Os experimentos com mutações pontuais no domínio carboxi-terminal mostraram que existem receptores mutantes capazes de manter o canal catiônico funcional sem que exista captação de etídeo (SMART e col., 2003).

A permeabilidade a grandes cátions orgânicos observada em células transfectadas com o cDNA o receptor P2X₂ e do receptor P2X₄ (VIRGINIO e col., 1999b) mostra que o receptor P2X₇ não seria o único com a propriedade de permeabilizar a membrana, podendo se tratar de receptores com a mesma capacidade de aumentar sua condutância ou de ativar uma molécula formadora de um poro.

Como apresentado no esquema da Figura 13, desde 1998 a equipe de nosso laboratório inclina-se pela segunda hipótese, defendendo a idéia de que existem duas moléculas diferentes envolvidas no fenômeno da captação de corantes associado ao receptor P2X₇.

1.3.5.2 Candidatos a Molécula Formadora do Poro: A Panexina é a Peça que Faltava?

Nos últimos dez anos tem se discutido a possibilidade que a entidade molecular responsável pelo poro Z seja uma conexina (Figura 15 A). Como já mencionado, as conexinas são uma família de proteínas que compõem as junções célula-célula conhecidas como *gap-junctions*. Estas junções são canais iônicos que comunicam uma célula com outra e permitem a passagem de moléculas de até 1 kDa. Seu funcionamento depende da voltagem, do cálcio intracelular e do pH. São reguladas por diversas moléculas como hormônios, neurotransmissores e citocinas, entre outros (CAMPOS-DE-CARVALHO, 1988; EVANS e MARTIN, 2002; SPRAY e BURT, 1990). Em diferentes tipos celulares foi observada uma regulação cruzada entre conexinas e os receptores P2 (HOMOLYA e col., 2000; LAGOSTENA e col., 2001; SCEMES e col., 2000). Existia uma hipótese que sugeria que o poro aberto pela ativação de P2X₇ fosse a conexina 43, mas esta foi descartada já que a abertura das conexinas é inibida por octanol, o que não acontece com a permeabilização induzida pelo ATP (ALVES e col., 1996). Por outro lado, artigos recentes mostram que existiria uma associação física entre o receptor e a conexina 43, já que experimentos de microscopia confocal mostraram que estas duas proteínas co-localizam tanto na membrana quanto em vesículas citoplasmáticas (FORTES e col., 2004). Isto traz de volta a discussão e a possibilidade de que os fenômenos de captação de corante pelos macrófagos podem ter a participação de alguma conexina.

Enquanto esta tese de doutorado estava sendo desenvolvida, uma nova molécula apareceu no cenário do poro associado ao receptor P2X₇, favorecendo a hipótese de que este é formado por uma entidade molecular diferente. Em 2006,

Introdução

Pellegrini e colaboradores propuseram que uma proteína da família das panexinas (Figura 15 B), a panexina-1, é responsável pela entrada de YO-PRO-1 na célula após estimulação do receptor P2X₇ (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b). O que estes autores mostraram, usando fármacos inibidores e siRNA, é que a inibição da panexina diminui a entrada de corante estimulada pelo ATP extracelular.

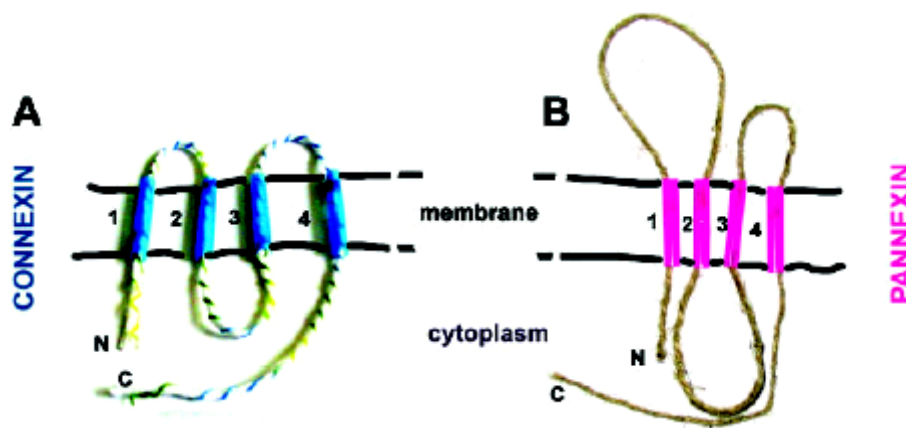


Figura 15 Estrutura prevista para as conexinas e para as panexinas.

As conexinas são proteínas com quatro domínios transmembrana, com os domínios amino e carboxi terminais citoplasmáticos (A). As panexinas apresentam uma estrutura similar (B); com uma grande alça extracelular entre os domínios transmembrana 1 e 2. Adaptado de PANCHIN, 2005.

As panexinas formam uma família protéica de três membros, caracterizadas em mamíferos a partir da sua homologia com as proteínas formadoras de *gap-junctions* em invertebrados, as inexas (PANCHIN, 2005; BARBE e col., 2006).

A função das panexinas em mamíferos ainda é controversa, aparentemente não teriam a mesma função que em invertebrados de comunicação entre células. Alguns autores propuseram que os canais de panexina liberam ATP em resposta a estímulos mecânicos e a ativação de receptores P2, em particular P2Y₁ (LOCOVEI e col., 2006).

A expressão de panexina-1 em oócitos mostrou que os canais formados por esta molécula tem uma condutância de aproximadamente 470 pS e que a saída de ATP através dela é favorecida pela despolarização da membrana (BAO e col., 2004).

Recentemente, Boassa e colaboradores mostraram que a panexina-1 forma canais multiméricos na membrana plasmática (BOASSA e col., 2007), sustentando a hipótese que estas moléculas teriam como função conectar o citoplasma com o meio extracelular, e apoiando a candidatura da panexina como a estrutura responsável pela formação do poro associado ao receptor P2X₇.

1.3.6 PROPRIEDADES DO PORO ASSOCIADO AO FENÔMENO DE PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Existem na literatura dados confusos e até contraditórios sobre as propriedades do poro associado ao receptor P2X₇. Em primeiro lugar, cabe destacar que até o momento só dois grupos de pesquisadores tem realizado registros de canal unitário deste poro: nossa equipe e Faria e colaboradores (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997; FARIA e col., 2004). Estes registros foram feitos em células que expressam endogenamente o receptor P2X₇: macrófagos de camundongo, macrófagos da linhagem J774 e células epiteliais tímicas 2BH4. Nestes experimentos foi testada a passagem de cátions orgânicos, como Tris⁺ e NMDG⁺, e de ânions orgânicos, como glutamato (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Os outros grupos de pesquisadores realizaram experimentos na conformação *whole-cell* e, como já mencionado, relataram o aumento gradual da permeabilidade a grandes cátions na presença contínua do agonista, efeito denominado pelos autores como “dilatação do poro” ou “alargamento” (VIRGINIO e col., 1999b). Muitos destes

Introdução

registros foram realizados em células HEK-293 ou em oócitos de *Xenopus* transfectados com o receptor P2X₇.

Como outro conjunto de dados temos os experimentos nos quais a captação de corantes fluorescentes é associada à abertura do poro associado ao receptor P2X₇. Observamos a utilização de corantes catiônicos que se ligam ao DNA, como brometo de etídeo, YO-PRO e iodeto de propídeo (STEINBERG e col., 1987; VIRGINIO e col., 1999a; KHAKH e LESTER, 1999) e corantes aniônicos de localização citoplasmática, como carboxifluoresceína, FURA-2 e Lucifer Yellow (STEINBERG e col., 1987; FERRARI e col., 2000; DUAN e col., 2003) em diferentes tipos celulares (Figura 16 e Tabela 3).

Olhando com atenção a tabela 3 percebemos que a entrada de corantes aniônicos através do poro associado ao receptor P2X₇ só foi testado em células que expressam endogenamente esta proteína. Em todos os sistemas de transfecção deste receptor foram testados somente corantes catiônicos que fluorescem quando associados ao DNA.

Introdução

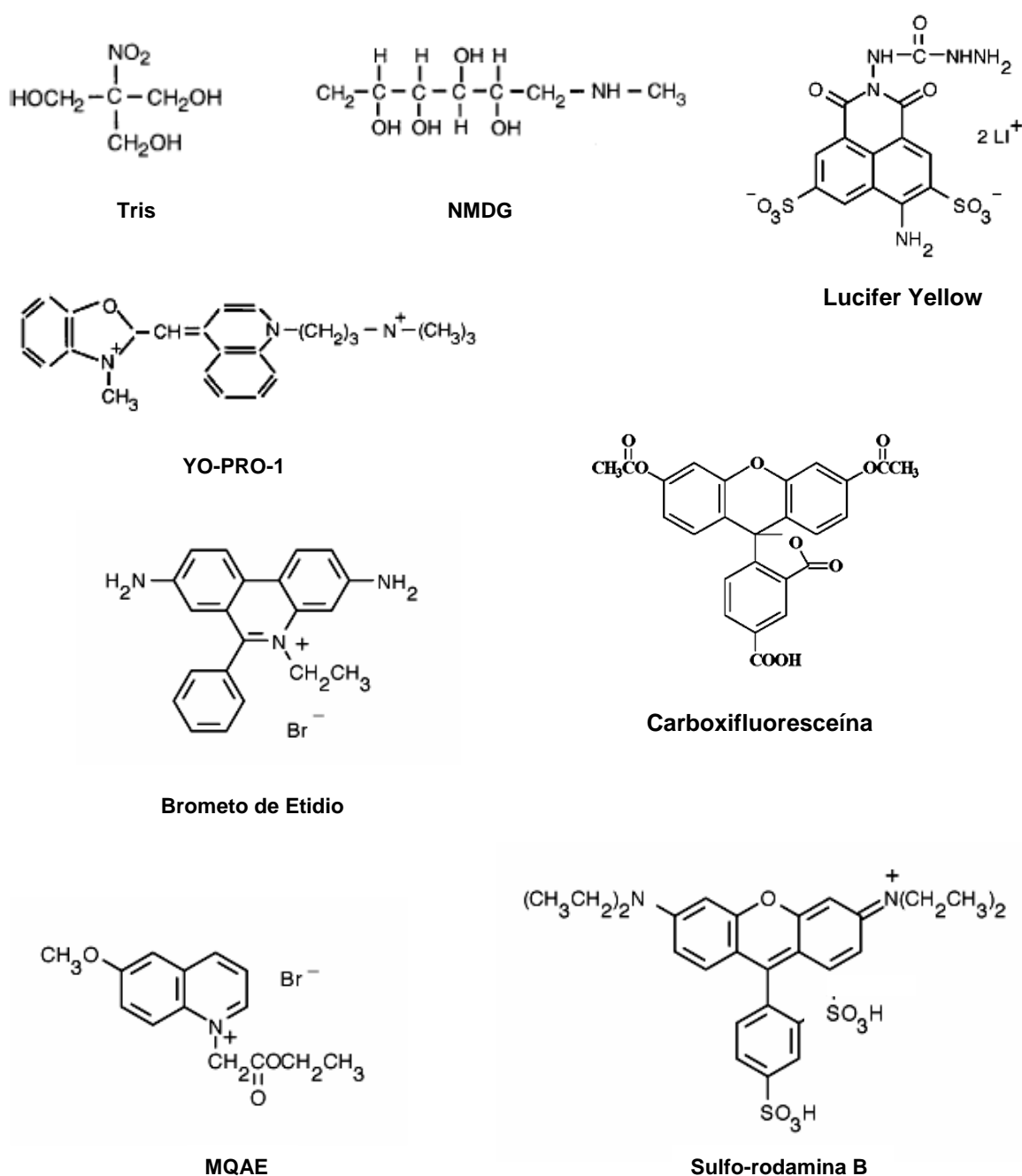


Figura 16 Estruturas dos diferentes cátions orgânicos e de alguns corantes fluorescentes utilizados para testar a abertura do poro associado ao receptor P2X₇.

O MQAE e a sulfo-rodamina B são corantes fluorescentes que utilizaremos ao longo desta tese de doutorado, porém não se encontram entre os corantes rotineiramente utilizados para medir atividade do receptor P2X₇.

Introdução

<i>Tipo celular</i>	<i>Corante</i>	<i>Citação</i>
Oócitos de <i>Xenopus</i> expressando P2X ₇ humano	Brometo de Etídeo	(WORTHINGTON e col., 2002)
Astrócitos de rato	Lucifer Yellow	(DUAN e col., 2003)
Oócitos de <i>Xenopus</i> expressando P2X ₇ de rato	Brometo de Etídeo	(SMART e col., 2003)
Linfócitos B humanos	Brometo de Etídeo	(GARGETT e WILEY, 1997) (FERNANDO e col., 1999) (GU e col., 2000) (JURSIK e col., 2007)
HEK (embrionárias de rim humano) transfectadas com P2X ₇ humano	YO-PRO	(RASSENDREN e col., 1997) (MICHEL e col., 2000) (HIBELL e col., 2001) (JIANG e col., 2005) (MICHEL e col., 1999)
HEK transfectadas com P2X ₇ humano	Brometo de Etídeo	(MICHEL e col., 2001) (HIBELL e col., 2001) (WORTHINGTON e col., 2002) (BARDEN e col., 2003) (CABRINI e col., 2005)
HEK transfectadas com P2X ₇ de rato	YO-PRO	(RASSENDREN e col., 1997) (VIRGINIO e col., 1997) (VIRGINIO e col., 1999a) (JIANG e col., 2001) (HIBELL e col., 2001) (JIANG e col., 2005) (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b)
HEK transfectadas com P2X ₇ de rato	Brometo de Etídeo	(MICHEL e col., 2001) (HIBELL e col., 2001) (SMART e col., 2002) (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b; SMART e col., 2003) (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006a)
HEK transfectadas com P2X ₇ de camundongo	YO-PRO-1	(HIBELL e col., 2001) (MICHEL e col., 1999)
HEK transfectadas com P2X ₇ de camundongo	Brometo de Etídeo	(MICHEL e col., 2001) (HIBELL e col., 2001)
Linfócitos B humanos	Iodeto de propídeo	(FERNANDO e col., 1999)
Microglia de camundongo	Brometo de Etídeo	(TAKENOUCI e col., 2005)

Introdução

Microglia de camundongo	YO-PRO	(TAKENOUCI e col., 2007a) (TAKENOUCI e col., 2007b)
Células CHO (ovário de hamster chinês)	YO-PRO-1	(MICHEL e col., 1998)
Células CHO	Brometo de Etídeo	(LUNDY e col., 2004)
Células do epitélio tímico de rato	Brometo de Etídeo	(BISAGGIO e col., 2001)
Células dendríticas de camundongo	Lucifer Yellow	(NIHEI e col., 2000)
Células dendríticas de camundongo	Brometo de Etídeo	(NIHEI e col., 2000)
Linfócitos T humanos	Brometo de Etídeo	(GU e col., 2000) (JURSIK e col., 2007)
Células NK humanas	Brometo de Etídeo	(GU e col., 2000) (JURSIK e col., 2007)
Monócitos humanos	Brometo de Etídeo	(GU e col., 2000) (SLUYTER e col., 2004) (JURSIK e col., 2007)
Monócitos humanos	YO-PRO-1	(AGA e col., 2002) (DENLINGER e col., 2005) (GUDIPATY e col., 2001)
Células HL-60 (leucemia promielocítica humana)	Lucifer Yellow	(SUH e col., 2001)
Células HL-60 (leucemia promielocítica humana)	YO-PRO-1	(SUH e col., 2001)
Células J774 (macrófagos de camundongo)	Lucifer Yellow	(SANZ e col., 1998) (STEINBERG e col., 1988)
Células J774	Carboxifluoresceína	(STEINBERG e col., 1988)
Células de Swann de camundongo	Lucifer Yellow	(COLOMAR e AMELEE, 2001)
Células de glândula submandibular de rato	Brometo de Etídeo	(ALZOLA e col., 2001)
Células da glândula parótida de rato	YO-PRO-1	(GIBBONS e col., 2001)
Células COS (de rim de macaco africano) expressando P2X ₇ de rato	Brometo de Etídeo	(SMART e col., 2002)
Células THP-1 (monócitos humanos)	YO-PRO-1	(DONNELLY-ROBERTS e col., 2004)
Células THP-1	Brometo de Etídeo	(ALCARAZ e col., 2003)
Células da vasculatura da retina de rato	YO-PRO-1	(SUGIYAMA e col., 2004) (ELSSNER e col., 2004)
Células 2BH4 (epitelial tímica de camundongo)	Brometo de Etídeo	(FARIA e col., 2004)
Células 2BH4	Lucifer Yellow	(FARIA e col., 2004)
Macrófagos intraperitoneais de camundongo	Brometo de Etídeo	(COUTINHO-SILVA e PERSECHINI,

		1997; FARIA e col., 2004; MONTEIRO-DA-CRUZ e col., 2006)
Macrófagos intraperitoneais de camundongo	Lucifer Yellow	(ALVES e col., 1996) (FARIA e col., 2004)
Células da retina de rato	YO-PRO-1	(INNOCENTI e col., 2004)
Células DTH-40 (células T de frango) transfectadas com P2X ₇ de rato	Brometo de Etídeo	(TSUKIMOTO e col., 2004) (HILLMAN e col., 2003)
Astrócitos fetais humanos	YO-PRO	(NARCISSE e col., 2005)
Macrófagos intraperitoneais de rato	Brometo de Etídeo	(CHEN e col., 2005)
Células 1321N1 (astrocitomas humanos) transfectadas com P2X ₇ de humano	YO-PRO-1	(LOCOVEI e col., 2007)

Tabela 3 Alguns dos tipos celulares e os corantes fluorescentes utilizados em cada caso para testar abertura do poro associado ao receptor P2X₇

Notar que nos sistemas de expressão heteróloga do receptor P2X₇ só foram utilizados corantes fluorescentes catiônicos que se ligam ao DNA.

Resumindo então os dados que existem na literatura até o momento sobre o poro inespecífico ativado pela presença de ATP extracelular:

- registros em *cell-attached* mostram passagem de cátions e ânions orgânicos, apresentando um potencial de reversão próximo de 0 mV, o que sugere um poro inespecífico,

- em sistemas de expressão endógena do receptor P2X₇ se observa entrada de corantes fluorescentes de peso molecular de entre 300 e 800 Da tanto catiônicos quanto aniônicos,

- em sistemas de expressão heteróloga do receptor P2X₇ tem sido observada até momento só entrada de corantes fluorescentes catiônicos e não existe ainda registro do canal unitário associado ao poro inespecífico,

- em sistemas de expressão heteróloga só existem registros eletrofisiológicos da atividade do receptor P2X₇ na conformação *whole-cell*.

1.4 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Os mecanismos intracelulares pelos quais o receptor P2X₇ medeia os seus diversos efeitos ainda permanecem desconhecidos. Vários autores mostraram que o receptor ativa várias cascatas intracelulares que levam à liberação de interleucinas e a morte celular provocadas pela presença de ATP no meio extracelular (ERB e col., 2006) (Figura 17).

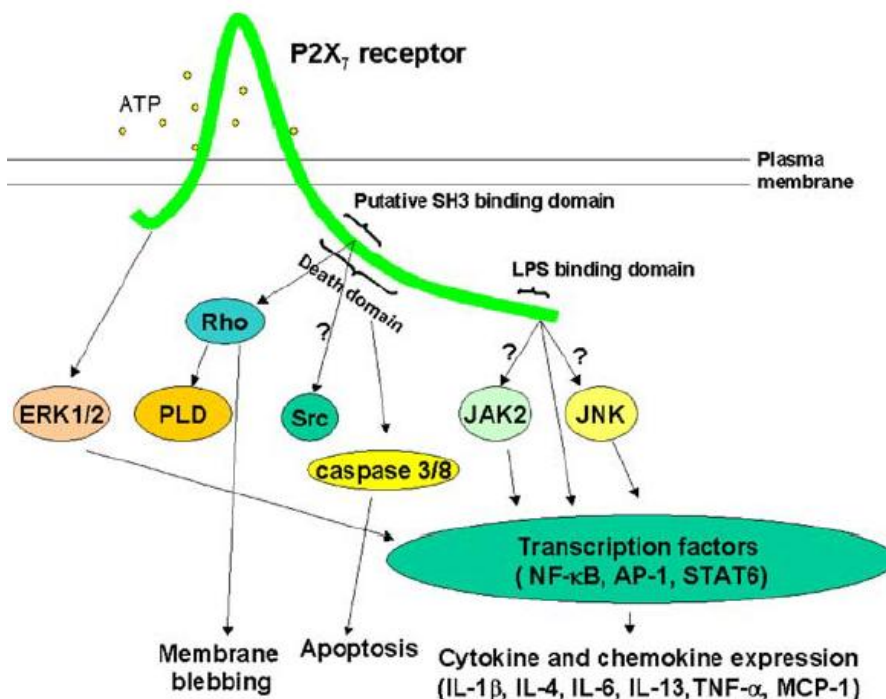


Figura 17 Vias de sinalização associadas ao receptor P2X₇.

Abreviaturas: ERK: quinases ativadas por sinais extracelulares; PLD: fosfolipase D; JNK: quinases com amino-terminal c-Jun. JAK: quinase janus 2 (do inglês *Janus Kinase 2*); Src: família das tirosinas quinases proto-oncogênicas (Src vem de sarcoma); LPS: lipopolissacarídeo. Adaptado de (ERB e col., 2006).

Em particular, ao longo desta tese de doutorado nos interessamos pelos mecanismos de sinalização intracelular que levam a abertura do poro inespecífico associado ao fenômeno de permeabilização.

Introdução

Como já discutimos, experimentos de *patch-clamp* na conformação *cell-attached* mostraram que o poro associado a permeabilização abria na porção da membrana isolada da solução extracelular contendo ATP. Isto sugere que este canal ou poro estaria associado ao receptor P2X₇ através de algum tipo de cascata intracelular (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Simultaneamente, nos últimos anos tem se acumulado evidências que relacionam o receptor P2X₇ à via de sinalização nas quais participam proteínas quinases.

A família das proteínas quinases inclui a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase A (PKA) e as proteínas quinases ativadas por fatores mitogênicos (MAPKs), entre outras.

A ativação da PKC geralmente requer a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Resumidamente, após a estimulação da célula por determinados agentes o fosfatidil-inositol 4-5-bifosfato (PIP₂) é clivado pela fosfolipase C (PLC), produzindo-se inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ causa a liberação do Ca²⁺ do retículo, o que possibilitaria a aproximação da PKC ao DAG, com a conseqüente ativação desta. Uma vez ativada a PKC fosforila várias proteínas, entre elas fatores de transcrição (ROBINSON-WHITE e STRATAKIS, 2002).

A PKA é ativada por receptores associados à proteína G. A ativação destes receptores estimula a adenilato ciclase, que produz AMPc. O AMPc se liga à PKA e ativa-a. Uma vez ativa, a PKA fosforila também vários fatores de transcrição (ROBINSON-WHITE e STRATAKIS, 2002).

A família das MAPKs está organizada em quatro grupos principais: as quinases ativadas por sinais extracelulares (ERK, do inglês extracellular *signal-regulating kinase*), a quinase p38, as quinases com amino-terminal c-Jun (JNK) e as proteínas

Introdução

quinases ativadas por estresse (SAPK). Quando ativadas, todas estas proteínas fosforilam diversos fatores de transcrição (DONG e col., 2002) (Figura 18).

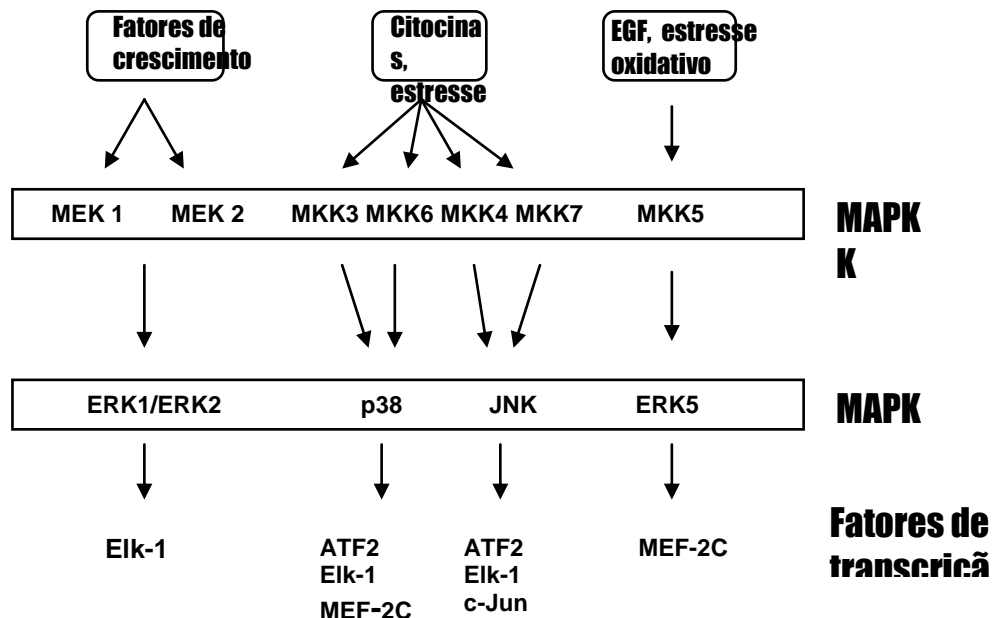


Figura 18 Proteínas quinases ativadas por fatores mitogênicos (MAPKs).

O esquema sumariza as principais vias de sinalização das MAPKs. As MAPK são ativadas por quinases da família das MAPKK (MAP quinases quinases). A ativação das MAPK leva a ativação de diferentes fatores de transcrição, mediando diversos efeitos. Adaptado de Dong e col. 2002.

Kim e colaboradores mostraram que para a abertura do canal catiônico dependente de ATP e associado ao receptor P2X₇ é necessária à defosforilação da Tirosina 343, indicando que provavelmente há tirosina-quinases envolvidas na formação do poro (KIM e col., 2001a). Outros estudos também sugerem a participação de tirosina quinases (BRONTE e col., 1996; HUNG e SUN, 2002) e MAPKs na sinalização da resposta associada ao receptor P2X₇ (BRADFORD e SOLTOFF, 2002; HUMPHREYS e col., 2000; PANENKA e col., 2001; PFEIFFER e col., 2004).

Introdução

Recentemente, dois grupos de pesquisadores transfectaram o receptor P2X₇ em células que não possuem receptores P2 e mostraram que este receptor é capaz de ativar a via das ERK1/2 (AMSTRUP e NOVAK, 2003; GENDRON e col., 2003). Porém, a participação das MAPKs no processo de permeabilização ainda não é clara, já que na literatura encontram-se dados aparentemente contraditórios. Por um lado, em células THP-1 a inibição de p38 (mas não à das ERK1/2) bloqueia a captação de corantes por estas células (DONNELLY-ROBERTS e col., 2004). Em timócitos foi mostrado que as ERK1/2 não têm participação alguma na formação do poro associado a P2X₇ (AUGER e col., 2005). Por outro lado, um artigo recentemente publicado mostra que tanto inibidores de p38 como das ERK1/2 inibem a captação de corantes e a formação do poro em macrófagos intraperitoneais de camundongo e em células de linhagem epiteliais tímicas 2BH4 (FARIA e col., 2004).

Dados do nosso laboratório produzidos ao longo desta tese de doutorado indicam que, tanto em macrófagos intraperitoneais de camundongo como em células J774, o estímulo do receptor P2X₇ ativa a via das ERK1/2, mas esta via não está envolvida no processo de captação de etídio induzido pelo ATP e BzATP (ver “Anexo” e (MONTEIRO-DA-CRUZ e col., 2006)).

A participação do cálcio intracelular no processo de permeabilização também é bastante controversa. O cálcio extracelular parece ser necessário para algumas das funções mediadas pelo receptor, como por exemplo a regulação da liberação de IL-1 β (GUDIPATY e col., 2003). Mas tem sido relatado que a presença de cálcio extracelular diminui a captação de YO-PRO-1 induzida por ATP mediada por P2X₇ (VIRGINIO e col., 1997). Por outro lado, no ano retrasado foi publicado que a permeabilização e a abertura do poro associado a P2X₇ macrófagos de camundongo

não acontece em ausência de cálcio extracelular (FARIA e col., 2004). Esta será uma das questões abordadas ao longo desta tese de doutorado.

1.5 UMA QUESTÃO AINDA SEM RESPOSTA

Nos últimos anos o interesse sobre o receptor P2X₇ e sua participação no sistema imune tem aumentado notavelmente. Os efeitos no contexto imunológico mediados pelo receptor são variados e muitos fenômenos celulares associados com sua ativação ainda não têm uma explicação fisiológica clara.

Por outro lado, como desenvolvido ao longo desta introdução, ainda existem grandes questões em aberto no que diz respeito aos mecanismos que levam ao ATPe induzir poros na membrana da célula e estimular a captação de corantes fluorescentes, de maneira dependente da presença do receptor P2X₇. Este em particular será o assunto que abordará a presente tese de doutorado.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese de doutorado é aprofundar nossos conhecimentos sobre o fenômeno de captação de corantes induzido pela presença do ATPe através da ativação do receptor P2X₇ e sobre o papel que os poros Z desempenham nesses fenômeno.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as características eletrofisiológicas do poro inespecífico induzido pelo ATPe na membrana plasmática associado ao receptor P2X₇.
- Correlacionar os dados eletrofisiológicos com a captação de corantes fluorescentes tradicionalmente utilizada como ferramenta para o estudo do receptor P2X₇.
- Estudar o papel do cálcio intracelular na sinalização do fenômeno de captação de corantes fluorescentes ativado pelo receptor P2X₇ na presença do ATP.
- Estabelecer um modelo heterólogo de expressão do receptor P2X₇ que permita comparar as características de um sistema deste tipo com as que apresenta o receptor P2X₇ em macrófagos.
- Novo objetivo surgido a partir do desenvolvimento da pesquisa: investigar diferenças nos fenômenos de captação de corantes fluorescentes catiônicos e aniônicos, e sua correlação com os dados eletrofisiológicos.

3 Materiais e Métodos

3.1 MATERIAIS

3.1.1 REAGENTES E DROGAS UTILIZADAS

Utilizamos meio de cultura DMEM (pela sigla em inglês de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina da marca Gibco/BRL (São Paulo, SP, Brasil). O tioglicolato foi da Difco (Detroit, MI, USA). NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂, metanol, Trizma-base, glicina e glicerol foram comprados na Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Adenosina-5-Trifosfato (ATP), EGTA, EDTA, 2-beta-mercaptoetanol, Tween 20, sodium dodecil sulfato (SDS), N, N, N', N'-Tetrametil-etilen-diamina (TEMED), ATP oxidado (oxATP), Brometo de etídeo, sacarose, Poly-L-Lisina, HEPES, dimetil sulfóxido (DMSO) e Lucifer Yellow, providenciados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). BAPTA-AM, YO-PRO, Fura-2 e probenecida foram comprados na Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Lipofectamina 2000, pcDNA6/V5-His A e Blastidina S HCl foram da Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil). A soro albumina bovina foi comprada na USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA). A carboxifluoresceína utilizada foi marca KODAK. As membranas de PVDF, os anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase, o reagente Bradford e o kit quimioluminescente (ECL-Plus) foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biosciences (São Paulo, SP, Brasil). O anticorpo anti P2X₇ foi comprado na Alomone Labs (Jerusalém, Israel). Os inibidores de proteinases Fenil-metil-sulfonil fluoride (PMSF), leupeptina e aprotinina foram obtidos com Biochemica Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha).

Ao longo de toda esta tese de doutorado investigaremos as características da captação de diferentes corantes fluorescentes induzida pelo ATPe. Acreditamos ser útil para as futuras discussões dos resultados esclarecer o peso molecular e a carga

Materiais e Métodos

associada aos corantes fluorescentes utilizados. Na Tabela 4 indicam-se a carga, a localização intracelular e o peso molecular corresponde de cada corantes, com e sem o contra-íon associado.

Corante	Carga	Localização Intracelular	Peso Molecular Total (Da)	Peso Molecular da Forma Ionizada (Da)
Brometo de Etídeo	Positiva	Ligação ao DNA	394	314
Lucifer Yellow	Negativa	Citoplasmática	457	443
Carboxifluoresceína	Negativa	Citoplasmática	376	375
MQAE	Positiva	Citoplasmática	326	246
Sulfo-rodamina B	Positiva	Citoplasmática	580	559
YO-PRO-1	Positiva	Ligação ao DNA	629	375

Tabela 4 Corantes utilizados com a localização intracelular e os pesos moleculares

3.1.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Os camundongos utilizados foram de duas linhagens diferentes: *Swiss-Webster* e *C57/Bl6*. Os ratos utilizados foram da linhagem *Wistar*.

A manipulação dos animais foi feita conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética do Instituto Carlos Chagas Filho.

3.1.3 CÉLULAS UTILIZADAS

Para a transfecção com o cDNA do receptor P2X₇ utilizamos células HEK-293 (células humanas embrionárias de rim).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENÇÃO MACRÓFAGOS DE INTRAPERITONEAIS MURINOS

Os camundongos ou os ratos foram elicitados com uma injeção intraperitoneal de 1 mL de tioglicolato (10 mL no caso do rato) com o propósito de provocar uma reação inflamatória e assim recrutar macrófagos para esta região. Após 4 dias os animais foram sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e fixados em uma placa de cortiça, onde foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de meio DMEM, massageando o peritônio para obter a maior quantidade de macrófagos possíveis. Em seguida as células foram lavadas 2 vezes com meio sem soro centrifugando 5 min a 1000 x g. O número total de células obtidas foi contado com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As células foram mantidas em gelo até o momento de uso no caso dos experimentos de citometria de fluxo ou plaqueadas como descrito a seguir.

3.2.2 CULTURA DE MACRÓFAGOS

As células intraperitoneais obtidas como descrito acima foram plaqueadas com meio DMEM em placas de 24 poços ou de 35 mm, de acordo com o desempenho experimental. Após 40 min na estufa umedecida com atmosfera 5 % de CO₂, as placas foram lavadas com meio e as células não aderidas foram descartadas. Em seguida foi adicionado meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 0.3 mg/L de L- Glutamina, 100 U/L de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e as células foram mantidas na estufa por três dias até o

Materiais e Métodos

momento do experimento. Este processo constitui o método eficaz para obtenção de macrófagos, evitando contaminação com outras células presentes no peritônio, como por exemplo linfócitos.

Para ensaios de permeabilização e eletrofisiologia utilizou-se uma densidade de 2×10^5 células por poço, nos ensaios de *Western blot* a densidade foi de 1×10^7 células por placa de 35 mm.

3.2.3 TRANSFECCÃO ESTÁVEL DE CÉLULAS HEK-293-P2X₇

Utilizamos cDNA de P2X₇ de rato, cedido pelo Dr. David Julius da Universidade de Califórnia, San Francisco, USA (SURPRENANT e col., 1996), subclonado no plasmídeo pcDNA6/V5-His A (Figura 19).

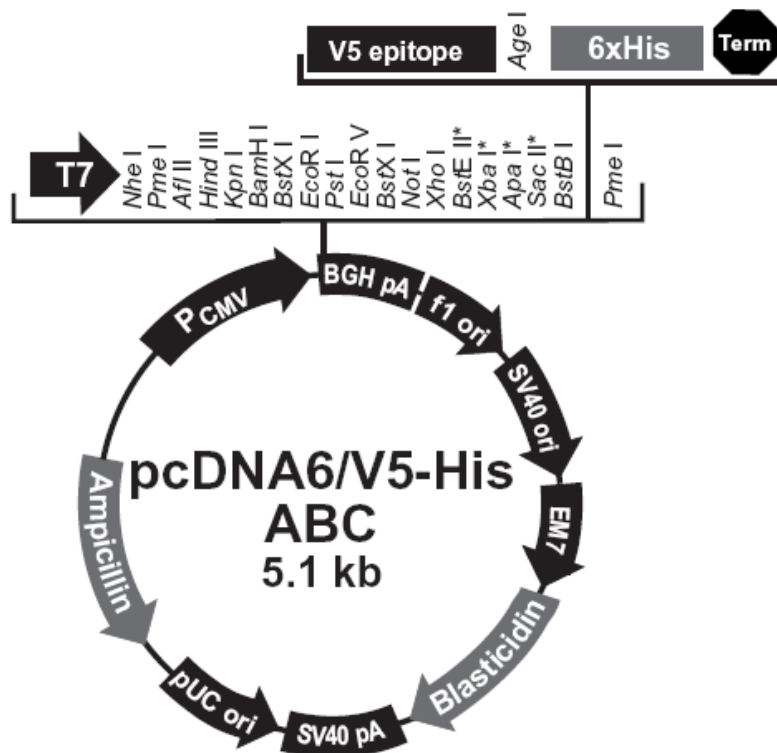


Figura 19 Esquema que mostra a estrutura do pcDNA6/V5-His A, utilizado na clonagem de células HEK-293-P2X₇.

Adaptado de www.invitrogen.com

Materiais e Métodos

As células HEK-293 foram mantidas em DMEM suplementado e plaqueadas a 70-80 % de confluência para serem transfectadas. Foram utilizados aproximadamente 30 µg de plasmídeo linearizado junto com Lipofectamina 2000, segundo instruções do fabricante. No dia seguinte o meio foi substituído por DMEM suplementado contendo 5 µg/mL de Blastidina S HCl, para selecionar as células que incorporaram o plasmídeo. Duas semanas depois cada um dos clones crescidos nessas condições foi plaqueado separadamente e realizaram-se ensaios de permeabilização e medições de cálcio intracelular para testar a resposta do receptor P2X₇. Foram selecionados dois clones, dos quais um deles foi utilizado em todos os experimentos desta tese de doutorado.

3.2.4 CULTURA DE CÉLULAS HEK-293

As células HEK-293 foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado nas mesmas condições que descritas para os macrófagos. No caso das células HEK-P2X₇ foi adicionado no meio o antibiótico de seleção Blastidina-S HCl, 5 µg/mL.

Para ensaios de permeabilização as placas de cultura foram pré-tratadas com poly-l-lisina, para melhorar a adesão das células HEK-P2X₇.

3.2.5 ENSAIOS DE CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES

Os ensaios de captação de corantes fluorescentes foram realizados basicamente de duas maneiras: com células em suspensão utilizando um citômetro de fluxo, ou com células aderidas à placa de cultura utilizando um microscópio de fluorescência .

3.2.5.1 Citometria de Fluxo

Uma suspensão de 10^6 células/mL de lavado peritoneal foi incubada em tubos próprios para citometria de fluxo com PBS durante 5 minutos à 37 °C, com o objetivo de que as células estejam homogeneamente a esta temperatura antes de começar o ensaio. A suspensão celular foi incubada nos tempos indicados na seção “Resultados” com as diferentes drogas e posteriormente tratada com ATP 5 mM ou 3 mM segundo indicado em cada caso por 10 minutos, adicionando nos últimos 5 minutos brometo de etídeo 2 μ M. A captação do corante foi medida utilizando um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA). A intensidade da captação do corante em cada amostra foi determinada usando um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 – 670 nm. Ao menos 5000 pontos foram coletados em cada amostra. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.8 (Multiple Document Interface Flow Cytometry Application, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

3.2.5.2 Microscopia de fluorescência

As células aderidas na placa de cultura foram incubadas por 5 minutos com a solução e na temperatura indicada em cada caso e posteriormente tratadas ou não com a droga mencionada nos Resultados. A incubação com ATP nas diferentes concentrações foi de 10 minutos (exceto quando especificado o contrário). Os corantes fluorescentes utilizados foram; YO-PRO 25 μ M, brometo de etídeo 10 μ M, carboxifluoresceína 5 mM, Lucifer Yellow 3 mM, MQAE 5 mM, sulfo-rodamina 3 mM.

No caso da utilização de corantes citoplasmáticos, como Lucifer Yellow, carboxifluoresceína, sulfo-rodamina e MQAE, após transcorrido o tempo de

Materiais e Métodos

tratamento com ATP as células foram lavadas pelo menos 5 vezes para eliminar o excesso de corante. Desta maneira só permaneceu na placa o corante que entrou nas células.

A entrada dos corantes fluorescentes Lúifer Yellow, etídeo, YO-PRO-1, Carboxifluoresceína e sulfo-rodamina B foi observada em um microscópio Axiovert 100 (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando uma lâmpada UV (HBO) com filtros apropriados. As imagens foram capturadas com o programa Image-Pro Plus v 6.2, Media Cybernetics, Inc. (Bethesda, MD, USA).

A entrada do corante fluorescente MQAE foi observada em um microscópio Axiovert 200 (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando uma lâmpada UV (HBO) com filtros apropriados. As imagens foram capturadas utilizando o programa Axiovision v 4.1 (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.6 MEDIÇÃO DAS VARIAÇÕES DO CÁLCIO CITOPLASMÁTICO

As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 1.5 cm x 1.5 cm e mantidas na estufa durante pelo menos 2 dias antes de cada experimento. Estas células foram pré-incubadas com 5 μ M de FURA-2 AM e 2.5 mM de probenecida diluídos no próprio meio de cultura, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Quando indicado foi adicionado também o quelante de cálcio BAPTA, 10 μ g/mL. Após esse tempo as células foram lavadas duas vezes com solução externa com cálcio (ver mais adiante) e colocadas em uma câmara de perfusão com três compartimentos, cuja base é a lamínula de vidro na qual encontram-se aderidas às células. A câmara central que contém as células tem um volume de 200 μ L e é

Materiais e Métodos

perfundida numa velocidade de 1 mL/min, com a solução externa com cálcio a uma temperatura de 37 °C.

As variações no nível de cálcio citoplasmático foram monitoradas com um fluorímetro (Photon Technology). O FURA-2 foi excitado alternativamente a 340 e 380 nm e foi medida a emissão a 510 nm. O índice entre estes dois comprimentos de excitação é proporcional à concentração citoplasmática de cálcio, e foi medido cada 100 ms. O ATP foi perfundido nessa mesma solução à 37 °C durante 10 minutos.

3.2.7 LISE CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Células aderidas à placa de cultura foram transferidas ao gelo e, com auxílio de um rodo de cultura, foram homogeneizadas em tampão contendo: 20 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 2 mM EDTA; 10 mM EGTA; 0.25 M de sacarose; 25 mg/mL de leupeptina; 25 mg/mL de aprotinina e PMSF (20 mg/mL). As células homogeneizadas foram então submetidas a 30 passagens pela agulha de seringa de insulina. Este procedimento cria as condições de pressão necessárias para causar o rompimento da membrana plasmática. Uma vez lisadas as células foram centrifugadas a 1000 x g durante 5 min para a sedimentação dos núcleos e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 40 minutos em ultracentrífuga HITACHI. O novo sobrenadante foi coletado e armazenado e o precipitado resolubilizado no mesmo tampão descrito acima. As amostras contendo a fração de membrana foram submetidas à dosagem protéica pelo método de Bradford.

3.2.8 ELETROFORESE SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

As células foram submetidas aos procedimentos de lise e fracionamento celular descritos acima. Entre 10-20 ug de proteína total das amostras foram submetidas à separação por eletroforese SDS-PAGE a 10 % de acrilamida em uma cuba BioRad. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com o auxílio de um aparato de transferência (BioRad). A membrana contendo as proteínas foi tratada com uma solução de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado em solução Tris-HCl 20 mM, Tween 20 0,05 %, pH 7.4 [TBS-T]) por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T e incubada durante toda a noite com o anticorpo anti-porção intracelular de P2X₇ (diluído 1:200) à 4 °C. Ao término desta incubação a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e incubada 2 horas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído 1:2000. Finalmente a membrana foi lavada e revelada por quimiluminescência com o kit ECL-Plus, de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição da imagem final de revelação foi feita pela utilização do scanner para luminescência de géis STORM860 e o software ImageQuant versão 5.2 (Molecular Dynamics).

3.2.9 ELETROFISIOLOGIA

Os registros eletrofisiológicos das diferentes correntes foram obtidos nas configurações *cell-attached* e *whole-cell*, no modo *voltage-clamp*, utilizando-se a técnica de *patch-clamp* (HAMILL e col., 1981).

Os registros foram feitos utilizando um amplificador EPC-7 (List Electronic, Darmstadt, Germany), conectado a uma bomba de injeção pneumática PPM-2

Materiais e Métodos

(NeuroPhore BH-2system, List). Os dados foram coletados usando o programa pClamp and Fetchex software, v6.0, e uma interface Digidata 1200 (Axon Instruments, U.S.A.) e representado graficamente utilizando o programa Origin v4.0 (Microcal Inc., U.S.A.).

3.2.9.1 Cell-attached

Esta configuração utiliza-se para medir a corrente que atravessa um ou uns poucos canais na membrana plasmática. A pipeta de vidro, contendo solução extracelular e com uma resistência de aproximadamente $12\text{ M}\Omega$, forma um selo de alta resistência com a membrana. Este selo é chamado de “gigaselo”, já que neste momento a resistência registrada na pipeta aumenta até pelo menos $1\text{ G}\Omega$. As correntes registradas serão as que se produzam na porção da membrana que fica dentro do selo (Figura 20).

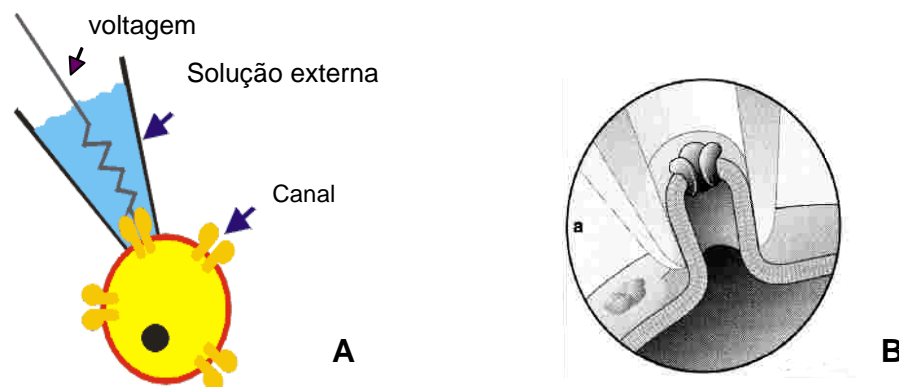


Figura 20 Esquemas da configuração *cell-attached*.

A: esquema geral B: detalhe do selo.

3.2.9.2 Whole-cell

Nesta configuração é possível medir correntes macroscópicas que acontecem através da membrana toda. Utilizam-se pipetas que contêm solução intracelular e com uma resistência de aproximadamente 6 M Ω . Após o estabelecimento do selo de alta resistência entre a pipeta e a membrana, aplica-se uma pressão subatmosférica para romper o retalho de membrana que separa o interior da pipeta do interior da célula, ganhando-se acesso ao meio intracelular (Figura 21).

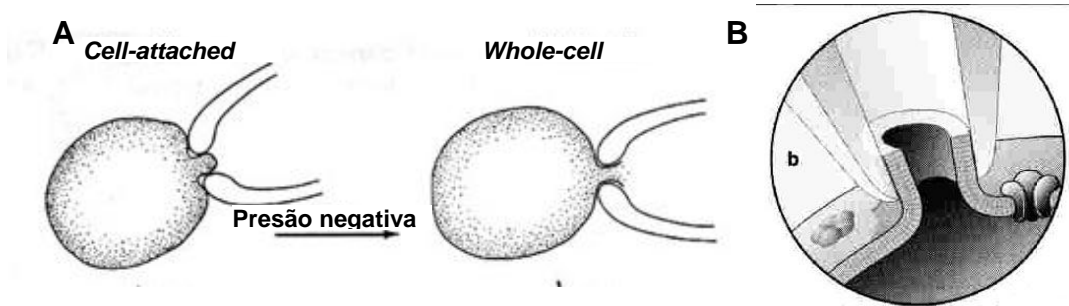


Figura 21 Esquemas da configuração whole-cell.

A: esquema geral **B:** detalhe do selo

3.2.10 SOLUÇÕES UTILIZADAS

Solução Padrão Externa (mM): NaCl 145, KCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, pH 7.4

Solução Externa com Cálcio (mM): NaCl 145, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 10, pH 7.4

Solução Externa com Tris (solução com baixa concentração de sódio) (mM): Tris-Cl 150, KCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, pH 7.4.

Solução Externa com EDTA (mM): NaCl 145, KCl 5, MgCl₂ 1, EDTA 10, HEPES 10, pH 7.3 (Ca²⁺ livre menos de 1 nM e Mg²⁺ livre 550 nM)

Solução Padrão Interna (mM): KCl 135, NaCl 5, MgCl₂ 2, EGTA 0,1, HEPES 10, pH 7,4

Materiais e Métodos

Solução com Glutamato (Solução com baixa concentração de cloreto) (mM): NaGlu 145, KCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, pH 7.4

Solução com EGTA: NaCl 145, KCl 5, MgCl₂ 1, EGTA 1, HEPES 10, pH 7.4 (Ca²⁺ livre menos de 50 nM e Mg²⁺ livre 1mM)

Consideramos o Ca²⁺ contaminante na Solução Padrão 100 µM.

3.2.11 MEDIÇÃO DOS PARÂMETROS DESCRITIVOS DO CANAL UNITÁRIO

Cada registro durou em média 7 minutos. Os registros onde não teve abertura de canais o tempo foi de 30 minutos ou mais, o que indica que a abertura dos poros influencia na estabilidade do selo. O número de eventos quantificados em cada registro foi em média de 21.

A medição dos parâmetros descritos foi realizada manualmente. Para calcular a amplitude foi feita a média da medida de 5 amplitudes de cada canal.

A probabilidade de abertura (P_{open}) do canal unitário foi calculada como:

$$P_{open}: \frac{\text{Tempo total que o canal permanece aberto}}{\text{Tempo total do registro}}$$

3.2.12 ANÁLISE DAS IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para quantificar a fluorescência das imagens de microscopia nos ensaios de permeabilização de células aderidas foi utilizado o programa Image J 1.38 (National Institutes of Health, USA).

3.2.13 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE ÍONS LIVRES NAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

Para calcular os valores das concentrações de Ca^{2+} , Mg^{2+} e ATP^{4-} livres nas soluções utilizadas usamos o programa Sliders v2.00 (Stanford University, Pacific Grove, CA, USA).

3.2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas utilizamos o programa GraphPad Prism 4 Software, Inc. (São Diego, CA, USA) e usamos um teste estatístico não-paramétrico para amostras não pareadas, o Teste t de Student (*t-Test*). Representação da significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4 Resultados

Só com grande força interior poderá enfrentar seu destino

Provérbio chinês

(achado num biscoito da sorte no começo desta tese de doutorado)

Inicialmente caracterizamos os fenômenos associados ao receptor P2X₇, como captação de corantes e correntes elétricas registradas tanto na conformação *whole-cell* como *cell-attached*. Posteriormente pesquisamos a correlação existente entre os dois tipos de abordagens aos efeitos do receptor P2X₇ sobre os macrófagos intraperitoneais de camundongo.

Investigamos a participação do cálcio como possível sinal envolvido tanto no fenômeno de abertura de canais quanto na captação de corantes.

Tentando melhorar nosso sistema experimental, transfectamos células HEK-293 com o receptor P2X₇ e procuramos reproduzir os dados obtidos em macrófagos.

4.1 FENÔMENOS TÍPICAMENTE ASSOCIADOS AO RECEPTOR P2X₇ EM RESPOSTA AO ATP_E

Ao começar esta tese de doutorado nos propusemos reunir os dados conhecidos sobre as propriedades eletrofisiológicas do poro associado ao receptor P2X₇ e aqueles que caracterizavam o fenômeno de permeabilização da membrana plasmática desencadeado pela ativação do mesmo receptor. Nosso interesse era investigar se estes dois processos são na realidade diferentes manifestações de um mesmo mecanismo ativado pela presença de ATPe.

Inicialmente, realizamos ensaios utilizando o modelo experimental do laboratório: o macrófago intraperitoneal murino.

4.1.1 REGISTRO DAS CORRENTES ELÉTRICAS CARACTERISTICAMENTE ASSOCIADAS AO RECEPTOR P2X₇

Inicialmente registramos as correntes elétricas típicas associadas ao receptor P2X₇ ativadas pela presença de ATPe.

Em macrófagos intraperitoneais de camundongo, utilizando a conformação *whole-cell*, foi possível registrar uma corrente catiônica de influxo associada ao receptor P2X₇ em resposta a concentrações micromolares de ATP (Figura 22 A). Esta corrente de influxo, que se gera pela entrada de Ca²⁺ e Na⁺ através da membrana, pode ser registrada à temperatura ambiente, aparece milisegundos depois da aplicação do agonista e não dessensibiliza após sucessivas aplicações (Figura 22 B).

Geralmente uma corrente de efluxo se observa imediatamente após a corrente de influxo (Figura 22 A). Esta corrente é uma corrente de K⁺ que se gera pela abertura dos canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺ presentes no macrófago (HARA e col., 1990). A entrada de Ca²⁺ pelo canal formado pelo receptor P2X₇ e a liberação de Ca²⁺ a partir dos estoques intracelulares como resultado da estimulação dos receptores P2Y pelo ATPe provocam o aumento de Ca²⁺ citoplasmático necessário para ativar os canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺. Esta resposta típica ao ATPe é chamada de “resposta bifásica”. No entanto, em algumas células em nossas condições experimentais esta corrente de saída de K⁺ não é observada (Figura 22 B).

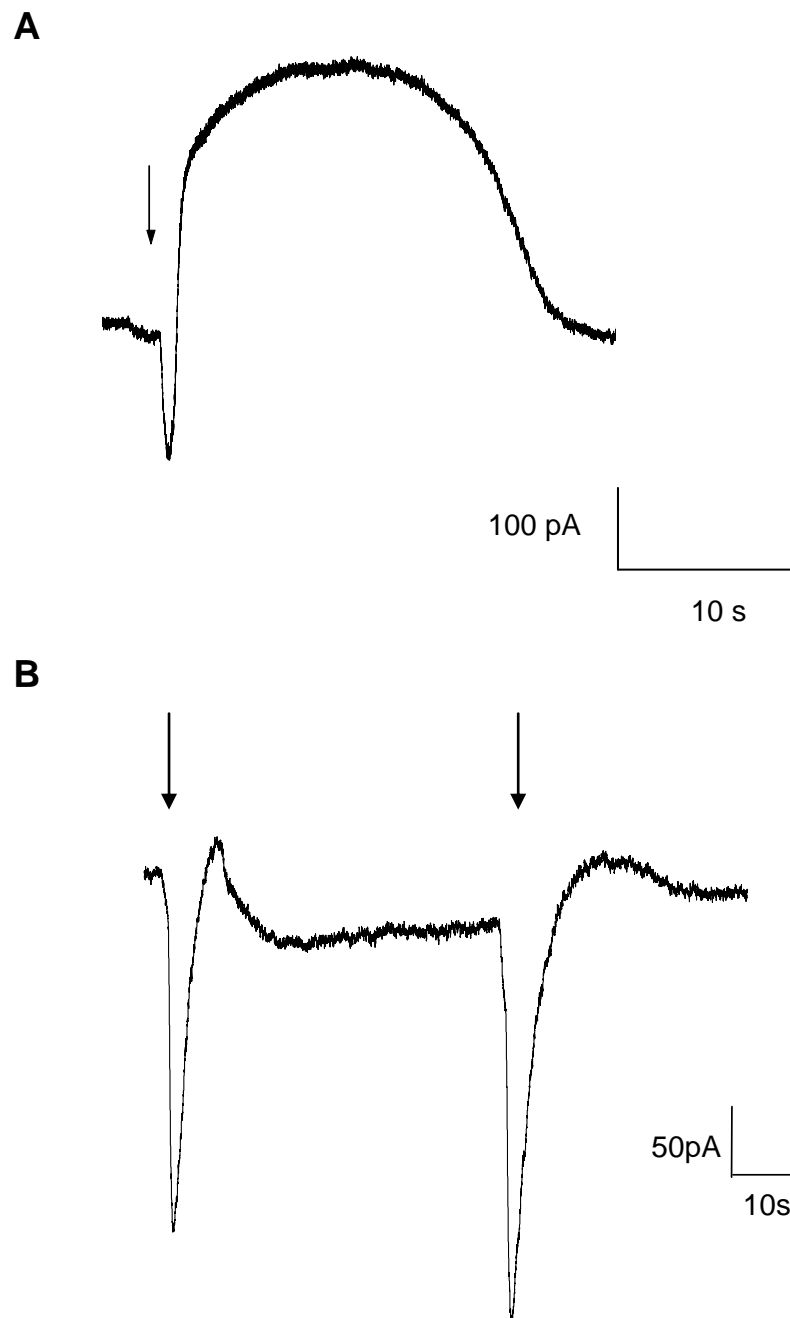


Figura 22 Resposta eletrofisiológica típica de macrófagos intraperitoneais murinos ao ATP extracelular na conformação *whole-cell*.

Macrófagos intraperitoneais de camundongo. **A**: resposta bifásica associada ao receptor P2X₇. **B**: resposta a repetidas aplicações de ATP. Solução no banho: solução externa padrão, solução intrapipeta: solução interna padrão. Registros realizados à temperatura ambiente. As setas indicam a injeção pneumática de ATP (pulso de 1 s, 1 mM). $V_H = -40$ mV. $n = 10$ células.

Resultados

Para registrar o canal inespecífico ou poro Z, presumivelmente responsável pela entrada de corantes fluorescentes na célula, foi utilizada a conformação *cell-attached* (Figura 23). Nesta conformação foi possível registrar um poro cuja abertura depende fortemente da voltagem aplicada dentro da pipeta, como descrito previamente por Robson Coutinho-Silva (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Foram testadas as voltagens de pipeta -100 mV, -80 mV, -60 mV, -40 mV, -20 mV, +20 mV, +40 mV e +60 mV, e as amplitudes das correntes obtidas foram medidas e representadas graficamente em função da voltagem correspondente (Figura 24 A). Nesta figura pode se observar que a voltagens positivas dentro da pipeta, quando a membrana da célula encontra-se hiperpolarizada, não foi possível registrar o canal inespecífico aberto (n= 10 células).

Os experimentos de canal unitário foram realizados usando um sistema de aquecimento que mantém a placa de cultura à 37 °C durante o registro. O ATP foi adicionado manualmente à solução extracelular até ficar numa concentração final de 1 mM.

É importante destacar que Robson Coutinho-Silva mostrou que alguns minutos após a aplicação do ATP em concentrações milimolares a voltagem da membrana fica em zero, logo a voltagem aplicada dentro da pipeta corresponde a voltagem da membrana com símbolo inverso ($V_H = - V_m$) (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997).

Os dados apresentados na Figura 24 diferem, em parte, dos dados previamente obtidos no laboratório, já que anteriormente foi possível registrar alguns canais abertos em condições de hiperpolarização (Robson Coutinho-Silva, Tese de Doutorado e (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997)).

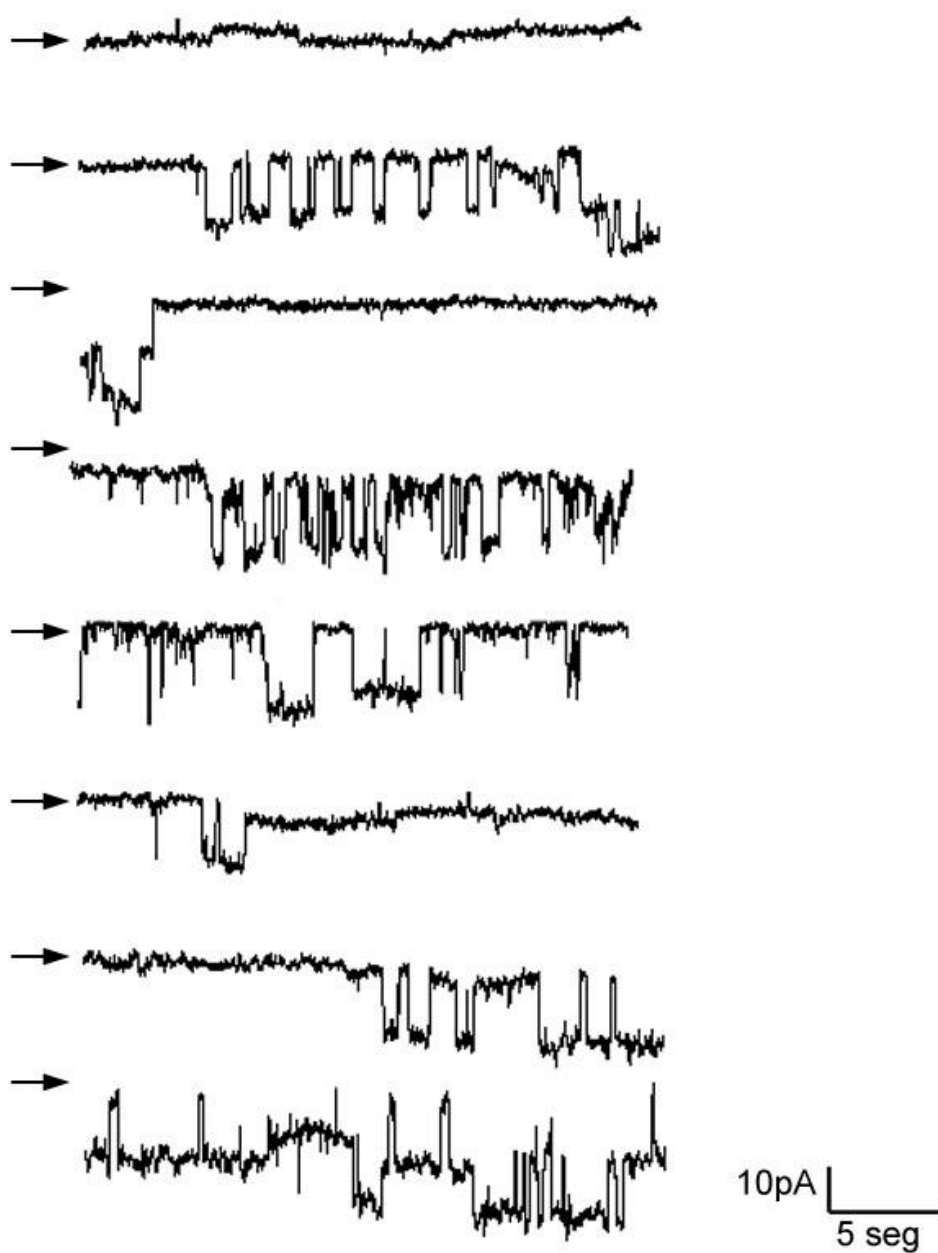


Figura 23 Registros do poro Z associado ao receptor P2X₇ em macrófagos murinos utilizando a conformação *cell-attached*.

Solução no banho = solução intra-pipeta: solução externa padrão, -40 mV, ATP 1 mM final no banho, 37 °C. n = 32 células.

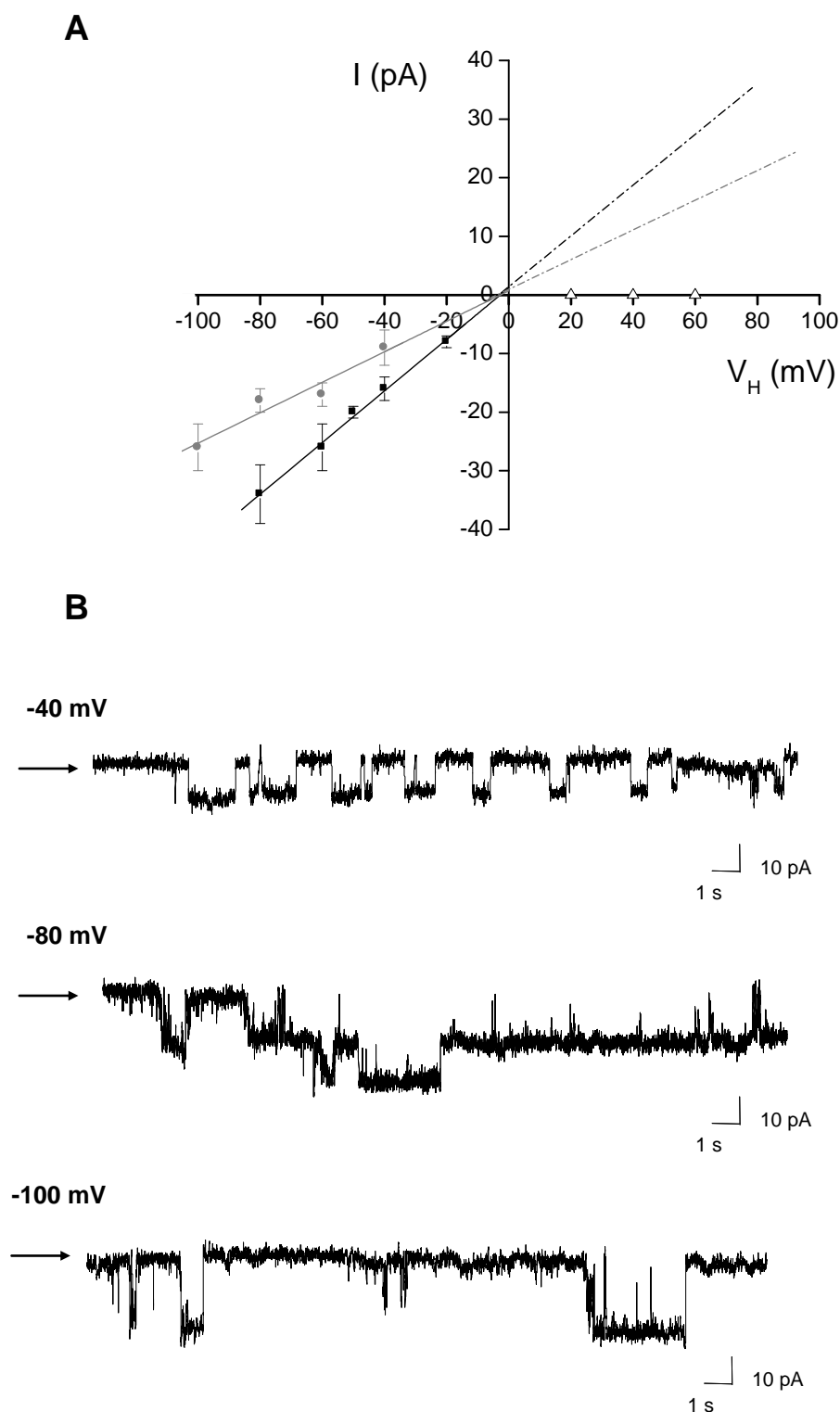


Figura 24 Dependência da voltagem apresentada pelo poro Z associado ao receptor P2X₇. Registros *cell-attached* de macrófagos intraperitoneais murinos

A: Curva corrente vs voltagem, **B:** Exemplos dos registros de canal unitário obtidos em cada voltagem. A voltagem indicada corresponde à voltagem dentro da pipeta. Solução no banho = solução intra-pipeta: solução externa padrão. ATP 1 mM, 37 °C. Cada ponto da curva é uma media de pelos menos três amplitudes registradas na mesma voltagem. N = 14 células.

Resultados

Na maioria dos registros o canal mostrou duas amplitudes diferentes (Figuras 23 e 24). A análise destas duas amplitudes em função da voltagem aplicada em cada registro permitiu calcular duas condutâncias: uma de 440 ± 16 pS e outra de 220 ± 49 pS. Em alguns registros foi possível observar mais de duas amplitudes diferentes.

Se são dois canais abrindo juntos em resposta ao ATPe ou um mesmo canal com dois subestados de condutância ainda não está claro. O fato de que o canal de maior condutância abra sempre quando o de menor condutância encontra-se aberto faz supor que se trata de um mesmo canal com dois subestados.

Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que este canal é inibido pela presença de ATP oxidado, conhecido inibidor do receptor P2X₇ (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997).

4.1.2 AUMENTO DE CÁLCIO CITOPLASMÁTICO EM RESPOSTA AO ATP

Outro efeito característico do ATPe mediado pelo receptor P2X₇ é a mobilização do cálcio citoplasmático. Este fenômeno tem sido amplamente descrito na literatura, inclusive pelo nosso laboratório (BISAGGIO e col., 2001).

Quando os macrófagos murinos são perfundidos com uma solução contendo cálcio e ATP 5 mM durante 10 minutos à 37 °C, observa-se inicialmente um aumento rápido do cálcio intracelular e logo um alto nível de cálcio citoplasmático mantido durante o tempo que dura a presença do ATP (Figura 25 A).

Acredita-se que este aumento rápido registrado no início da perfusão com ATP é devido em parte à entrada de cálcio através do poro de 8 pS formado pelo receptor P2X₇, mas principalmente à ativação dos receptores P2Y, presentes na membrana

Resultados

do macrófago, também ativados por ATPe, que provocam a liberação do cálcio do retículo endoplasmático (DEL REY e col., 2006).

A participação dos receptores P2Y no aumento transitório de cálcio citoplasmático é confirmada pelos experimentos realizados em macrófagos intraperitoneais de camundongos P2X₇^{-/-}. Os nossos resultados mostram que ainda em células que não expressam o receptor P2X₇ observa-se um pico de cálcio quando perfundida com ATP 5 mM numa solução com CaCl₂ 1 mM (Figura 25 B e C).

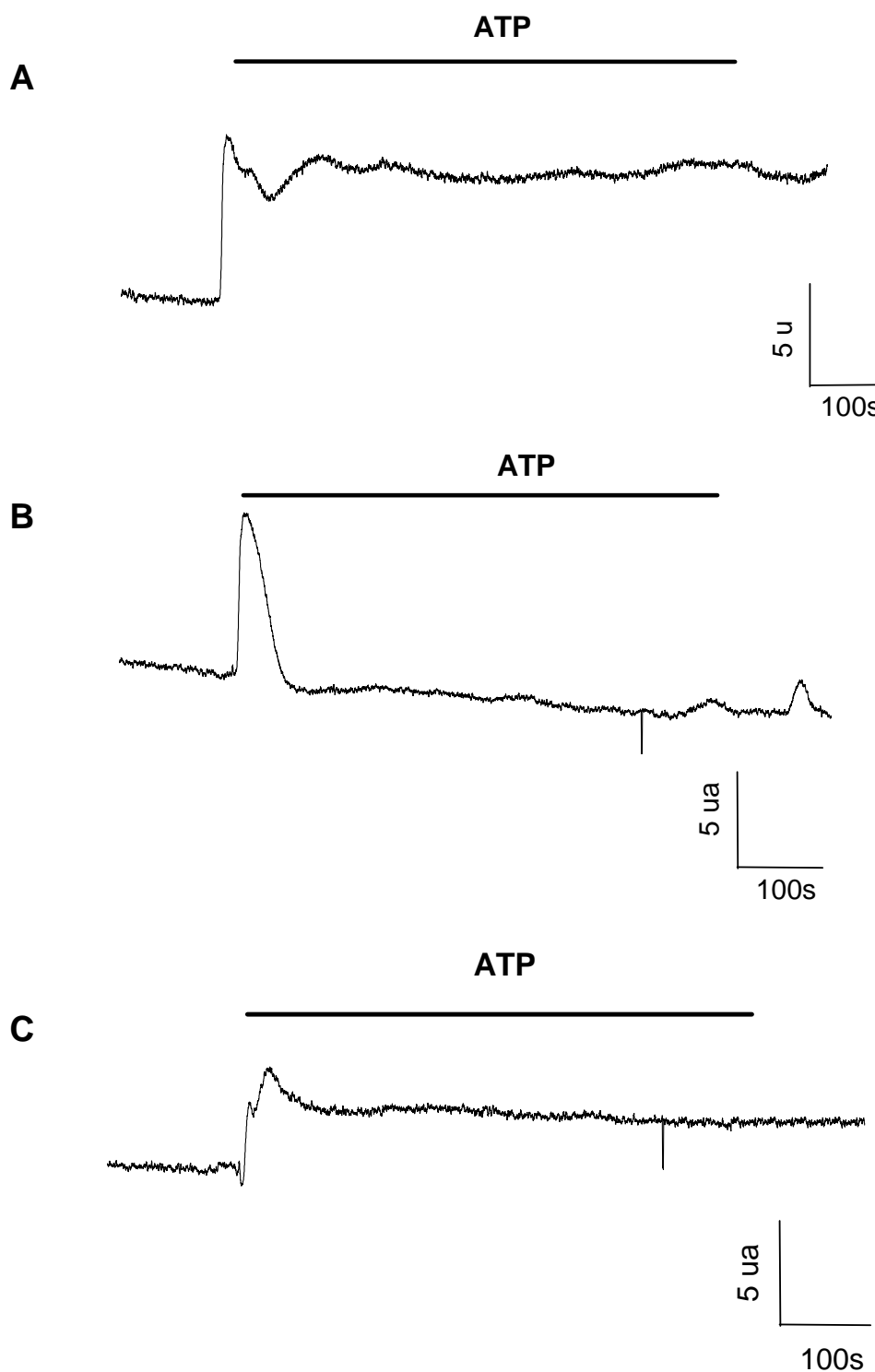


Figura 25 Variações do cálcio citoplasmático em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe.

Os experimentos foram realizados em solução com cálcio, à 37 °C, em células previamente carregadas com FURA-2 como descrito em materiais e métodos. **A:** macrófagos de camundongo suíço. n = 10 experimentos independentes. **B:** macrófagos de camundongo B16 P2X^{-/-}. n = 5 experimentos independentes. **C:** macrófagos de camundongo B16 WT. n = 5. u.a.: Unidades Arbitrarias de fluorescência.

4.1.3 CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES ASSOCIADA AO RECEPTOR P2X₇ EM RESPOSTA AO ATPe

A marca registrada do receptor P2X₇ é a capacidade de induzir o fenômeno que se chamou “permeabilização” da membrana plasmática na presença de ATPe. Este fenômeno historicamente tem sido medido como a entrada de corantes fluorescentes na célula, que se acredita atravessam a membrana celular passando pelo poro inespecífico após a ativação do receptor.

Como parte de nossa caracterização inicial da resposta ao ATPe nos macrófagos murinos, medimos a entrada de corantes mediada pelo receptor P2X₇.

Vários autores relatam dependência da temperatura na permeabilização da membrana plasmática induzida pelo ATPe, registrando entrada de corantes só a temperaturas próximas à 37 °C (NUTTLE e DUBYAK, 1994; GIBBONS e col., 2001; SMART e col., 2002), enquanto outros indicam que o mesmo efeito observa-se à temperatura ambiente (VIRGINIO e col., 1999a; HIBELL e col., 2001; TAKENOUCHI e col., 2005).

Em nossas condições experimentais, observamos que a abertura do poro eletrofisiológico depende fortemente da temperatura: nos experimentos em *cell-attached* o poro Z foi registrado somente à 37 °C, não observamos abertura do canal unitário à temperatura ambiente.

Para saber se existe uma correlação na dependência da temperatura nos registros eletrofisiológicos e o fenômeno de captação de corantes, realizamos ensaios de permeabilização com macrófagos de camundongo aderidos na presença de ATP e Lucifer Yellow (corante aniônico) ou brometo de etídeo (corante catiônico) a diferentes temperaturas.

Resultados

Como mostram as Figuras 26 e 27, a entrada de etídeo ou de Lucifer Yellow não foi observada à 20 °C ou menos, em nossas condições experimentais.

A captação de etídeo em resposta ao ATPe foi significativamente maior ($p < 0,05$) à 37 °C que à 30 °C (Figura 26 A - F e Figura 27 A), enquanto que não observamos diferenças significativas na entrada de Lucifer Yellow entre estas duas temperaturas, observando uma captação maior deste último corante à 30 °C (Figura 26 G - L e Figura 27 B).

Este primeiro resultado nos alerta sobre uma diferença na dependência da temperatura na captação de um corante catiônico (etídeo) e outro aniônico (Lucifer Yellow). Tendo isto em mente, nos seguintes experimentos investigamos outras possíveis diferenças entre as duas classes de corantes.

A temperatura pode estar afetando tanto as vias de sinalização intracelular do receptor P2X₇ quanto as prováveis mudanças conformacionais na proteína canal responsável pela entrada de corantes.

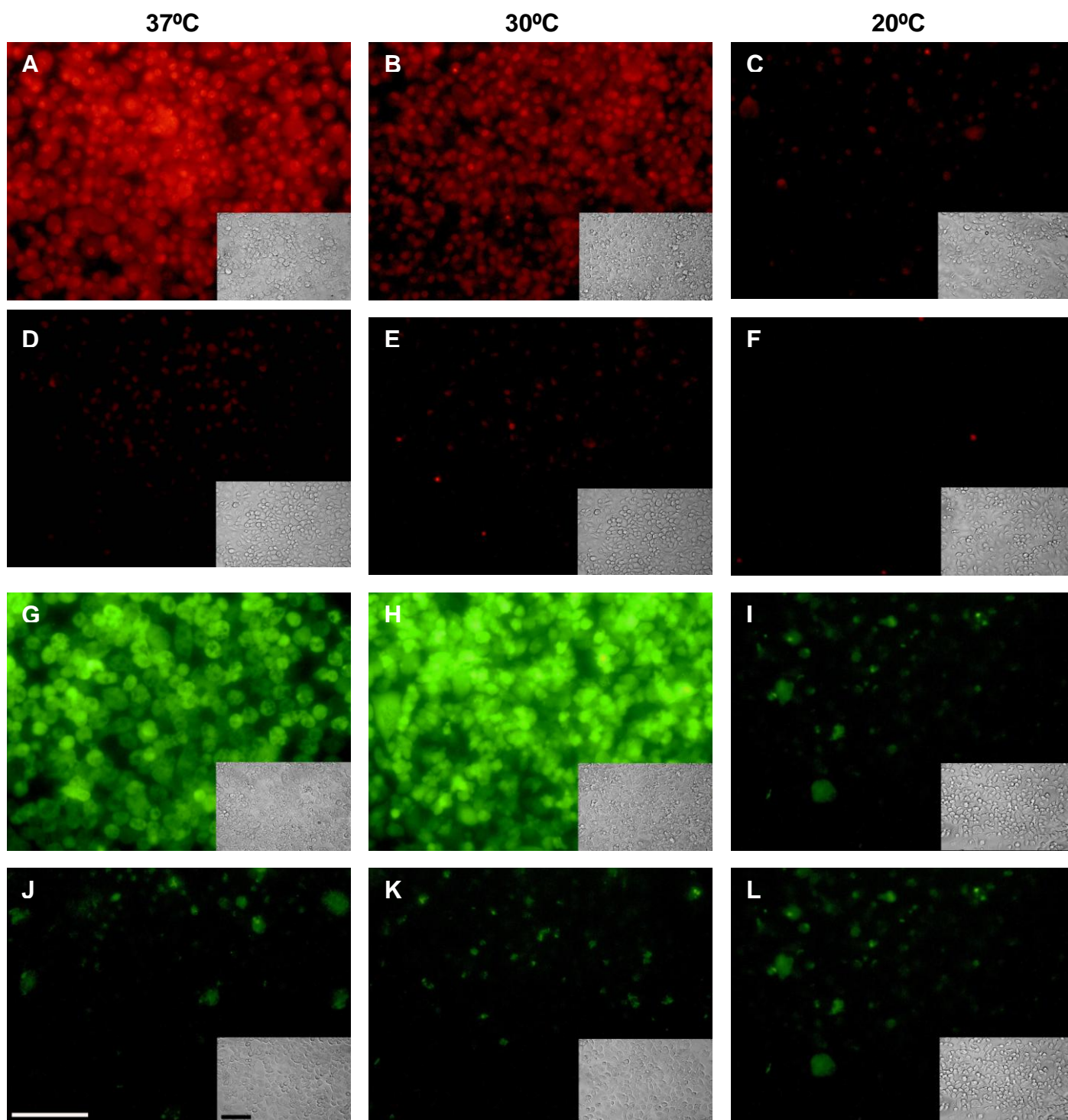


Figura 26 Dependência da temperatura na captação de corantes em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe.

Ensaio de captação de corantes em presença de ATPe. **A, B e C:** macrófagos incubados com ATP 5 mM e brometo de etídeo. **D, E e F:** macrófagos incubados com brometo de etídeo. **G, H e I:** macrófagos incubados com ATP 5 mM e Lucifer Yellow. **J, K e L:** macrófagos incubados com Lucifer Yellow. **A, D, G e J:** 37 °C. **B, E, H e K:** 30 °C. **C, F, I e L:** 20 °C. Todos os tratamentos foram feitos por 10 minutos. As barras equivalem ambas a 100 μ m. n =3 experimentos independentes.

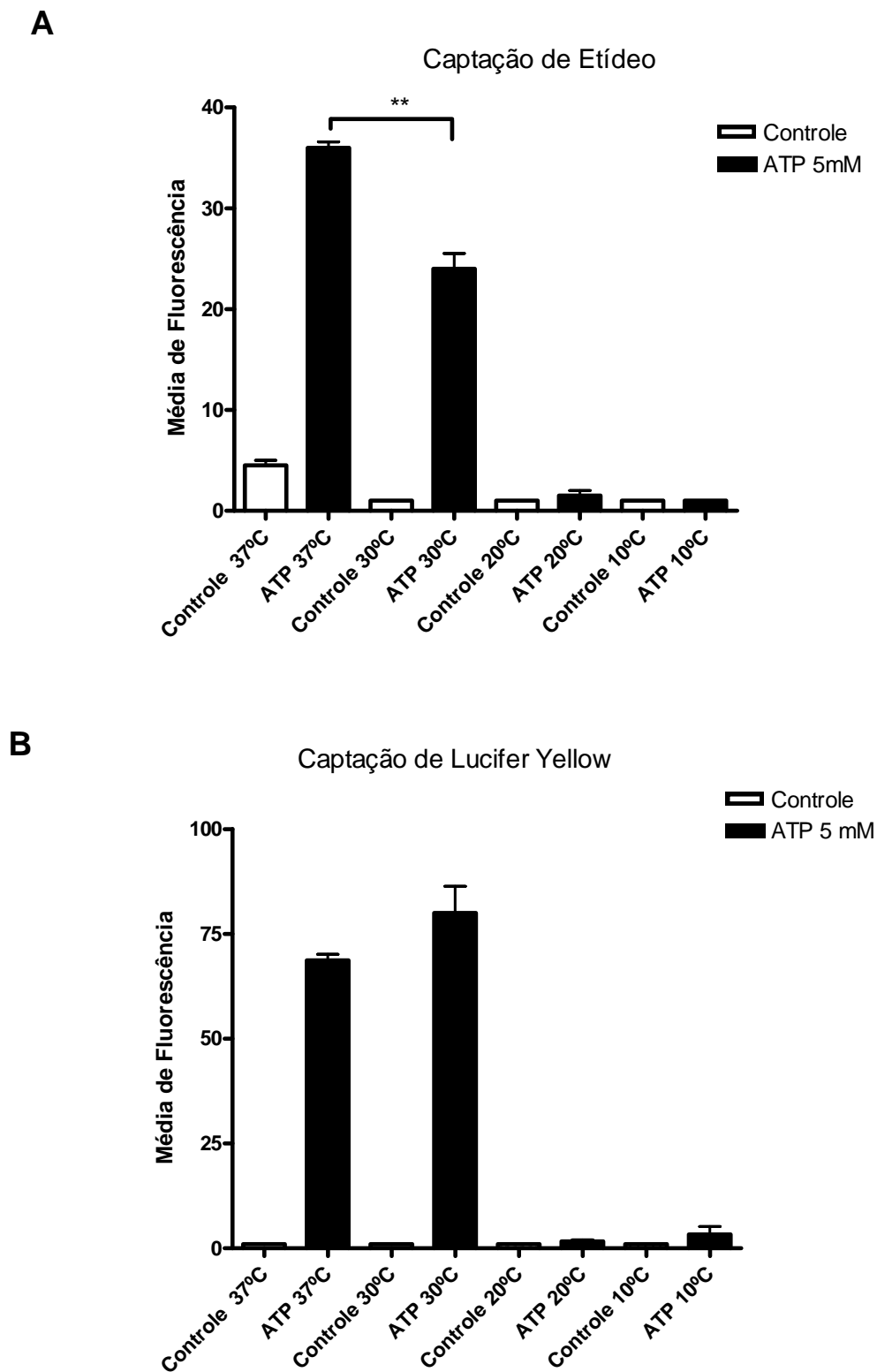


Figura 27 Dependência da temperatura na captação de corantes em macrófagos intraperitoneais de camundongo em resposta ao ATPe, quantificação da fluorescência.

A: quantificação da entrada de etídeo. **B:** quantificação da entrada de Lucifer Yellow. Os experimentos quantificados correspondem às fotos da figura 26. Cada barra do gráfico foi calculada como a média de 3 experimentos feitos em duplicata. ** $p < 0,01$, Teste t

4.2 CORRELAÇÕES E DIFERENÇAS ENTRE AS DIFERENTES ABORDAGENS AO FENÔMENO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X₇ EM MACRÓFAGOS

Num segundo momento nos dedicamos a explorar as possíveis semelhanças e diferenças que poderiam existir entre as diferentes maneiras de registrar os efeitos do ATPe mediados pelo receptor P2X₇.

4.2.1 EFEITO DOS ÍONS EXTRACELULARES SOBRE AS CORRENTES ELÉTRICAS ASSOCIADAS AO RECEPTOR P2X₇

Foi descrito na literatura que a captação de corantes induzida pelo ATPe e mediada pelo receptor P2X₇ é facilitada pela ausência de cálcio e magnésio no meio extracelular (VIRGINIO e col., 1997). Também existem evidências que o mesmo acontece quando o sódio extracelular diminui (GUDIPATY e col., 2001; MICHEL e col., 1999). Porém, como mencionado na introdução, estes dados são polêmicos já que alguns autores observaram justamente o contrário: Faria e colaboradores relataram que o cálcio, tanto interno quanto externo, é necessário para a captação de etídeo induzida pelo ATPe (FARIA e col., 2004).

Para testar se os efeitos do Ca²⁺, o Mg²⁺ e o Na⁺ sobre a permeabilização têm correlação com a cinética de abertura do poro Z foram feitos registros deste canal com diferentes soluções externas: utilizaram-se uma solução com EDTA para quelar o Ca²⁺ e Mg²⁺ extracelulares e uma solução onde o Na⁺ foi substituído pelo Tris⁺ (solução com EDTA e solução com glutamato, detalhadas na seção “Materiais e Métodos”). Os resultados são apresentados na Tabela 5 e nas Figuras 28 e 29.

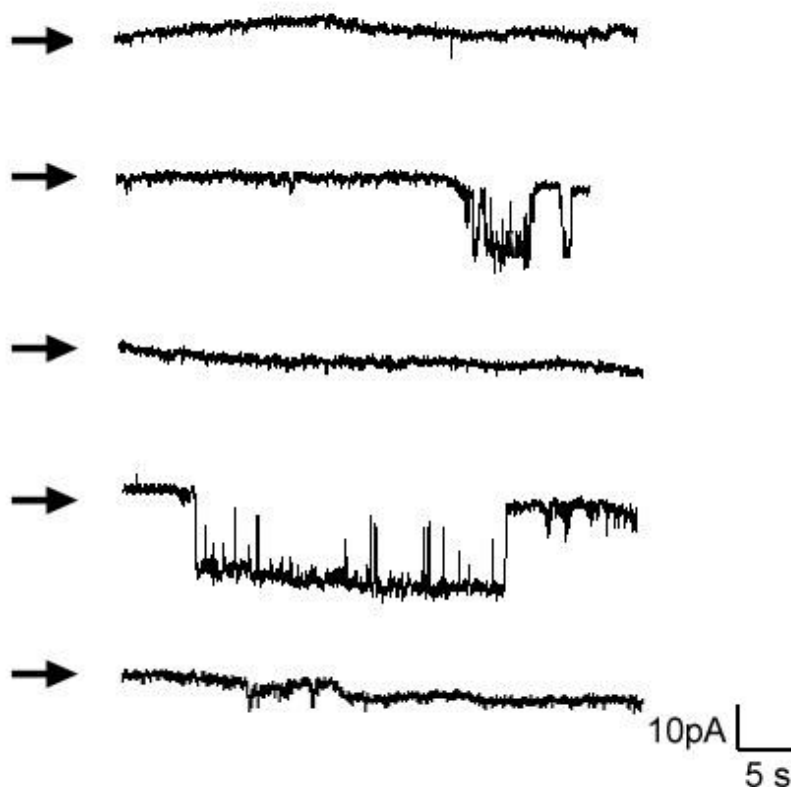


Figura 28 Efeito da ausência de cátions divalentes no meio externo no registro do poro Z associado ao receptor P2X₇ em macrófagos intraperitoneais murinos utilizando a conformação *cell-attached* em solução externa com EDTA.

ATP 1 mM final no banho. Solução externa = solução intrapipeta. Registros feitos à 37 °C, $V_{H} = -40$ mV. n = 5 células.

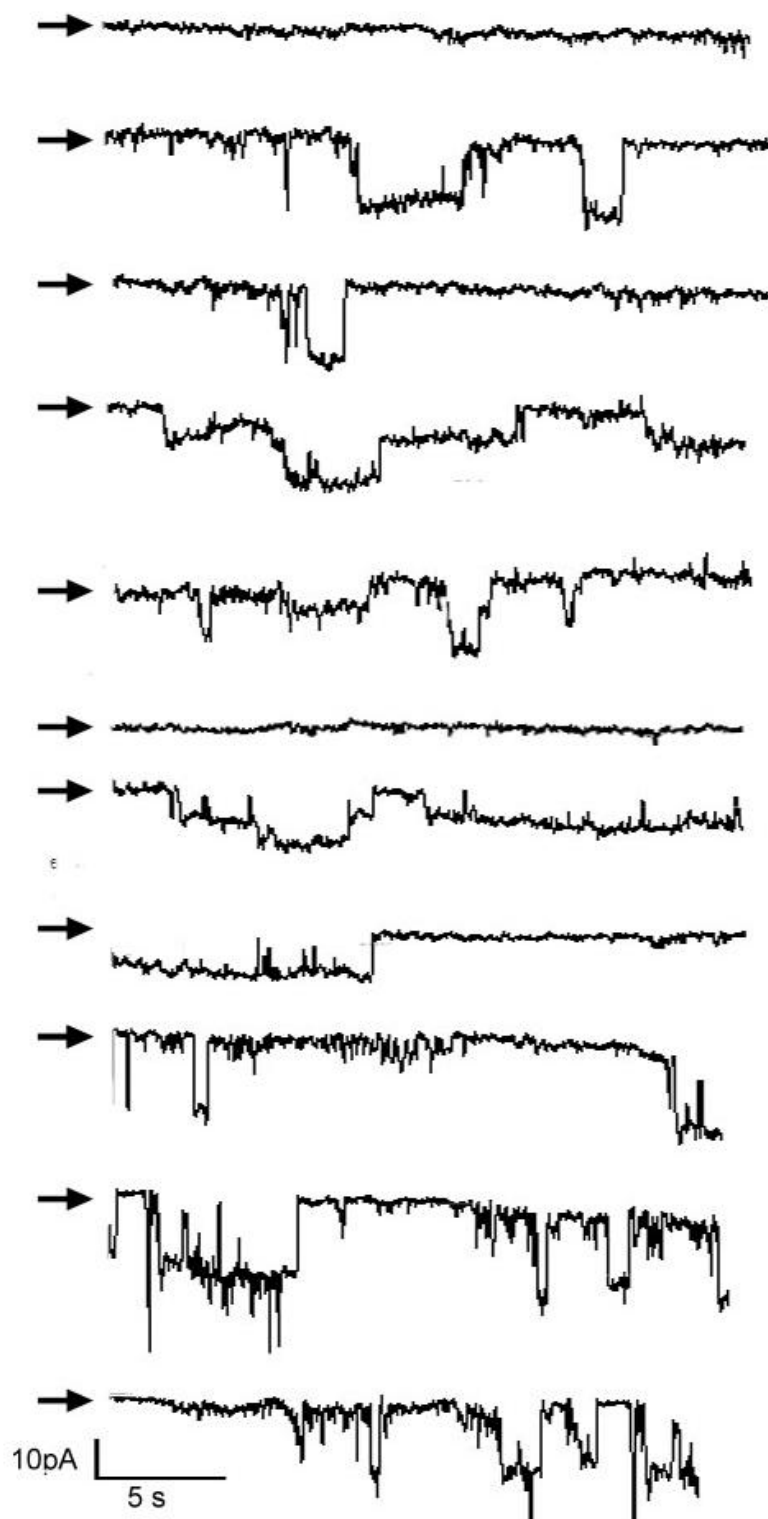


Figura 29 Efeito da ausência de sódio no registro do poro Z associado ao receptor P2X7 em macrófagos intraperitoneais murinos utilizando a conformação *cell-attached* em solução externa com baixas concentrações de sódio.

ATP 1 mM final no banho, Solução externa = solução intrapipeta, registro feito à 37 °C, $V_H = -40$ mV n = 5 células.

Resultados

Solução externa	Probabilidade de abertura	Tempo médio de abertura
Solução Padrão	0.11 ± 0,02	1,87 ± 0,01 seg
Solução Baixo Sódio	0.18 ± 0,04	1,9 ± 0,9 seg
Solução com EDTA	0.07 ± 0,04	3,7 ± 1 seg

Tabela 5 Probabilidade de abertura e tempo médio de abertura do canal registrado na presença de ATP 1 mM em macrófagos intraperitoneais murinos.

Conformação *cell-attached*, solução do banho = solução intrapipeta, indicada na tabela. Todos os registros foram realizados à 37 °C, $V_H = -40$ mV. $n = 5$ células.. Dados apresentados como a média ± desvio padrão.

A ausência de Na^+ parece aumentar a probabilidade de abertura do poro Z, enquanto o tempo médio de abertura permanece praticamente igual. Já a ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio extracelular parece ter o efeito inverso: aumenta o tempo médio de abertura mas reduz a probabilidade de encontrar o canal aberto.

4.2.2 EFEITO DOS ÍONS EXTRACELULARES NA CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDA PELO ATP

Para pesquisar se efetivamente existe uma correlação entre a cinética do poro Z registrado eletrofisiologicamente na presença de ATPe e a captação de corantes fluorescentes, realizamos ensaios de captação de corantes utilizando as mesmas soluções. Analisamos a captura de corantes tanto catiônicos quanto aniônicos na ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+} extracelulares e em condições de baixa concentração de Na^+ .

Macrófagos intraperitoneais de camundongo foram incubados durante 10 minutos com brometo de etídeo ou Lucifer Yellow na presença ou não de ATP 5 mM,

Resultados

à 37 °C, em solução externa padrão, solução sem Ca^{2+} nem Mg^{2+} (com EDTA 10 mM) e solução com baixa concentração Na^+ (NaCl substituído por TrisCl).

Observado as fotos e a quantificação da fluorescência resultantes podemos concluir que a entrada de etídeo acontece sem diferenças significativas ($p < 0,01$, Teste de t) nas três soluções extracelulares utilizadas (Figura 30 A - F e Figura 31 A). Porém, na entrada de Lucifer Yellow pode ser observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) quando o tratamento com ATP é realizado na solução com EDTA, se comparado com o tratamento na solução padrão ou na solução com baixo sódio (Figura 30 G - L e Figura 31 B).

Tentando aprofundar as diferenças observadas nas diferentes soluções extracelulares, diminuimos a quantidade de ATP utilizado nos ensaios de captação de corantes para 3 mM. Nestas condições, não conseguimos registrar entrada de Lucifer Yellow, mas sim de etídeo.

Quando utilizamos a um estímulo com ATP 3 mM amplificamos os efeitos dos íons extracelulares. O tratamento dos macrófagos com ATPe na solução com EDTA 10 mM, sem Ca^{2+} nem Mg^{2+} , observamos um aumento significativo na captação de etídeo. A ausência de Na^+ não provocou variações significativas respeito ao mesmo tratamento em solução padrão (Figura 32).

Resultados

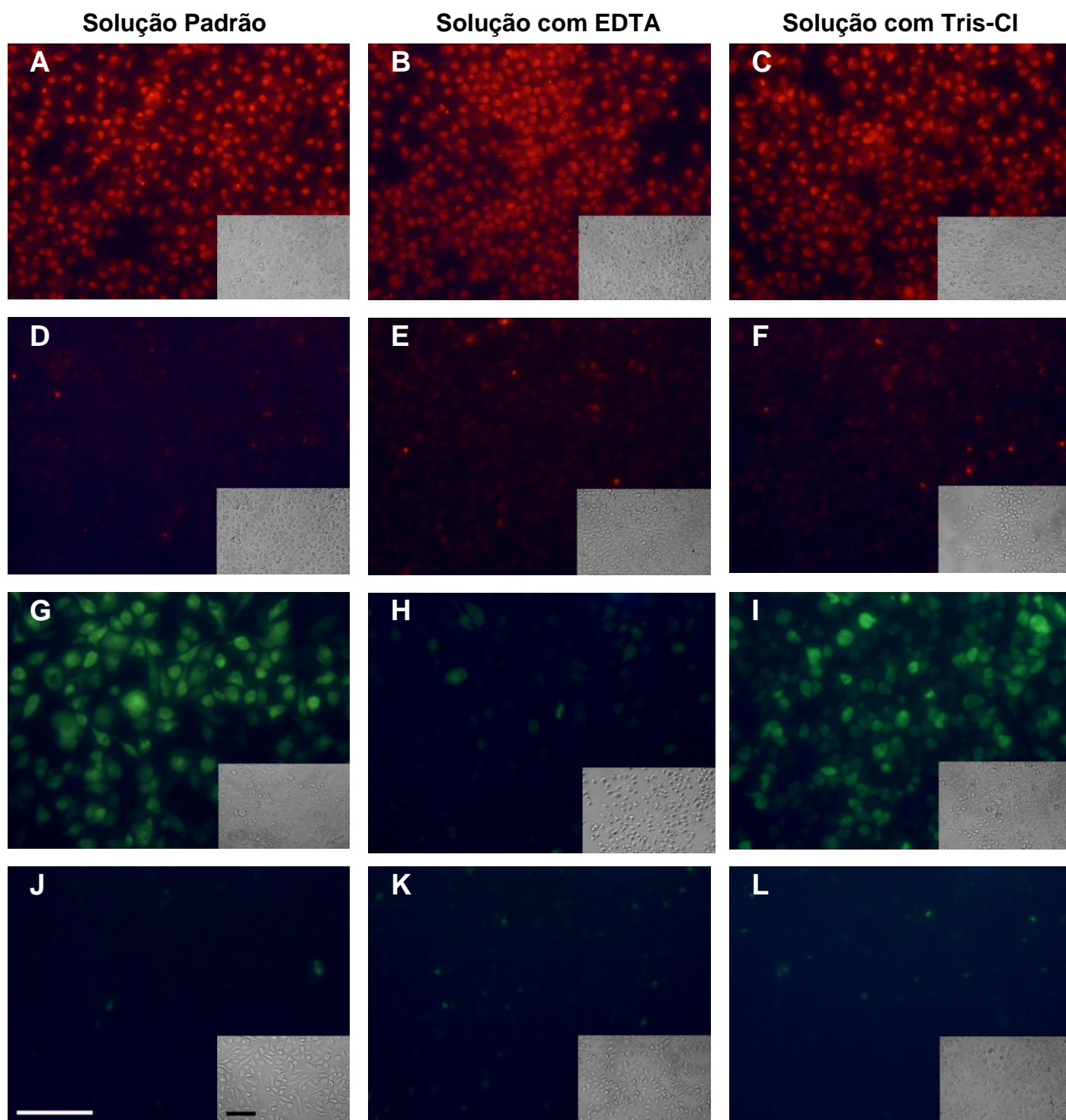


Figura 30 Efeitos da composição iônica do meio externo na captação de corantes fluorescentes induzida pelo ATPe.

Ensaio de captação de etídeo e Lucifer Yellow em diferentes soluções externas. **A, B e C:** macrófagos incubados com ATP 5 mM e brometo de etídeo. **D, E e F:** macrófagos incubados com brometo de etídeo. **G, H e I:** macrófagos incubados com ATP 5 mM e Lucifer Yellow. **J, K e L:** macrófagos incubados com Lucifer Yellow. **A, D, G e J:** Solução Padrão. **B, E, H e K:** Solução com EDTA. **C, F, I e L:** Solução com Tris-Cl (baixa concentração de sódio). Todos os tratamentos foram feitos por 10 minutos a 37 °C. As barras equivalem ambas a 100µm. n = 4 experimentos independentes.

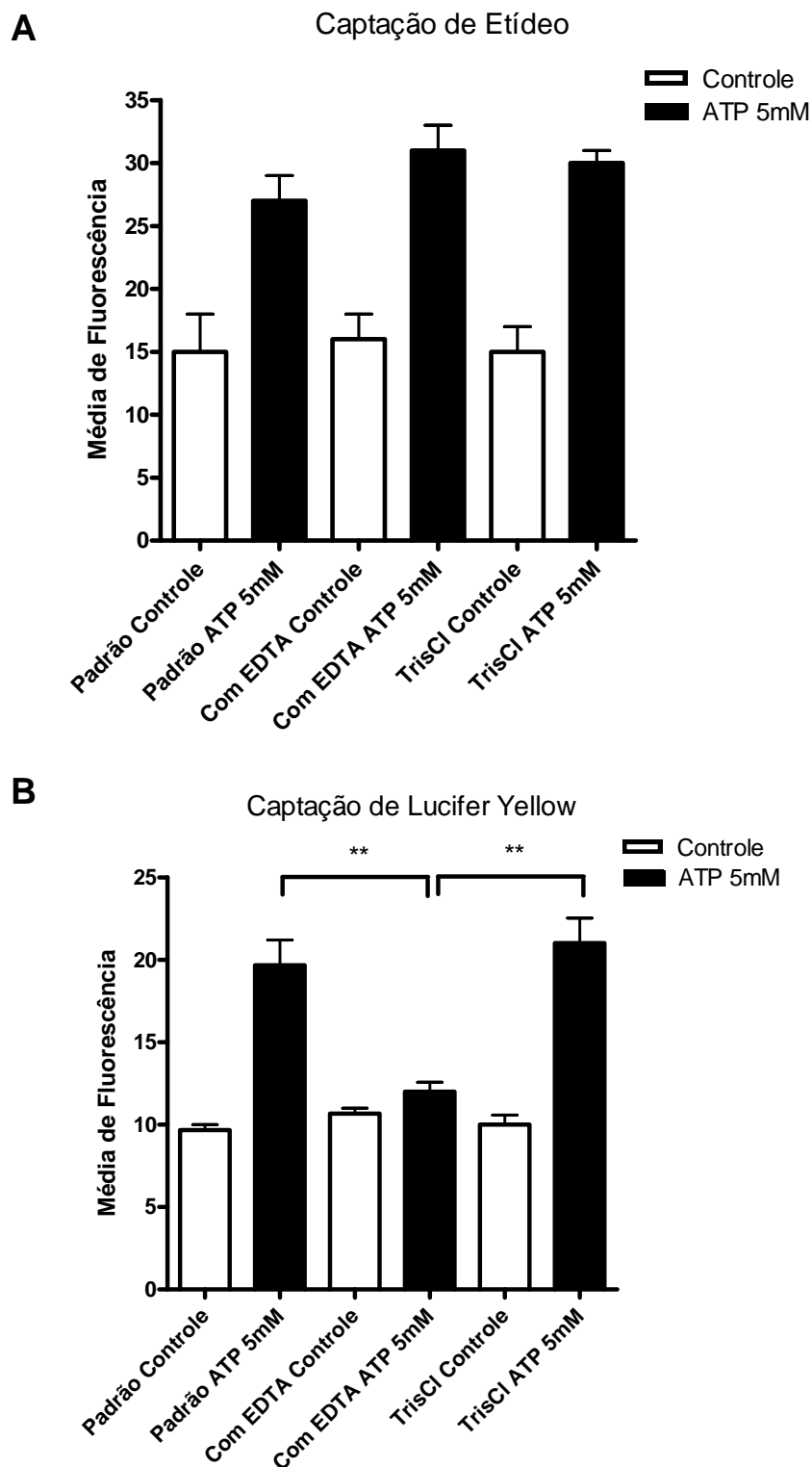


Figura 31 Quantificação dos efeitos da composição iônica do meio externo na captação de corantes fluorescentes induzida pelo ATPe.

Quantificação da captação de corantes em diferentes soluções extracelulares. **A:** ensaio realizado na presença de brometo de etídeo (Figura 30 A-F). **B:** ensaio realizado na presença de Lucifer Yellow (Figura 30 G-L). Cada barra do gráfico foi calculada como a média de 4 experimentos feitos em duplicata. ** $p < 0,01$ Teste *t*.

Resultados

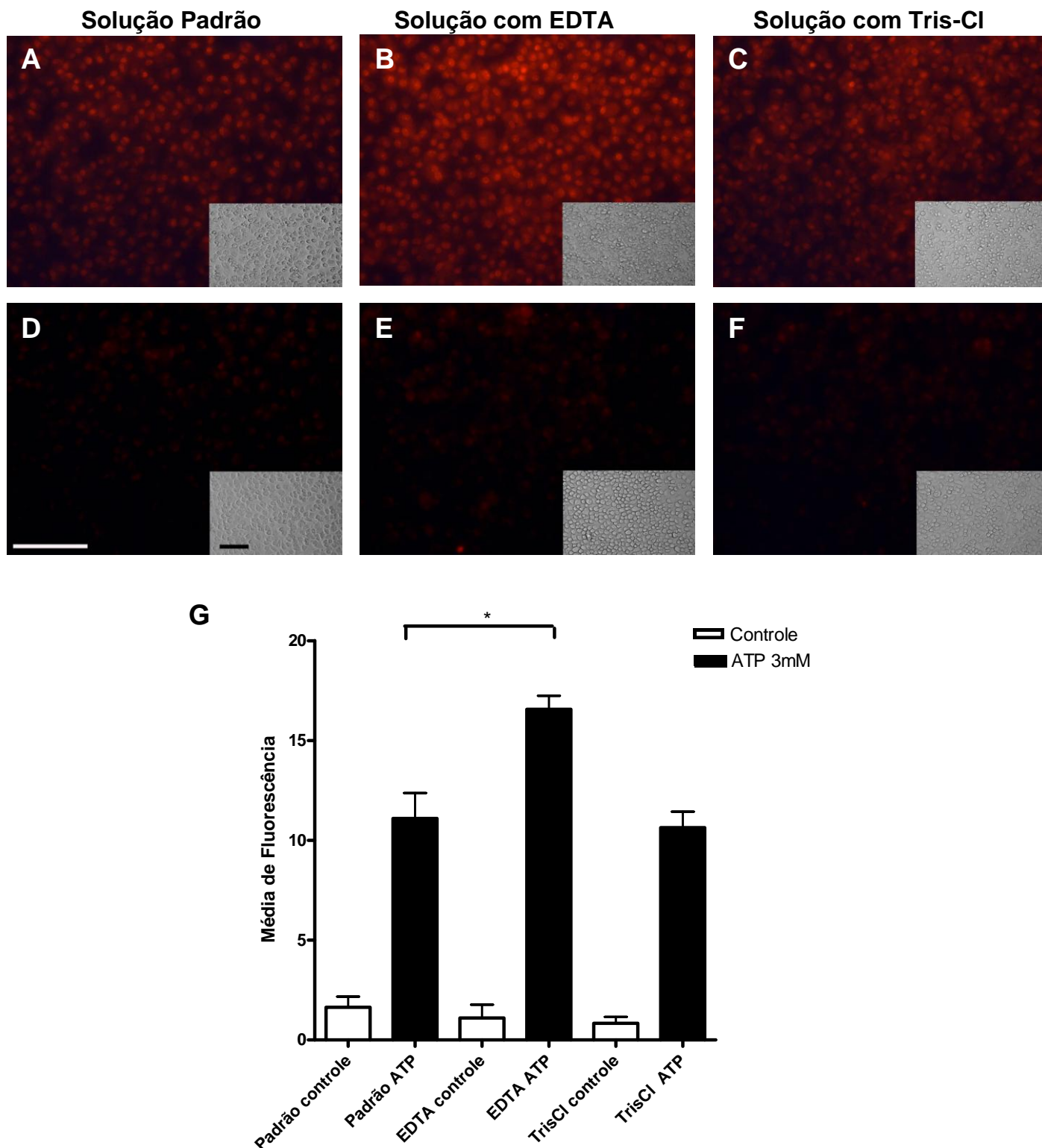


Figura 32 Efeito dos íons extracelulares na captação de etídeo induzida por ATP 3 mM em macrófagos

Ensaio de captação de etídeo em diferentes soluções externas. **A, B e C:** macrófagos incubados com ATP 3 mM e brometo de etídeo. **D, E e F:** macrófagos incubados com brometo de etídeo. Todos os tratamentos foram realizados a 37° durante 10 minutos. A barra equivale a 100 µm. **G:** Quantificação da captação de etídeo em diferentes soluções extracelulares. Cada barra do gráfico foi calculada como a média de 3 experimentos feitos em duplicata. * $p < 0,05$, Teste *t*.

Resultados

Os dados mostram que a presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ no meio extracelular afeta de maneira diferente a entrada de corantes catiônicos e a de corantes aniônicos. Este resultado modificou o curso dos próximos experimentos, pois mesmo existindo dados compatíveis com os nossos (que serão revistos com maior profundidade na seção “Discussão”) a literatura atribui a entrada de corantes aniônicos e catiônicos a um mesmo mecanismo. A idéia de que existe um poro inespecífico que permite a entrada tanto de cátions quanto de ânions de peso molecular de até 900 Da, repetida em todas as revisões sobre o receptor P2X_7 começa a ficar suspeita frente a estes dados.

Por outro lado, se comparados os resultados da captação de corantes com os dados eletrofisiológicos, a diminuição da entrada de Lucifer Yellow é coerente com a cinética de abertura do canal observada nos experimentos eletrofisiológicos: o poro Z permanece aberto durante mais tempo mas ele abre muito pouco, se comparado com o registrado na solução padrão e na solução com baixa concentração de Na^+ .

4.2.3 PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR NO FENÔMENO DE CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDO POR ATP

Em vista aos resultados dos ensaios da captação de corantes em solução com EDTA, decidimos aprofundar nossa pesquisa sobre o papel do Ca^{2+} na sinalização intracelular que leva a captação de corantes fluorescentes induzida pelo ATPe.

Para tentar avaliar se o Ca^{2+} intracelular tem ou não uma participação no fenômeno de captação de corantes decidimos eliminar tanto o cálcio externo quanto interno, pois nos ensaios utilizando a solução com EDTA ainda tínhamos a presença do cálcio intracelular liberado pela ativação dos receptores P2Y . Com este objetivo

Resultados

utilizamos o quelante de cálcio intracelular BAPTA, soluções extracelulares contendo EGTA e medições em paralelo dos níveis de cálcio intracelular e da captação de brometo de etídeo.

Nos experimentos iniciais foram testados a dose de BAPTA e o tempo de incubação necessários para anular o aumento de Ca^{2+} citoplasmático que acontece na presença do ATPe.

A perfusão durante 10 minutos com ATP 5 mM à temperatura de 37 °C, na solução extracelular com cálcio provoca a entrada de Ca^{2+} constante, pois acredita-se que o poro ativado pelo receptor P2X_7 encontra-se aberto e o cátion pode entrar por ele na célula ou pelo canal catiônico formado pelo próprio receptor P2X_7 (Figura 33 A).

A perfusão de ATP 5 mM na solução com EGTA 1 mM evita a entrada continuada de cálcio, mostrando que esta corresponde efetivamente à entrada de cálcio extracelular. Nestas condições observa-se um aumento transitório de cálcio citoplasmático, principalmente devido à liberação do cálcio do retículo endoplasmático devido à ativação dos receptores P2Y (Figura 33 B).

Este aumento transitório de cálcio foi completamente abolido pré-incubando a célula com 10 $\mu\text{g/mL}$ de BAPTA por 30 minutos e mantendo a célula em uma solução com EGTA 1 mM (Figura 33 C).

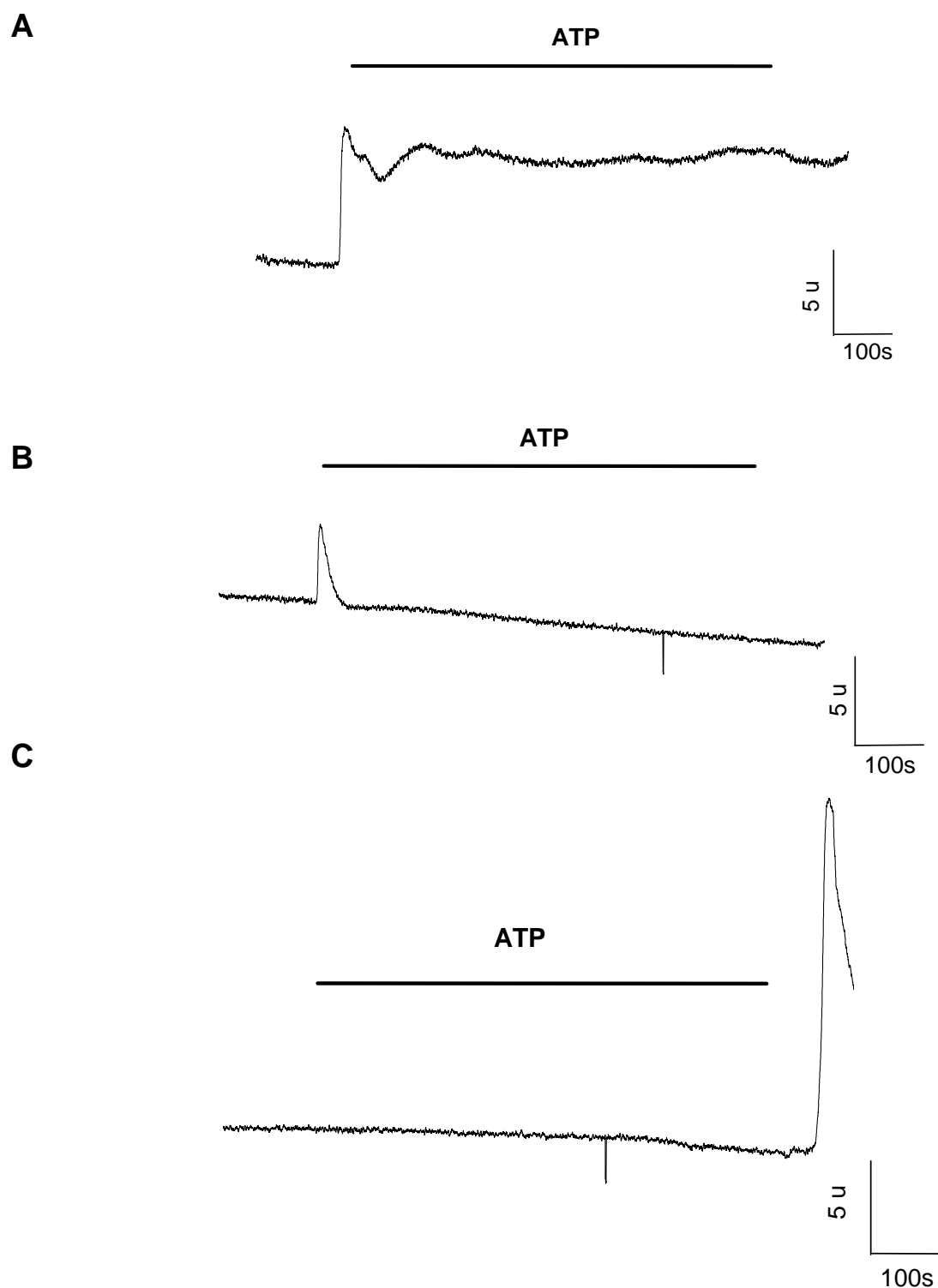


Figura 33 Registros das variações do cálcio intracelular dos macrófagos murinos em resposta ao tratamento com ATP 5 mM em diferentes condições

A: Solução externa padrão **B:** Solução externa com 1 mM EGTA. **C:** pré-incubação 30 min com BAPTA 10 μ g/mL, perfusão do ATP na solução externa com 1 mM EGTA, e posteriormente tratamento com saponina 1%. A perfusão com ATP durou 10 min e o experimento foi feito à 37°C. Experimento representativo de pelo menos 5 experimentos independentes.

Resultados

Uma vez encontradas as condições nas quais a adição de ATPe não induz nenhuma alteração nos níveis de cálcio intracelular, foi testada a capacidade de captação de corantes fluorescentes induzida por ATPe nestas mesmas condições.

Macrófagos intraperitoneais de camundongo foram pré-incubados com BAPTA 10µg/mL ou DMSO na mesma quantidade (no caso do controle negativo e positivo) e posteriormente tratados ou não durante 10 minutos com ATP 5 mM na presença dos diferentes corantes fluorescentes. Passado esse tempo, as células foram lavadas, fotografadas e as imagens analisadas para a quantificação da fluorescência.

Os resultados apresentados na Figura 34 e na Figura 35 mostram que o fenômeno de captação de corantes fluorescentes catiônicos, neste caso etídeo e sulfo-rodamina B acontece ainda em ausência de Ca^{2+} , tanto extracelular como intracelular. No entanto, a captação de corantes fluorescentes aniônicos, como Lucifer Yellow, encontra-se visivelmente diminuída.

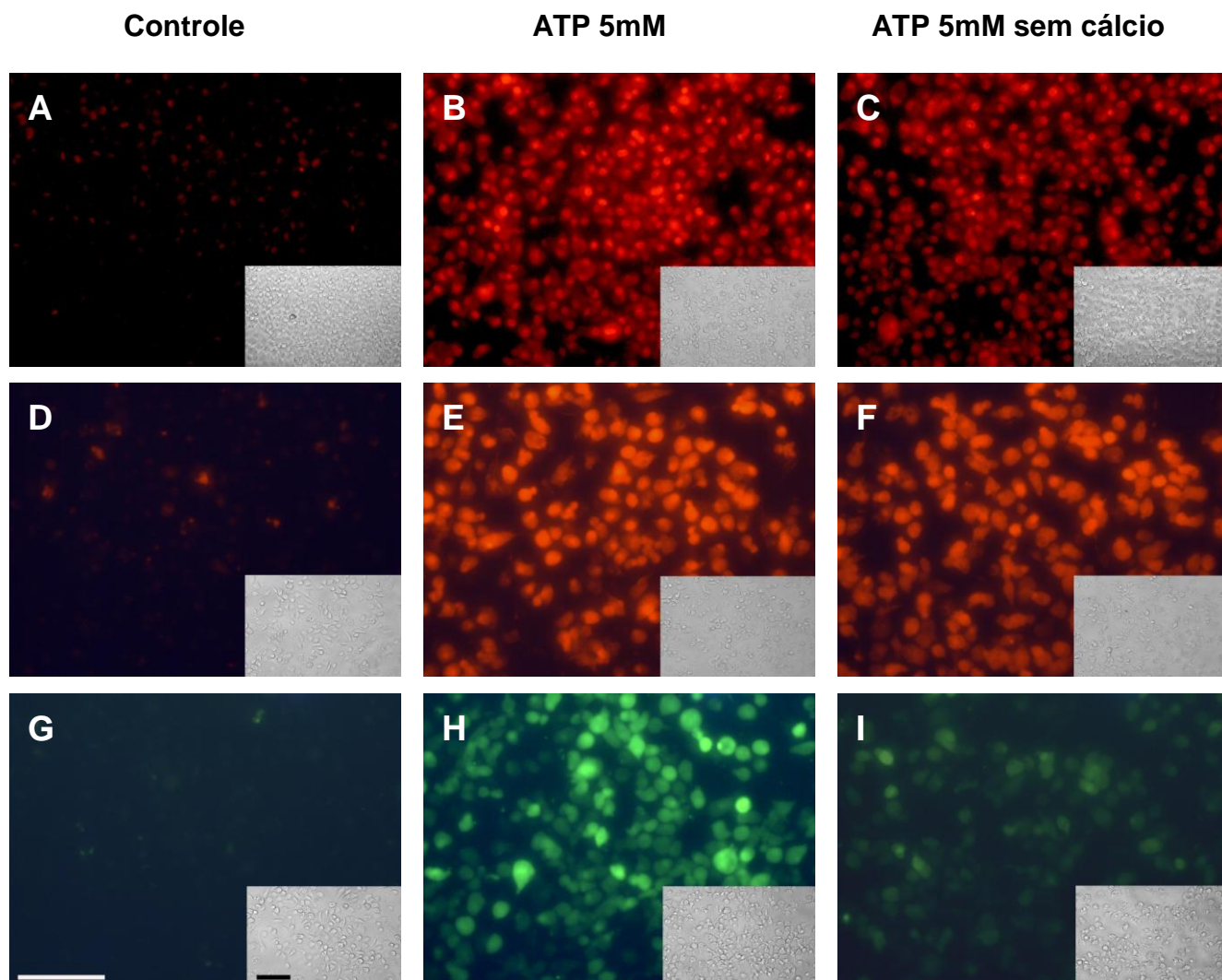


Figura 34 A ausência de cálcio intracelular inibe a entrada de Lúclifer Yellow mas não a entrada de etídeo e de sulfo-rodamina B estimulada pelo ATPe em macrófagos murinos

A, B e C: macrófagos incubados com brometo de etídeo. **D, E e F:** macrófagos incubados com sulfo-rodamina B. **G, H e I:** macrófagos incubados com Lucifer Yellow. **A, D e G:** macrófagos pré-incubados com DMSO durante 30 minutos. **B, E, H:** macrófagos pré-incubados com DMSO durante 30 minutos e tratados com ATP 5 mM durante 10 minutos em solução externa padrão. **C, F, I:** macrófagos pré-incubados durante 30 minutos com BAPTA 10 µg/mL e tratados com ATP 5 mM durante 10 minutos em solução externa com EGTA 5 mM. Todos os tratamentos foram feitos a 37 °C. As barras equivalem ambas a 100 µm. Experimentos representativos de pelos menos 3 experimentos independentes feitos em duplicata.

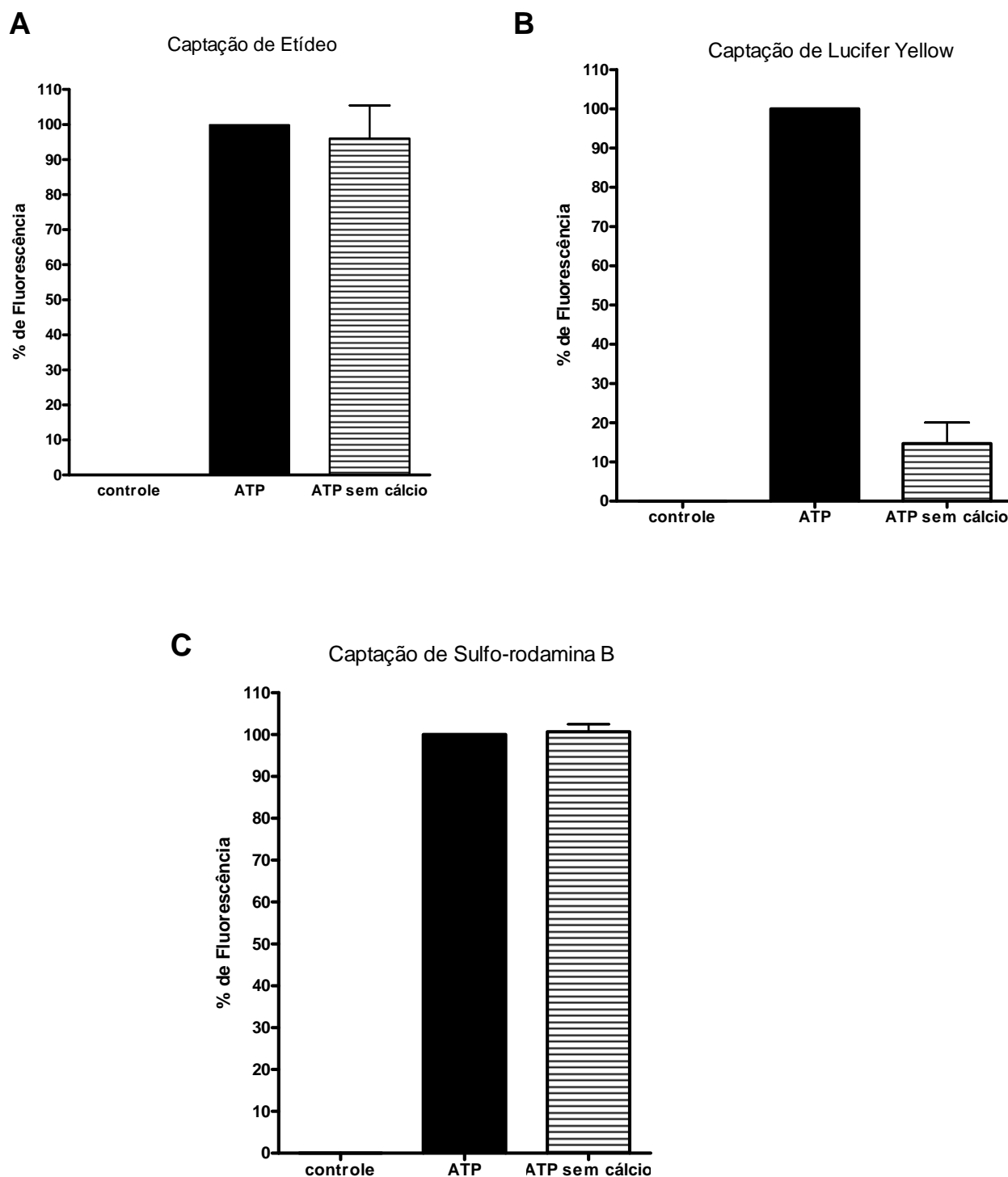
Resultados

Figura 35 Quantificação da fluorescência dos ensaios de captação de corantes induzida por ATP em ausência de cálcio

Quantificação dos experimentos de captação de corantes fluorescentes induzidos por ATP na presença e ausência de cálcio A: ensaio realizado na presença de brometo de etídeo (Figura 33 A-C). B: ensaio realizado na presença de Lucifer Yellow (Figura 33 D-F). C: ensaio realizado na presença de sulfo-rodamina B (Figura 33 G-I). Cada barra do gráfico corresponde à média de 3 experimentos independentes feitos em duplicata. Os dados são apresentados como porcentagem de fluorescência, tendo com 100% o valor de fluorescência médio dos macrófagos tratados com ATP 5 mM e subtraindo em cada caso o valor de fluorescência do controle.

Resultados

Para uma abordagem mais quantitativa utilizou-se a técnica de citometria de fluxo na medição da permeabilização ao etídeo em presença ou não de cálcio. Células do lavado peritoneal de camundongos, submetidas ou não a uma pré-incubação com BAPTA 10 μ g/mL, foram tratadas com diferentes concentrações de ATP. Estes experimentos mostraram que, mesmo observando-se uma diminuição na entrada de etídeo na concentração de ATPe 1 mM, o fenômeno de permeabilização na presença de ATP (3 mM e 5 mM) não é impedido pela ausência de Ca²⁺, tanto intracelular como extracelular (Figura 36).

Estes dados mostram que o aumento de Ca²⁺ citoplasmático é necessário para a entrada na célula de corantes aniônicos induzida pelo ATPe mas não para a captação de corantes catiônicos.

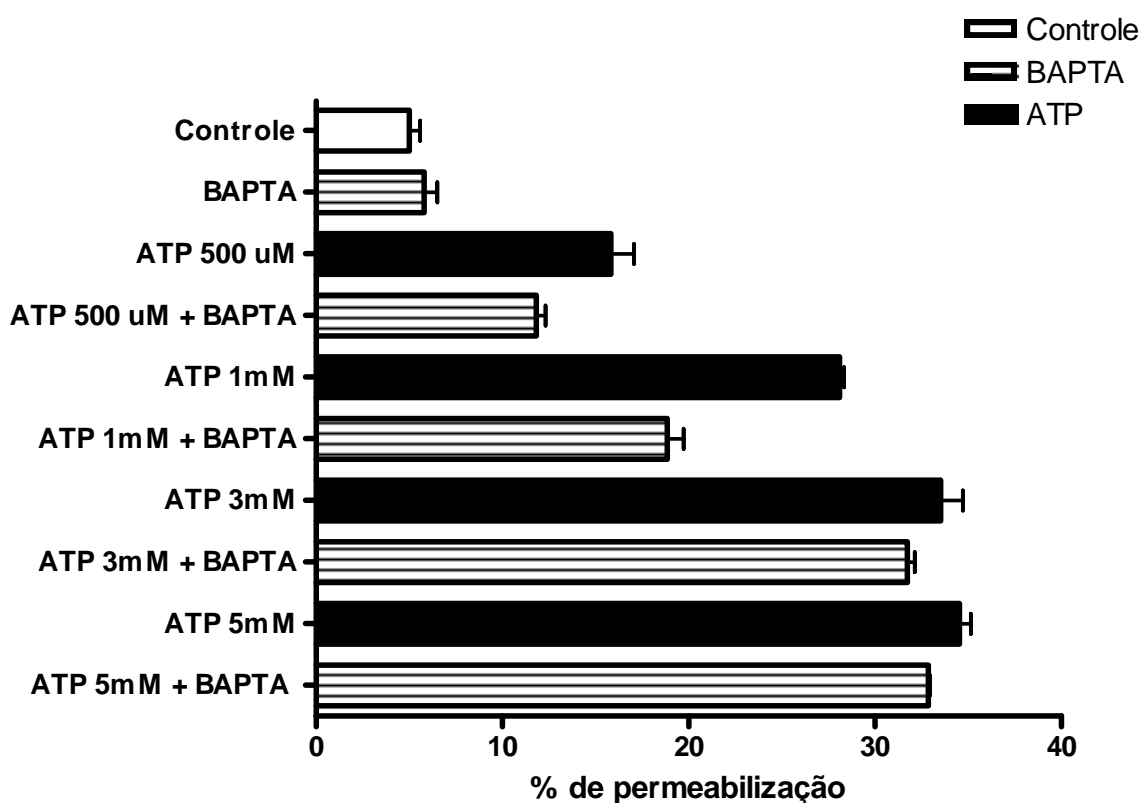


Figura 36 A entrada de etídeo induzida pelo ATPe acontece ainda em ausência de cálcio intracelular.

Células de lavado peritoneal de camundongo, pré-incubadas ou não com BAPTA e tratadas com diferentes concentrações de ATP. A pré-incubação das células com BAPTA realizou-se em meio de cultura durante 30 min à 37 °C. O tratamento com ATP foi feito em solução externa padrão com EGTA durante 10 min a 37 °C. Cada barra é a média de 3 experimentos independentes feitos em duplicata.

4.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK-293 COM O RECEPTOR P2X₇

Os macrófagos de camundongo expressam vários tipos de receptores P2. Foi observada a expressão de receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇ (COUTINHO-SILVA e col., 2005; LUTTIKHUIZEN e col., 2004). Isto é um obstáculo no estudo do receptor P2X₇, pois todos os fenômenos observados podem ter contribuições em diferentes graus dos outros P2, que estão sendo ativados pelos mesmos agonistas. Por outro lado, tendo em vista as diferenças observadas na captação de corantes fluorescentes catiônicos e aniônicos na presença de ATP, nos interessava ver qual é especificamente a participação do receptor P2X₇ neste fenômeno e quais efeitos podem dever-se a outros receptores ou a outras moléculas.

Para solucionar este problema experimental e trabalhar com um sistema mais “limpo” para pesquisar as características do fenômeno de permeabilização da membrana plasmática dependente de ATP decidimos transfectar células HEK-293 com o cDNA do receptor P2X₇. As células HEK-293 tem sido amplamente utilizadas no estudo do receptor P2X₇ pois elas não possuem nenhum receptor P2X, só expressam baixas quantidades do receptor P2Y₁ e P2Y₂ (QI e col., 2000). Criamos assim nossa própria linhagem que estavelmente expressa o receptor P2X₇ na membrana (Figura 37 A) e começamos a realizar os testes funcionais.

4.3.1 REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS HEK-P2X₇

Inicialmente fomos testar a resposta eletrofisiológica destas células na conformação *whole-cell*. Da mesma forma que observado nos macrófagos de

Resultados

camundongo, em nossas condições experimentais, a injeção pneumática de ATP na proximidade das células transfectadas provocou uma corrente de entrada, provavelmente devida à abertura do canal catiônico associado ao receptor P2X₇ (Figura 37 C). As células HEK-293 não transfectadas com o receptor não mostraram nenhuma resposta ao tratamento com ATP nas mesmas condições (Figura 37 B).

A diferença na amplitude desta corrente quando comparada com a corrente obtida em *whole-cell* nos macrófagos sob o mesmo tratamento pode dever-se a sobre expressão do receptor P2X₇.

Nas células HEK-293 transfectadas com o cDNA do receptor P2X₇ (HEK-P2X₇) não foi possível registrar em nenhum caso a corrente de saída, presumivelmente pela ausência de canais de potássio dependentes de cálcio nestas células.

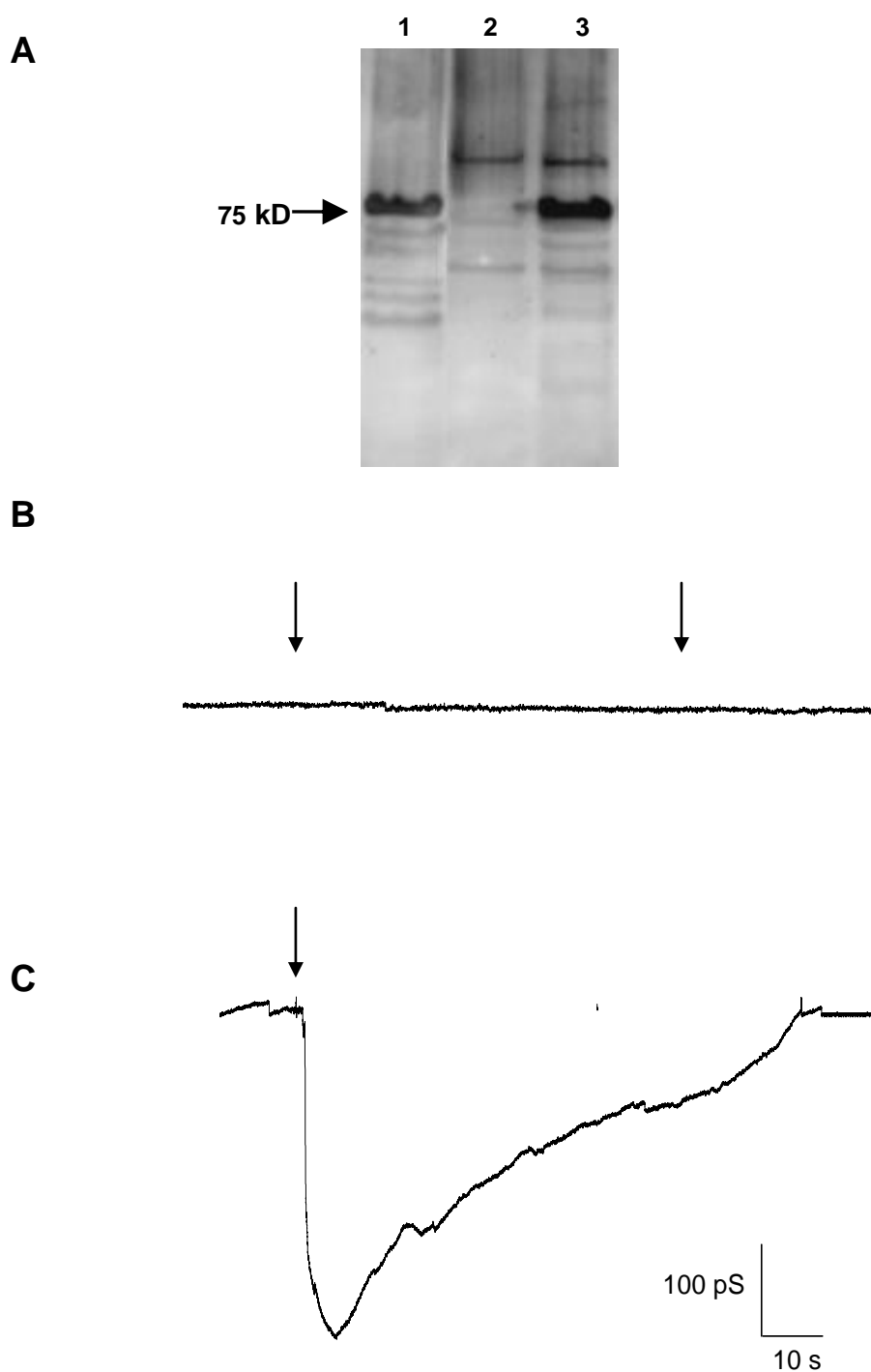


Figura 37 Linhagem HEK-293 estavelmente transfectadas com o receptor P2X₇, expressão do receptor e resposta eletrofisiológica em *whole-cell*.

A: *Western Blot* mostrando a expressão do receptor P2X₇ na membrana de macrófagos de camundongo (trilha 1), ausência de expressão em células HEK-293 (trilha 2) e expressão em HEK-293-P2X₇ (trilha 3). Experimento representativo de 3 experimentos independentes **B** e **C:** registros *whole-cell* das células HEK-293 (**B**) e HEK-293-P2X₇ (**C**) em resposta a injeção pneumática com ATP 1 mM (seta), temperatura ambiente, V_H -40 mV, em solução externa padrão, n = 10 células.

Resultados

No entanto, quando tentamos registrar o canal inespecífico na conformação *cell-attached* grande foi nossa surpresa e decepção ao não conseguir registrar canal nenhum em nenhuma das células HEK-P2X₇ testadas (n = 23) (Figura 38).

Foram testadas as voltagens -100 mV, -80 mV, -60 mV, -40 mV, +40 mV, +60 mV, +80 mV e maiores concentrações de ATP extracelular (até 100 mM). Colocamos também ATP dentro da pipeta do selo, pois supusemos que talvez nas células HEK estivesse ausente alguma molécula responsável pela transdução de sinais que se encontra no macrófago. Em nenhum caso conseguimos ver o poro Z, mesmo em registros de uma hora de duração.

Este resultado impossibilitou as futuras caracterizações biofísicas planejadas para o poro Z neste novo sistema. Passamos então aos ensaios de captação de corantes fluorescentes induzidos por ATPe nas células HEK-P2X₇.

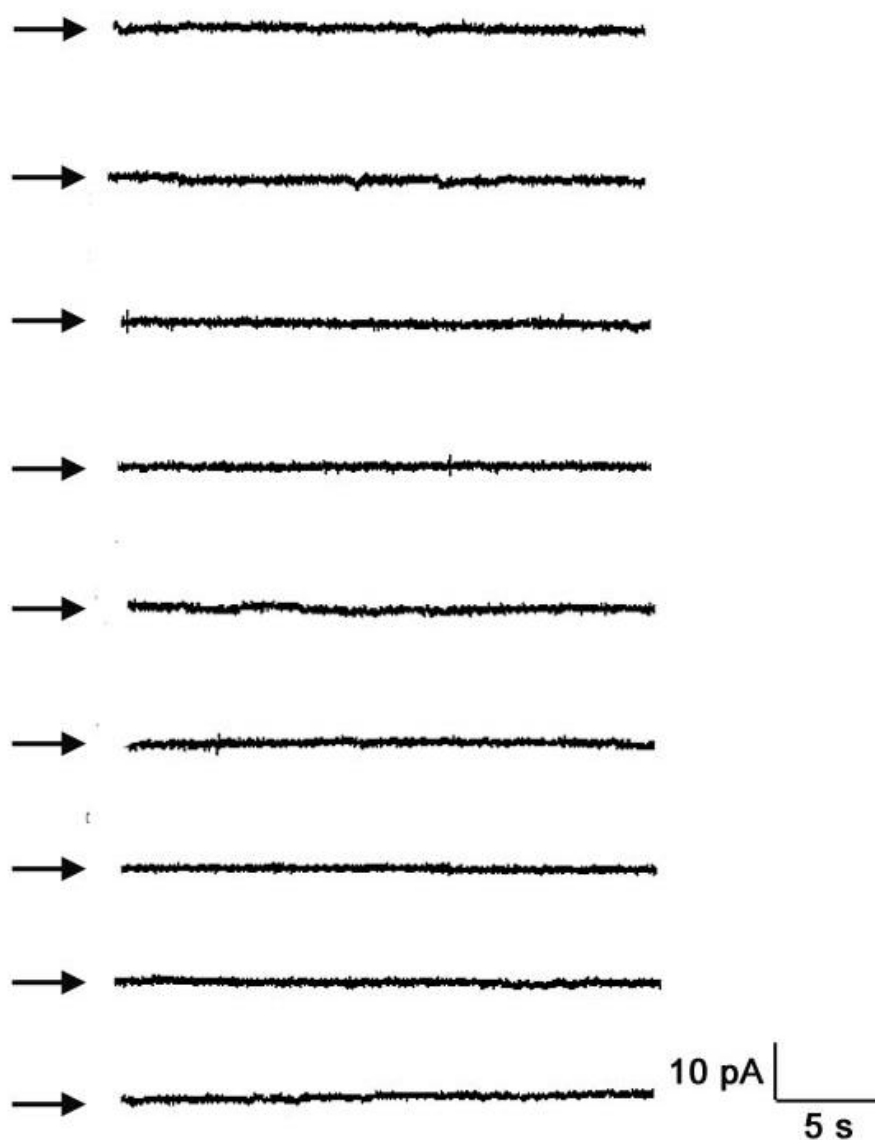


Figura 38 O poro Z não é registrado nas células HEK-P2X₇. Ausência de registros do canal na conformação *cell-attached* na presença de ATPe.

Em nenhuma das células testadas conseguimos registrar o poro Z. Neste registro: ATP 3 mM, 37 °C. Solução do banho = solução intrapipeta, solução externa padrão. V_H - 40 mV. n = 23 células.

4.3.2 AUMENTO DO CÁLCIO CITOPLASMÁTICO EM RESPOSTA AO ATP NAS CÉLULAS HEK-P2X₇

Realizamos ensaios de medição do cálcio citoplasmático em células HEK-293 transfectadas ou não com o cDNA do receptor P2X₇, para comparar os resultados obtidos com o que acontece nos macrófagos que expressam endogenamente este receptor.

Para as medições de cálcio intracelular e para os ensaios de captação de corantes as células HEK foram plaqueadas sobre poly-L-lisina, pois o ATP produz o desprendimento das células da placa de cultura.

Nos experimentos da Figura 39 podemos observar como a perfusão de uma solução contendo cálcio 1 mM e ATP 3 mM à 37 °C provocou a entrada mantida de cálcio nas células HEK-P2X₇ (Figura 39 B) mas não nas células HEK-293 não transfectadas (Figura 39 A). Nestas últimas o tratamento com ATP induziu um aumento transitório de cálcio citoplasmático, acreditamos devido à expressão endógena de receptores P2Y nas células HEK-293.

O aumento citoplasmático de cálcio foi quantificado como a relação entre o pico máximo obtido com uma solução de saponina 1 % e o aumento de cálcio obtido após 5 minutos da perfusão com diferentes concentrações de ATP (Figura 39 C). A curva dose-resposta mostra que o EC₅₀ das células HEK-P2X₇ para o ATP é 800 μM, mas se consideramos a presença de Ca²⁺ no meio externo na concentração de 1 mM devemos calcular a concentração de ATP⁴⁻ livre disponível para ligar-se ao receptor P2X₇. Fazendo isto, obtivemos que o EC₅₀ para o ATP⁴⁻ é 86 μM, similar ao registrado por Surprenant e colaboradores com o cDNA do receptor P2X₇ de rato em condições similares (SURPRENANT e col., 1996).

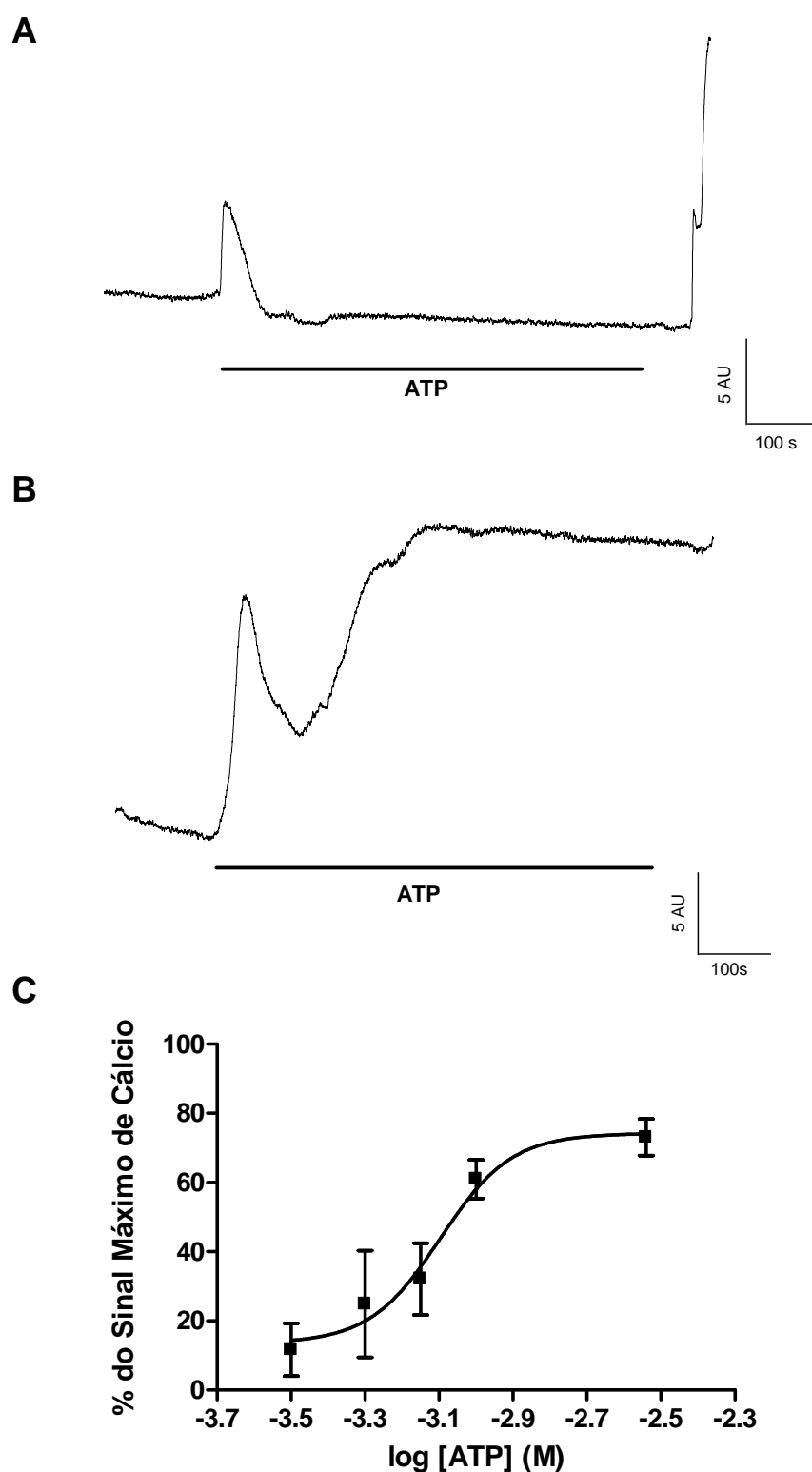


Figura 39 Registros das variações do cálcio intracelular em resposta à perfusão com ATP em células HEK-293 transfectadas ou não com o receptor P2X₇.

A e B: variação dos níveis citoplasmáticos de cálcio da célula HEK-293 (A) e HEK-P2X₇ (B) Experimentos representativos de pelo menos 10 experimentos. **C:** curva dose-resposta. Cada ponto da curva é a média de pelo menos 3 experimentos independentes feitos em duplicata. Todos os registros foram feitos a 37 °C e em solução externa padrão com 1 mM de cálcio.

4.3.3 ENTRADA DE CORANTES FLUORESCENTES NAS CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM P2X₇

A seguir testamos a captação de etídeo e de Lucifer Yellow nas células HEK-P2X₇ induzida pela presença de ATPe. As células HEK transfetadas ou não com o cDNA do receptor foram tratadas por 15 minutos com ATP 5 mM na presença de brometo de etídeo ou Lucifer Yellow, à 37 °C. Experimentos idênticos foram realizados com macrófagos em paralelo para confirmar o efeito das drogas (Figura 40).

Neste experimento comprovamos que as células HEK não transfetadas não deixam entrar etídeo em resposta ao ATPe mas sim aquelas que foram transfetadas com o cDNA do receptor P2X₇ (Figura 40 C – E). Este fenômeno é revertido pelo pré-tratamento com ATPox (Figura 40 F), o que sugere que a entrada do etídeo é devida ao estímulo do receptor P2X₇.

Nos experimentos com Lucifer Yellow observamos que o tratamento com ATPe não induz entrada deste corante nas células HEK-P2X₇ (Figura 40 I e J).

Experimentamos aumentar o tempo de exposição ao ATP até 20 minutos, mas obtivemos o mesmo resultado: Lucifer Yellow não entrou nas células HEK-P2X₇. Mais uma vez encontramos uma diferença no fenômeno de captação de corantes aniônicos e catiônicos: o etídeo, corante catiônico, entrou na células HEK-P2X₇, enquanto que Lucifer Yellow, corante aniônico, não.

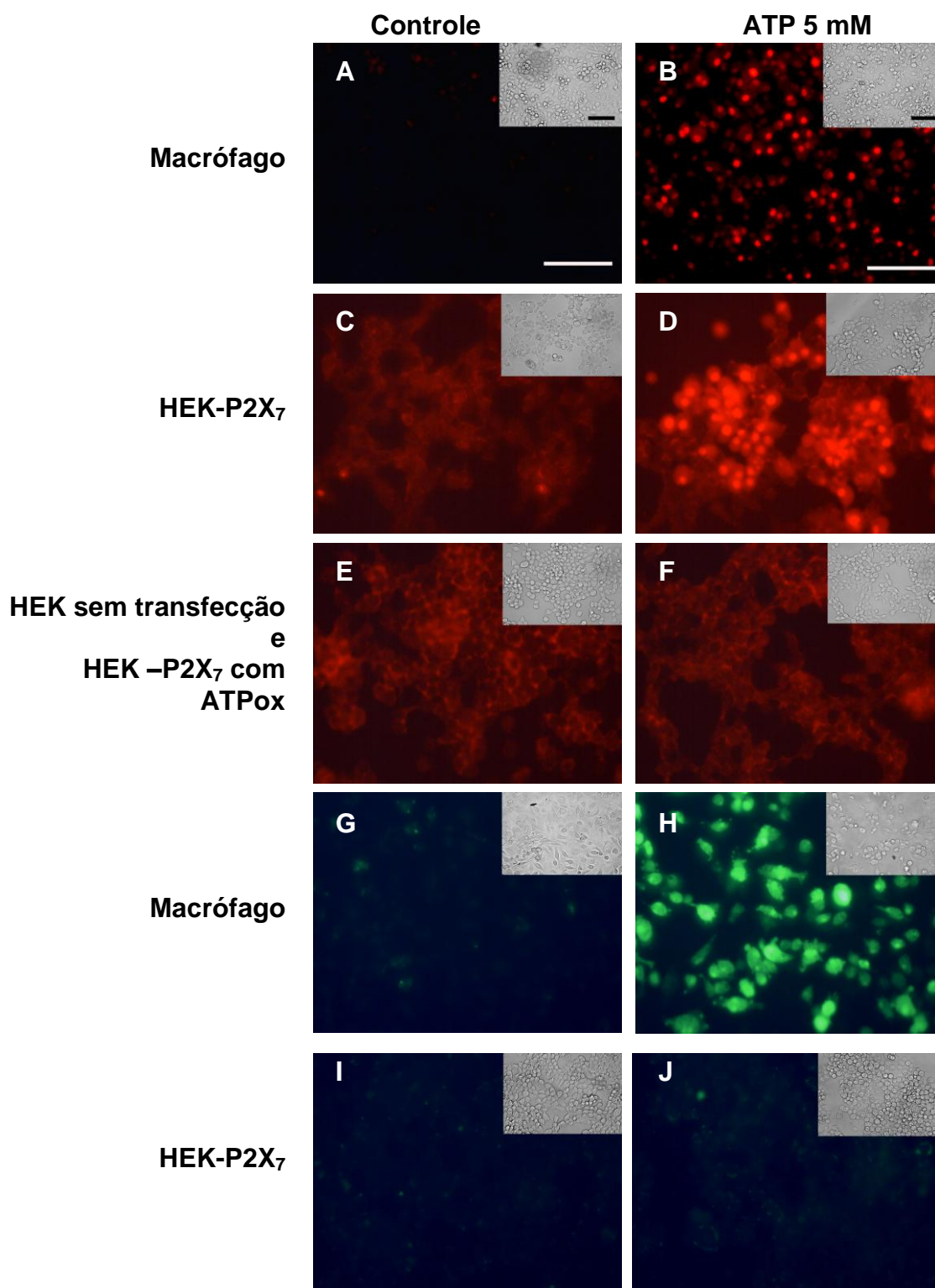


Figura 40 As células HEK-P2X₇ permitem a entrada de etídeo mas não de Lucifer Yellow em resposta ao tratamento com ATP extracelular

A: macrófagos com brometo de etídeo. **B:** macrófagos com brometo de etídeo e ATP 5 mM. **C:** HEK-P2X₇ com brometo de etídeo. **D:** HEK-P2X₇ com brometo de etídeo e ATP 5 mM, **E:** HEK com brometo de etídeo e ATP 5 mM. **F:** HEK-P2X₇ com brometo de etídeo e ATP 5 mM, pré-incubados com ATPox, 500 μ M durante 2 horas. **G:** macrófagos com Lucifer Yellow **H:** macrófagos com ATP 5 mM e Lucifer Yellow **I:** HEK-P2X₇ com Lucifer Yellow **J:** HEK-P2X₇ com ATP 5 mM Lucifer Yellow. Todos os tratamentos foram feitos por 15 minutos, em solução externa padrão à 37 °C. As barras equivalem ambas a 100 μ m. n = 5 experimentos independentes.

Resultados

Como o cDNA utilizado para transfectar as células HEK-293 é de rato, e nossos experimentos estão sendo sempre realizados em células de camundongo, realizamos ensaios de permeabilização com macrófagos de rato, nas mesmas condições, para ver se esta diferença na entrada de corantes aniônicos tratava-se de uma variabilidade do receptor P2X₇ interespecífica. Como observa-se na Figura 41, os macrófagos de rato permitiram a entrada de etídeo e de Lucifer Yellow em resposta ao tratamento com ATP 5 mM.

Para confirmar que a diferença observada na captação de etídeo e de Lucifer Yellow estava relacionada com a carga e não com o tipo de corante, testamos outros corantes fluorescentes nos macrófagos e nas células HEK-P2X₇.

Utilizamos YO-PRO-1, outro cátion e carboxifluoresceína, outro ânion. Nossos resultados foram os mesmos que obtidos anteriormente: enquanto estes dois corantes entram no macrófago após tratamento deste com ATP 5 mM (Figura 42 A, B, E e F), só o YO-PRO-1 entrou na célula HEK-P2X₇ (Figura 42 C, D, H e I).

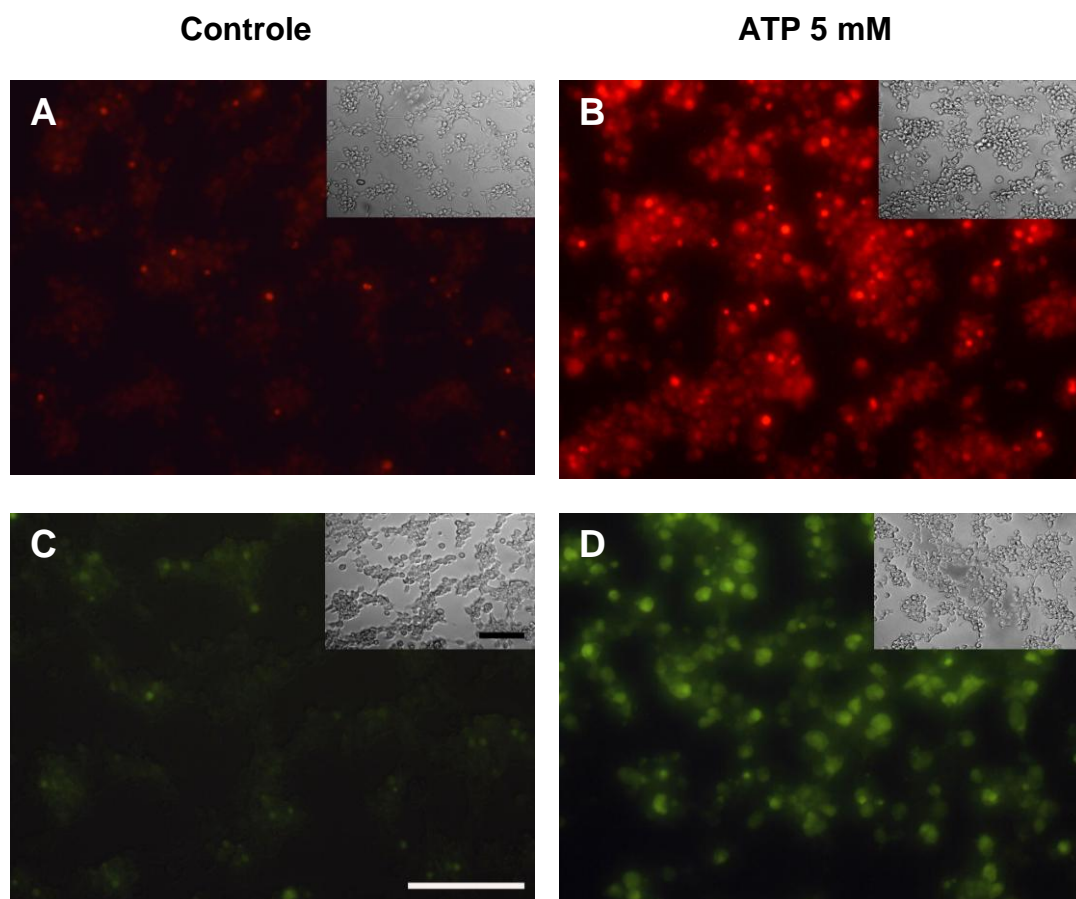


Figura 41 Os macrófagos de rato deixam entrar tanto Lucifer Yellow quanto etídeo em resposta ao tratamento com ATP extracelular.

A: macrófagos com brometo de etídeo. **B:** macrófagos com brometo de etídeo e ATP 5 mM. **C:** macrófagos com Lucifer Yellow **D:** macrófagos com ATP 5 mM e Lucifer Yellow. Todos os tratamentos foram feitos por 15 minutos, em solução externa padrão à 37 °C. As barras equivalem ambas a 100 μ m. n = 2 experimentos independentes.

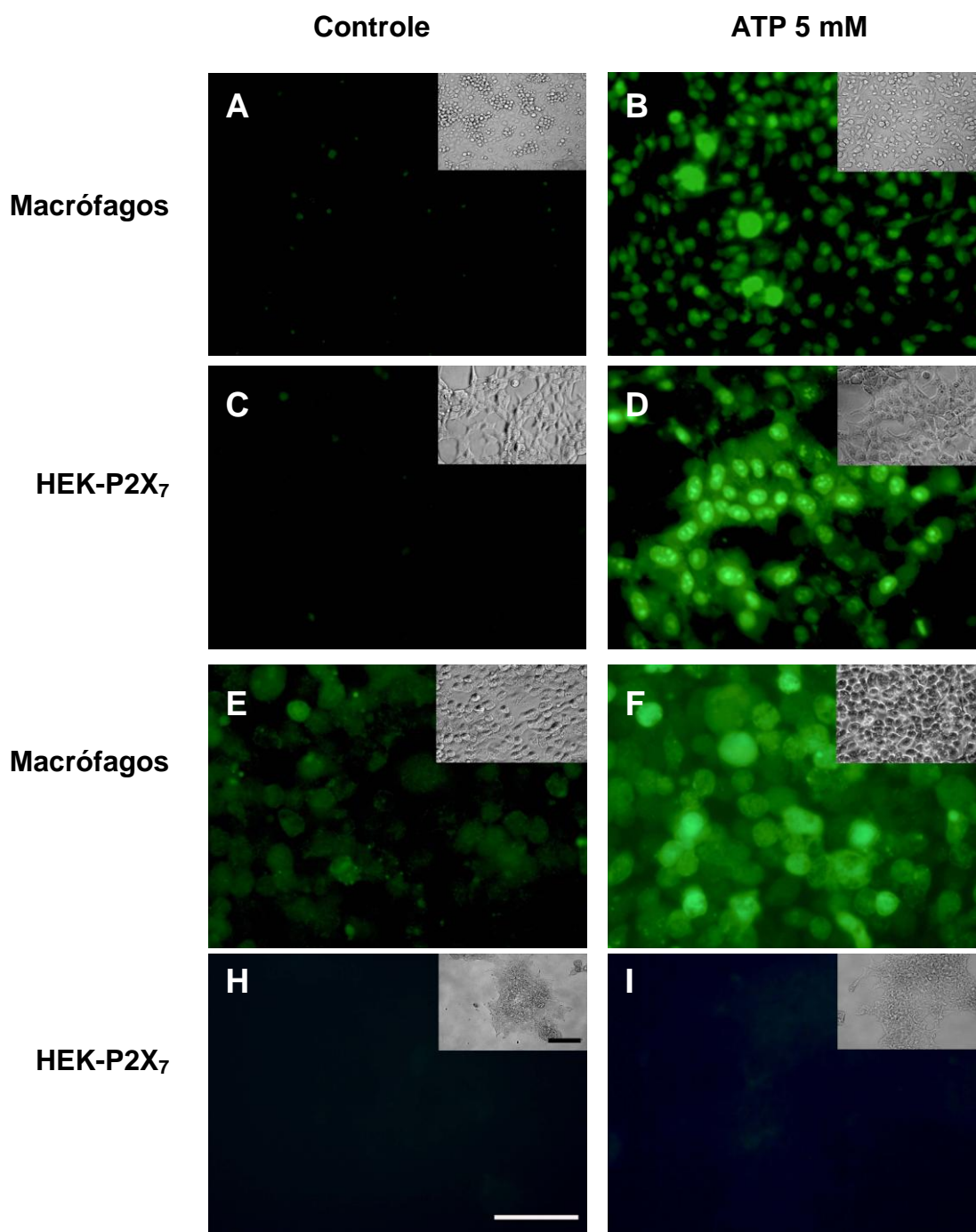


Figura 42 As células HEK-P2X₇ permitem a entrada de YO-PRO-1 mas não de carboxifluoresceína em resposta ao ATP extracelular.

A: macrófagos com YO-PRO-1. **B:** macrófagos com YO-PRO-1 e ATP 5 mM. **C:** HEK-P2X₇ com YO-PRO-1 **D:** HEK-P2X₇ com YO-PRO-1 e ATP 5 mM. **F:** macrófagos com carboxifluoresceína. **G:** macrófagos com carboxifluoresceína e ATP 5 mM. **H:** HEK-P2X₇ com carboxifluoresceína. **I:** HEK-P2X₇ com carboxifluoresceína e ATP 5 mM. Todos os tratamentos foram feitos por 15 minutos, em solução externa padrão a 37 °C. As barras equivalem ambas a 100 µm. n = 4 experimentos independentes.

Resultados

Para descartar a possibilidade de que as diferenças observadas estejam relacionadas com a localização intracelular do corante, testamos nas células HEK-P2X₇ um cátion de localização citoplasmática e escolhemos com esta finalidade o corante MQAE. O MQAE é um corante catiônico utilizado para medir entrada de cloreto nas células, já que ele possui a propriedade de fluorescer em condições de baixas concentrações de cloreto, a presença de cloreto inibe sua fluorescência.

Tendo isto em mente utilizamos nos ensaios de permeabilização uma solução na qual o cloreto foi substituído pelo glutamato (Solução com Glutamato).

Como mostra a Figura 43, o MQAE entrou tanto nos macrófagos de camundongo tratados durante 10 minutos com ATP 5 mM (Figura 43 B), quanto nas células HEK-P2X₇ (Figura 43 E e F), mas não nas células HEK não transfectadas (Figura 43 D) nem nas células não tratadas com ATP (Figura 43 A, C e E).

Estes dados confirmaram nossa idéia de que as células HEK-P2X₇, por algum motivo ainda desconhecido, permitem a entrada de cátions mas não de ânions após o tratamento com ATPe.

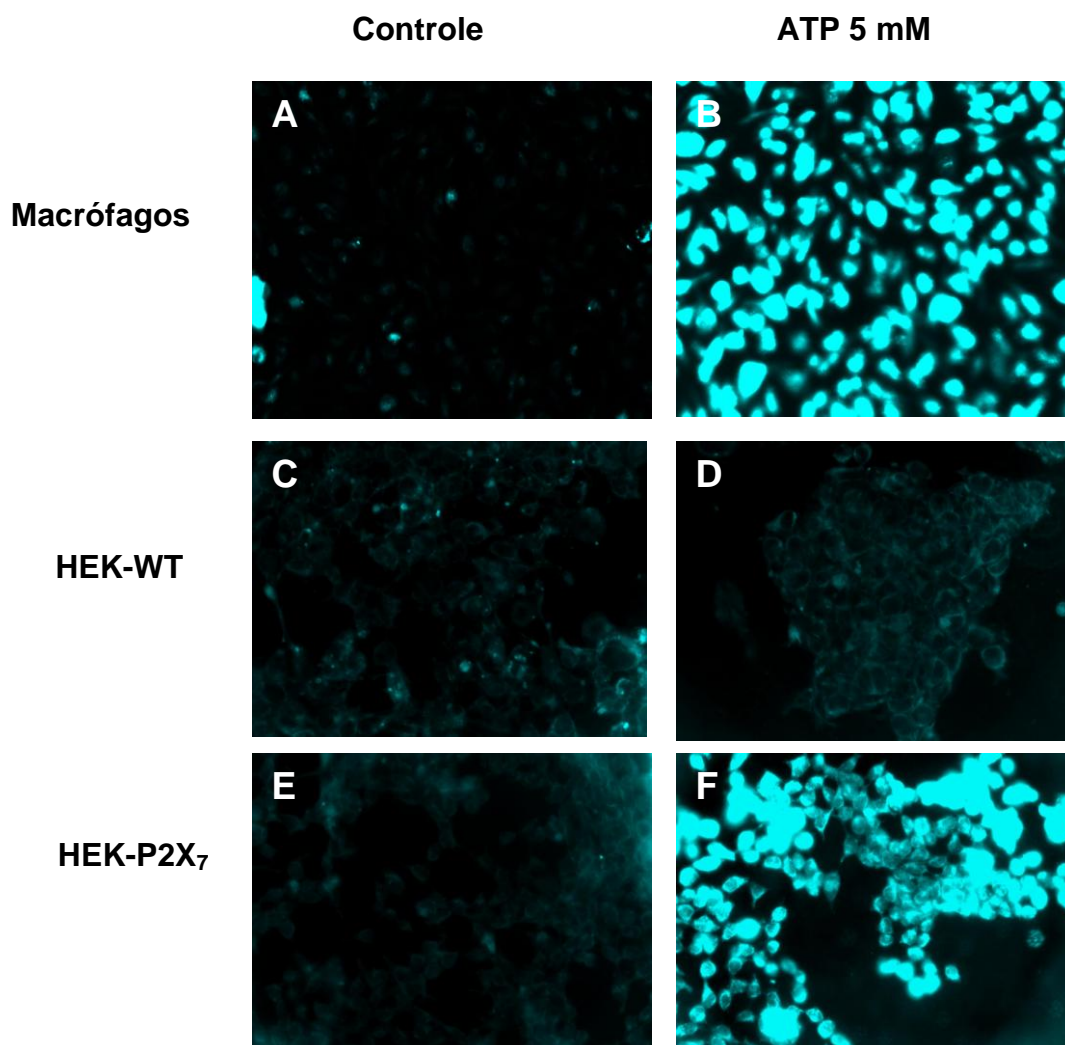


Figura 43 Os macrófagos de camundongo e as células HEK-P2X₇ deixam entrar MQAE em resposta ao tratamento com ATP extracelular.

A: macrófagos com MQAE. **B:** macrófagos com MQAE e ATP 5 mM. **C:** HEK-293 com MQAE **D:** HEK-293 com MQAE e ATP 5 mM. **E:** HEK-P2X₇ com MQAE. **F:** HEK-P2X₇ com MQAE e ATP 5 mM. **G:** estrutura do MQAE. Todos os tratamentos foram feitos por 15 minutos, em solução com glutamato a 37 °C. n = 3 experimentos independentes.

Resultados

Para confirmar que a solução com baixa concentração de cloreto, utilizada nos ensaios de fluorescência com MQAE, não interfere no fenômeno de permeabilização induzido por ATP realizamos ensaios controles em macrófagos de camundongo com esta solução na presença de Lucifer Yellow e brometo de etídeo.

Os macrófagos de camundongo foram tratados ou não com ATP 5 mM durante 10 minutos à 37 °C em uma solução com baixa concentração de cloreto. Ao observar os resultados tivemos outra surpresa: nestas condições a captação de etídeo induzida pelo ATPe aumentou significativamente ($p < 0,01$) quando comparado com a captação deste corante na solução padrão (Figura 44 A - D e Figura 45 A), enquanto que significativamente diminuiu ($p < 0,001$) a entrada de Lucifer Yellow nas mesmas condições (Figura 44 D - G Figura 45 B).

Ainda não está claro por que motivo a ausência de Cl^- interfere na captação de Lucifer Yellow, enquanto potencia a captação de etídeo. Os dados na literatura sobre a interferência deste ânion nos processos mediados pelo receptor P2X_7 serão abordados na seção “Discussão”. Porém, o que podemos concluir destes experimentos é que a entrada de corantes aniônicos e a de corantes catiônicos estimulada pelo ATPe acontecem no macrófago por vias separadas, e por algum motivo, só uma destas vias está presente nas células HEK- P2X_7 .

A ausência da via de captação de corantes fluorescentes aniônicos nas células HEK- P2X_7 poderia dever-se a uma particularidade deste tipo celular ou ser uma característica comum aos sistemas de expressão heteróloga do receptor P2X_7 , pois, como apresentado na introdução, quando fomos olhar a literatura encontramos que em nenhum caso de transfecção do receptor foi testada entrada de corantes aniônicos.

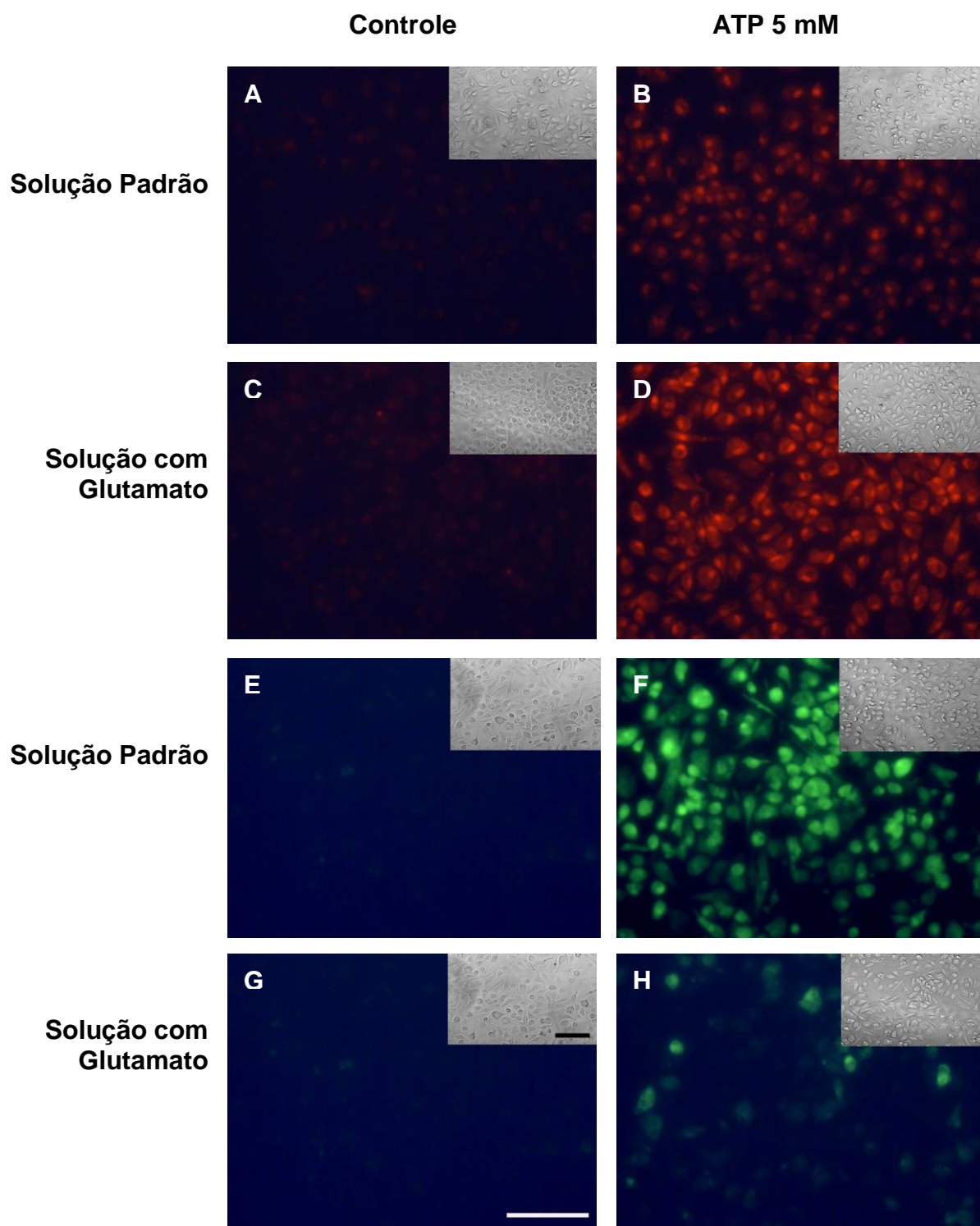


Figura 44 A entrada de Lucifer Yellow mas não a de etídeo é diminuída nos ensaios de captação de corantes em resposta ao tratamento com ATPe na solução com baixa concentração de cloreto.

Macrófagos intraperitoneais de camundongo. **A** e **C**: com brometo de etídeo. **B** e **D**: com brometo de etídeo e ATP 5 mM. **E** e **G**: com Lucifer Yellow. **F** e **H**: com Lucifer Yellow e ATP 5 mM. **A - D**: em solução externa padrão **E - H**: em solução com glutamato. Todos os tratamentos foram feitos por 10 minutos, a 37 °C. n = 3 experimentos independentes.

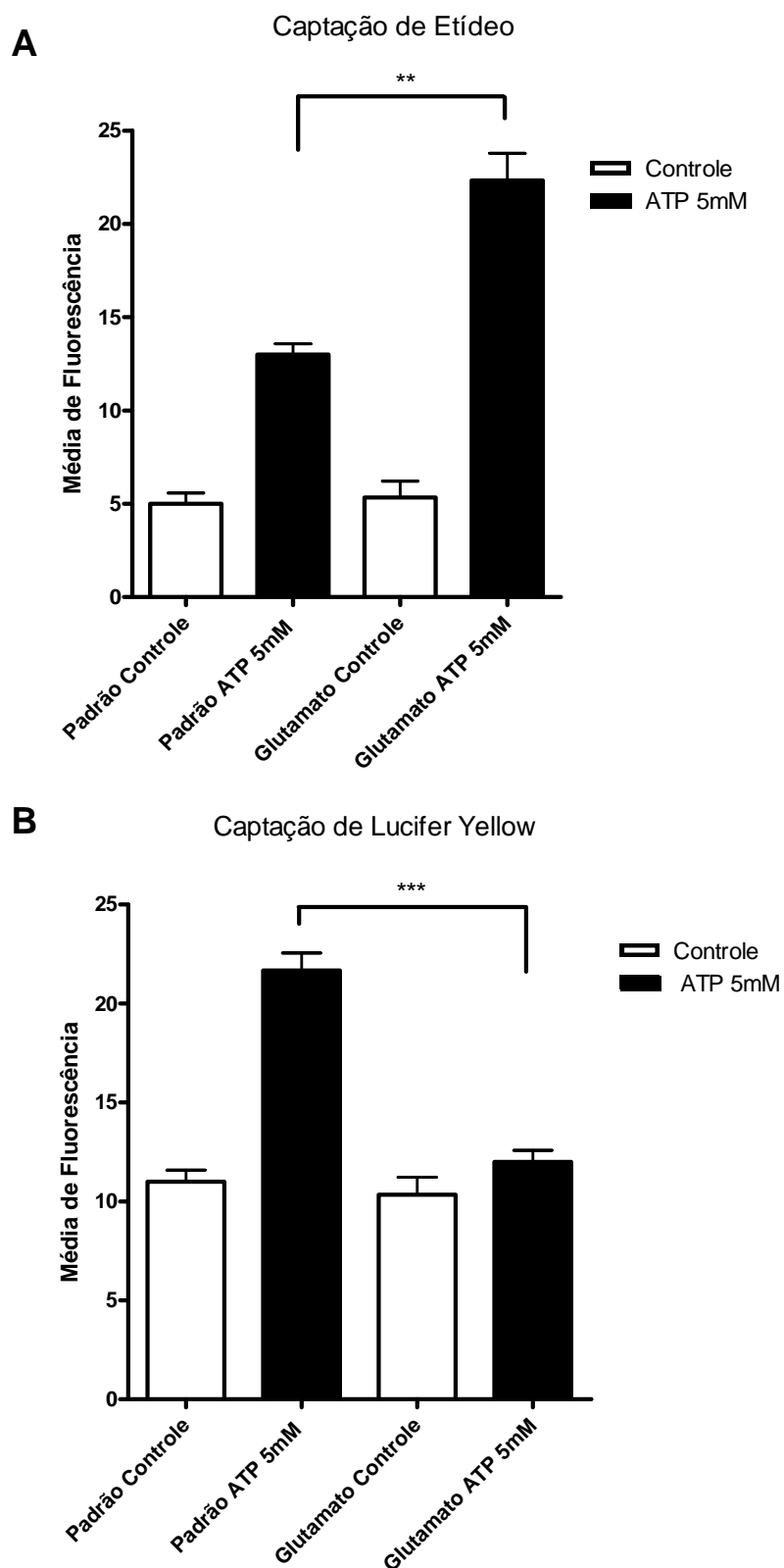


Figura 45 Quantificação da captação de corantes fluorescentes em macrófagos em resposta ao ATP extracelular em solução padrão e solução com baixa concentração de cloreto.

A: quantificação da entrada de brometo de etídeo. **B:** quantificação da entrada de Lucifer Yellow. Os experimentos quantificados correspondem às fotos da Figura 44. Cada barra do gráfico foi calculada como a média de 3 experimentos independentes feitos em duplicata. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.4 OUTRAS LINHAGENS CELULARES TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR P2X₇

Com a intenção de saber se a ausência da captação de corantes aniônicos na presença de ATP que tínhamos encontrado nas células HEK-P2X₇, acontecia em outras linhagens celulares transfectadas com o receptor ou se se tratava de uma particularidade das células HEK fomos a testar a entrada de etídeo e de Lucifer Yellow em astrocitomas 1321N1, também transfectados com o cDNA do receptor P2X₇ (astrocitomas 1321N1-P2X₇). Estas células foram cedidas generosamente pela Dra. Eliana Scemes (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA).

Nos ensaios de captação de corantes fluorescentes realizados com os astrocitomas 1321N1-P2X₇ comprovamos que o tratamento com ATP extracelular durante 10 minutos à 37 °C induz entrada de etídeo (Figura 46 A e B), mas não de Lucifer Yellow (Figura 46 C e D).

Estes experimentos nos permitem concluir que a entrada de corantes catiônicos e aniônicos não acontece pela mesma via, pelo menos não em todas as células. A presença do receptor P2X₇ parece ser suficiente para induzir captação de corantes catiônicos em resposta ao tratamento com ATP, mas não para permitir a entrada de corantes aniônicos.

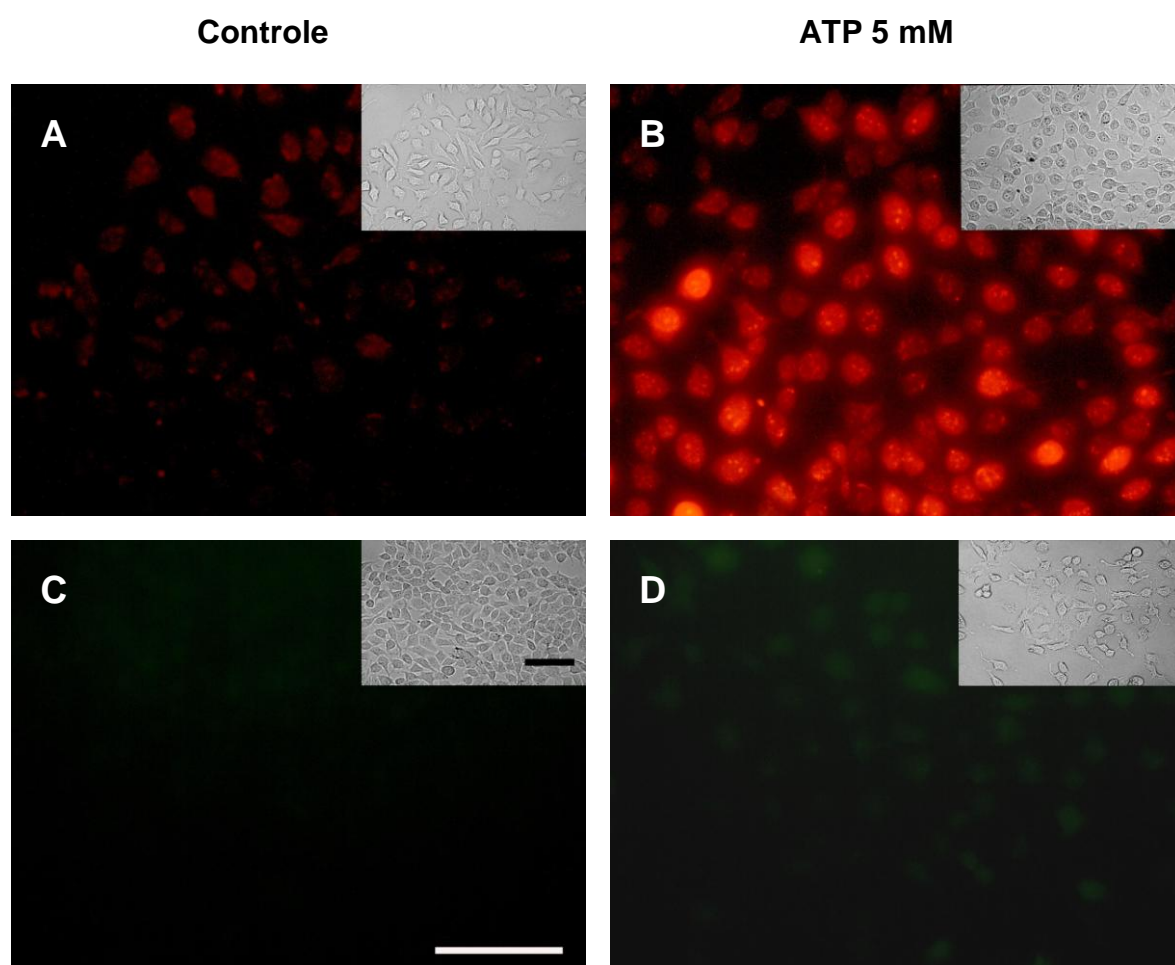


Figura 46 O tratamento com ATPe nos astrocitomas 1321N1-P2X₇ provoca entrada de etídeo mas não de Lucifer Yellow.

Astrocitomas 1321N1-P2X₇ tratados com **A**: brometo de etídeo. **B**: brometo de etídeo e ATP 5 mM. **C**: Lucifer Yellow **D**: Lucifer Yellow e ATP 5 mM. Todos os tratamentos foram feitos em solução externa padrão, durante 10 minutos, a 37 °C. n = 3 experimentos independentes.

4.5 BUSCANDO UMA EXPLICAÇÃO PARA AS DIFERENÇAS OBSERVADAS ENTRE OS MACRÓFAGOS E AS CÉLULAS HEK-P2X₇

Nossos resultados obtidos até este ponto nos indicavam que:

- a composição iônica do meio extracelular em que se realiza o ensaio de captação de corantes influencia de maneira diferente a entrada de cátions e de ânions fluorescentes na presença de ATPe
- o poro Z registrado eletrofisiologicamente no macrófago na presença de ATPe não é registrado nas mesmas condições nas células HEK-P2X₇
- nas células transfectadas pelo receptor P2X₇ só encontra-se ativa a via de captação de corantes fluorescentes catiônicos

Em vista destes dados, desenvolvemos então uma hipótese que relacionasse os dois fenômenos que estão ausentes nas células HEK-P2X₇: os corantes aniônicos entrariam pelo poro Z registrado em *cell-attached*, enquanto que os corantes catiônicos estariam entrando por algum outro mecanismo. Estes dois processos seriam dependentes do estímulo do receptor, pois nenhum dos dois acontece em camundongos que não expressam o receptor P2X₇.

Para testar nossa hipótese desenhamos uma série de experimentos. Em primeiro lugar pensamos num experimento simples que nos permitisse comprovar a hipótese de que os corantes aniônicos estão entrando na célula por um mecanismo difusional, compatível com a idéia de um poro abrindo na membrana plasmática, enquanto os corantes catiônicos não.

Os macrófagos de camundongo aderidos à placa de cultura foram tratados com ATP 5 mM durante 10 minutos à 37 °C em ausência de qualquer corante. Posteriormente as células foram levadas à 4 °C, ainda na presença de ATP 5 mM e

Resultados

o corante fluorescente foi adicionado nestas condições e mantido durante outros 10 minutos. O tratamento com ATP à 37 °C abriria um poro e este permaneceria aberto ainda à 4 °C, se o corante estiver difundindo através dele deveríamos ver a célula fluorescente após este procedimento. Este experimento foi inspirado no trabalho de Elliot e colaboradores, quem o utiliza para carregar a célula com trehalose numa técnica de preservação celular (ELLIOTT e col., 2005).

Na Figura 47 observamos que nem o etídeo (Figura 47 A-C) nem o MQAE (Figura 47 D e E) são capazes de entrar nos macrófagos tratados da maneira descrita, enquanto que o Lucifer Yellow (Figura 47 F e G) difunde através do poro e entra na célula.

Para confirmar este resultado realizamos o mesmo experimento utilizando outro ânion, carboxifluoresceína, e outro cátion, sulfo-rodamina B, e tivemos resultados similares. Enquanto que a carboxifluoresceína difunde até o citoplasma da célula uma vez que o poro Z foi ativado com ATP à 37 °C (Figura 48 C e D), a sulfo-rodamina-B não entra nas células nas mesmas condições (Figura 48 A e B).

Estes experimentos nos permitem concluir que os corantes aniônicos estão entrando na célula por um processo de difusão, compatível com a idéia de que são este tipo de corantes fluorescentes que estão passando através do poro Z.

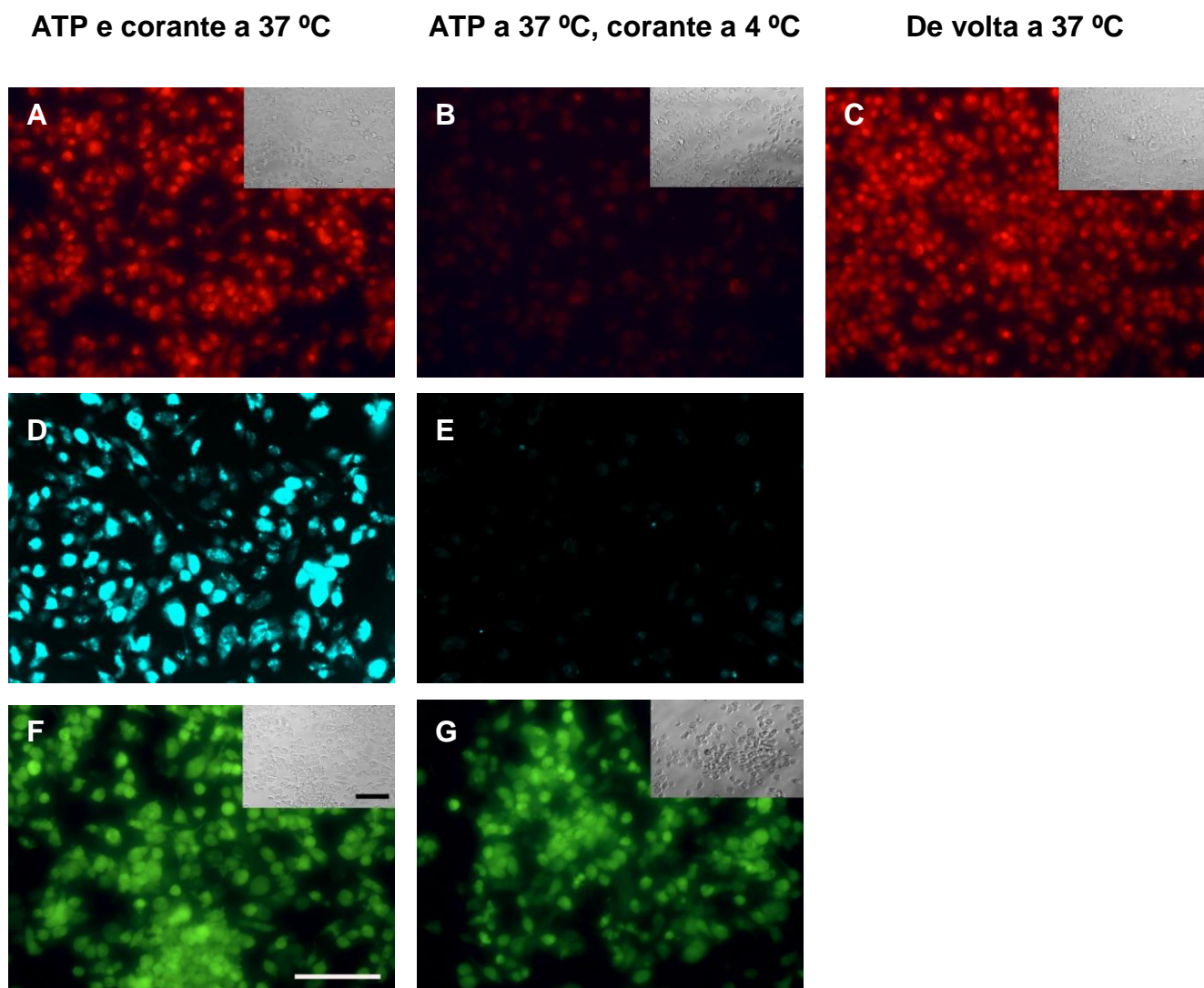


Figura 47 Ensaio de captação de corantes fluorescentes com tratamento com ATPe a 37 °C e entrada de etídeo, Lucifer Yellow e MQAE a 4 °C em macrófagos de camundongo.

A: Tratamento com ATP 5 mM durante 10 minutos e brometo de etídeo durante 15 minutos à 37 °C (controle positivo). **B:** Tratamento com ATP 5 mM à 37 °C durante 10 minutos, e incubação com ATP 5 mM e brometo de etídeo à 0 °C. **C:** Mesma placa que em B levada à 37 °C nas mesmas condições. **D:** Tratamento com ATP 5 mM durante 10 minutos e MQAE durante 15 minutos à 37 °C (controle positivo). **E:** Tratamento com ATP 5 mM à 37 °C durante 10 minutos, e incubação com ATP 5 mM e MQAE a 4 °C. **F:** Tratamento com ATP 5 mM durante 10 minutos e Lucifer Yellow durante 15 minutos a 37 °C (controle positivo). **G:** Tratamento com ATP 5 mM a 37 °C durante 10 minutos, e incubação com ATP 5 mM e Lucifer Yellow à 4 °C. Todos os experimentos foram feitos em solução externa padrão exceto F e G que foram incubados na solução de baixo cloreto. As barras equivalem ambas a 100 µm. n = 4 experimentos independentes.

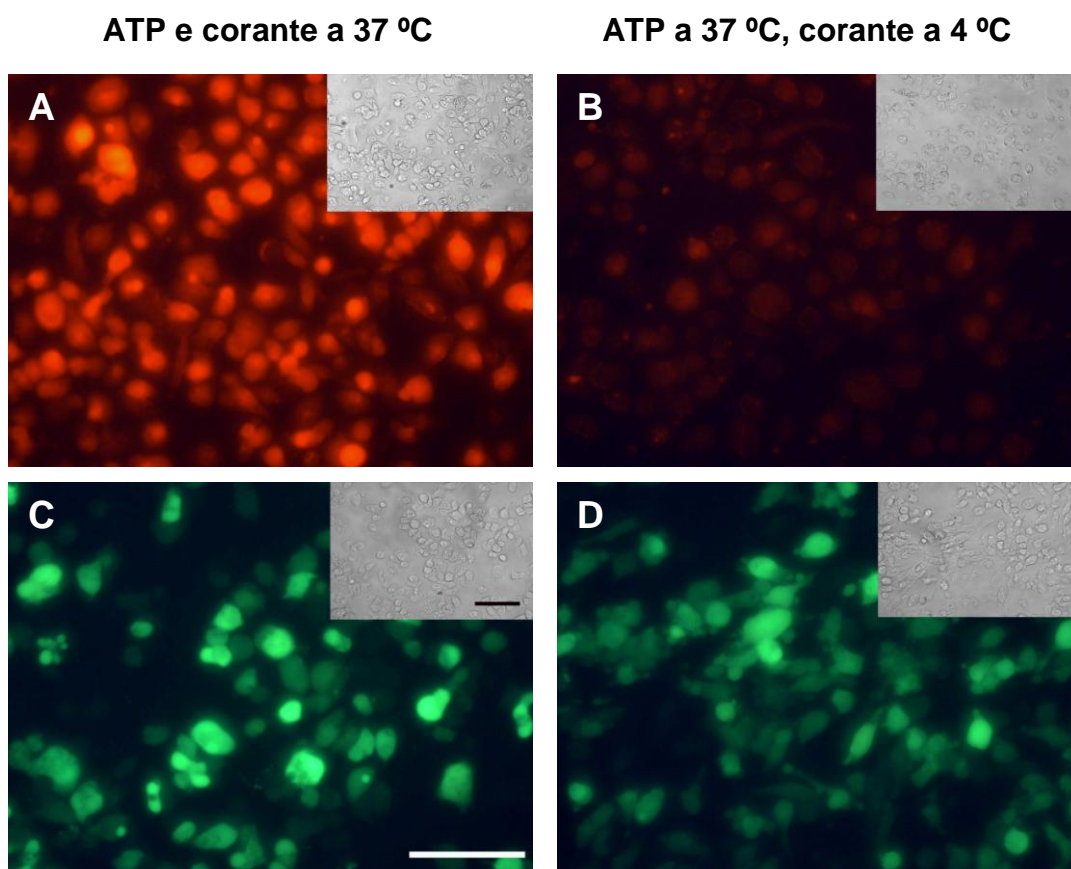


Figura 48 Ensaio de captação de corantes fluorescentes com tratamento com ATP a 37 °C e entrada de sulfo-rodamina B e carboxifluoresceína a 4 °C em macrófagos de camundongo.

A: Tratamento com ATP 5 mM durante 10 minutos e sulfo-rodamina B durante 10 minutos à 37 °C (controle positivo). **B:** Tratamento com ATP 5 mM à 37 °C durante 10 minutos, e incubação com ATP 5 mM e sulfo-rodamina B à 4 °C durante 10 minutos. **C:** Tratamento com ATP 5 mM durante 10 minutos e carboxifluoresceína durante 10 minutos à 37 °C (controle positivo). **D:** Tratamento com ATP 5 mM à 37 °C durante 10 minutos, e incubação com ATP 5 mM e carboxifluoresceína à 4 °C durante 10 minutos. n = 2 experimentos independentes.

Resultados

Posteriormente, idealizamos outro experimento para demonstrar a passagem do Lucifer Yellow através de um poro na membrana. Para este experimento nos baseamos na seguinte idéia: se os corantes aniônicos estão entrando por um canal, provavelmente ele seja capaz de sair pelo mesmo caminho. Neste sentido, decidimos fazer dois tratamentos com ATP, o primeiro para que o corante entre na célula e o segundo para que este corante saia do citoplasma.

Um problema que tivemos que enfrentar durante estes ensaios foi o fato, descrito por Lipman e col. em 1990, de que quando o corante aniônico entra no citoplasma é bombeado por transportadores de ânions até o interior de vesículas citoplasmáticas (LIPMAN e col., 1990). Por este motivo, o nosso experimento só deu certo quando pré-incubamos os macrófagos com probenecida 5 mM, um inibidor destes transportadores para ânions, que garantiu que o corante fique no citoplasma e possa sair da célula quando o canal é novamente aberto.

Como pode ser observado na Figura 49, macrófagos carregados com Lucifer Yellow por um primeiro tratamento com ATP ficam vazios deste corante se são tratados novamente com a mesma concentração de ATP durante o mesmo período de tempo, à 37 °C.

Nos detalhes da Figura 49 (Figura 49 E e F) pode ver-se a diferença na localização citoplasmática do corante aniônico: enquanto nas células não tratadas com probenecida observa-se o corante dentro das vesículas, nas células tratadas com o inibidor dos transportadores aniônicos o corante encontra-se livre no citoplasma, disponível para difundir através do poro que o ATP abrirá novamente na membrana plasmática.

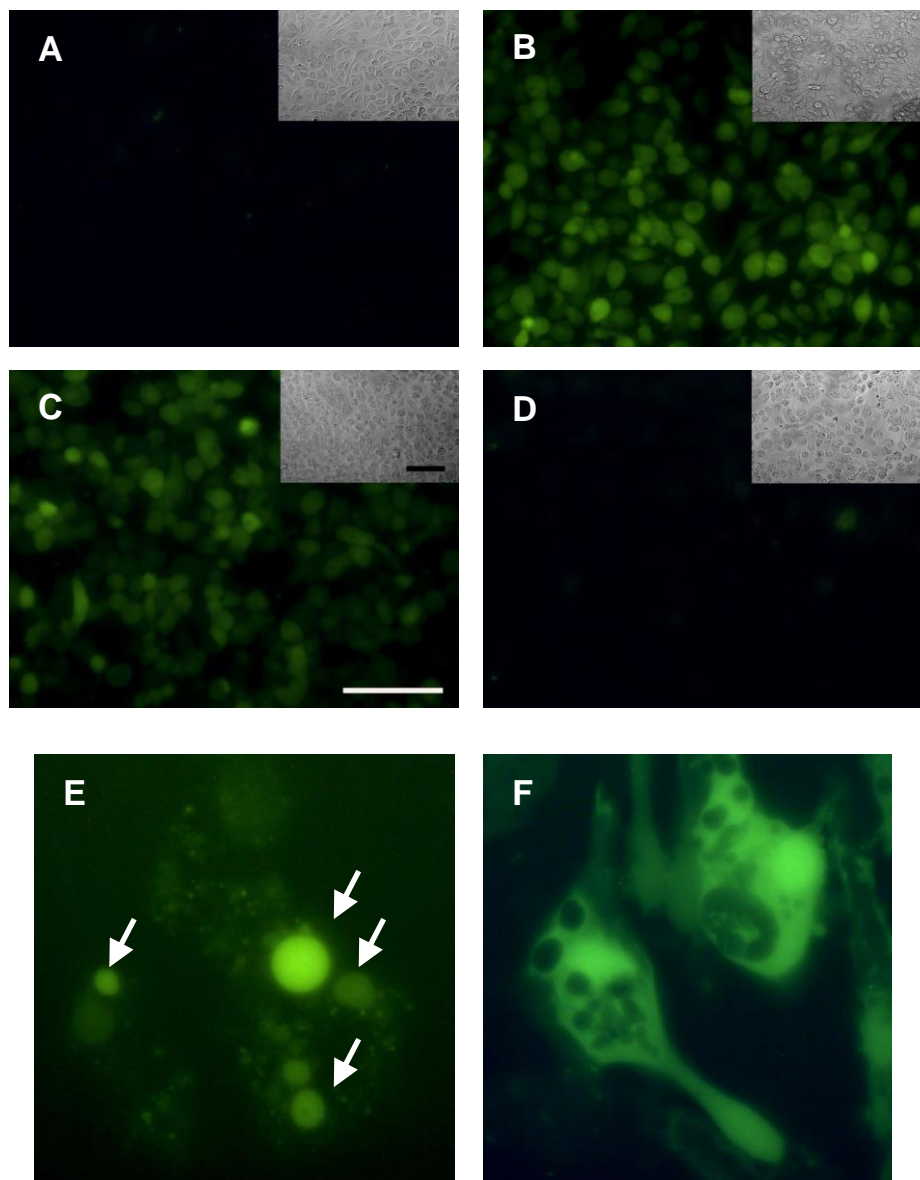


Figura 49 Experimentos de entrada e saída de Lucifer Yellow através do poro aberto pelo ATP associado ao receptor P2X₇ em macrófagos de camundongo.

A: Macrófagos tratados com Lucifer Yellow durante 20 minutos. **B:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de Lucifer Yellow durante 10 minutos. **C:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de Lucifer Yellow durante 10 minutos, e mantidas mais 10 minutos até o momento de tirar a foto. **D:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de Lucifer Yellow durante 10 minutos, lavadas e tratadas novamente com ATP 5 mM durante 10 minutos mais. **E:** Detalhe das células tratadas com ATP 5 mM e Lucifer Yellow sem probenecida (as setas indicam as vesículas citoplasmáticas contendo o corante). **F:** Detalhe das células tratadas com ATP 5 mM na presença de probenecida. Todos os experimentos foram feitos em solução externa padrão à 37 °C. As barras equivalem ambas a 100 µm. n = 3 experimentos independentes. Em todos os casos exceto E as células forma pré-incubadas com probenecida 5 mM por 30 minutos e os tratamentos foram feitos também na presença desta droga na mesma concentração.

Resultados

O mesmo experimento foi realizado com um corante citoplasmático catiônico, a sulfo-rodamina B. Os macrófagos de camundongo foram incubados ou não com ATP 5 mM durante 10 minutos na presença da sulfo-rodamina B. As células foram fotografadas para comprovar que no caso do tratamento com ATP o corante entrou e na ausência do ATP o corante não entrou (Figura 50 A e B). Posteriormente as células tratadas com ATP com o corante fluorescente no citoplasma foram novamente incubadas ou não com ATP 5 mM por outros 10 minutos (Figura 50 C e D). Em nenhum destes dois casos o corante saiu da célula.

No caso da sulfo-rodamina B este corante não difundiu do citoplasma da célula mesmo após 30 minutos de tratamento com ATP 5 mM. O tratamento com saponina 1 % permitiu a saída da sulfo-rodamina B da célula, mostrando que a permanência dentro da célula no caso do tratamento com ATPe não se deve à ligação deste corante com algum componente do citoplasma.

Estes experimentos nos indicam que enquanto os corantes aniônicos fluorescentes entram e saem da célula através de um poro aberto na membrana da célula pela presença do ATPe (possivelmente o poro Z), os corantes catiônicos utilizam outro mecanismo, até agora desconhecido.

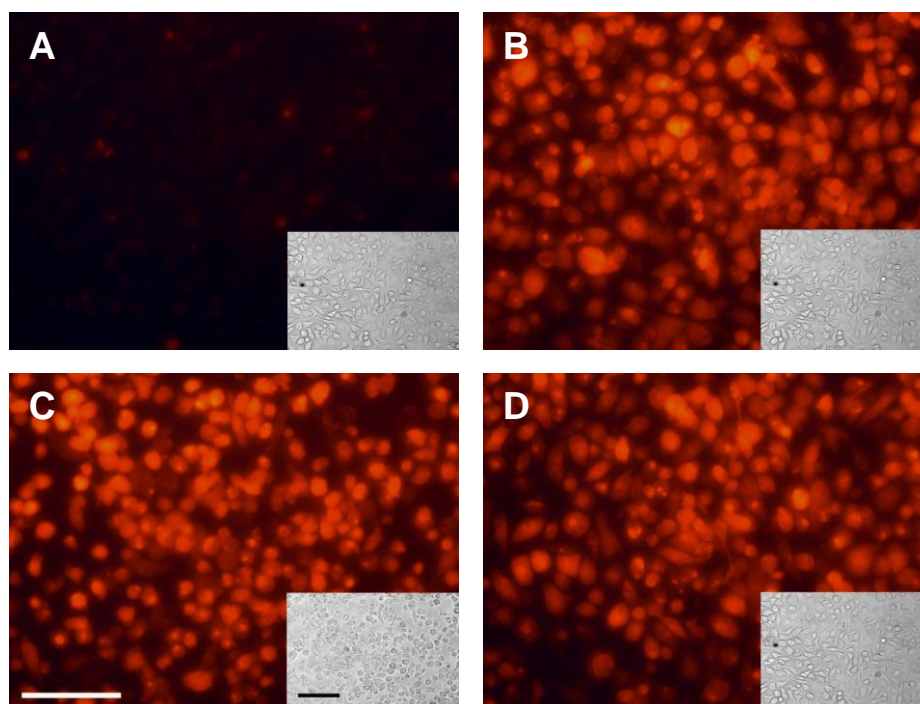


Figura 50 Ensaio de entrada e saída de sulfo-rodamina B através do poro aberto pelo ATP associado ao receptor $P2X_7$ em macrófagos de camundongo.

A: Macrófagos tratados com sulfo-rodamina B durante 20 minutos. **B:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de sulfo-rodamina B durante 10 minutos. **C:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de sulfo-rodamina B durante 10 minutos, e mantidas mais 10 minutos até o momento de tirar a foto. **D:** Macrófagos tratados com ATP 5 mM na presença de sulfo-rodamina B durante 10 minutos, lavadas e tratadas novamente com ATP 5 mM durante 10 minutos mais. Todos os experimentos foram feitos em solução externa padrão à 37 °C. As barras equivalem ambas a 100µm. n = 2 experimentos independentes.

Resultados

Recentemente, dois grupos de pesquisadores relataram que o receptor P2X₇ é capaz de formar heterodímeros com P2X₄ na membrana da célula (GUO e col., 2007) e que as correntes do receptor P2X₇ podem ser afetadas pela presença deste outro receptor (BRONE e col., 2007).

Pensando na possibilidade de que os processos de captação de corantes fluorescentes induzidos por ATPe sejam influenciados pela presença do receptor P2X₄ realizamos uma co-transfecção transitória nas células HEK, expressando o cDNA do receptor P2X₄ junto com o cDNA do receptor P2X₇ (HEK-P2X₇-P2X₄). Talvez para o correto funcionamento do poro Z seja necessária a expressão do P2X₄.

As células HEK-P2X₇-P2X₄ foram tratadas com ATPe 5 mM durante 10 e 20 minutos na presença de corantes catiônicos (etídeo) e aniônicos (Lucifer Yellow). Porém, não obtivemos resultados diferentes do que os obtidos com as HEK-P2X₇: nem as células HEK-P2X₄ nem as células HEK-P2X₇-P2X₄ permitiram a entrada de corantes aniônicos (dados não mostrados).

4.6 O PROBLEMA DA ENTRADA DOS CORANTES FLUORESCENTES CATIÔNICOS

Ao longo desta tese de doutorado desenvolvemos a hipótese de que os corantes fluorescentes aniônicos estariam entrando na célula difundindo através de um poro aberto na membrana pela ação do ATPe. Mas, por onde entram na célula os corantes catiônicos, cuja captura também é estimulada pelo ATPe e depende do receptor P2X₇?

Resultados

Pensamos na possibilidade de que os corantes catiônicos estejam sendo endocitados. De fato, quando as células são incubadas com altas concentrações de corante em ausência de ATPe, observa-se formação de vesículas fluorescentes perto da membrana plasmática. De alguma maneira o ATP poderia estar estimulando a passagem do corante destas vesículas até o citoplasma.

Desenhemos então um experimento que consistiu em incubar as células com 20 mM de sulfo-rodamina B durante 10 minutos. Depois de lavar o corante e observar a formação de vesículas citoplasmáticas, tratamos as células com ATP 5 mM durante 10 minutos. Nestas condições não observamos passagem de corante das vesículas ao citoplasma (Figura 51).

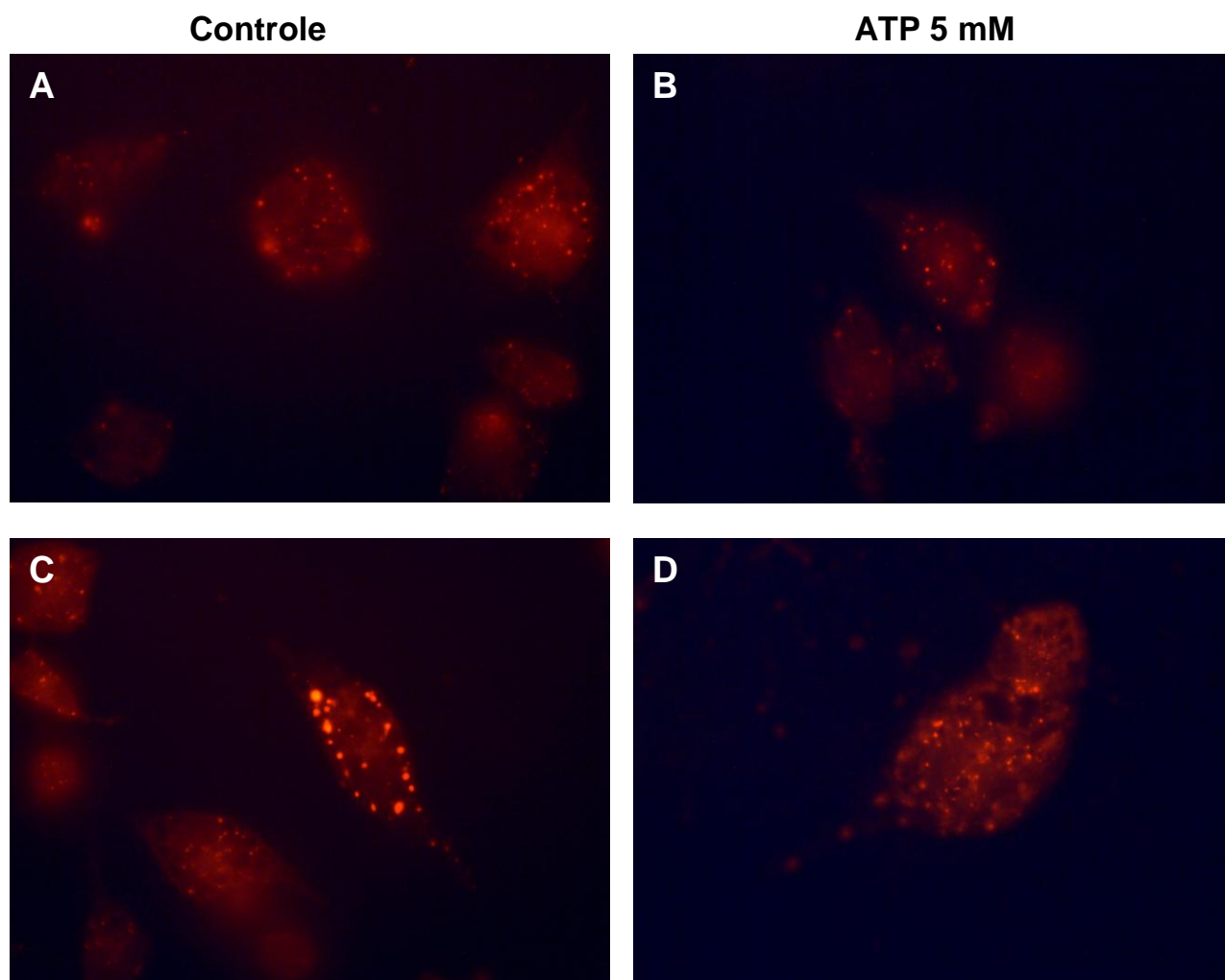


Figura 51 Efeito do ATPe nas vesículas endocíticas formadas pela incubação dos macrófagos de camundongo com sulfo-rodamina B

A e C: macrófagos incubados durante 10 minutos na presença de sulfo-rodamina B 20 mM. **B e D:** tratamento dos macrófagos apresentando as vesículas com sulfo-rodamina B no citoplasma com ATP 5 mM durante 10 minutos. Todos os tratamentos foram realizados à 37 °C. n = 1 experimento.

Resultados

Enquanto esta tese estava sendo desenvolvida, experimentos de transdução intracelular de sinais nos levaram ao encontro de uma droga que provoca nas células captação de etídeo mas não de Lucifer Yellow. Esta droga é um inibidor de lipoxigenase chamado NDGA (do inglês *Nordihydroguaiaretic acid*), que também tem sido descrito como um inibidor do transporte vesicular intracelular (ARTEAGA e col., 2005). A incubação do NDGA na concentração de 50 μ M induz a entrada de etídeo (Figura 52 A e B) e YO-PRO-1, mas não de Lucifer Yellow (não mostrado).

Experimentos de medições do cálcio intracelular mostraram que a incubação dos macrófagos nas mesmas condições nas quais o NDGA induz entrada de etídeo esta droga não produz aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático (Figura 52 C).

O fato de que o NDGA estimule a entrada de corantes fluorescentes mas não de ânions e de que o mesmo tratamento não deixe entrar Ca^{2+} no citoplasma, mostra que é possível que exista um mecanismo de entrada para os corantes catiônicos distinto à passagem através de um poro. O processo de captação de corantes pelo tratamento dos macrófagos com NDGA ainda está sendo estudado no laboratório e pode tratar-se ou não de um mecanismo similar ao estimulado pelo ATPe. Em camundongos $P2X_7^{-/-}$ o tratamento com NDGA continua induzindo entrada de etídeo nas células (dados não mostrados), o que sugere que se a via de entrada do etídeo ativada por esta droga é a mesma que a estimulada pelo ATPe, o NDGA a está ativando em um nível da cascata de sinalização posterior à ativação do receptor $P2X_7$.

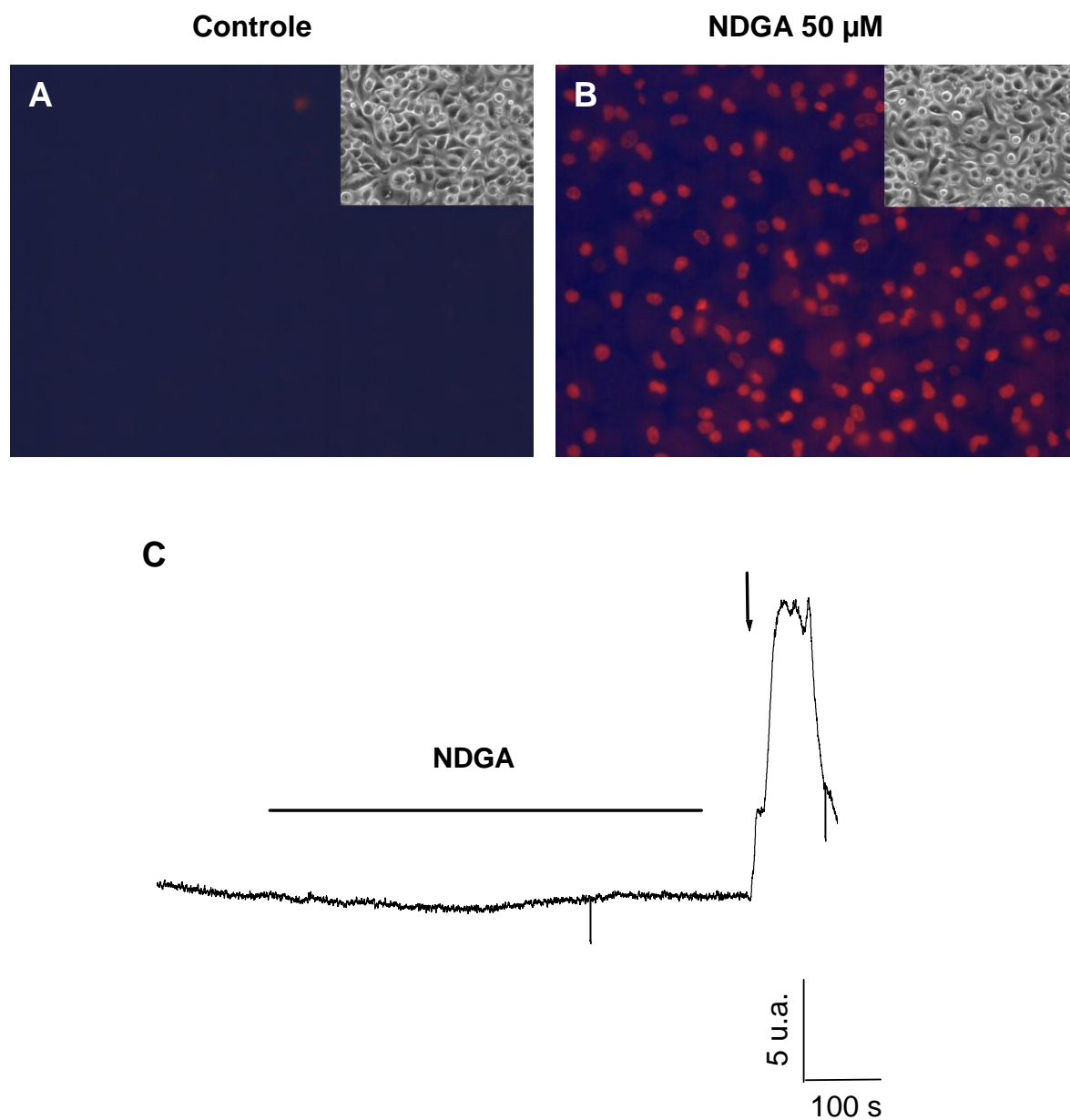


Figura 52 O NDGA estimula entrada de etídeo nos macrófagos sem provocar entrada do cálcio extracelular

Macrófagos intraperitoneais de camundongo. A e B: ensaios de captação de etídeo realizados por Hercules Antonio da Silva. A: células incubadas com brometo de etídeo. B: células incubadas com brometo de etídeo e NDGA 50 μM. C: medição dos níveis citoplasmáticos de cálcio durante a perfusão das células com NDGA 50 μM. Todos os tratamentos foram feitos durante 10 minutos à 37 °C. Experimentos representativos de pelo menos 5 experimentos independentes.

5 Discussão

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A estimulação do receptor P2X₇ pelo ATPe provoca vários efeitos no sistema imune, como a liberação de IL-1 β e IL-18 em macrófagos e diferenciação e morte em diversos tipos celulares. Entre os fenômenos que a ativação deste receptor desencadeia nas células encontra-se o que tem sido chamado de “permeabilização da membrana plasmática”, descrito na literatura como uma característica particular do receptor P2X₇ e que consiste na abertura de poros ou canais inespecíficos na membrana que deixam passar moléculas de até 900 Da. Ainda não está claro qual é a funcionalidade deste fenômeno na fisiologia da célula.

A “permeabilização” da membrana celular induzida pelo ATPe via receptor P2X₇, medida como a entrada de corantes fluorescentes na célula, tem merecido grande atenção nos últimos anos e vários grupos de pesquisa tentaram elucidar suas características biofísicas, farmacológicas e bioquímicas, bem como sua identidade molecular. Utilizando corantes fluorescentes de diversas propriedades foi sempre dado por entendido que todos eles entrariam por algum tipo de poro aberto na membrana plasmática pela ação do ATPe e foi pesquisado seu funcionamento em células nativas e em sistemas heterólogos, buscando uma relação entre a entrada destes corantes e a liberação de interleucinas, diversas cascatas intracelulares e a morte celular.

Ao longo desta tese de doutorado realizamos diferentes ensaios, abordando o fenômeno associado à ativação do receptor P2X₇ desde diferentes ângulos experimentais e comparando os resultados obtidos. Utilizamos registros eletrofisiológicos, medições dos níveis citoplasmáticos de cálcio e captação de diversos tipos de corantes, tanto em células que expressam endogenamente o

receptor quanto em células transfectadas com seu cDNA. A principal contribuição desta tese de doutorado acreditamos seja a descoberta de que nem todos os corantes fluorescentes utilizados historicamente na pesquisa do receptor P2X₇ entram na célula pelo mesmo mecanismo, e isto leva necessariamente a uma reavaliação das conclusões feitas a partir de todos os dados obtidos até o momento.

Propomos que o termo “permeabilização da membrana plasmática” deve ser abandonado, pois o fenômeno induzido pelo ATPe não se trata simplesmente da formação de poros na membrana, senão que, além desta, alguns tipos de corantes podem estar entrando no citoplasma por outra via que ainda não está totalmente esclarecida. Isso implica na necessidade de revisão de muitos resultados até agora publicados na literatura que avaliavam apenas um dos fenômenos associados ao receptor P2X₇, geralmente a captura de etídeo ou Yo-Pro-1, supondo que com isso se analisava o “poro de permeabilização”. Com isso, novas perspectivas se abrem na interpretação do papel desses receptores no sistema imune e na elaboração de estratégias farmacológicas para imunomodulação baseada em receptores P2.

5.2 O Poro Z

O canal inespecífico registrado em *cell-attached* na presença de ATPe foi chamado de poro Z e acreditou-se ser o canal pelo qual os corantes fluorescentes e outras moléculas entram na célula após ativação do receptor P2X₇. Esta correlação foi feita a partir do fato de que este canal é inespecífico, pois seu potencial de reversão é muito próximo de zero, e de experimentos que mostram que através deste canal é capaz de passar íons orgânicos relativamente grandes, como Tris⁺, NMDG⁺ e Glutamato⁻ (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997). Porém, o maior

Discussão

destes íons orgânicos, o NMDG⁺, tem um peso molecular de 195 Da, muito inferior aos 900 Da que a literatura menciona como peso molecular máximo capaz de atravessar o poro da membrana aberto pelo ATPe, obtido a partir de ensaios de captação de corante fluorescentes realizados pela equipe de Silverstein em 1987 (STEINBERG e col., 1987). No trabalho que deu origem à idéia de que o limite de peso molecular capaz de atravessar o poro ativado pelo ATPe os autores avaliam a entrada de diferentes corantes fluorescentes aniônicos em macrófagos J774. Eles observam que a carboxifluoresceína (376 Da), o Lucifer Yellow (457 Da) e o FURA-2 (831 Da) são capazes de difundir no interior da célula, enquanto Azul de Evans (961 Da) e Azul de Tripán (961 da) não (STEINBERG e col., 1987). Os pesos moleculares entre parênteses são os informados pelos autores no artigo, mas referem-se aos corantes fluorescentes mais os contra íons associados na forma salina. Se considerarmos que estes corantes serão dissolvidos em água e que a espécie que atravessa o poro, como os próprios pesquisadores descrevem, é só o ânion, devemos analisar o peso molecular individual da forma aniônica. Fazendo isto teremos que a maior molécula testada capaz de difundir através do poro será o FURA-2 com 632 Da, enquanto que o Azul de Evans e o Azul de Tripán, não conseguem entrar na célula com 869 Da cada um. Isto supõe que devemos reavaliar o que todos os autores, incluindo nós mesmos até hoje, considerávamos uma verdade.

Continua sem ser resolvida a questão que diz respeito à relação entre o que passa pelo poro Z registrado eletrofisiologicamente e aos corantes fluorescentes que entram na célula. Neste contexto, é de relevância destacar as observações de Jiang e colaboradores. Estes autores sugerem que poderia existir mais de uma via de entrada para as moléculas orgânicas durante o tratamento com ATPe (JIANG e col.,

2005). Em células HEK-293 transfectadas com P2X₇ estes autores observaram que o aumento da permeabilidade ao NMDG, induzido pelo ATPe é anulado em presença de concentrações normais de Na⁺ extracelular, enquanto a captação de YO-PRO-1 acontece normalmente nestas mesmas condições. No mesmo sentido, os autores mostram que retirando a porção rica em cisteínas na região extracelular da proteína P2X₇ anula-se a permeabilidade ao NMDG sem afetar a entrada de YO-PRO-1.

Devemos notar no entanto que a permeabilidade ao NMDG⁺ foi medida por esta equipe através de registros eletrofisiológicos na conformação *whole-cell*, enquanto que os poros Z foram originalmente obtidos em *cell-attached* e a captura de YO-PRO foi realizada em células livres.

Até o momento o único experimento que correlaciona o registro de canal unitário do poro Z com a entrada de corantes foi feito por Faria e colaboradores, utilizando o corante fluorescente aniônico Lucifer Yellow (FARIA e col., 2004). Este grupo de pesquisadores observa a passagem do corante desde a pipeta de registro até célula através do *patch* de membrana no selo, enquanto registra a abertura de um canal de 423 ± 19 pS. Os mesmos autores utilizam entrada de etídeo como indicação de abertura do poro mas não testam a entrada deste corante na mesma condição na qual é testada a entrada do corante aniônico: no trabalho a entrada de etídeo é observada colocando este corante no banho, não na pipeta do selo (FARIA e col., 2004).

Por outro lado, cabe destacar que não encontramos na literatura nenhum estudo relatando canais unitários dos poros Z em células transfectadas com o cDNA do receptor P2X₇. Células HEK-293 e astrocitomas 1321N1 têm sido as células utilizadas com maior frequência e em todos os casos, quando se relata a presença

de correntes elétricas em resposta ao ATPe, fala-se de correntes registradas em *whole-cell*, nunca em *cell-attached*.

Em 1996 Surprenant e colaboradores clonaram pela primeira vez o receptor P2X₇ a partir de células do sistema nervoso de rato e caracterizaram os fenômenos relacionados com a expressão deste receptor em células HEK-293 (HUANG e col., 1993). Eles descreveram a captura de YO-PRO-1 e correntes catiônicas de entrada em *whole-cell*. Segundo estes pesquisadores a contínua estimulação (alguns segundos) das células HEK-P2X₇ leva a um aumento na permeabilidade, pois as correntes elétricas são inicialmente devidas à entrada só de pequenos cátions inorgânicos mas alguns segundos após continua estimulação com o agonista (10-20 s) pode ser evidenciada a passagem de NMDG⁺ (VIRGINIO e col., 1999a). Porém, um fato destacável é que, mesmo nas condições nas quais os autores observam entrada de cátions orgânicos grandes, a permeabilidade para cloreto continua sendo baixa, o que levou estes pesquisadores a concluir que este efeito, chamado por eles de “alargamento do poro” é um fenômeno seletivo para cátions. Mesmo assim, e sem relato algum sobre a captura ou não de corantes aniônicos, esse fenômeno foi identificado como correspondendo à “permeabilização induzida por ATPe” previamente atribuída ao receptor P2Z, um receptor até então caracterizado apenas funcional- e farmacologicamente, antes da era da clonagem dos receptores P2 (RASSENDREN e col., 1997; SURPRENANT e col., 1996).

Desde então, vários outros grupos de pesquisa têm utilizado sistemas de expressão heteróloga para estudar os fenômenos associados ao receptor P2X₇ mas em todos os casos as correntes catiônicas em *whole-cell* e a entrada de corantes catiônicos tem sido indicadas como evidências do correto funcionamento do sistema de expressão.

Discussão

A idéia do “alargamento do poro” ou “dilatação do poro” implica na noção de que o próprio receptor P2X₇ é o responsável pela formação do poro Z, idéia que recentemente foi abandonada pelo mesmo grupo de pesquisadores que a lançou, favorecendo agora a idéia de que o poro de permeabilização seria composto de moléculas distintas do próprio P2X₇ (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b).

Já em 1998 nossa equipe tinha proposto que os poros Z correspondiam a uma entidade molecular diferente do canal catiônico formado pelo receptor P2X₇ (PERSECHINI e col., 1998). Mais de uma década depois vários grupos de pesquisa aceitam a idéia de que a panexina-1 seria a molécula formadora de poros associada ao receptor P2X₇ de alguma maneira ainda não esclarecida (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006a; DI VIRGILIO, 2007a; LOCOVEI e col., 2007). Reforçando esta idéia, Riedel e colaboradores observaram recentemente, em experimentos eletrofisiológicos na conformação *outside-out* realizados em células transfectadas com o receptor P2X₇, que o canal de ~8 pS não aumenta a permeabilidade a cátions orgânicos, mesmo depois de mantida estimulação com ATPe. Os autores observam que cátions como Tris⁺ e NMDG⁺ são capazes de atravessar o canal formado pelo receptor P2X₇ e que a permeabilidade a estas moléculas permanece constante após mais de um minuto de estimulação com o agonista. Este fato leva aos pesquisadores concluir que moléculas orgânicas grandes como o etídeo não entram por este canal, descartando a hipótese de dilatação do poro e sugerindo a existência de outra molécula (RIEDEL e col., 2007).

Em nossas condições experimentais, na conformação *cell-attached*, registramos um canal de 440 ± 16 pS em macrófagos de camundongo estimulados com ATP 1 mM. Este canal, que chamamos de poro Z, apresentou dependência de voltagem, já que só foi registrado em condições de despolarização da membrana, e

de temperatura, já que não foi possível registrar atividade do canal a menos de ~ 30 °C. A curva corrente vs voltagem mostrou que o potencial de reversão é perto de 0 mV, o que é compatível com a idéia de um canal inespecífico (Figura 23 e Figura 24). Estes dados estão de acordo com o que nosso grupo (COUTINHO-SILVA e PERSECHINI, 1997) e outros (FARIA e col., 2004) descreveram anteriormente.

Apesar da alta freqüência de registros positivos para os poros Z em macrófagos (32 em 40), em experimentos equivalentes em células HEK-P2X₇ não conseguimos registrar atividade de nenhum canal em nenhuma das 23 células estudadas (Figura 38). Como estas células apresentam receptores P2X₇ funcionais, concluímos que os poros Z não estão presentes neste tipo celular, que a presença do receptor P2X₇ não é suficiente para a formação dos poros Z e que a presença desses poros não é uma condição necessária para o fenômeno de captura de corantes catiônicos.

Experimentos de captação de corantes fluorescentes em células HEK-P2X₇ mostraram que o estímulo destas células pelo ATPe induz somente entrada de corantes catiônicos, em nossas condições experimentais não registramos a entrada de corantes aniônicos (Figura 40). Este fato junto com a ausência de poros Z nestas células sugere uma relação entre o poro Z e os corantes aniônicos.

5.3 EFEITOS DOS ÍONS EXTRACELULARES NOS FENÔMENOS ASSOCIADOS AO RECEPTOR P2X₇

A composição do meio extracelular no qual acontece o estímulo com ATPe tem merecido atenção particular no estudo do receptor P2X₇. Diferentes íons tem sido relatados como reguladores dos efeitos de ATPe sobre o receptor P2X₇.

Vários autores postularam que os cátions divalentes modificam a atividade do receptor P2X₇ devido à capacidade de seqüestrar ATP⁴⁻, forma ligante do ATPe.

Virginio e colaboradores publicaram que os cátions extracelulares Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ inibem, em ordem decrescente, o efeito do ATPe e do BzATP sobre a corrente registrada em *whole-cell* e a entrada de YO-PRO-1 em células HEK transfectadas com o receptor P2X₇ de rato (VIRGINIO e col., 1997). Estes autores observaram também que a presença de 10 mM de Mg²⁺ e/ou de Ca²⁺ na mesma concentração no meio interno não teve nenhum efeito sobre as correntes registradas em *whole-cell* (VIRGINIO e col., 1997). Porém, eles não utilizam uma condição de ausência total de divalentes pois não adicionam quelantes como EDTA nem EGTA no meio externo em nenhum experimento. Desta maneira, não é possível distinguir se o efeito destes cátions se deve ao seqüestro do ATPe adicionado, diminuindo assim a quantidade de ATP⁴⁻ disponível ou se estes íons afetam de alguma maneira os mecanimos ativados pelo receptor P2X₇.

Outros autores mostraram que a diminuição das concentrações extracelulares de Ca²⁺ e Mg²⁺, aumenta a captação de YO-PRO-1 (MICHEL e col., 1999), e as correntes registradas em *whole-cell* em resposta ao ATP em células HEK-P2X₇ humano (CHESSELL e col., 1998a). Também neste caso os autores não experimentam a condição ausência total de divalentes.

Em osteoclastos de rato que expressam endogenamente o receptor P2X₇ também foi observado um aumento nas correntes catiônicas induzidas pelo ATPe em ausência de Ca²⁺ e de Mg²⁺, utilizando uma solução com 0,5 mM de EGTA para quelar estes cations (NAEMSCH e col., 2001).

Por outro lado, o Ca^{2+} externo parece ter o efeito contrário sobre a atividade do receptor P2X_7 se olharmos os dados da literatura relacionados com outros efeitos induzidos pelo ATPe via este receptor.

Courageot e colaboradores mostraram que, em timócitos de camundongo, a apoptose mediada pelo receptor P2X_7 em resposta ao ATPe, depende da presença de Ca^{2+} extracelular, mostrando que a apoptose é significativamente diminuída na presença de uma solução extracelular contendo 150 μM de EGTA (COURAGEOT e col., 2004).

MacKenzie e colaboradores reportaram que a formação dos *blebs* de membrana, observada tipicamente na presença de ATPe, e a exposição de fosfatidil serina (PS), característica da morte celular, dependem do Ca^{2+} extracelular. Ambos fenômenos diminuem significativamente quando são induzidos pelo ATPe em uma solução extracelular contendo EGTA 10 mM (MACKENZIE e col., 2001).

Juntando os dados da literatura apresentado aqui observamos que os cátions divalentes no meio externo inibem ou diminuem a entrada de corantes catiônicos e as correntes catiônicas de entrada registradas em *whole-cell* enquanto que parecem ser necessários para a formação dos *blebs* de membrana e a apoptose ativados pela presença de ATPe via receptor P2X_7 ,

Em nossas condições experimentais, observamos um aumento na entrada de etídeo estimulada por exposição ao ATP 3 mM na solução externa com EDTA 10 mM quando comparado com o mesmo tratamento realizado nos macrófagos em solução externa padrão (Figura 32). Estes dados coincidem com o relatado pela maioria dos pesquisadores em relação à entrada de corantes catiônicos em ausência de cátions divalentes no meio externo. Por outro lado, observamos uma diminuição na probabilidade de abertura do poro Z registrado eletrofisiologicamente

Discussão

na solução externa com EDTA 10 mM (Figura 28), e uma diminuição também na entrada de Lucifer Yellow induzida por o tratamento com ATP 5 mM na mesma solução, quando comparado aos resultados obtidos na solução padrão (Figura 30 e Figura 31).

Já nossa equipe tinha observado uma diminuição na entrada do corante aniônico Lucifer Yellow em macrófagos tratados com ATP 5 mM em uma solução com EGTA 10 mM quando comparado com o mesmo tratamento feito em uma solução com 1 mM de Ca^{2+} (ALVES e col., 1996).

Estes resultados mostram que a entrada de corantes aniônicos e a abertura dos poros Z registrados eletrofisiologicamente se comportam de maneira similar frente às variações do Ca^{2+} e oposta ao que acontece com a entrada de corantes catiônicos. Isto sugere que as vias pelas quais estes dois tipos de corantes estão entrando na célula em resposta ao ATPe são diferentes ou que se trata de um mesmo mecanismo regulado diferencialmente pelo Ca^{2+} e/ou o Mg^{2+} para os dois tipos de corantes.

É importante chamar a atenção para o fato de que a entrada de corantes aniônicos e o comportamento cinético dos poros Z em situações de baixa ou nula concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} externo se correlacionam com as observações feitas por diversos grupos de pesquisadores sobre os efeitos destes cátions na morte celular induzida pelo ATPe via P2X_7 . Futuramente, os efeitos de inibidores de morte celular deverão ser avaliados separadamente para verificar seus efeitos sobre a captação de corantes catiônicos e aniônicos separadamente, como também sua influência na cinética do poro Z. Aparece como uma hipótese provável a idéia de que o poro Z e captação de corantes aniônicos, antes que a entrada de corantes catiônicos, estejam relacionados diretamente com a apoptose. Isto implicaria uma

revisão de grande parte da literatura, onde encontramos a utilização do termo “permeabilização da membrana plasmática” para referir-se a entrada de etídeo ou YO-PRO-1, e a entrada destes mesmos corantes como evidência de abertura do poro Z. Assim, quando uma equipe de pesquisadores declara que a apoptose de um determinado tipo celular está ou não relacionada com a “permeabilização da membrana plasmática” na verdade estão falando do fenômeno de captação de corantes fluorescentes catiônicos, corantes que provavelmente não estejam entrando na célula através de um poro, como discutiremos mais adiante.

Finalmente, vale a pena ressaltar a dificuldade encontrada em nossos experimentos e nos de outros pesquisadores em separar os efeitos do Mg^{2+} extracelular com os do Ca^{2+} extracelular. Mais experimentos deverão ser feitos no futuro manipulando as concentrações destes cátions junto com a presença de EDTA e EGTA em concentrações variáveis para poder separar os efeitos particulares destes dois íons extracelulares no funcionamento do receptor $P2X_7$.

Os efeitos do Na^+ sobre a atividade do receptor $P2X_7$ também têm merecido atenção mas os resultados são menos controversos: a maioria dos pesquisadores encontrou que a ausência do Na^+ provoca um aumento nos efeitos do ATPe mediados pelo receptor $P2X_7$.

Riedel e colaboradores mostraram recentemente através de registros eletrofisiológicos do canal unitário de ~8 pS associado ao receptor $P2X_7$ que quando a estimulação com ATPe acontece em uma solução na qual o Na^+ é substituído por cátions orgânicos ou K^+ , aumenta a probabilidade de abertura e o tempo médio de abertura deste canal, se comparado com o obtido em solução com concentrações fisiológicas de Na^+ (RIEDEL e col., 2007). Estes autores sugerem que os efeitos do Na^+ sobre a atividade do receptor $P2X_7$ devem-se a uma interação alostérica entre

este íon e uma região de ligação ao Na⁺ dependente da voltagem no receptor. A despolarização provocada pelo ATP através da ativação do receptor, diminuiria a afinidade pelo Na⁺ e permitiria um aumento na eficácia de ativação do ATP⁴⁻ (RIEDEL e col., 2007).

Em células NG108-15 (híbrido de neuroblastoma de camundongo e glioma de rato), Watano e colaboradores observaram que a substituição de Na⁺ por NMDG⁺ aumenta a resposta ao ATPe, medida através das variações do Ca²⁺ citoplasmático (WATANO e col., 2002). A explicação para este fenômeno sugerida pelos autores é que o Na⁺ se liga em algum sítio do receptor P2X₇ e modifica sua atividade. Já em 1992 Wiley e colaboradores tinham mostrado um aumento na entrada de Ca²⁺ induzida pelo ATPe via receptor P2X₇ quando diminuída a concentração extracelular de Na⁺, utilizando como modelo linfócitos humanos (WILEY e col., 1992).

Li e colaboradores mostraram o efeito do Na⁺ sobre as correntes registradas em *whole-cell* em resposta ao ATPe. Estes autores observaram um aumento nas correntes catiônicas de entrada em células da glândula parótida de camundongo, quando a concentração extracelular de Na⁺ é diminuída (LI e col., 2005).

Sobre os efeitos do Na⁺ extracelular na captação de corantes, Gudipaty e colaboradores, utilizando um modelo de macrófagos humanos, registram um aumento na entrada de YO-PRO-1 induzida por ATPe quando substituem o NaCl externo por KCl (GUDIPATY e col., 2001)

Em nossos experimentos eletrofisiológicos observamos um aumento na probabilidade de abertura dos poros Z induzidos por ATPe na solução externa com baixas concentrações de Na⁺ quando comparado com a solução padrão (Tabela 5 e Figura 29). Nos ensaios de captação de corantes não constatamos nenhuma diferença na entrada de Lucifer Yellow nem de etídeo estimulada por ATPe na

Discussão

solução com baixas concentrações de Na^+ (Figura 30 a 32). O dado da eletrofisiologia é coincidente com os dados encontrados na literatura. Tendo em vista os resultados observados com a solução de EDTA, esperávamos observar uma correlação maior entre a entrada de Lucifer Yellow e os registros eletrofisiológicos. É possível que nossas condições experimentais não tenham permitido observar diferenças na entrada de corantes fluorescentes. No futuro, mais experimentos precisam ser feitos para aprofundar esta questão.

Poucas referências foram encontradas na literatura sobre o papel do Cl^- extracelular na regulação das funções do receptor P2X_7 .

Em 1999 Michel e colaboradores observaram que a substituição de Cl^- extracelular por glutamato produz um aumento nas correntes de entrada registradas em *whole-cell* em células HEK- P2X_7 humano tratadas com ATPe. Neste trabalho, os autores pesquisam o poder inibitório sobre as correntes induzidas pelo ATPe e estabelecem um ordem: brometo > iodeto > cloreto > glutamato > aspartato (MICHEL e col., 1999). Posteriormente Li e colaboradores também relatam inibição das correntes catiônicas de entrada induzidas pelo ATPe na presença de Cl^- esta vez em células HEK transfectadas com o receptor P2X_7 humano, de camundongo e células da parótida de rato (LI e col., 2005). Estes últimos pesquisadores sugerem que no receptor P2X_7 existiria também um sitio de união ao Cl^- , que regularia o funcionamento do canal.

O mesmo efeito do Cl^- foi observado por Watano e colaboradores sobre o aumento do Ca^{2+} citoplasmático estimulado pelo ATPe através do receptor P2X_7 . Em experimentos com as células NG108-15 estes autores observam que a substituição do Cl^- extracelular por ácido aspártico ou ácido metassulfônico provoca um aumento maior nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em resposta ao ATPe quando comparado

com uma solução com Cl^- em concentrações fisiológicas. Isto não acontece quando o Cl^- é substituído por I^- ou Br^- , confirmando os resultados de Michel e col. sobre o poder inibitório destes outros ânions (WATANO e col., 2002).

Em macrófagos humanos a substituição de Cl^- por glutamato aumentou a captação do corante fluorescente catiônico YO-PRO-1. Os autores do trabalho sugerem que isto é devido à diminuição da afinidade de ATPe pelo receptor na presença destes íons (GUDIPATY e col., 2001). Estes pesquisadores, que também observaram aumento na entrada deste corante substituindo o Na^+ extracelular por K^+ , chamam a atenção para o fato de que a concentração iônica do meio que ativa o receptor é parecida com a composição intracelular: baixa concentração de Na^+ , alta concentração de K^+ e ânions orgânicos substituindo o Cl^- . Isso poderia estar relacionado com uma condição momentânea na qual uma célula vizinha explode e libera não somente o ATP intracelular como todo o conteúdo citoplasmático. Como este microambiente seria gerado só em situações de inflamação ou dano tissular, funcionaria como uma espécie de controle fisiológico da ativação do receptor P2X_7 (GUDIPATY e col., 2001).

Quando olhamos outros efeitos do ATPe mediados pelo receptor P2X_7 distintos à captação de corantes fluorescentes e à ativação das correntes catiônicas de entrada encontramos novamente dados contraditórios sobre o papel do Cl^- extracelular na regulação do receptor.

Coincidentemente com os dados eletrofisiológicos das correntes catiônicas de entrada, as variações citoplasmáticas de Ca^{2+} e a captação de corantes fluorescentes estimulados pelo ATPe, a liberação de $\text{IL-1}\beta$ mediada pela ativação do receptor P2X_7 também é aumentada quando o Cl^- extracelular é substituído por gluconato em macrófagos humanos e de camundongo (VERHOEF e col., 2005).

Contrariamente, Tsulimoto e colaboradores, trabalhando com células DT40 (linfócitos B de frango) transfectados com o receptor P2X₇ de humano observaram que a substituição de Cl⁻ por gluconato bloqueia a apoptose e a liberação de LDH induzida por ATPe (TSUKIMOTO e col., 2004). É interessante que neste mesmo trabalho os autores mostram que a ausência de Cl⁻ externo não bloqueia a entrada de etídeo nem a despolarização de membrana plasmática provocada pelo ATPe (TSUKIMOTO e col., 2004).

Posteriormente a mesma equipe de pesquisadores confirma este resultado mostrando que em células T do baço de rato a ausência de Cl⁻ externo inibe a apoptose mediada pelo receptor P2X₇ (TSUKIMOTO e col., 2006).

Resumindo os dados mencionados com relação ao Cl⁻ vemos que a literatura apresenta dois efeitos deste ânion sobre os fenômenos relacionados com a ativação do receptor P2X₇: por um lado a presença de Cl⁻ no meio externo inibe as correntes catiônicas de entrada, a captação de corantes fluorescentes catiônicos, o aumento do Ca²⁺ citoplasmático e a liberação de IL-1β, por outro lado o Cl⁻ é necessário para a indução de apoptose e a liberação de LDH.

Em relação aos efeitos do Cl⁻ externo, nossos dados de captação de corantes fluorescentes novamente encaixam-se como a peça que faltava do quebra-cabeça. Enquanto que a substituição do Cl⁻ externo por glutamato aumentou significativamente a entrada de etídeo em resposta ao ATPe quando comparado com a solução padrão, esta mesma situação praticamente inibiu a entrada de Lucifer Yellow (Figura 44). Estes dados voltam a alinhar a entrada de corantes aniônicos com a apoptose mediada pelo receptor P2X₇ e confirmam o processo de entrada de corantes catiônicos como um mecanismo diferente estimulado pelo ATPe. Falta saber o que acontece no caso dos poros Z, pois durante esta tese de doutorado não

foram realizados experimentos eletrofisiológicos em condições de baixa concentração extracelular de Cl^- .

5.4 A MOVIMENTAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR E OS PROCESSOS MEDIADOS PELO RECEPTOR P2X₇

O Ca^{2+} citoplasmático é um sinal fundamental para numerosos processos celulares, mas a sua participação no mecanismo de captação de corantes e de regulação de outros efeitos do ATPe via receptor P2X₇ não está bem esclarecida até o momento.

A ativação do receptor P2X₇ produz um aumento do Ca^{2+} citoplasmático devido à entrada deste íon pelo canal seletivo para cátions associado a este receptor.

Sun e colaboradores relataram que o tratamento de astrócitos tipo-2 de rato tratados com ATPe ou BzATP apresentavam um aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e que isto levava a ativação de PLD, de maneira dependente do Ca^{2+} externo e da presença do receptor P2X₇ (SUN e col., 1999). Já que os autores indicam que este tipo celular não expressa nenhum receptor P2Y, o aumento mantido do Ca^{2+} observado só pode vir do Ca^{2+} que entra na célula através do canal de 8 pS específico para cátions formado pelo próprio receptor P2X₇ (SUN e col., 1999).

Sun e colaboradores também mostraram o aumento de Ca^{2+} citoplasmático estimulado pelo tratamento com BzATP em osteoclastos de rato, indicando a dependência da concentração extracelular de Ca^{2+} e caracterizando farmacologicamente a participação do receptor P2X₇ neste fenômeno (NAEMSCH e col., 2001).

Discussão

Em células que possuem mais de um receptor P2, o aumento do Ca^{2+} citoplasmático em resposta ao tratamento com ATPe pode ter contribuições dos efeitos do agonista sobre diferentes classes de receptores. Tentando esclarecer o que acontece nestes casos Del Rey e colaboradores estudaram a contribuição dos diferentes receptores P2 e das diferentes fontes de Ca^{2+} no aumento citoplasmático de Ca^{2+} induzido pelo ATPe em macrófagos de camundongo. Utilizando camundongos $\text{P2Y}_2^{-/-}$, $\text{P2Y}_4^{-/-}$ e $\text{P2Y}_2/\text{P2Y}_4^{-/-}$ os pesquisadores concluíram que P2Y_2 é o único receptor acoplado a proteína G capaz de mediar a ativação a PLC- β pelo ATPe. A PLC- β catalisa a hidrólise de PIP_2 em DAG e IP_3 , o qual provoca a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, produzindo a elevação transitória deste cátion observada (DEL REY e col., 2006). A contribuição do Ca^{2+} externo para o pico transitório deveria-se aos receptores P2X_1 , P2X_4 e P2X_7 e a abertura de canais de Ca^{2+} que abrem quando aumentam as concentrações citoplasmáticas deste mesmo cátion, presentes na membrana do macrófago (Figura 53) (DEL REY e col., 2006).

Objeto de grande controversa é qual é a função deste aumento citoplasmático de Ca^{2+} nos efeitos mediados pelo receptor P2X_7 .

Poucos trabalhos pesquisam os efeitos do ATPe via receptor P2X_7 utilizando quelantes intracelulares do Ca^{2+} em conjunção com o controle das concentrações extracelulares. Uma das dificuldades experimentais encontradas no estudo do papel do Ca^{2+} citoplasmático de maneira independente da função deste íon no meio extracelular é que quando se utilizam quelantes extracelulares e o poro Z é ativado, estas moléculas poderiam estar difundindo ao interior da célula. O mesmo acontece no caso da utilização de quelantes intracelulares.

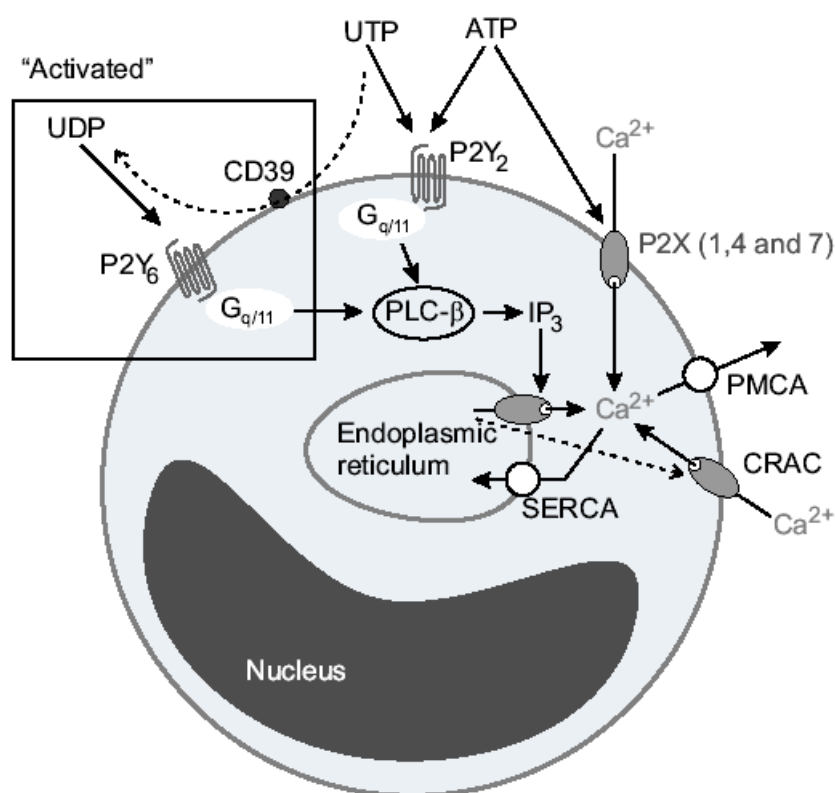


Figura 53 Contribuição dos receptores P2Y e P2X no aumento de cálcio citoplasmático observado no macrófago em resposta ao ATPe.

O ATP e o UTP são capazes de ativar o receptor P2Y₂ e o UDP ativa P2Y₆, os quais através da ativação da PLC e a geração de IP₃ provocam a liberação de Ca²⁺ do RE. Por outro lado a ativação do receptor P2X₁, P2X₄ e P2X₇ pelo ATPe provocam a entrada do Ca²⁺ externo através deles. O aumento do Ca²⁺ citoplasmático gerado estimula a saída de Ca²⁺ do RE e ativa canais de Ca²⁺ dependentes de Ca²⁺ através dos quais entra mais Ca²⁺ ao citoplasma. O Ca²⁺ é bombeado novamente para dentro do RE e para fora da célula por duas ATPases dependentes de Ca²⁺, SERCA e PMCA. Abreviaturas: PLC: fosfolipase C; RE: retículo endoplasmático, CRAC: canais de Ca²⁺ ativados por Ca²⁺ (do inglês *Ca²⁺-release-activated Ca²⁺*); SERCA: ATPase dependente de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (do inglês *sarco(endo)plasmic reticular Ca²⁺-ATPase*); PMCA: ATPase dependente de Ca²⁺ da membrana plasmática (do inglês *plasma membrane Ca²⁺-ATPase*). Adaptado de (DEL REY e col., 2006)

Em 2004 Faria e colaboradores relataram que a entrada de etídeo e LY, bem como a abertura dos poros Z em células 2BH4 induzida pelo tratamento com ATPe 1 mM era evitada pela pré-incubação destas células com o quelante de Ca²⁺ BAPTA-AM 20 μM (FARIA e col., 2004).

Posteriormente, Sugiyama e colaboradores, em experimentos com células da microvasculatura de retina de rato, observaram que a entrada de YO-PRO-1

induzida pelo tratamento com BzATP 100 μM ainda em células pré-incubadas com BAPTA-AM (10 μM), sem a presença de quelantes de Ca^{2+} no meio externo (SUGIYAMA e col., 2005).

Em relação à liberação de IL-1 β mediada pela ativação do receptor P2X₇, Brough e colaboradores observaram que o processamento e a liberação desta interleucina depende de liberação de estoques intracelulares de cálcio, já que é inibida pela presença de BAPTA-AM (50 μM). Por outro lado, a remoção de cálcio externo aumenta a liberação de IL-1 β produzida pelo ATP 1 mM (BROUGH e col., 2003). Já que os autores não utilizam quelantes extracelulares de Ca^{2+} , concentrações micromolares devidas à presença residual deste cátion poderiam explicar estas observações aparentemente contraditórias.

Em uma revisão recente Qu e colaboradores recolhem as informações publicadas em relação aos mecanismos de liberação de IL-1 β sob ativação por ATPe e concluem que existem pelo menos três modelos propostos para este processo. O primeiro modelo propõe que a pro-IL1 β seria transportada desde o citoplasma para dentro de lisossomos secretórios onde seria processada a IL-1 β . A estimulação do receptor P2X₇ pelo agonista levaria a liberação destes lisossomos por uma via exocítica na qual a fusão do lisossomo com a membrana plasmática depende de Ca^{2+} . O segundo modelo, baseado em observações realizadas em monócitos e células dendríticas humanas, propõe que o estímulo do receptor P2X₇ inicia uma acumulação de IL-1 β em locais do citosol próximos à membrana plasmática, que seqüencialmente se evagina formando *blebs* contendo IL-1 β no interior, de maneira dependente de Ca^{2+} . O terceiro modelo propõe que a IL-1 β passa diretamente do citosol ao exterior através de uma proteína ainda não

identificada, em um processo independente do aumento citoplasmático de Ca^{2+} (QU e col., 2007).

Os macrófagos intraperitoneais de camundongo utilizados ao longo desta tese de doutorado apresentam um aumento transitório de Ca^{2+} citoplasmático, que se apresenta como um pico inicial nos experimentos realizados com FURA-2 e logo um aumento mantido de Ca^{2+} , quando perfundidos com uma solução contendo CaCl_2 1 mM de ATP 3 mM a 37 °C (Figura 33). Atribuímos o aumento inicial transitório à estimulação dos receptores P2Y e a conseqüente liberação dos estoques intracelulares do Ca^{2+} , e ao alto nível constante observado posteriormente ao Ca^{2+} externo que entra através do receptor P2X₇.

Em células HEK-P2X₇ observamos uma resposta similar (Figura 39). A presença dos receptores P2Y₁ e P2Y₂ nesta linhagem levam à aparição de um pico transitório inicial e logo se observa uma entrada constante de Ca^{2+} durante todo o tempo que dura a perfusão com ATPe. Este último fenômeno não foi observado nas células HEK-293 não transfectadas.

Avaliando nossos dados e às observações de outros grupos de pesquisadores concluímos que o aumento do Ca^{2+} citoplasmático observado nos macrófagos tratados com ATPe deve-se a entrada deste cátion pelo canal catiônico formado pelo receptor P2X₇ e à liberação do Ca^{2+} no retículo plasmático estimulada pela ativação dos receptores P2Y. Nos macrófagos não podemos descartar a entrada do Ca^{2+} também pelo poro Z, desde que existem observações de que este poro deixa passar cátions inorgânicos também, mas nas células HEK-P2X₇ esta contribuição estaria ausente, já que os poros Z não foram registrados nestas células. A contribuição dos estoques intracelulares aparece como um aumento transitório enquanto que a entrada pelo canal de 8 pS do receptor P2X₇ e pelo poro Z seria constante e duraria

todo o tempo em que o ATPe encontra-se presente. Os estoques intracelulares são logo re-enchidos pela atuação dos CRACs.

Com a intenção de pesquisar o papel do Ca^{2+} citoplasmático nos processos de captação de corantes fluorescentes nos macrófagos, estabelecemos inicialmente a concentração de BAPTA-AM necessária para evitar o aumento de Ca^{2+} . A pré-incubação com 10 $\mu\text{g/mL}$ de BAPTA-AM (13 μM) durante meia hora evitou completamente o aumento de Ca^{2+} citoplasmático induzido pelo ATPe, desde que o meio extracelular contivesse numa condição livre de Ca^{2+} pela adição de EGTA. Foi nestas condições que realizamos ensaios de captação de corantes fluorescentes catiônicos e aniônicos (Figura 33).

Nestas condições, observamos que a entrada de etídeo (MONTEIRO-DA-CRUZ e col., 2006) e de sulfo-rodamina B, mas não de Lucifer Yellow (Figura 34 e Figura 35) induzida por ATPe não se modificou se comparada com o mesmo experimento realizado em solução padrão. Novamente a entrada de corantes catiônicos e a de corantes aniônicos parecem estar reguladas de forma independente, já que a entrada de corantes aniônicos foi significativamente diminuída na ausência de Ca^{2+} intracelular.

Estes dados coincidem com nossas observações anteriores sobre a dependência do Ca^{2+} no fenômeno de abertura do poro Z e de captação de corantes fluorescentes aniônicos. O fato de termos observado entrada de etídeo ainda em condições de ausência de Ca^{2+} intracelular vai à contramão do relatado por Farias e colaboradores, já que estes pesquisadores observam inibição da captação de etídeo em uma condição similar a nossa. Talvez a diferença deva-se à concentração de ATPe utilizada, pois em nossos experimentos com células aderidas utilizamos a concentração de ATPe 5 mM e Farias e colaboradores relatam ter utilizado 1 mM.

Em nossos experimentos de células em suspensão realizados no citometro de fluxo registramos uma diminuição da permeabilização, porém não significativa, da entrada de etídio quando os macrófagos foram incubados com BAPTA-AM se comparados com a solução padrão só no estímulo com ATPe 1 mM.

5.5 DUAS VIAS DE ENTRADA PARA OS CORANTES FLUORESCENTES: UMA PARA CÁTIONS E OUTRA PARA ÂNIONS

Em 1987 Steinberg e colaboradores mostraram que o tratamento de macrófagos murinos com ATPe provoca entrada de Lucifer Yellow de maneira compatível com uma passagem difusional através de um poro (STEINBERG e col., 1987). Até o momento não temos conhecimento de outra demonstração semelhante de entrada por difusão para corantes fluorescentes catiônicos. As diferentes equipes de pesquisadores, incluindo a nossa, sempre interpretaram que os dois tipos de corantes estavam entrando na célula pelo mesmo mecanismo. Reavaliando os dados de Steinberg à luz de nossos novos resultados começamos a pensar que talvez os corantes aniônicos estivessem entrando na célula através de um poro aberto pelo estímulo do ATPe (o poro Z) e os corantes catiônicos não.

Os resultados obtidos dos experimentos desenhados para testar esta hipótese sugerem que realmente os corantes aniônicos estão difundindo para o interior da célula através de um poro. Em primeiro lugar, observamos somente entrada de ânions quando as células pré-ativadas com ATPe à 37 °C foram mantidas à 4 °C na presença do corante fluorescente. Nesta condição, esperamos que o poro Z, aberto durante o tratamento com ATPe, permaneça aberto à 4 °C e só aquelas moléculas capazes de difundir pelo poro entrem na célula. Tanto Lucifer Yellow como

carboxifluoresceína entraram na célula nestas condições, mas não etídeo, sulfo-rodamina B nem MQAE. O fato dos corantes fluorescentes aniônicos entrarem nestas condições, é consistente com a hipótese de transporte por difusão através de um poro e o fato dos corantes catiônicos não entrarem sugere que a via de entrada destas moléculas pode incluir algum processo ativo de captura (Figura 47 e Figura 48).

Para reforçar essa conclusão, pensamos que se o corante é capaz de entrar na célula através do poro Z, ele provavelmente seja capaz de sair pela mesma via. Isto foi o que observamos com a entrada e saída de corantes fluorescentes aniônicos e novamente não com os corantes catiônicos. Uma vez induzida a entrada dos corantes fluorescentes pelo tratamento com ATPe à 37 °C, experimentamos tratar novamente as células com ATPe. Nestas condições observamos saída de Lucifer Yellow (Figura 49), mas não de etídeo nem de sulfo-rodamina B (Figura 50).

Este conjunto de experimentos nos levou a concluir que os corantes aniônicos entram na célula pelo poro Z e os corantes catiônicos utilizam alguma outra via também ativada por ATPe através do receptor P2X₇.

5.5.1 ENTRADA DE ÂNIONS: A HIPÓTESE DA PANEXINA

Para explicar a ausência de captação de corantes aniônicos induzida por ATPe nas células HEK-P2X₇ pensamos na possibilidade de que outros P2X, presentes no macrófago e ausentes na linhagem HEK estejam participando da formação do poro Z que, abrindo, permitiria a entrada deste tipo de corantes.

Dois trabalhos recentemente publicados mostraram que o receptor P2X₇ forma heterodímeros funcionais com o receptor P2X₄ (GUO e col., 2007) e que a expressão

do receptor P2X₄ modifica as correntes observadas em whole-cell associadas ao receptor P2X₇, amplificando-as (GUO e col., 2007; BRONE e col., 2007). Estes dados induziram-nos a pensar que talvez a presença do receptor P2X₄ nas células HEK-P2X₇ era o que faltava para que estas células permitissem a entrada de corantes aniônicos quando tratadas com ATPe.

Em função disso realizamos uma co-transfecção nas células HEK-P2X₇ e o cDNA do receptor P2X₄. Porém, estas células HEK-P2X₇-P2X₄, embora também apresentassem o fenômeno de captura de etídeo, não apresentaram entrada de Lucifer Yellow após tratamento com ATPe.

Em 2006, Pelegrin e colaboradores propuseram a panexina-1 como a molécula formadora do poro que permitiria a entrada de corantes fluorescentes na célula após estímulo com ATPe (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b). Utilizando RT-PCR quantitativa, os autores mostram a expressão da panexina-1 em diferentes tipos celulares: HEK-293, HeLa, 1321N1, J774 e THP-1 e macrófagos alveolares. Entre todos eles, a expressão da panexina-1 é consideravelmente maior só em J774 (macrófagos murinos), THP-1 (linhagem monocítica humana) e macrófagos alveolares de camundongo. Os autores desenvolveram um RNA de interferência e um peptídeo que se liga ao domínio extracelular da panexina-1 e o tratamento das células HEK-P2X₇ e das células THP-1 com estas moléculas inibiu, parcialmente, a entrada de etídeo e de YO-PRO-1 induzida pelo ATPe, sem inibir as correntes registradas em *whole-cell* nas mesmas condições (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006b).

Em um artigo posterior, Locovei e colaboradores repetem estes resultados mostrando que o RNA de interferência da panexina-1 bloqueia parcialmente a entrada de YO-PRO-1 (aproximadamente 40 % de inibição) em astrocitomas 1321-

Discussão

N1-P2X₇ (LOCOVEI e col., 2007). Estes autores observam que só co-expressando a panexina-1 com o receptor P2X₇ em oócitos de *Xenopus* observam-se correntes elétricas de entrada e captação de carboxifluoresceína (um ânion!) (LOCOVEI e col., 2007). Os autores não apresentam dados em oócitos com cátions.

Por outro lado, existem vários registros de que a expressão do RNA de P2X₇ em oócitos de *Xenopus* é suficiente para permitir entrada de corantes catiônicos: Nuttle e colaboradores mostraram entrada de etídeo utilizando RNA do receptor P2X₇ de rato (NUTTLE e DUBYAK, 1994), Worthington e colaboradores observaram também entrada de etídeo utilizando RNA do receptor P2X₇ humano (WORTHINGTON e col., 2002) e Marília Guimarães observou entrada de YO-PRO-1 utilizando RNA do receptor P2X₇ de rato e de humano (comunicação pessoal).

Em colaboração com a Professora Marília Guimarães realizamos ensaios de captação de corantes em oócitos de *Xenopus* expressando o receptor P2X₇ de rato e observamos que o tratamento com ATP 5 mM induz a entrada de etídeo mas não de Lucifer Yellow. Este resultado, junto com as observações de Locovei e colaboradores sugere que a expressão de panexina-1 talvez seja necessária para a entrada de corantes fluorescentes aniônicos mas não a de corantes catiônicos.

Em um artigo publicado em 2004, Bao e colaboradores realizam experimentos de canal unitário na conformação *inside-out* com membranas de oócitos de *Xenopus* expressando panexina-1 de humano. O canal registrado possui uma condutância de 475 pS em solução de KGlu 150 mM e vários subestados, com marcada dependência da voltagem e potencial de reversão próximo de 0 mV (BAO e col., 2004). Neste trabalho os autores observam que o ATP³⁻ é capaz de atravessar o poro formado pela panexina-1, demonstrando que o canal é permeável para ânions (BAO e col., 2004).

Recentemente, os mesmos autores que postularam a panexina-1 como responsável pela entrada de corantes fluorescentes catiônicos após tratamento com ATPe, publicaram um trabalho mostrando que a inibição da entrada de etídeo em células HEK-P2X₇ pelo RNA de interferência da panexina-1 só acontece nos primeiros 5 minutos de tratamento com ATP 3 mM. A diferença entre as células tratadas com inibidores da panexina-1 ou não na captação de etídeo é quase nula quando o fenômeno é observado após 10 – 15 minutos de tratamento com ATPe (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006a). Os pesquisadores concluem que existem dois mecanismos para a captação de etídeo dependentes de ATP e do receptor P2X₇: um deles dependente de panexina-1 que aconteceria nos primeiros minutos do tratamento com ATP e outro independente de panexina-1, que aconteceria posteriormente (PELEGRIN e SURPRENANT, 2006a). Resta saber o que aconteceria com os corantes aniônicos nestas duas situações, pois os autores do trabalho não aprofundam nesta questão.

Em nossas condições experimentais os corantes aniônicos Lucifer Yellow e carboxifluoresceína entram na célula por um mecanismo difusional, compatível com a idéia de um poro. Este mecanismo está ausente nas células transfectadas com o receptor P2X₇, da mesma forma que o poro Z registrado eletrofisiologicamente. Dado que a panexina-1 é permeável a ânions e que os registros eletrofisiológicos realizados em oócitos apresentam grande semelhança com os nossos registros de canal unitário realizados em macrófagos na presença de ATP, propomos que a entidade molecular do poro Z é a panexina-1, e que é através deste poro que os corantes aniônicos entram na célula.

A ausência de entrada de corantes aniônicos e de registros eletrofisiológicos do poro Z nas células HEK-P2X₇ e nos astrocitomas 1321-N1-

P2X₇ poderia estar relacionada com a baixa expressão da panexina-1 nestes tipos celulares. Também é possível que em nossas condições experimentais não fomos capazes de registrar o poro Z nas células HEK-P2X₇ mas ele encontra-se nesse tipo celular, ainda que em baixas quantidades.

É plausível que a panexina-1 também deixe entrar corantes catiônicos em alguma medida, mas aparentemente esta não é a única via de entrada para este tipo de corantes estimulada pelo ATPe via receptor P2X₇, pois oócitos de *Xenopus* que não expressam panexina-1 permitiram a entrada de etídeo e YO-PRO quando injetados com RNA do receptor P2X₇ e tratados com ATPe. Não está descartada também a idéia de que a panexina-1 não seja em si o canal de entrada de cátions se não que esta proteína interaja de alguma maneira com outros mecanismos de entrada de corantes catiônicos.

Outro ponto ainda não esclarecido é a seletividade do canal formado pela panexina-1. Nos experimentos realizados em nosso laboratório o poro Z mostrou-se permeável a cátions orgânicos como Tris⁺ e NMDG⁺, com potencial de reversão próximo de 0 mV. Não está claro como um canal suficientemente grande para deixar passar Lucifer Yellow e carboxifluoresceína, se não é seletivo para ânions, permita a entrada de etídeo, YO-PRO-1 ou outros corantes catiônicos.

Uma explicação que ainda deve ser testada experimentalmente é que o canal formado pela panexina-1 tem um tamanho limite para cátions (deixando passar só aqueles de tamanho similar ao Tris⁺ ou NMDG⁺ mas não etídeo e YO-PRO-1) e outro limite de tamanho para ânions (permitindo a passagem de Lucifer Yellow e carboxifluoresceína mas não de outros ânions maiores como Azul de Evans). Uma outra hipótese é que a panexina-1, do mesmo jeito que algumas conexinas, tenha a capacidade de discriminar espécies pela sua estrutura molecular além de tamanho e

a carga (MESE e col., 2007). Em todos os casos mais experimentos deverão ser desenvolvidos para esclarecer estas incógnitas.

5.5.2 QUAL É O MECANISMO DE ENTRADA DOS CORANTES FLUORESCENTES CATIÔNICOS?

Os nossos resultados indicam que os corantes fluorescentes catiônicos estão entrando na célula estimulada pelo ATP por algum processo não-difusional. Os mecanismos prováveis incluem endocitose e transportadores.

Recentemente nosso laboratório demonstrou que o NDGA, um inibidor de 5-lipoxigenase, produz entrada de etídeo nos macrófagos de maneira dependente da temperatura, quando incubado por 10 minutos na concentração 50 μM . Interessantemente, o mesmo tratamento não provocou entrada de corantes aniônicos nem de Ca^{2+} extracelular (Figura 52), o que sugere que a captação de etídeo está acontecendo por um processo não-difusional e que poderia ser o mesmo que é ativado pelo tratamento com ATPe.

Na última década tem merecido grande interesse o estudo de moléculas não permeáveis que atravessam a membrana plasmática. Em particular, o transporte de moléculas associadas a peptídeos que penetram a membrana tem chamado a atenção pela possibilidade de utilizar esta via de entrada para introduzir drogas grudadas a estes peptídeos, que são chamados de peptídeos de penetração celular (CPP, do inglês *cell-penetrating peptides*). Foram descritos mais de 20 peptídeos diferentes capazes de atravessar a membrana, que variam entre 9 e 30 aminoácidos e a maioria deles têm uma carga total positiva. Muitos destes peptídeos catiônicos atravessam a membrana, após passar pelas vesículas intracelulares são detectados

no citoplasma. O estudo dos CPP tem especial interesse no contexto da imunologia, onde processos como a apresentação cruzada de antígenos ainda não estão completamente esclarecidos. Na apresentação cruzada um antígeno fagocitado sai da vesícula endocítica, cai no citoplasma e é apresentado na membrana pela molécula do complexo maior de histocompatibilidade classe I.

Neste contexto, alguns autores tem relatado que o NDGA induz o transporte retrogrado das vesículas com peptídeos endocitados e que isto leva a liberação do peptídeo previamente capturado por pinocitose no citoplasma (FISCHER e col., 2004; TAGAYA e col., 1996).

Mas, como acontece a entrada destes peptídeos catiônicos nas células? Inicialmente acreditava-se que os CPPs entravam passivamente, por um mecanismo não-endocítico, mas hoje parece claro que é um mecanismo ativo, endocítico. O mecanismo exato pelo qual estes peptídeos atravessam a membrana não é conhecido. O passo inicial é a ligação do peptídeo por afinidade física com a membrana lipídica, mas especificamente com os proteoglicanos da matriz extracelular, carregados negativamente. A afinidade diminui proporcionalmente com o tamanho do peptídeo e a entrada depende da concentração, da temperatura e é inibida pela depleção de ATP intracelular (revisado por HERBIG e col., 2005). Segundo a maioria dos autores a possibilidade da formação de um poro está excluída, mas não todos os CPPs entram pelo mesmo mecanismo (HENRIQUES e col., 2006). A localização intracelular também é variada: alguns ficam em vesículas endocíticas, outros ficam difusos no citoplasma e vão até o núcleo. Utilizando fracionamento celular foi observado que alguns peptídeos translocam diretamente ao citoplasma enquanto que outros chegam ao citoplasma depois de serem endocitados e escaparem do endossomo. O tipo de endocitose varia de acordo com o

peptídeo: alguns utilizam macro-pinocitose e endocitose dependente de calveolina ao mesmo tempo, e outros só uma destas formas. Alguns autores sugeriram que os CPP entram no citoplasma pelo transporte retrógrado. O NDGA acelera este transporte (revisado por PUJALS e col., 2006).

Já que outros processos mediados pelo receptor P2X₇ envolvem a formação de vesículas, como por exemplo a liberação de IL-1 β , onde alguns autores propuseram que se formam microvesículas exocítica que transportam a citocina para o exterior (PIZZIRANI e col., 2006) pensamos que também na entrada de corantes fluorescentes catiônicos poderia estar envolvida formação de vesículas, mas neste caso endocíticas.

Em macrófagos de camundongo, observamos que quando o corante fluorescente sulfo-rodamina B é adicionado em altas concentrações no meio extracelular (20 mM), na ausência de ATPe, formam-se vesículas fluorescentes no citoplasma da célula. Já que após 10 minutos de incubação com ATPe e o corante normalmente observamos fluorescência no citoplasma da célula, pensamos que de alguma maneira o ATPe provoca a passagem do corante desde o interior da vesícula para o citosol. Para testar esta hipótese adicionamos ATPe 5 mM aos macrófagos que apresentavam vesículas de sulfo-rodamina B no citoplasma, mas não observamos passagem deste corante para o citoplasma (Figura 51).

É importante ressaltar que até recentemente apenas os corantes catiônicos que ligam a ácido nucléico haviam sido utilizados nos fenômenos associados ao receptor P2X₇. Ao demonstrarmos que outros corantes como MQAE e SR-B podem também ser utilizados, abrimos novas possibilidades para o estudo do mecanismo de captura, o que permitirá também um maior aprofundamento dos fenômenos de endocitose.

Se a entrada de corantes fluorescentes catiônicos acontece por um processo endocítico que envolve a formação inicial vesículas e a posterior passagem do corante ao citoplasma talvez este mecanismo precise da presença de altas concentrações extracelulares do corante junto com a presença do ATPe, e mais experimentos deverão ser pensados para identificar este mecanismo.

Por outro lado, existe a possibilidade de que o etídeo e outros corantes fluorescentes catiônicos estejam entrando nas células através de um transportador.

A família dos transportadores ABC são a maior classe de transportadores encontrados em todos os tipos celulares estudados até hoje. Estes transportadores translocam diferentes substratos, desde íons até peptídeos e tem diferentes papéis fisiológicos. A capacidade de expulsar moléculas citotóxicas é de grande interesse médico e econômico, já que confere as células resistência a herbicidas, antibióticos e drogas quimioterapêuticas (LINTON, 2007).

Todos estes transportadores utilizam a energia da hidrólise do ATP. Todos transportam moléculas desde o citoplasma da célula até o exterior ou até o interior de organelas. Mas existe um transportador bacteriano que transporta moléculas para dentro do citosol, com a ajuda de uma proteína chamada PBP (proteína de união ao periplasma, do inglês *periplasmic binding protein*) (BALAKRISHNAN e col., 2004).

O transportador LmrA de *Lactococcus lactis* é homólogo à glicoproteína P de mamíferos (também conhecida como MDR1, por *multidrug resistance-associated protein* ou como ABC-B1, segundo a nova nomenclatura de transportadores ABC) e Balakrishnan e colaboradores mostraram que é capaz de captar etídeo do meio extracelular quando a taxa ATPi/ATPe diminui (BALAKRISHNAN e col., 2004).

Existem alguns trabalhos que relacionam aos transportadores ABC com um fenômeno induzido pelo receptor P2X₇: a liberação de IL-1 β . Em 1997, Hamon e

colaboradores relataram que o gliburide, um inibidor do transportadores ABC, inibe também a secreção de IL-1 β em macrófagos, sem interferir na secreção de IL-1 α , IL-6 nem TNF- α (HAMON e col., 1997). Estes dados foram confirmados posteriormente por Zhou e colaboradores, que mostraram que o tratamento de macrófagos humanos com oligonucleotídeos anti-sense para o transportador ABC-A1 inibe a liberação de IL-1 β (mas não o processamento) induzida por LPS nestas células (ZHOU e col., 2002).

Será possível a existência em mamíferos de um ABC-transportador inverso igual ao encontrado em *L. lactis*? Para testar a hipótese de que os transportadores ABC estão envolvidos no mecanismo de entrada de corantes fluorescentes catiônicos serão necessários mais experimentos, como por exemplo um ensaio de captação destes corantes na presença de ATPe e inibidores dos transportadores ABC.

5.6 MODELO PROPOSTO PARA A CAPTAÇÃO DE CORANTES FLUORESCENTES INDUZIDA PELO ATPe VIA RECEPTOR P2X₇

Considerando os resultados obtidos ao longo destes quatro anos de pesquisa e os dados disponíveis na literatura, sugerimos um novo modelo para a entrada de corantes na célula induzida pelo ATPe através do estímulo do receptor P2X₇.

A ativação do receptor P2X₇ provocaria três fenômenos diferentes:

1- Entrada de cátions pelo canal formado pelo próprio receptor P2X₇. Através do canal de 8 pS entra Ca²⁺, que se registra como nível elevado que permanece constante durante todo o tempo que dura o tratamento com ATPe. Pelo mesmo canal entra Na⁺ e quando presente na solução extracelular também entra NMDG⁺.

Discussão

Estes fenômenos podem ser registrados tanto em macrófagos quanto nas HEK-P2X₇.

2- Abertura dos poros Z, produzida por algum mecanismo de sinalização intracelular ou biofísico ainda desconhecido, mas possivelmente envolvendo cátions divalentes (ou Ca²⁺). Através destes poros entram os corantes aniônicos como Lucifer Yellow e carboxifluoresceína. Sugerimos que a entidade responsável pelo poro Z é a panexina-1. Este fenômeno depende da temperatura e da voltagem. Em nossa condições experimentais foi observado só em macrófagos.

O Ca²⁺ externo poderia também entrar pelo poro Z, contribuindo com o aumento do Ca²⁺ citoplasmático observado.

3- Captação de corantes catiônicos por um mecanismo não difusional ainda desconhecido mas dependente da temperatura. Este fenômeno foi observado em macrófagos e em células HEK-P2X₇.

Este modelo apresenta-se esquematizado na Figura 54, onde também ilustramos os resultados obtidos relacionados com os efeitos dos íons extracelulares sobre cada um dos fenômenos associados ao receptor P2X₇.

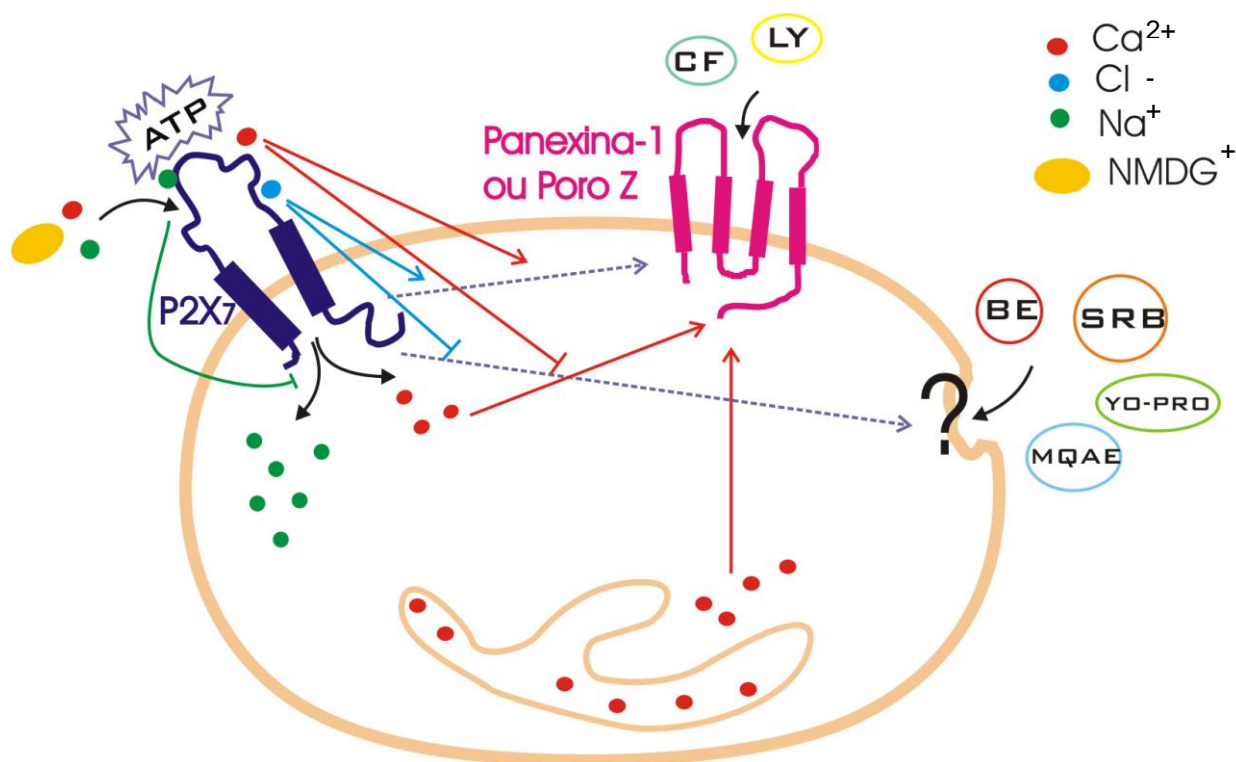


Figura 54 Modelo proposto para explicar os efeitos do ATPe sobre o receptor P2X₇ em macrófagos de camundongo.

A ativação do receptor P2X₇ pela ligação ao ATPe estimula a entrada de cátions inorgânicos como Ca^{2+} e Na^+ e orgânicos como NMDG^+ . A entrada de Ca^{2+} e possivelmente algum mecanismo de sinalização intracelular ainda desconhecido (representado pela linha tracejada) ativam o poro Z / Panexina-1. Através deste poro entram os corantes fluorescentes aniônicos Lucifer Yellow (LY) e Carboxifluoresceína (CF). A ativação do poro Z requer a presença de Ca^{2+} tanto intracelular quanto extracelular, de Cl^- extracelular e é inibida pela presença de Na^+ extracelular.

A ativação do receptor P2X₇ também estimula a entrada de corantes fluorescentes catiônicos como MQAE, sulfo-rodamina B (SR-B), YO-PRO e etídio (BE). A relação entre a ativação do receptor P2X₇ e o mecanismo de entrada destes corantes ainda não está clara e esta representada também por uma linha tracejada. O mecanismo de captação dos corantes catiônicos também permanece desconhecido, por isso está sinalizado com um signo de interrogação. A captação de corantes fluorescentes catiônicos é inibida pela presença de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} no meio extracelular. O Ca^{2+} intracelular não participa nem na ativação nem na inibição deste mecanismo.

6 Conclusões

Conclusões

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desta tese de doutorado nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

- O poro Z registrado eletrofisiologicamente apresenta uma condutância de aproximadamente 440 pS, com vários subestados de condutância, depende da temperatura e da voltagem e sua probabilidade de abertura diminui em ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio extracelular.
- O receptor P2X_7 , quando estimulado pelo ATPe, desencadeia a entrada de corantes fluorescentes catiônicos e aniônicos, mas estes dois tipos de corantes não entram na célula pelo mesmo mecanismo.
- Os corantes fluorescentes aniônicos atravessam a membrana plasmática por difusão, processo compatível com a idéia de que estas moléculas estão entrando na célula através de um poro aberto pela presença de ATPe.
- Os corantes fluorescentes catiônicos entram na célula por um mecanismo não-difusional ainda não esclarecido, que pode depender do metabolismo pois não acontece a baixas temperaturas .
- A ausência de registros eletrofisiológicos do poro Z e da captação de corantes fluorescentes aniônicos nas células HEK- P2X_7 e nos astrocitomas 1321N1- P2X_7 , bem como os experimentos com animais $\text{P2X}_7^{-/-}$, sugerem que a presença do receptor P2X_7 é necessária mas não suficiente para provocar

Conclusões

entrada destes corantes e também que a o poro Z poderia ser o responsável por este processo.

- O aumento constante do Ca^{2+} citoplasmático observado pela estimulação do receptor P2X_7 pelo ATPe acontece nas células HEK- P2X_7 do mesmo jeito que nos macrófagos, o que indica que o fenômeno deve-se a entrada de Ca^{2+} externo que atravessa o canal formado pelo próprio receptor P2X_7 .
- A entrada de corantes aniônicos é inibida pela ausência de Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} e Cl^- no meio extracelular, condições que aumentam a entrada de corantes catiônicos.
- O Ca^{2+} intracelular participa de alguma maneira na sinalização que leva à abertura do poro Z e à captação de corantes aniônicos, mas não está envolvido na captação de corantes catiônicos.

Pelo exposto, o fenômeno conhecido como “permeabilização da membrana plasmática” deve ser reavaliado à luz destes novos resultados e propormos seja tratado como dois fenômenos independentes: entrada corantes aniônicos por um lado e de corantes catiônicos por outro. As relações entre estes dois fenômenos e os outros efeitos descritos para o receptor P2X_7 no sistema imune devem ser também revisadas.

7 Perspectivas

Perspectivas

Os resultados obtidos ao longo desta tese de doutorado indicam que o estímulo do receptor P2X7 pelo ATPe ativa pelo menos dois mecanismos de transporte diferentes, um para corantes fluorescentes catiônicos e outro para corantes aniônicos. Para determinar a natureza destes fenômenos de transporte transmembrana mais experimentos deverão ser feitos. Entre eles pretendemos:

- Realizar registros na conformação *cell-attached* em condições nas quais realizamos experimentos de captação de corantes fluorescentes mais ainda não temos o correlato da atividade do poro Z:
 - ausência de Ca^{2+} interno, pré-incubando as células com BAPTA-AM.
 - ausência de Cl^- externo.
 - experimentar condições que permitam distinguir os efeitos do Mg^{2+} externo de aqueles do Ca^{2+} .
 - colocar corantes fluorescentes catiônicos e aniônicos dentro da pipeta do selo e observar a passagem ou não através do poro Z.

- Pesquisar experimentalmente a possibilidade de que a panexina-1 seja efetivamente o poro Z:
 - realizar experimentos eletrofisiológicos na conformação *cell-attached* utilizando inibidores da panexina-1
 - realizar experimentos de captação de corantes fluorescentes aniônicos e catiônicos utilizando inibidores da panexina-1
 - realizar experimentos eletrofisiológicos em células transfectadas tanto com o cDNA do receptor P2X₇ quanto com o cDNA da panexina-1

Perspectivas

- Reavaliar os dados obtidos anteriormente na luz da descoberta dos dois mecanismos independentes de captação de corantes fluorescentes estimulados pelo receptor P2X₇:
 - realizar ensaios de morte celular e correlacionar a farmacologia deste fenômeno com o observado para corantes catiônicos e aniônicos
 - estudar a correlação entre a captação de corantes catiônicos e aniônicos e a liberação de IL-1 β

- Pesquisar a possibilidade de que os transportadores ABC estejam envolvidos no fenômeno de captação de corantes fluorescentes catiônicos ativado pelo receptor P2X₇:
 - testar o efeito dos inibidores dos diferentes membros da família de transportadores ABC na captação de corantes catiônicos induzida pelo ATPe

- Pesquisar o envolvimento de processos de endocitose na captação de corantes fluorescentes catiônicos ativada pelo receptor P2X₇:
 - realizar experimentos de captação de corantes catiônicos na presença de drogas que interfiram com os processos de endocitose em vários momentos desta via: inibindo o rearranjo do citoesqueleto, impedindo a fusão de vesículas citoplasmáticas, etc.

8 Bibliografia

1. ABBRACCHIO MP and Burnstock G (1998) **Purinergic signalling: pathophysiological roles.** *Jpn.J.Pharmacol.* Vol 78, 2.113-145
2. ABRAHAM EH; Prat AG; Gerweck L; Seneveratne T; Arceci RJ; Kramer R; Guidotti G, and Cantiello HF (1993) **The Multidrug Resistance (mdr1) Gene Product Functions as an ATP Channel.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* Vol 90, 312-316
3. ADINOLFI E; Pizzirani C; Idzko M; Panther E; Norgauer J; Di Virgilio F, and Ferrari D (2005) **P2X7 receptor: death or life?** *Purinergic Signaling.* Vol 1, 219-227
4. ADRIOUCH S; Dubberke G; Diessenbacher P; Rassendren F; Seman M; Haag F, and Koch-Nolte F (2005) **Probing the expression and function of the P2X7 purinoceptor with antibodies raised by genetic immunization.** *Cell Immunol.*
5. AGA M; Johnson CJ; Hart AP; Guadarrama AG; Suresh M; Svaren J; Bertics PJ, and Darien BJ (2002) **Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7).** *Journal of Leukocyte Biology.* Vol 72, 1.222-232
6. ALCARAZ L; Baxter A; Bent J; Bowers K; Braddock M; Cladingboel D; Donald D; Fagura M; Furber M; Laurent C; Lawson M; Mortimore M; McCormick M; Roberts N, and Robertson M (2003) **Novel P2X7 receptor antagonists.** *Bioorg.Med.Chem.Lett.* Vol 13, 22.4043-4046
7. ALVES LA; Coutinho-Silva R; Persechini PM; Spray DC; Savino W, and Campos-de-Carvalho AC (1996) **Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages?** *Blood.* Vol 88, 1.328-334
8. ALZOLA E; Chaib N; Pochet S; Kabre E; Marino A, and Dehaye JP (2001) **Modulation by propranolol of the uptake of ethidium bromide by rat submandibular acinar cells exposed to a P2X(7) agonist or to maitotoxin.** *Cell Signal.* Vol 13, 7.465-473
9. ALZOLA E; Perez-Etxebarria A; Kabre E; Fogarty DJ; Metioui M; Chab N; Macarulla JM; Matute C; Dehaye JP, and Marino A (1998) **Activation by P2X7 agonists of two phospholipases A2 (PLA2) in ductal cells of rat submandibular gland. Coupling of the calcium-independent PLA2 with kallikrein secretion.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 273, 46.30208-30217

Bibliografia

10. AMSTRUP J and Novak I (2003) **P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx.** *Biochemical Journal*. Vol 374, Pt 1.51-61
11. ARTEAGA S; Andrade-Cetto A, and Cardenas R (2005) **Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid.** *J.Ethnopharmacol*. Vol 98, 3.231-239
12. ASWAD F and Dennert G (2006) **P2X(7) receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes.** *Cell Immunol*. Vol 243, 1.58-65
13. AUGER R; Motta I; Benihoud K; Ojcius DM, and Kanellopoulos JM (2005) **A role for mitogen-activated protein kinase ERK1/2 activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 280, 28142-28151
14. BALAKRISHNAN L; Venter H; Shilling RA, and van Veen HW (2004) **Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 279, 12.11273-11280
15. BALLERINI P; Ciccarelli R; Caciagli F; Rathbone MP; Werstiuk ES; Traversa U; Buccella S; Giuliani P; Jang S; Nargi E; Visini D; Santavenere C, and Di Iorio P (2005a) **P2X7 receptor activation in rat brain cultured astrocytes increases the biosynthetic release of cysteinyl leukotrienes.** *Int.J.Immunopathol.Pharmacol*. Vol 18, 3.417-430
16. BALLERINI P; Di Iorio P; Ciccarelli R; Caciagli F; Poli A; Beraudi A; Buccella S; D'Alimonte I; D'Auro M; Nargi E; Patricelli P; Visini D, and Traversa U (2005b) **P2Y1 and cysteinyl leukotriene receptors mediate purine and cysteinyl leukotriene co-release in primary cultures of rat microglia.** *Int.J.Immunopathol.Pharmacol*. Vol 18, 2.255-268
17. BANKSTON LA and Guidotti G (1996) **Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 271, 29.17132-17138
18. BAO L; Locovei S, and Dahl G (2004) **Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP.** *FEBS Letters*. Vol 572, 1-3.65-68

Bibliografia

19. BARALDI PG; del Carmen NM; Morelli A; Falzoni S; Di Virgilio F, and Romagnoli R (2003) **Synthesis and biological activity of N-Arylpiperazine-modified analogues of KN-62, a potent antagonist of the purinergic P2X7 receptor.** *J.Med.Chem.* Vol 46, 8.1318-1329
20. BARBE MT; Monyer H, and Bruzzone R (2006) **Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels.** *Physiology.* Vol 21, 103-114
21. BARDEN JA; Sluyter R; Gu BJ, and Wiley JS (2003) **Specific detection of non-functional human P2X(7) receptors in HEK293 cells and B-lymphocytes.** *FEBS Letters.* Vol 538, 1-3.159-162
22. BEIGI RD; Kertesy SB; Aquilina G, and Dubyak GR (2003) **Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms.** *British Journal of Pharmacology.* Vol 140, 3.507-519
23. BERCHTOLD S; Ogilvie AL; Bogdan C; Muhl-Zurbes P; Ogilvie A; Schuler G, and Steinkasserer A (1999) **Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases.** *FEBS Letters.* Vol 458, 3.424-428
24. BISAGGIO DF; Peres-Sampaio CE; Meyer-Fernandes JR, and Souto-Padron T (2003) **Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction .** *Parasitology Research.* Vol 91, 4.273-282
25. BISAGGIO RC; Nihei OK; Persechini PM; Savino W, and Alves LA (2001) **Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells.** *Cellular and Molecular Biology.* Vol 47, 1.19-31
26. BOASSA D; Ambrosi C; Qiu F; Dahl G; Gaietta G, and Sosinsky G (2007) **Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane.** *Journal of Biological Chemistry.*
27. BRADFORD MD and Soltoff SP (2002) **P2X7 receptors activate Protein Kinase D and p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) downstream of Protein Kinase C.** *Biochemical Journal.* Vol 366, Pt 3.745-755
28. BRAKE AJ; Wagenbach MJ, and Jullus D (1994) **New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor.** *Nature.* Vol 371, 519-523

Bibliografia

29. BRANDLE U; Kohler K, and Wheeler-Schilling TH (1998) **Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina.** *Brain Res.Mol.Brain Res.* Vol 62, 1.106-109
30. BRONE B; Moechars D; Marrannes R; Mercken M, and Meert T (2007) **P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X(4)(-/-) mice.** *Immunology Letters.*
31. BRONTE V; Macino B; Zambon A; Rosato A; Mandruzzato S; Zanovello P, and Collavo D (1996) **Protein tyrosine kinases and phosphatases control apoptosis induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol 218, 1.344-351
32. BROUGH D; Le Feuvre RA; Wheeler RD; Solovyova N; Hilfiker S; Rothwell NJ, and Verkhatsky A (2003) **Ca(2+) stores and Ca(2+) entry differentially contribute to the release of IL-1beta and IL-1alpha from murine macrophages.** *Journal of Immunology.* Vol 170, 6.3029-3036
33. BULANOVA E; Budagian V; Orinska Z; Hein M; Petersen F; Thon L; Adam D, and Bulfone-Paus S (2005) **Extracellular ATP Induces Cytokine Expression and Apoptosis through P2X7 Receptor in Murine Mast Cells.** *Journal of Immunology.* Vol 174, 7.3880-3890
34. BURNSTOCK G (1978) **A basis for distinguishing two types of purinergic receptor.** *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach.* New York: Raven Press. 107-118
35. BURNSTOCK G (1997) **The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules.** *Neuropharmacology.* Vol 36, 9.1127-1139
36. BURNSTOCK G (2006) **Purinergic signalling.** *British Journal of Pharmacology.* Vol 147 Suppl 1, S172-S181
37. BURNSTOCK G (2007a) **Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.** *Physiol Rev.* Vol 87, 2.659-797
38. BURNSTOCK G (2007b) **Purine and pyrimidine receptors.** *Cell Mol.Life Sci.* Vol 64, 12.1471-1483
39. CABRINI G; Falzoni S; Forchap SL; Pellegatti P; Balboni A; Agostini P; Cuneo A; Castoldi G; Baricordi OR, and Di Virgilio F (2005) **A His-155 to Tyr Polymorphism Confers Gain-of-Function to the Human P2X7 Receptor of Human Leukemic Lymphocytes.** *Journal of Immunology.* Vol 175, 1.82-89

Bibliografia

40. CAMAIONI E; Boyer JL; Mohanram A; Harden TK, and Jacobson KA (1998) **Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors.** *J.Med.Chem.* Vol 41, 2.183-190
41. CAMPOS-DE-CARVALHO AC (1988) **Regulation of gap junctional channels.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* Vol 21, 2.177-188
42. CANTIELLO HF; Jackson GRJ; Grosman CF; Prat AG; Borkan SC; Wang Y; Reisin IL; ORiordan CR, and Ausiello DA (1998) **Electrodiffusional ATP movement through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *American Journal of Physiology.* Vol 274, 3 Pt 1.C799-C809
43. CARACCIO N; Monzani F; Santini E; Cuccato S; Ferrari D; Callegari MG; Gulinelli S; Pizzirani C; Di Virgilio F; Ferrannini E, and Solini A (2005) **Extracellular ATP modulates interleukin-6 production by human thyrocytes through functional purinergic P2 receptors.** *Endocrinology.* Vol 146 (7). 3172-8.
44. CARIO-TOUMANIANTZ C; Loirand G; Ladoux A, and Pacaud P (1998) **P2X7 receptor activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle.** *Circulation Research.* Vol 83, 2.196-203
45. CHAKFE Y; Seguin R; Antel JP; Morissette C; Malo D; Henderson D, and Seguela P (2002) **ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels.** *Journal of Neuroscience.* Vol 22, 8.3061-3069
46. CHEN YW; Donnelly-Roberts DL; Namovic MT; Gintant GA; Cox BF; Jarvis MF, and Harris RR (2005) **Pharmacological characterization of P2X7 receptors in rat peritoneal cells.** *Inflamm.Res.* Vol 54, 3.119-126
47. CHESSELL IP; Michel AD, and Humphrey PP (1998a) **Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor.** *British Journal of Pharmacology.* Vol 124, 6.1314-1320
48. CHESSELL IP; Simon J; Hibell AD; Michel AD; Barnard EA, and Humphrey PP (1998b) **Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor.** *FEBS Letters.* Vol 439, 1-2.26-30
49. CHOW SC; Kass GE, and Orrenius S (1997) **Purines and their roles in apoptosis.** *Neuropharmacology.* Vol 36, 9.1149-1156

Bibliografia

50. COCKCROFT S and Gomperts BD (1979) **ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells.** *Nature*. Vol 279, 5713.541-542
51. COLOMAR A and Amedee T (2001) **ATP stimulation of P2X7 receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells.** *Eur.J.Neurosci*. Vol 14, 6.927-936
52. COSTA-JUNIOR HM; Hamaty FC; Farias RS; Einicker-Lamas M; da Silva MH, and Persechini PM (2006) **Apoptosis-inducing factor of a cytotoxic T cell line: involvement of a secretory phospholipase A2.** *Cell and Tissue Research*. Vol 324, 2.255-266
53. COTRINA ML; Lin JH; Alves-Rodrigues A; Liu S; Li J; Azmi-Ghadimi H; Kang J; Naus CC, and Nedergaard M (1998) **Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol 95, 26.15735-15740
54. COURAGEOT MP; Lepine S; Hours M; Giraud F, and Sulpice JC (2004) **Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by P2X7 purinoceptor activation in thymocytes.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 279, 21.21815-21823
55. COUTINHO-SILVA R; Alves LA; Savino W, and Persechini PM (1996) **A cation non-selective channel induced by extracellular ATP in macrophages and phagocytic cells of thymic reticulum.** *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1278, 125-130
56. COUTINHO-SILVA R; Ojcius DM; Górecki DC; Persechini PM; Bisaggio RC; Mendes AN; Marks J; Burnstock G, and Dunn PM (2005) **Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages.** *Biochemical Pharmacology*. Vol 69, 4.641-655
57. COUTINHO-SILVA R and Persechini PM (1997) **P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells.** *American Journal of Physiology*. Vol 273, C1793-C1800
58. COUTINHO-SILVA R; Persechini PM; Bisaggio RC; Perfettini J-L; Sá-Neto ACT; Kanellopoulos JM; Motta-Ly I; Dautry-Varsat A, and Ojcius DM (1999) **P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells.** *American Journal of Physiology*. Vol 276, C1139-C1147
59. COUTINHO-SILVA R; Stahl L; Raymond M-N; Jungas T; Verbeke P; Burnstock G; Darville T, and Ojcius DM (2003) **Inhibition of chlamydial**

- infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation.** *Immunity*. Vol 19, 403-412
60. D'ALIMONTE I; Ciccarelli R; Di Iorio P; Nargi E; Buccella S; Giuliani P; Rathbone MP; Jiang S; Caciagli F, and Ballerini P (2007) **Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain.** *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* Vol 20, 2.301-316
61. DEL REY A; Renigunta V; Dalpke AH; Leipziger J; Matos JE; Robaye B; Zuzarte M; Kavelaars A, and Hanley PJ (2006) **Knockout mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca²⁺ signaling in macrophages.** *Journal of Biological Chemistry*.
62. DENLINGER LC; Angelini G; Schell K; Green DN; Guadarrama AG; Prabhu U; Coursin DB; Bertics PJ, and Hogan K (2005) **Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production.** *Journal of Immunology*. Vol 174, 7.4424-4431
63. DENLINGER LC; Fisetta PL; Garis KA; Kwon G; Vazqueztorres A; Simon AD; Nguyen B; Proctor RA; Bertics PJ, and Corbett JA (1996) **Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoceptors and calcium.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 271, 1.337-342
64. DENNERT G and Aswad F (2006) **The role of NKT cells in animal models of autoimmune hepatitis.** *Crit Rev.Immunol.* Vol 26, 5.453-474
65. DI VIRGILIO F (1995) **The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death.** *Immunology Today*. Vol 16, 524-528
66. DI VIRGILIO F (2000) **Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP.** *Journal of the Autonomous Nervous System*. Vol 81, 1-3.59-63
67. DI VIRGILIO F (2003) **Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 140, 3.441-443
68. DI VIRGILIO F (2007a) **Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome.** *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol 28, 9. 465-72.

Bibliografia

-
69. DI VIRGILIO F (2007b) **Purinergic signalling in the immune system. A brief update.** *Purinergic Signaling*. Vol 3, 1-2.1-3
 70. DI VIRGILIO F; Borea PA, and Illes P (2001) **P2 receptors meet the immune system.** *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol 22, 1.5-7
 71. DI VIRGILIO F; Sanz JM; Chiozzi P, and Falzoni S (1999) **The P2Z/P2X7 receptor of microglia cells: a novel immunomodulatory receptor.** *Progress in Brain Reseach*. Vol 120, 355-368
 72. DONG C; Davis RJ, and Flavell RA (2002) **MAP kinases in the immune response.** *Annual Review of Immunology*. Vol 20, 55-72
 73. DONNELLY-ROBERTS DL; Namovic MT; Faltynek CR, and 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.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*. Vol 308, 3.1053-1061
 74. DRURY AN and Szent-Gyorgyi A (1929) **The Physiological Activity of Adenine Compounds with especial reference to their Action upon The Mammalian Heart.** *Journal of Physiology (London)*. Vol 68, 213-237
 75. DUAN S; Anderson CM; Keung EC; Chen Y; Chen Y, and Swanson RA (2003) **P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes.** *Journal of Neuroscience*. Vol 23, 4.1320-1328
 76. DUBYAK GR (2000) **Purinergic signaling at immunological synapses.** *Journal of the Autonomous Nervous System*. Vol 81, 1-3.64-68
 77. DUBYAK GR (2007) **Go It Alone No More - P2X7 Joins the Society of Heteromeric ATP-Gated Ion Channel Receptors** *Molecular Pharmacology*. Vol 72 (6). 1402-5.
 78. DUBYAK GR and El-Moatassim C (1993) **Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides.** *American Journal of Physiology*. Vol 265, C577-C606
 79. DWYER KM; Deaglio S; Gao W; Friedman D; Strom TB, and Robson SC (2007) **CD39 and control of cellular immune responses.** *Purinergic Signalling*. Vol 3, 1.171-180

Bibliografia

-
80. EGAN TM; Samways DS, and Li Z (2006) **Biophysics of P2X receptors.** *Pflugers Arch.* Vol 452, 5.501-512

 81. EICKHORST AN; Berson A; Cockayne D; Lester HA, and Khakh BS (2002) **Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain.** *J.Gen.Physiol.* Vol 120, 2.119-131

 82. ELLIOTT GD; Liu XH; Cusick JL; Menze M; Vincent J; Witt T; Hand S, and Toner M (2006) **Trehalose uptake through P2X(7) purinergic channels provides dehydration protection.** *Cryobiology.* Vol 52,1. 114-27.

 83. ELSSNER A; Duncan M; Gavrilin M, and Wewers MD (2004) **A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release.** *Journal of Immunology.* Vol 172, 8.4987-4994

 84. ERB L; Liao Z; Seye CI, and Weisman GA (2006) **P2 receptors: intracellular signaling.** *Pflugers Arch.* Vol 452, 5.552-562

 85. EVANS WH; De Vuyst E, and Leybaert L (2006) **The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight.** *Biochemical Journal.* Vol 397, 1.1-14

 86. EVANS WH and Martin PE (2002) **Gap junctions: structure and function.** *Mol.Membr.Biol.* Vol 19, 2.121-136

 87. FARIA RX; de Farias FP, and Alves LA (2004) **Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?** *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* Vol 288, C260-C271

 88. FENG YH; Wang L; Wang Q; Li X; Zeng R, and Gorodeski GI (2005) **ATP stimulates GRK-3 - phosphorylation and b-arrestin-2 - dependent internalization of the P2X7-receptor.** *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* Vol. 288,6. C1342-56.

 89. FERNANDO KC; Gargett CE, and Wiley JS (1999) **Activation of the P2Z/P2X7 receptor in human lymphocytes produces a delayed permeability lesion: involvement of phospholipase D.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Vol 362, 2.197-202

 90. FERRARI D; Chiozzi P; Falzoni S; Dal Susino M; Melchiorri L; Baricordi OR, and Di Virgilio F (1997a) **Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by**

-
- activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages.** *Journal of Immunology*. Vol 159, 3.1451-1458
91. FERRARI D; la Sala A; Chiozzi P; Morelli A; Falzoni S; Girolomoni G; Idzko M; Dichmann S; Norgauer J, and Di Virgilio F (2000) **The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release.** *FASEB Journal*. Vol 14, 15.2466-2476
92. FERRARI D; Los M; Bauer MK; Vandenabeele P; Wesselborg S, and Schulze-Osthoff K (1999) **P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death.** *FEBS Letters*. Vol 447, 1.71-75
93. FERRARI D; Wesselborg S; Bauer MKA, and Schulze-Osthoff K (1997b) **Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65.** *Journal of Cell Biology*. Vol 139, 7.1635-1643
94. FIELDS RD and Burnstock G (2006) **Purinergic signalling in neuron-glia interactions.** *Nat.Rev.Neurosci*. Vol 7, 6.423-436
95. FISCHER R; Kohler K; Fotin-Mleczek M, and Brock R (2004) **A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 279, 13.12625-12635
96. FISHER CA; Manns JM; Young ED, and Kannan S (2003) **Molecular mechanism of extracellular nucleotide-induced degranulation from human polymorphonuclear leukocytes: Role of leukotriene B4 and p38 MAP kinase as essential intermediates.** *Journal of Biological Chemistry*. (retraido pelos autores).
97. FORRESTER T (1990) **Release of ATP from heart:Presentation of a release model using human erythrocyte.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 603, 335-352
98. FORTES FSA; Pecora IL; Persechini PM; Hurtado S; Costa V; Coutinho-Silva R; Melo-Braga MB; Silva-Filho FC; Bisaggio RC; Pires-de-Farias F; Scemes E; Campos-de-Carvalho AC, and Goldenberg RC (2004) **Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors.** *Journal of Cell Science*. Vol 117, 4717-4726
99. GACHET C (2006) **Regulation of Platelet Functions by P2 Receptors.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol 46, 277-300

Bibliografia

-
100. GALLUCCI S and Matzinger P (2001) **Danger signals: SOS to the immune system.** *Current Opinion in Immunology.* Vol 13, 1.114-119
 101. GARGETT CE and Wiley JS (1997) **The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z- receptor of human lymphocytes.** *British Journal of Pharmacology.* Vol 120, 8.1483-1490
 102. GENDRON FP; Neary JT; Theiss PM; Sun GY; Gonzalez FA, and Weisman GA (2003) **Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells.** *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* Vol 284, 2.C571-C581
 103. GESSI S; Varani K; Merighi S; Fogli E; Sacchetto V; Benini A; Leung E; MacLennan S, and Borea PA (2007) **Adenosine and lymphocyte regulation.** *Purinergic Signalling.* Vol 3, 1.109-116
 104. GIBBONS SJ; Washburn KB, and Talamo BR (2001) **P2X7 receptors in rat parotid acinar cells: formation of large pores.** *J.Auton.Pharmacol.* Vol 21, 4.181-190
 105. GOLDBERG GS; Moreno AP, and Lampe PD (2002) **Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 277, 39.36725-36730
 106. GRYGORCZYK R and Hanrahan JW (1997) **CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli.** *American Journal of Physiology.* Vol 272, 3 Pt 1.C1058-C1066
 107. GU BJ; Zhang W; Worthington RA; Sluyter R; Dao-Ung P; Petrou S; Barden JA, and Wiley JS (2001) **A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 276, 14.11135-11142
 108. GU BJ; Zhang WY; Bendall LJ; Chessell IP; Buell GN, and Wiley JS (2000) **Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors.** *American Journal of Physiology.* Vol 279, 4.C1189-C1197
 109. GUDIPATY L; Humphreys BD; Buell G, and Dubyak GR (2001) **Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density.** *American Journal of Physiology.* Vol 280, 4.C943-C953

Bibliografia

-
110. GUDIPATY L; Munetz J; Verhoef PA, and Dubyak GR (2003) **Essential role for Ca²⁺ in the regulation of IL-1{beta} secretion by the P2X7 nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK293 fibroblasts.** *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* Vol 171,1. 1304-11.
111. GUO C; Masin M; Qureshi OS, and Murrell-Lagnado RD (2007) **Evidence for functional P2X4 / P2X7 heteromeric receptors.** *Molecular Pharmacology.* Vol 72, 6.1447-1456
112. HAMILL OP; Marty A; Neher E; Sakmann B, and Sigworth FJ (1981) **Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** *European Journal Physiology.* Vol 391, 85-100
113. HAMON Y; Luciani MF; Becq F; Verrier B; Rubartelli A, and Chimini G (1997) **Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1.** *Blood.* Vol 90, 8.2911-2915
114. HARA N; Ichinose M; Sawada M, and Maeno T (1990) **Extracellular ATP activates Ca²⁺-dependent K⁺ conductance via Ca²⁺ influx in mouse macrophages.** *Comparative Biochemistry and Physiology.* Vol 97A, 417-421
115. HENRIQUES ST; Melo MN, and Castanho MA (2006) **Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?** *Biochemical Journal.* Vol 399, 1.1-7
116. HERBIG ME; Fromm U; Leuenberger J; Krauss U; Beck-Sickinger AG, and Merkle HP (2005) **Bilayer interaction and localization of cell penetrating peptides with model membranes: a comparative study of a human calcitonin (hCT)-derived peptide with pVEC and pAntp(43-58).** *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol 1712, 2.197-211
117. HIBELL AD; Thompson KM; Xing M; Humphrey PP, and Michel AD (2001) **Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy.* Vol 296, 3.947-957
118. HILLMAN KA; Harada H; Chan CM; Townsend-Nicholson A; Moss SE; Miyamoto K; Suketa Y; Burnstock G; Unwin RJ, and Dunn PM (2003) **Chicken DT40 cells stably transfected with the rat P2X7 receptor ion channel: a system suitable for the study of purine receptor-mediated cell death.** *Biochemical Pharmacology.* Vol 66, 3.415-424

Bibliografia

-
119. HOMOLYA L; Steinberg TH, and Boucher RC (2000) **Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia.** *Journal of Cell Biology.* Vol 150, 6.1349-1360
120. HONORE PM; Donnelly-Roberts D; Namovic M; Hsieh G; Zhu C; Mikusa J; Hernandez G; Zhong C; Gauvin D; Chandran P; Harris R; Perez-Medrano A; Carroll W; Marsh K; Sullivan J; Faltynek C, and Jarvis MF (2006) **A-740003 (N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide, A Novel And Selective P2X7 Receptor Antagonist Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy.*
121. HUANG AJ; Manning JE; Bandak TM; Rataou MC; Hanser KR, and Silverstein SC (1993) **Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells.** *Journal of Cell Biology.* Vol 120, 6.1371-1380
122. HUGHES JP; Hatcher JP, and Chessell IP (2007) **The role of P2X7 in pain and inflammation.** *Purinergic Signalling.* Vol 3, 1.163-169
123. HUMPHREYS BD; Rice J; Kertesy SB, and Dubyak GR (2000) **Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 275, 35.26792-26798
124. HUMPHREYS BD; Virginio C; Surprenant A; Rice J, and Dubyak GR (1998) **Isoquinolines as antagonists of the P2X₇ nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues.** *Molecular Pharmacology.* Vol 54, 1.22-32
125. HUNG AC and Sun SH (2002) **The P2X(7) receptor-mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2.** *Cell Signal.* Vol 14, 1.83-92
126. IDZKO M; Hammad H; van Nimwegen M; Kool M; Willart MA; Muskens F; Hoogsteden HC; Luttmann W; Ferrari D; Di Virgilio F; Virchow JC, Jr., and Lambrecht BN (2007) **Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells.** *Nat.Med.* Vol 13, 8.913-919

Bibliografia

-
127. INNOCENTI B; Pfeiffer S; Zrenner E; Kohler K, and Guenther E (2004) **ATP-induced non-neuronal cell permeabilization in the rat inner retina.** *Journal of Neuroscience.* Vol 24, 39.8577-8583
128. INOUE K (2005) **The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release.** *Pharmacol.Ther.* Vol 109, 1-2. 210-26.
129. INOUE K (2007) **P2 receptors and chronic pain.** *Purinergic Signalling.* Vol 3, 1.135-144
130. JACOBSON KA; King BF, and Burnstock G (2002) **Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors.** *Celltransmissions.* Vol 16, 3.1-23
131. JIANG LH; Mackenzie AB; North RA, and Surprenant A (2001) **Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors.** *Molecular Pharmacology.* Vol 58, 1.82-88
132. JIANG LH; Rassendren F; Mackenzie AB; Zhang YH; Surprenant A, and North RA (2005) **N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X7 receptors.** *Am.J.Physiol Cell Physiol.* Vol 289, C1295-C1302
133. JURSIK C; Sluyter R; Georgiou JG; Fuller SJ; Wiley JS, and Gu BJ (2007) **A quantitative method for routine measurement of cell surface P2X(7) receptor function in leucocyte subsets by two-colour time-resolved flow cytometry.** *Journal of Immunological Methods.* Vol 325, 1-2.67-77
134. KANNEGANTI TD; Lamkanfi M; Kim YG; Chen G; Park JH; Franchi L; Vandenabeele P, and Nunez G (2007) **Pannexin-1-Mediated Recognition of Bacterial Molecules Activates the Cryopyrin Inflammasome Independent of Toll-like Receptor Signaling.** *Immunity.* Vol 26, 4.433-443
135. KAWAMURA H; Aswad F; Minagawa M; Govindarajan S, and Dennert G (2006) **P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis.** *Journal of Immunology.* Vol 176, 4.2152-2160
136. KAWAMURA H; Aswad F; Minagawa M; Malone K; Kaslow H; Koch-Nolte F; Schott WH; Leiter EH, and Dennert G (2005) **P2X7 Receptor-Dependent and -Independent T Cell Death Is Induced by Nicotinamide Adenine Dinucleotide.** *Journal of Immunology.* Vol 174, 4.1971-1979

Bibliografia

-
137. KHAKH BS; Bao XR; Labarca C, and Lester HA (1999) **Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds.** *Nat.Neurosci.* Vol 2, 4.322-330
138. KHAKH BS and Lester HA (1999) **Dynamic selectivity filters in ion channels.** *Neuron.* Vol 23, 4.653-658
139. KIM M; Jiang LH; Wilson HL; North RA, and Surprenant A (2001a) **Proteomic and functional evidence for a P2X(7) receptor signalling complex.** *EMBO Journal.* Vol 20, 22.6347-6358
140. KIM M; Spelta V; Sim J; North RA, and Surprenant A (2001b) **Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 276, 26.23262-23267
141. KLAPPERSTUCK M; Buttner C; Schmalzing G, and Markwardt F (2001) **Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor.** *Journal of Physiology (London).* Vol 534, Pt 1.25-35
142. KLOTZ KN (2000) **Adenosine receptors and their ligands.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* Vol 362, 4-5.382-391
143. KUNAPULI SP and Daniel JL (1998) **P2 receptor subtypes in the cardiovascular system.** *Biochemical Journal.* Vol 336 (Pt 3), 513-523
144. KUSNER DJ and Adams J (2000) **ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D.** *Journal of Immunology.* Vol 164, 1.379-388
145. LA SALA A; Ferrari D; Corinti S; Cavani A; Di Virgilio F; Girolomoni G; Meyer MP; Clarke JD; Patel K; Townsend-Nicholson A, and Burnstock G (2001) **Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses.** *Journal of Immunology.* Vol 166, 3.1611-1617
146. LA SALA A; Sebastiani S; Ferrari D; Di Virgilio F; Idzko M; Norgauer J, and Girolomoni G (2002) **Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes.** *Blood.* Vol 99, 5.1715-1722

Bibliografia

-
147. LAGOSTENA L; Ashmore JF; Kachar B, and Mammano F (2001) **Purinergic control of intercellular communication between Hensen's cells of the guinea-pig cochlea.** *Journal of Physiology (London)*. Vol 531, Pt 3.693-706
148. LAMMAS DA; Stober C; Harvey CJ; Kendrick N; Panchalingam S, and Kumararatne DS (1997) **ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors.** *Immunity*. Vol 7, 433-444
149. LAZAROWSKI ER; Boucher RC, and Harden TK (2000) **Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 275, 40.31061-31068
150. LAZAROWSKI ER; Boucher RC, and Harden TK (2003) **Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules.** *Molecular Pharmacology*. Vol 64, 4.785-795
151. LI Q; Luo X, and Muallem S (2005) **Regulation of the P2X7 receptor permeability to large molecules by extracellular Cl⁻ and Na⁺.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 280, 29.26922-26927
152. LINTON KJ (2007) **Structure and function of ABC transporters.** *Physiology (Bethesda)*. Vol 22, 122-130
153. LIPMAN BJ; Silverstein SC, and Steinberg TH (1990) **Organic anion transport in macrophage membrane vesicles.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 265, 4.2142-2147
154. LOCOVEI S; Scemes E; Qiu F; Spray DC, and Dahl G (2007) **Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex.** *FEBS Letters*. Vol 581, 3.483-488
155. LOCOVEI S; Wang J, and Dahl G (2006) **Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium.** *FEBS Letters*. Vol 580, 1.239-244
156. LUNDY PM; Nelson P; Mi L; Frew R; Minaker S; Vair C, and Sawyer TW (2004) **Pharmacological differentiation of the P2X7 receptor and the maitotoxin-activated cationic channel.** *European Journal of Pharmacology*. Vol 487, 1-3.17-28

Bibliografia

-
157. LUO X; Zheng W; Yan M; Lee MG, and Muallem S (1999) **Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells.** *American Journal of Physiology.* Vol 277, 2 Pt 1.C205-C215
158. LUTTIKHUIZEN DT; Harmsen MC; de Leij LF, and van Luyn MJ (2004) **Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation.** *Cell and Tissue Research.* Vol 317, 3.289-298
159. MACKENZIE A; Wilson HL; Kiss-Toth E; Dower SK; North RA, and Surprenant A (2001) **Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.** *Immunity.* Vol 15, 5.825-835
160. MACKENZIE AB; Young MT; Adinolfi E, and Surprenant A (2005) **Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 280, 40.33968-33976
161. MARIATHASAN S and Monack DM (2007) **Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation.** *Nat.Rev.Immunol.* Vol 7, 1.31-40
162. MARTEAU F; Communi D; Boeynaems JM, and Suarez GN (2004) **Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells.** *Journal of Leukocyte Biology.* Vol 76, 4.796-803
163. MCGARAUGHTY S; Chu KL; Namovic MT; Donnelly-Roberts DL; Harris RR; Zhang XF; Shieh CC; Wismer CT; Zhu CZ; Gauvin DM; Fabiyi AC; Honore P; Gregg RJ; Kort ME; Nelson DW; Carroll WA; Marsh K; Faltynek CR, and Jarvis MF (2007) **P2X(7)-related modulation of pathological nociception in rats.** *Neuroscience.*
164. MEHTA VB; Hart J, and Wewers MD (2001) **ATP stimulated release of IL-1beta and IL-18 requires priming by LPS and is independent of caspase-1 cleavage.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 32, 9).
165. MELNIKOV A; Zaborina O; Dhiman N; Prabhakar BS; Chakrabarty AM, and Hendrickson W (2000) **Clinical and environmental isolates of Burkholderia cepacia exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells.** *Molecular Microbiology.* Vol 36, 6.1481-1493
166. MESE G; Richard G, and White TW (2007) **Gap junctions: basic structure and function.** *J.Invest Dermatol.* Vol 127, 11.2516-2524

Bibliografia

-
167. MICHEL AD; Chessell IP; Hibell AD; Simon J, and Humphrey PP (1998) **Identification and characterization of an endogenous P2X7 (P2Z) receptor in CHO-K1 cells.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 125, 6.1194-1201
168. MICHEL AD; Chessell IP, and Humphrey PP (1999) **Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Vol 359, 2.102-109
169. MICHEL AD; Kaur R; Chessell IP, and Humphrey PP (2000) **Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 130, 3.513-520
170. MICHEL AD; Xing M, and Humphrey PP (2001) **Serum constituents can affect 2'-& 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP potency at P2X(7) receptors.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 132, 7.1501-1508
171. MICHEL AD; Xing M; Thompson KM; Jones CA, and Humphrey PP (2006) **Decavanadate, a P2X receptor antagonist, and its use to study ligand interactions with P2X7 receptors.** *European Journal of Pharmacology*. Vol 534, 1-3.19-29
172. MONTEIRO-DA-CRUZ C; Ventura AL; Schachter J; Costa-Junior HM; Silva-Souza HA; Gomes FR; Coutinho-Silva R; Ojcius DM, and 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.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 147, 3.324-334
173. MURGIA M; Hanau S; Pizzo P; Rippa M, and Di Virgilio F (1993) **Oxidized ATP an irreversible inhibitor of macrophage purinergic P2Z receptor.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 268, 8199-8203
174. MYRTEK I and Idzko M (2007) **Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells.** *Purinergic Signalling*. Vol 3, 1.5-11
175. NAEMSCH LN; Dixon SJ, and Sims SM (2001) **Activity-dependent development of p2x7 current and ca²⁺ entry in rabbit osteoclasts.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 276, 42.39107-39114
176. NAGAOKA I; Tamura H, and Hirata M (2006) **An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7 .** *Journal of Immunology*. Vol 176, 5.3044-3052

Bibliografia

-
177. NARCISSE L; Scemes E; Zhao Y; Lee SC, and Brosnan CF (2005) **The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes.** *Glia*. Vol 49, 2.245-258
178. NELSON DW; Gregg RJ; Kort ME; Perez-Medrano A; Voight EA; Wang Y; Grayson G; Namovic MT; Donnelly-Roberts DL; Niforatos W; Honore P; Jarvis MF; Faltynek CR, and Carroll WA (2006) **Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists.** *J.Med.Chem.* Vol 49, 12.3659-3666
179. NICKE A; Baumert HG; Rettinger J; Eichele A; Lambrecht G; Mutschler E, and Schmalzing G (1998) **P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels.** *EMBO Journal*. Vol 17, 11.3016-3028
180. NIHEI OK; de Carvalho AC; Savino W, and Alves LA (2000) **Pharmacologic properties of P(2Z)/P2X(7) receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis.** *Blood*. Vol 96, 3.996-1005
181. NORTH RA (2002) **Molecular physiology of P2X receptors.** *Physiological Reviews*. Vol 82, 4.1013-1067
182. NORTH RA and Surprenant A (2000) **Pharmacology of cloned P2X receptors.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol 40, 563-580
183. NUTTLE LC and Dubyak GR (1994) **Differential activation of cation channels and non- selective pores by macrophage P-2Z purinergic receptors expressed in Xenopus oocytes.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 269, 13988-13996
184. OSIPCHUK Y and Cahalan M (1992) **Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells.** *Nature*. Vol 359, 6392.241-244
185. PANCHIN YV (2005) **Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative.** *Journal Experimental Biology*. Vol 208, Pt 8.1415-1419
186. PANENKA W; Jijon H; Herx LM; Armstrong JN; Feighan D; Wei T; Yong VW; Ransohoff RM, and MacVicar BA (2001) **P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase.** *Journal of Neuroscience*. Vol 21, 18.7135-7142

Bibliografia

-
187. PANGRSIC T; Potokar M; Stenovec M; Kreft M; Fabbretti E; Nistri A; Pryazhnikov E; Khiroug L; Giniatullin R, and Zorec R (2007) **Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes**. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 282, 39. 28749 – 58.
188. PANKRATOV Y; Lalo U; Verkhatsky A, and North RA (2006) **Vesicular release of ATP at central synapses**. *Pflugers Arch*. Vol 452, 5.589-597
189. PEARSON JD and Carter TD (1990) **Effects of extracellular ATP on the release of vasoactive mediators from endothelium**. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 603, 267-274
190. PELEGRIN P and Surprenant A (2006a) **Pannexin-1 couples to maitotoxin and nigericin-induced IL-1 β release through a dye-uptake independent pathway**. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 282,4. 2386 -94.
191. PELEGRIN P and Surprenant A (2006b) **Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X(7) receptor**. *EMBO Journal*. Vol 25,21. 5071- 82.
192. PELLEGGATTI P; Falzoni S; Pinton P; Rizzuto R, and Di Virgilio F (2005) **A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion**. *Molecular Biology of the Cell*. Vol 16, 8.3659-3665
193. PERREGAUX DG; McNiff P; Laliberte R; Conklyn M, and Gabel CA (2000) **ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 β and IL-18 in human blood**. *Journal of Immunology*. Vol 165, 8.4615-4623
194. PERSECHINI PM; Bisaggio RC; Alves-Neto JL, and Coutinho-Silva R (1998) **Extracellular ATP in the lymphohematopoietic system: P2Z purinoceptors and membrane permeabilization**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol 31, 1.25-34
195. PETROU S; Ugur M; Drummond RM; Singer JJ, and Walsh JV Jr (1997) **P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype**. *FEBS Letters*. Vol 411, 2-3.339-345
196. PFEIFFER ZA; Aga M; Prabhu U; Watters JJ; Hall DJ, and Bertics PJ (2004) **The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho**. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 75, 6.1173-1182

Bibliografia

-
197. PIZZIRANI C; Ferrari D; Chiozzi P; Adinolfi E; Sandona D; Savaglio E, and Di Virgilio F (2006) **Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1{beta}-loaded microvesicles from human dendritic cells.** *Blood*. Vol. 109,9. 3856-64.
198. PLACIDO R; Auricchio G; Falzoni S; Battistini L; Colizzi V; Brunetti E; Di Virgilio F, and Mancino G (2007) **P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability.** *Cell Immunol*. Vol.244,1. 10-8.
199. PUJALS S; Fernandez-Carneado J; Lopez-Iglesias C; Kogan MJ, and Giralt E (2006) **Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly.** *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1758, 3.264-279
200. PUNJ V; Zaborina O; Dhiman N; Falzari K; Bagdasarian M, and Chakrabarty AM (2000) **Phagocytic cell killing mediated by secreted cytotoxic factors of Vibrio cholerae.** *Infection and Immunity*. Vol 68, 9.4930-4937
201. QI Z; Murase K; Obata S, and Sokabe M (2000) **Extracellular ATP-dependent activation of plasma membrane Ca(2+) pump in HEK-293 cells.** *British Journal of Pharmacology*. Vol 131, 2.370-374
202. QU Y; Franchi L; Nunez G, and Dubyak GR (2007) **Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages.** *Journal of Immunology*. Vol 179, 3.1913-1925
203. RALEVIC V and Burnstock G (1998) **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacol.Rev*. Vol 50, 3.413-492
204. RALEVIC V and Burnstock G (2003) **Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases.** *Drug News Perspect*. Vol 16, 3.133-140
205. RASSENDREN F; Buell GN; Virginio C; Collo G; North RA, and Surprenant A (1997) **The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 272, 9.5482-5486
206. REISIN IL; Prat AG; Abraham EH; Amara JF; Gregory RJ; Ausiello DA, and Cantiello HF (1994) **The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 269, 20584-20591

Bibliografia

207. RIEDEL T; Schmalzing G, and Markwardt F (2007) **Influence of extracellular monovalent cations on pore and gating properties of P2X7 receptor-operated single channels currents.** *Biophysical Journal*. Vol 93,3. 846-58.
208. ROBINSON-WHITE A and Stratakis CA (2002) **Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 968, 256-270
209. SABIROV RZ and Okada Y (2005) **ATP release via anion channels.** *Purinergic Signaling*. Vol 1, 311-328
210. SAK K; Boeynaems JM, and Everaus H (2003) **Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells.** *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 73, 4.442-447
211. SAK K and Webb TE (2002) **A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 397, 1.131-136
212. SANZ JM; Chiozzi P, and Di Virgilio F (1998) **Tenidap enhances P2Z/P2X7 receptor signalling in macrophages.** *European Journal of Pharmacology*. Vol 355, 235-244
213. SCEMES E; Suadicani SO, and Spray DC (2000) **Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation.** *Journal of Neuroscience*. Vol 20, 4.1435-1445
214. SCHILLING WP; Sinkins WG, and Estacion M (1999a) **Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X(7)-like cytolytic pore in human skin fibroblasts.** *American Journal of Physiology*. Vol 277, 4 Pt 1.C755-C765
215. SCHILLING WP; Wasyllyna T; Dubyak GR; Humphreys BD, and Sinkins WG (1999b) **Maitotoxin and P2Z/P2X7 purinergic receptor stimulation activate a comon cytolytic pore.** *American Journal of Physiology*. Vol 277, 4 Pt 1.C766-C776
216. SCHNURR M; Toy T; Stoitzner P; Cameron P; Shin A; Beecroft T; Davis ID; Cebon J, and Maraskovsky E (2003) **ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling.** *Blood*. Vol 102, 2. 613-20.

Bibliografia

-
217. SEMAN M; Adriouch S; Scheuplein F; Krebs C; Freese D; Glowacki G; Deterre P; Haag F, and Koch-Nolte F (2003) **NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor.** *Immunity*. Vol 19, 4.571-582
218. SEYE CI; Kong Q; Yu N; Gonzalez FA; Erb L, and Weisman GA (2007) **P2 receptors in atherosclerosis and postangioplasty restenosis.** *Purinergic Signalling*. Vol 3, 1.153-162
219. SIKORA A; Liu J; Brosnan C; Buell G; Chessell I, and Bloom BR (1999) **Purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism.** *Journal of Immunology*. Vol 163, 2.558-561
220. SLUYTER R; Shemon AN, and Wiley JS (2004) **Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1beta release from human monocytes.** *Journal of Immunology*. Vol 172, 6.3399-3405
221. SMART ML; Gu B; Panchal RG; Wiley J; Cromer B; Williams DA, and Petrou S (2003) **P2X7 Receptor Cell Surface Expression and Cytolytic Pore Formation Are Regulated by a Distal C-terminal Region.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 278, 10.8853-8860
222. SMART ML; Panchal RG; Bowser DN; Williams DA, and Petrou S (2002) **Pore Formation is not associated with macroscopic redistribution of P2X7 receptors.** *American Journal of Physiology Cell*. Vol 283, C77-C82
223. SMITH RA; Alvarez AJ, and Estes DM (2001) **The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol 78, 3-4.249-262
224. SOLINI A; Chiozzi P; Morelli A; Fellin R, and Di Virgilio F (1999) **Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release.** *Journal of Cell Science*. Vol 112 (Pt 3), 297-305
225. SOLLE M; Labasi J; Perregaux DG; Stam E; Petrushova N; Koller BH; Griffiths RJ, and Gabel CA (2001) **Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 276, 1.125-132
226. SPERLAGH B; Vizi ES; Wirkner K, and Illes P (2006) **P2X(7) receptors in the nervous system.** *Prog.Neurobiol*. Vol 78, 6.327-346

Bibliografia

-
227. SPRAY DC and Burt JM (1990) **Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel.** *American Journal of Physiology.* Vol 258, C195-C205
228. STEINBERG TH and Hiken JF (2007) **P2 receptors in macrophage fusion and osteoclast formation.** *Purinergic Signalling.* Vol 3, 1.53-57
229. STEINBERG TH; Newman AS; Swanson JA, and Silverstein SC (1987) **ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 262, 8884-8888
230. STEINBERG TH; Swanson JA, and Silverstein SC (1988) **A prelysosomal compartment sequesters membrane-impermeant fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix of J774 macrophages.** *Journal of Cell Biology.* Vol 107, 3.887-896
231. STOBBER CB; Lammas DA; Li CM; Kumararatne DS; Lightman SL, and McArdle CA (2001) **ATP-mediated killing of mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes.** *Journal of Immunology.* Vol 166, 10.6276-6286
232. STONER HB (1950) **Studies on the role of the adrenal cortex in adenosine triphosphate shock.** *Br J Exp Pathol.* Vol 31, 603-614
233. SUGIYAMA T; Kawamura H; Yamanishi S; Kobayashi M; Katsumura K, and Puro DG (2005) **Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels.** *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* Vol 288, C568-C576
234. SUGIYAMA T; Kobayashi M; Kawamura H; Li Q; Puro DG, and Kobayashi M (2004) **Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature.** *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* Vol 45, 3.1026-1032
235. SUH BC; Kim JS; Namgung U; Ha H, and Kim KT (2001) **P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils.** *Journal of Immunology.* Vol 166, 11.6754-6763
236. SUN SH; Lin LB; Hung AC, and Kuo JS (1999) **ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors.** *Journal of Neurochemistry.* Vol 73, 1.334-343

Bibliografia

-
237. SURPRENANT A; Rassendren F; Kawashima E; North RA, and Buell G (1996) **The cytolytic P_{2z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2x} receptor (P2X₇)**. *Science*. Vol 272, 735-738
238. TAGAYA M; Henomatsu N; Yoshimori T; Yamamoto A; Tashiro Y, and Mizushima S (1996) **Inhibition of vesicle-mediated protein transport by nordihydroguaiaretic acid**. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. Vol 119, 5.863-869
239. TAKENOUCHI T; Iwamaru Y; Imamura M; Kato N; Sugama S; Fujita M; Hashimoto M; Sato M; Okada H; Yokoyama T; Mohri S, and Kitani H (2007a) **Prion infection correlates with hypersensitivity of P2X7 nucleotide receptor in a mouse microglial cell line**. *FEBS Letters*. Vol 581, 16.3019-3026
240. TAKENOUCHI T; Ogihara K; Sato M, and Kitani H (2005) **Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca(2+) influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line**. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1726, 2.177-186
241. TAKENOUCHI T; Sato M, and Kitani H (2007b) **Lysophosphatidylcholine potentiates Ca(2+) influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells**. *Journal of Neurochemistry*. Vol 102,5. 1518-32.
242. TAYLOR SR; Alexander DR; Cooper JC; Higgins CF, and Elliott JI (2007) **Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7**. *Journal of Immunology*. Vol 178, 6.3474-3482
243. TORRES-SANTOS EC; Mantuano MB; oliveira SAB; Persechini PM; Coutinho-Silva R, and Rossi-Bergmann B (1999) **Leishmanial Infection Enhances ATP-Induced Permeabilization of Macrophages**. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz XXVI Annual Meeting on Basic Researc in Chagas Disease*. Vol 94, II.74
244. TSUKIMOTO M; Harada H; Ikari A, and Takagi K (2004) **Involvement of chloride in apoptotic cell death induced by activation of ATP-sensitive P2X7 purinoceptor**. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280, 4. 2653-8.
245. TSUKIMOTO M; Maehata M; Harada H; Ikari A; Takagi K, and Degawa M (2006) **P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways** . *Journal of Immunology*. Vol 177, 5.2842-2850

Bibliografia

-
246. UGUR M; Drummond RM; Zou H; Sheng P; Singer JJ, and Walsh JV Jr (1997) **An ATP-gated cation channel with some P2Z-like characteristics in gastric smooth muscle cells of toad.** *Journal of Physiology (London)*. Vol 498, Pt2.427-442
247. VERHOEF PA; Kertesy SB; Lundberg K; Kahlenberg JM, and Dubyak GR (2005) **Inhibitory Effects of Chloride on the Activation of Caspase-1, IL-1{beta} Secretion, and Cytolysis by the P2X7 Receptor.** *Journal of Immunology*. Vol 175, 11.7623-7634
248. VIAL C; Tobin AB, and Evans RJ (2004) **G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation.** *Biochemical Journal*. Vol 382, Pt 1.101-110
249. VIRGINIO C; Church D; North RA, and Surprenant A (1997) **Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor.** *Neuropharmacology*. Vol 36, 9.1285-1294
250. VIRGINIO C; MacKenzie A; North RA, and Surprenant A (1999a) **Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor.** *Journal of Physiology (London)*. Vol 519 Pt 2:335-46, 335-346
251. VIRGINIO C; MacKenzie A; Rassendren FA; North RA, and Surprenant A (1999b) **Pore dilation of neuronal P2X receptor channels.** *Nat.Neurosci*. Vol 2, 4.315-321
252. VIRGINIO C; North RA, and Surprenant A (1998) **Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones.** *Journal of Physiology (London)*. Vol 510 (Pt 1), 27-35
253. VON K, I (2005) **Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes.** *Pharmacol.Ther*. Vol 110,3. 415-32.
254. WARNY M; Aboudola S; Robson SC; Sevigny J; Communi D; Soltoff SP, and Kelly CP (2001) **P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol 276, 28.26051-26056
255. WATANO T; Matsuoka I; Ogawa K, and Kimura J (2002) **Effects of ânions on ATP-induced Ca²⁺, increase in NG108-15 cells.** *Jpn.J.Pharmacol*. Vol 89, 3.302-308

Bibliografia

-
256. WATT WC; Lazarowski ER, and Boucher RC (1998) **Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 273, 22.14053-14058
257. WESTFALL DP; Sedaa KO; Shinozuka K; Bjur RA, and Buxton ILO (1990) **ATP as a cotransmitter.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 603, 300-310
258. WILEY JS; Chen R; Wiley MJ, and Jamieson GP (1992) **The ATP⁴⁻ receptor-operated ion channel of human lymphocytes: Inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Vol 292, 411-418
259. WILEY JS; Dao-Ung LP; Li C; Shemon AN; Gu BJ; Smart ML; Fuller SJ; Barden JA; Petrou S, and Sluyter R (2003) **An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor.** *Journal of Biological Chemistry.* Vol 278,19.17108-13.
260. WILKIN F; Stordeur P; Goldman M; Boeynaems JM, and Robaye B (2002) **Extracellular adenine nucleotides modulate cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells: dual effect on IL-12 and stimulation of IL-10.** *European Journal of Immunology.* Vol 32, 9.2409-2417
261. WORTHINGTON RA; Smart ML; Gu BJ; Williams DA; Petrou S; Wiley JS, and Barden JA (2002) **Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function.** *FEBS Letters.* Vol 512, 1-3.43-46
262. YOON MJ; Lee HJ; Lee YS; Kim JH; Park JK; Chang WK; Shin HC, and Kim DK (2007) **Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells.** *Biol.Pharm.Bull.* Vol 30, 4.671-676
263. ZABORINA O; Li X; Cheng G; Kapatral V, and Chakrabarty AM (1999a) **Secretion of ATP-utilizing enzymes, nucleoside diphosphate kinase and ATPase, by Mycobacterium bovis BCG: sequestration of ATP from macrophage P2Z receptors?** *Molecular Microbiology.* Vol 31, 5.1333-1343
264. ZABORINA O; Misra N; Kostal J; Kamath S; Kapatral V; El-Idrissi ME; Prabhakar BS, and Chakrabarty AM (1999b) **P2Z-Independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients.** *Infection and Immunity.* Vol 67, 10.5231-5242

Bibliografia

265. ZHOU X; Engel T; Goepfert C; Erren M; Assmann G, and von Eckardstein A (2002) **The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 291, 5.598-604
266. ZIMMERMANN H (2001) **Ectonucleotidases : Some Recent Developments and a Note on Nomenclature.** *Drug Dev.Res.* Vol 52, 44-56
267. ZOU H; Ugur M; Drummond RM, and Singer JJ (2001) **Coupling of a P2Z-like purinoceptor to a fatty acid-activated K(+) channel in toad gastric smooth muscle cells.** *J.Physiol.* Vol 534, Pt 1.59-70

9 Anexo

**ATP-induced P2X₇-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms
for cations and ânions in macrophages.**

Julieta Schachter^{*}, Andressa Piedade Motta^{*}, Aliane de Souza Zamorano^{*}, Marilia Zaluar P.
Guimarães[§], and Pedro Muanis Persechini^{*, 1}

^{*}Laboratório de Imunobiofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, and

[§]Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Running title: ATP-induced P2X₇- associated transport

¹*For correspondence:* Pedro Muanis Persechini, Laboratório de Imunobiofísica, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, Bloco G do CCS - Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de
Janeiro - RJ - Brasil. Tel: (55) 021 2562-6565. E-mail: pedrump@biof.ufrj.br

KEYWORDS:

ATP; P2 receptor; P2X₇; Permeabilization; Macrophage; cation; ânion; pore.

SUMMARY

Macrophages express P2X₇ and other nucleotide (P2) receptors, and display the phenomenon of extracellular ATP (ATP_e)-induced P2X₇-dependent membrane permeabilization which occurs through a poorly understood mechanism. We used patch-clamp recordings, intracellular Ca²⁺ measurements and fluorescent dye uptake assays to compare P2X₇-associated transport phenomena of macrophages and HEK 293 cells transfected with P2X₇ receptors (HEK-X₇ cells). Both cells presented inward currents, increase of free intracellular Ca²⁺ concentration and the uptake of cationic dyes upon exposure to ATP_e, as previously described. However, contrary to macrophages, HEK-X₇ cells did not uptake anionic dyes and did not display the 440 pS channels (Z pores) under cell-attached patch-clamping configuration. In addition the transport mechanism of anionic dyes displayed by macrophages can also support dye efflux and, once activated at 37°C, it remains active at 4°C, while cationic dyes follow a temperature-dependent unidirectional uptake pathway. Our results indicate that the mechanism of ATP_e-induced dye uptake, usually called “permeabilization phenomenon” and identified with a “permeabilization pore” can be ascribed to at least two distinct mechanisms in macrophages: a diffusional pathway, possibly associated with the 440 pS Z pores, and a cation uptake mechanism that is not diffusional and should be ascribed to a yet non-identified transport mechanism.

INTRODUCTION

Extracellular nucleotides and adenosine have been included among the immunomodulators during immune response/inflammation (Di Virgilio et al., 2001; Ferrari et al., 2006; Kornbluth and Stone, 2006). They can be delivered to the extracellular medium by several mechanisms such as regulated secretion, cell lyses, transmembrane channels and transporters (Lazarowski et al., 2003). Their activities are mediated in great part by nucleotide (P2) and adenosine (P1) receptors (North, 2002; Ralevic and Burnstock, 1998), and modulated by ecto-nucleotidases such as CD39 and CD73, expressed in macrophages, dendritic and endothelial cells, as well as by other cells that participate in the immune response (Dwyer et al., 2007).

The P2X₇ receptor is an ATP-gated cation-selective channel permeable to Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ that have also been associated with the opening of a non-selective pore that allows the passage of large organic ions (Erb et al., 2006; North, 2002; Persechini et al., 1998; Steinberg et al., 1987a). Its activation can induce cell death by apoptosis and necrosis, cytokine release, killing of intracellular pathogens, and membrane blebbing (Coutinho-Silva et al., 2003; Di Virgilio et al., 2001; Ferrari et al., 2006). In addition, P2X₇ receptors are up regulated by IFN- γ plus LPS (Ferrari et al., 2006) and cooperate with toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs) in the process of pathogen recognition, activation of inflammasome, and maturation and secretion of IL-1 β and IL-18 (Mariathasan and Monack, 2007).

Although different signaling pathways are known to be triggered by P2X₇ and other P2 receptors in macrophages, the specific pathways that lead to each of the P2X₇-dependent responses are still poorly understood (Erb et al., 2006; Humphreys et al., 2000; Kim et al., 2001; Mackenzie et al., 2005; Monteiro-da-Cruz et al., 2006; Monteiro-da-Cruz et al., 2007; North, 2002; Persechini et al., 1998; Pfeiffer et al., 2007). In particular, the elucidation of the pathway or pathways that link extracellular ATP (ATP_e) and P2X₇ to membrane

permeabilization still await further clarification (Garcia-Marcos et al., 2006), even though (Adinolfi et al., 2005; North, 2002) the requirement for P2X₇ receptors is firmly established by pharmacological tools and experiments with knock-out mice (Coutinho-Silva et al., 2003). The permeabilization phenomenon is itself poorly characterized. It is generally accepted that ATP_e can induce the opening of permeabilization pores that allow the passage of molecules of up to approximately 900 Da in macrophages and below 400 Da in lymphocytes (Adinolfi et al., 2005; North, 2002). However, few molecules have been in fact studied. In macrophages, the DNA-binding cationic dyes of different M_r (herein we use values corresponding to the ionized form in solution) such as ethidium (314 Da), propidium (414 Da), and YO-PRO-1 (375 Da) and the anionic dyes carboxyfluorescein (CF) (376 Da), Lucifer Yellow (LY) (443 Da), and Fura-2 (637 Da) are taken up upon ATP or BzATP stimulation (Steinberg et al., 1987a; Virginio et al., 1999). Anions of larger M_r such as Evans Blue (869 Da), and Trypan Blue (869 Da), are not taken up (Steinberg et al., 1987a). In lymphocytes, ATP_e induces the uptake of ethidium but not of propidium (Wiley et al., 1993).

LY and DNA-binding dyes have been widely used in macrophages, dendritic cells, lymphocytes, astrocytes and cells transfected with P2X₇ to investigate the permeabilization phenomenon. However, the uptake of anions have not been reported either in HEK 293 cells or astrocytomas transfected with P2X₇ receptors of different sources, nor in lymphocytes (Chessell et al., 1998; Duan et al., 2003; Ferrari et al., 2000; Paukert et al., 2002; Rassendren et al., 1997; Steinberg et al., 1987a; Suadicani et al., 2006; Surprenant et al., 1996; Wiley et al., 1993), suggesting that in these experimental situations, ATP_e does might induce membrane permeabilization to anions.

The mechanism underlining the dye uptake phenomena has been proposed to be by free diffusion through a permeabilization pore opened in the plasma membrane based on the evidences that LY concentration in the cytoplasm reaches a value close to the extracellular

concentration of the dye (Steinberg et al., 1987a) and, although the intracellular concentration and influx rate of most cationic dyes are more difficult to measure due to their nucleic acid-binding properties, it has been assumed that cations and anions enter the cells through the same pathway. However, different evidences indicate that the uptake of large cations and anions could involve distinct mechanisms (Egan et al., 2006; North, 2002). Whole-cell patch clamp recordings performed on cells transfected with P2X₇ receptors indicated a permeability shift from low to high M_r molecules in the first seconds after stimulated by ATP_e, while keeping the selectivity for cations (Virginio et al., 1999). In addition, ATP_e induces the uptake of both cationic and anionic dyes in macrophages (Steinberg et al., 1987a), while only the uptake of cationic dyes has been reported in HEK 293 and 1321N1 astrocytoma cells transfected with P2X₇ (Suadicani et al., 2006; Surprenant et al., 1996).

Based on cell-attached patch-clamping experiments demonstrating the opening of large cation- and anion- permeant channels (Z pores) induced by ATP_e in macrophages, we have hypothesized that the pore associated with the ATP_e-induced permeabilization phenomenon in macrophages could be ascribed to a molecular entity distinct from the receptor itself, but coupled to P2X₇ through an unidentified signaling mechanism (Coutinho-Silva and Persechini, 1997; Persechini et al., 1998). This possibility has recently been corroborated by data showing that pannexin-1, a protein that forms large non-selective transmembrane channels (Barbe et al., 2006), is involved in the phenomenon of P2X₇-associated, ATP_e-induced membrane permeabilization (Locovei et al., 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006). However, there have been no reports of any large and non selective unitary channels similar to the Z pores in cells transfected with P2X₇ receptors under conditions of ATP_e-induced dye uptake. Moreover, pannexin-1 channels are expected to be permeable to both cations and anions (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006; Locovei et al., 2007), while there is no reports of either whole cell currents or dye uptake of anions in cells transfected

with P2X₇ alone (Hibell et al., 2001; Rassendren et al., 1997; Virginio et al., 1997; Virginio et al., 1999). The lack of data regarding the downstream events associated with P2X₇ receptors prevent us from fully understand their role in macrophage physiology and in the immune system.

To further dissect the events involved in ATP_e-induced P2X₇-associated phenomena in macrophages we use a mixed approach by comparing macrophages and HEK 293 cells transfected with P2X₇ receptors (HEK-X₇ cells) using three different techniques: fluorescent dye uptake, intracellular Ca²⁺ measurement with Fura-2, and patch-clamp recordings. We concluded that the P2X₇-triggered phenomena are more diverse than previously thought and the so called “permeabilization phenomenon”, usually identified with a “permeabilization pore” can be ascribed to at least two distinct mechanisms: one for cations and another for ânions. Our results imply that previous data obtained using only one approach to study P2X₇-associated phenomena (e.g. whole cell current, LY uptake, YO-PRO-1 uptake, intracellular Ca²⁺ measurement) should be re-addressed and the uptake of ânions and cations should be treated separately.

RESULTS

Functional expression of P2X₇ receptors in HEK 293 cells. We stably transfected HEK 293 cells with P2X₇ cDNA and performed whole-cell current recordings, measurement of free intracellular Ca²⁺ concentration, and dye uptake experiments in order to ascertain the functionality of the transfected receptors. Macrophages were used as control wild type P2X₇-expressing cells. HEK-X₇ cells express the P2X₇ receptor protein (Fig 1H) and display typical ATP_e-induced inward currents (Fig. 1C) similar to what was observed in macrophages (Fig. 1A), as previously described (Surprenant et al., 1996). In macrophages, besides the inward current, ATP_e also triggers an outward current (Fig 1A) previously shown to ascribed to a Ca²⁺-dependent K⁺ channel (Albuquerque et al., 1993) that is not present in HEK-X₇ cells (Figs 1B-C). HEK-X₇ cells and macrophages, also display a sustained ATP_e-induced increase in the free intracellular Ca²⁺ concentration not present in wild untransfected HEK 293 cells (Figs. 1D-G). A small Ca²⁺ signal also observed in untransfected HEK 293 cells (Fig. 1E) is possibly due to the presence of other P2 receptors in these cells. The EC₅₀ obtained for the Ca²⁺ signal in HEK-X₇ cells was 0.8 mM ATP corresponding to 86 μM of ATP⁴⁻, a value consistent with previously published results for the EC₅₀ of the inward current of the cloned rat P2X₇ receptor in the absence of divalent cations (Surprenant et al., 1996).

We next showed that that macrophages (Figs. 2 A-B) and HEK-X₇ cells (Figs. 2 E-F)), but not untransfected HEK 293 cells (Figs. 2 C-D), presented the phenomenon of ATP_e-induced uptake of the cationic DNA-binding dyes ethidium (Fig. 2) and YO-PRO-1 (data not shown), as previously described (Virginio et al., 1999). In addition, the uptake of ethidium by HEK-X₇ cells was blocked by oxATP (Fig. 2G) as in macrophages ((Murgia et al., 1993) and data not shown), another raw mark of the P2X₇-associated phenomena.

Large ATP_e-induced channels (Z pores) are observed in macrophages but not in HEK-X₇ cells. The above results confirm data in the literature and ascertain that the P2X₇ receptors expressed in transfected cells are functional, establishing the ground to further investigate other P2X₇-associated phenomena.

We have previously identified an ATP_e-activated P2X₇-associated non-selective channel activated in macrophages (Coutinho-Silva and Persechini, 1997). These channels were called Z pores and could only be recorded under cell-attached patch-clamping configuration. Because they carry currents of large cations (Tris, 121 Da and NMDG, 195 Da) and ânions (Glutamate, 146 Da) we have proposed that they could be pathway for dye uptake (Coutinho-Silva and Persechini, 1997; Persechini et al., 1998). We have therefore investigated whether HEK-X₇ cells also displayed a similar large conductance non selective channel under cell-attached patch-clamping conditions. We observed that, while in macrophages Z pores were readily detected in 35 out of 42 cells during the first 4 min after ATP_e application (Fig. 3A recording a), no large conductance channels were observed under similar conditions neither in HEK-X₇ cells (n = 10) (Fig. 3B) during up to 30 min after ATP_e application. In all experiments, the holding potential was kept initially at -40 mV inside the pipette, but no channels were observed by varying pipette potential from -80 to +40 mV, corresponding to a patch transmembrane potentials ranging from -40 to +80 mV considering that the cellular transmembrane potential should be 0 mV in the presence of ATP due to the opening of the non-desensitizing P2X₇ cation currents.

In addition, in some experiments, we have also added 10 mM ATP to the pipette solution but no pores were observed either (n=13). The Z pores of macrophages presented a conductance state of 440 ± 16 pS and a more rare state of 260 ± 49 pS. They displayed a strong rectification, being detected only at negative pipette potentials (Fig. 3C). The reversal pipette potential was -2.7 mV, a value consistent with a reversal membrane potential of 0 mV

since in the presence of ATP_e the whole cell membrane is depolarized due to the opening of $P2X_7$ channels, as previously described (Coutinho-Silva and Persechini, 1997).

To further investigate the relationship between the Z pores and the phenomenon of dye uptake by macrophages, we also performed cell-attached recordings and uptake assays using both ethidium and LY in the absence of divalent cations, a condition known to interfere in the activation of $P2X_7$ receptors and in the uptake of dyes (Steinberg et al., 1987a) (Fig. 3A, recording b and Table I). In the divalent-free solution, the unitary events were rarer leading to a significantly decreased open probability (-36%), while the mean open time of each event increased significantly (+98%). These data suggest that any Z pore-associated permeability would decrease in the absence of divalent cations. In keeping with this possibility the uptake of LY by macrophages also decreased significantly under the same experimental conditions while the uptake ethidium did not (Fig. 3D). Similar results were obtained when macrophages were pre-loaded with BAPTA-AM and kept in the same divalent-free solution (data not shown), a condition that completely abrogates ATP_e -induced Ca^{2+} signaling in macrophages (Monteiro-da-Cruz et al., 2006). These results indicate that the Z pores are associated with the uptake of LY (an anion) but not ethidium (a cation). In accordance with this hypothesis, the uptake of ethidium HEK- X_7 cells, a phenomenon that seem not to involve Z pores, was not significantly changed in divalent-free solution regardless of pre-loading with BAPTA-AM (data not shown). Therefore, the changes in LY uptake requires intracellular Ca^{2+} signaling and correlates well with the changes in the total open time of the Z pores while the uptake of ethidium does not require either the presence of Z pores nor intracellular Ca^{2+} signaling.

ATP_e induces the uptake of anionic dyes in macrophages but not in HEK- X_7 cells. The above results suggest that anions and cations are taken up by distinct pathways and prompted us to further investigate possible differences between the ATP_e -induced dye uptake

phenomena of these two cell types. We began by using different anionic and cationic dyes. The anion LY (443 Da) is promptly taken up by macrophages (Figs. 4 A-B) but not by HEK-X₇ cells (Figs. 4 C-D). Similar results were obtained with CF, another anion, of a smaller M_r (376 Da) (data not shown). We next performed dye-uptake experiments with MQAE, a 246 Da cationic dye used as a Cl⁻ detector and that does not bind to DNA, being directly visualized in the cytoplasmic compartment of the cells (Munkonge et al., 2004). MQAE can be loaded into both macrophages (Figs. 4E-F) and HEK-X₇ cells (Figs. 4G-H) in a regular ATP_e-induced dye uptake assay. SR-B (558 Da), another cation that does not require nucleotide binding to be observed, was also taken up by macrophages (see Fig. 6). These results showed that the uptake of cations is not an exclusive property of DNA-binding dyes and is present in both macrophages and HEK-X₇ cells, while the uptake of anions is present only in macrophages.

Uptake of anions and not cations through a diffusional pathway.

The above described differences in electrophysiological and dye uptake properties of ATP_e-stimulated cells suggest that at least two distinct transport mechanisms are activated by ATP_e in P2X₇-bearing cells. To further distinguish between these two pathways, we decided to investigate the temperature dependence of the dye uptake phenomenon. First, as the effect of ATP_e has been reported to be temperature-dependent (Coutinho-Silva and Persechini, 1997; Gibbons et al., 2001; Nuttle and Dubyak, 1994; Persechini et al., 1998; Steinberg et al., 1987a) we stimulated macrophages and HEK-X₇ cells with 5 mM ATP, 10 min in the presence of either LY or BE, at 0, 10, 20, 25, 30, and 37°C. The results showed that both the uptake of LY or ethidium by macrophages and the uptake of ethidium by HEK-X₇ cells, decreases in the range 25-20°C and are not observed below 20°C (data not shown). Therefore

both anion and cation uptake in both cell types are temperature-dependent, suggesting a common regulatory mechanism for both pathways.

We next investigated the possibility that once opened at 37°C, either or both uptake pathways could remain opened if the cells are cooled down in the presence of ATP_e. This feature was uncovered and shown in a recent report where J774 macrophages were loaded with trehalose, a sugar used in dehydration protection of cells, under similar experimental conditions (Elliott et al., 2006). We then stimulated macrophages with ATP_e at 37°C for 10 min, cooled them down to 4°C on ice, and only then the dye was added into the culture plate. Cells were then washed gently with cold medium containing ATP and moved to the stage of the microscope. Under these conditions, any dye uptake that taking place at low temperature would allow us to distinguish between active and passive transport. We observed that ethidium (Fig. 5 A-B) and MQAE (Fig. 5 D-E) are not taken up by macrophages, while LY (Figs. 5 F-G) and CF (not shown) are still taken up. The result obtained with MQAE indicates that the blockade of ethidium uptake is not an exclusive characteristic of DNA-binding dyes that could also be influenced by any putative cytoplasm-nucleus communication mechanisms. In addition, we also showed that the blockade of cation uptake at low temperature was reversible since the typical staining could be observed after heating up to 37°C again the cells in the continuous presence of ATP_e (Fig. 5C).

The persistence of CF and LY uptake at low temperature supports the idea that the pathway used by anions to permeate macrophage membranes is by diffusion and is consistent with the presence of a pore that, once activated at 37°C, opened at low temperature. The lack of permeation of ethidium and MQAE at low temperature represent additional evidence supporting the hypothesis idea that the uptake of cations follows a different pathway.

To further differentiate the mechanisms of transport of cations and anions we next investigated the efflux of cytoplasmic dyes using LY as an anion (Fig. 6A-D) and SR-B as a

cation (Figs. 6E-H). Cells were initially loaded by the addition of ATP_e (Figs. 6B and F) washed free of the dye and ATP and, after a 10 min resting period in the absence of any dyes or agonist, re-exposed (Figs. 6 D and H) or not (Figs. 6 C and G) to ATP_e for an additional period of 10 min. We observed that while LY leaked out from the cells (Fig 6 D), SR-B remained trapped in the cytoplasm (Fig. 6 H). No significant decrease in the fluorescence emitted by SR-B was observed even after 30 min in the presence of ATP_e (data not shown) but it could be readily observed after the permeabilization plasma membranes with 0.01% saponin (data not shown), indicating that it did not retained inside the cell due to unspecific binding. Ethidium could not be used in these efflux experiments due to its DNA-binding properties which makes its fluorescence to remain in the nuclei even after addition of saponin (data not shown). Interestingly, the efflux of LY could only be observed in the presence of probenecid, a blocker of anion transporters required to avoid the uptake of LY into intracellular compartments, as previously described (Steinberg et al., 1987b) and confirmed by us under our experimental conditions (data not shown).

DISCUSSION

P2X₇ receptors have been linked to several signaling pathways and cellular events and its role in many cells, including those of the immune and nervous systems, has been raising increasing interest. The original identification of this receptor (Surprenant et al., 1996) originated from the search for a molecular identity for the then called P2Z receptor, originally characterized in mastocytes and macrophages by its pharmacological characteristics and by the remarkable phenomenon of uptake of cationic and anionic dyes of M_r below 900 Da (Cockcroft and Gomperts, 1980; Dubyak and El-Moatassim, 1993; Steinberg et al., 1987a). The identification of P2Z-associated phenomena with the P2X₇ was confirmed established after the establishment of P2X₇ knock-out mice lineages by the demonstration that macrophages lacking the expression of these receptors did not display the phenomena of ATP_e-induced uptake of dyes, cytokine secretion and apoptosis (Coutinho-Silva et al., 2003; Labasi et al., 2002; Solle et al., 2001). However, although the original work by Silberstein's group have clearly demonstrated that anions as well as cations were taken up by macrophages upon ATP_e stimulation, most studies aimed to characterize the permeabilization phenomenon associated with P2X₇ receptors focused on nucleotide-binding cationic dyes such as ethidium propidium and YO-PRO-1 (Adinolfi et al., 2005), overlooking the previous results with anionic dyes. In fact, we could not find any reports of uptake of anionic dyes by cells transfected with P2X₇ receptor alone.

In this work, besides investigating the uptake of different cationic and anionic dyes, we have performed, whole-cell and cell attached patch-clamping, and intracellular Ca²⁺ measurements to comparatively investigate ATP_e-induced P2X₇-associated phenomena displayed by murine macrophages and HEK-X₇ cells. Both cells present ATP_e-induced inward currents and raise in free intracellular Ca²⁺ concentration consistent with previously reported data for P2X₇-associated phenomena (Persechini et al., 1998; Rassendren et al., 1997). In

addition, HEK-X₇ cells displays the phenomenon of ATP_e-induced dye uptake when probed with cationic dyes such as ethidium and YO-PRO-1 usually referred as membrane permeabilization or pore formation (Rassendren et al., 1997; Virginio et al., 1997; Virginio et al., 1999).

Besides these similarities, there are also important differences between macrophages and HEK-X₇ cells. While the uptake of cationic dyes occurs in both cells, the uptake of anionic dyes occurs only in macrophages. Moreover, in cell attached patch-clamp experiments, only macrophages displayed an ATP_e-induced 440 pS channel (Z pores) previously shown to be associated with P2X₇ (Coutinho-Silva and Persechini, 1997; Faria et al., 2004). The ability to uptake both cation and anions is not a solely property of murine macrophages since rat peritoneal macrophages (data not shown), rat astrocytes (Duan et al., 2003) and human macrophages (Suh et al., 2001) also present the same phenomenon. Therefore the differences between native P2X₇ expressed in macrophages and in transfected cells are more likely due to the lack of specific conditions such as signal transduction machinery or a pore-forming molecule in the later.

Based on these observations we investigated the possibility that the pathway for uptake of anionic dyes involve the opening of Z pores, while the uptake of cationic dyes does not. In keeping with this possibility we showed that when dyes were added to ATP_e-activated cells after cooling them down on ice, the uptake of cationic dyes are inhibited in both cells, while anionic dyes still permeates through macrophage membranes. These results support the view that the mechanisms of uptake anionic dyes is present only in macrophages and follows a diffusional pathway, while the uptake of cationic dyes requires a different mechanism. The use of two different anions (CF and LY), four different cations (ethidium, YO-PRO-1, MQAE AND SR-B), as well as efflux experiments make it difficult to ascribe these results to different sensibility of the detection system for the fluorescence of anionic and cationic dies.

The diffusional nature of the anion pathway was further confirmed by showing that anions but not cations previously loaded into macrophages by ATP_e can be released from the cells after re-exposure to ATP_e. These results confirm the original work from Silverstein's group that used anionic dyes to show that ATP_e-induced dye uptake is due to a diffusional process (Steinberg et al., 1987a). However, although this concept has been frequently generalized to all dyes limited only to their M_r, we could find no similar reports regarding cationic dyes. In keeping with this possibility, we have also shown that both the uptake of anionic dyes and the open probability of Z pores decreases in the absence of divalent cations. It should be emphasized that even though divalent-free extracellular solutions increases the effect of extracellular ATP, possibly by increasing the concentration of free ATP⁴⁻ ions (Steinberg et al., 1987a), the inhibition observed by us requires the chelation of these divalent ion with 10 mM EDTA, a condition that reduces the concentration of free extracellular Mg²⁺ in our normal extracellular solution from 1 mM to 0.5 μM and the concentration of free Ca²⁺ to 0.5 nM or even less (assuming a maximum of 100 μM residual concentration of this ion). In accordance with this view, it has been shown that the flow of LY from the patch pipette into the cell through the attached membrane patches is coincident with the opening of Z pores (Faria et al., 2004). The blockade of the uptake of LY after chelating extracellular Ca²⁺ with EGTA has also been previously reported (Alves et al., 1996), indicating that Ca²⁺ rather than Mg²⁺ is the critical divalent cation. On the other hand, the uptake of ethidium was resistant to the chelation of divalent cations, even in cells loaded with BAPTA-AM, a condition that completely abrogates the intracellular Ca²⁺ signaling (Monteiro-da-Cruz et al., 2006). Taken together these results also imply that it is unlikely that Z pores are involved in the uptake of large cationic dyes.

We therefore propose that, besides the small (8-9 pS) and non-selective cation channels directly associated with the P2X₇ receptors (Persechini et al., 1998; Riedel et al.,

2006), at least two additional transport mechanisms are activated by ATP_e in macrophages in normal extracellular solution: the anion uptake mechanism is associated with Z pores and allows the free diffusional flow of anionic dyes through the plasma membrane, while the mechanism for the non diffusional uptake of cations remains to be elucidated.

The molecular nature of these two transport mechanisms remains to be elucidated. Recently, it has been proposed that pannexin 1 is required for cationic dye uptake in both macrophages and P2X₇-transfected cells (Locovei et al., 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006). However, these studies make use of whole-cell patch-clamping currents but no unitary channels have been reported. Pannexin 1 can form large non selective transmembrane channels that have some biophysical properties that resembles the Z pores as a large unitary conductance (475 pS), a reversal potential of 0 mV, multiple conductance states, and a voltage-dependent gating that favors the opening at positive membrane potentials (Bao et al., 2004; Shestopalov and Panchin, 2007). Moreover pannexin-1 channels expressed in oocytes can also carry currents for a large anions such as ATP^{3-} (504 Da) in inside-out recordings patches (Bao et al., 2004), a data consistent with the flux of LY (443 Da), but we found no single channel studies for the permeability of pannexin-1 unitary channels for large cations. On the other hand, we have previously shown that under cell attached conditions, the reversal potential of the Z pores of macrophages did not change significantly in solutions where Tris (121 Da) or NMDG (195 Da) were substituted for Na^+ , Glutamate (146 Da) was substituted for Cl^- or mannitol was partially substituted for NaCl (Coutinho-Silva and Persechini, 1997). These results are consistent of both cation and anion permeability but more experiments are needed to examine the selectivity for larger molecules, the opening probability and other properties of these pores. The requirement for divalent cations also deserves further investigation. Although pannexin pores opens in the presence of a range of Ca^{2+} concentrations in the extracellular medium (Bruzzone et al., 2005), a more stringent control of

the low concentration range with the use of chelating agents such as EDTA or BAPTA-AM has not been reported.

Taken together, our data are consistent with the possibility that the Z pores of macrophages are involved in the uptake of anionic dyes but are difficult to conciliate with the possibility that the same pores mediate the uptake of cationic dyes. Consistent with this view, *Xenopus* oocytes transfected with P2X₇ display the phenomenon of ATP_e-induced uptake of cationic dye ((Nuttle and Dubyak, 1994; Worthington et al., 2002) and our unpublished results), and became permeable to the anionic dye CF only after co-transfected with pannexin 1 (Locovei et al., 2007). Therefore, although we do not exclude the involvement of pannexin 1 in the uptake of cationic dyes coupled to P2X₇ activation, our data shows that this phenomenon does not involve the formation of large no-selective channels, suggesting that P2X₇ might also couple to another transport mechanism. Interestingly, it has been recently shown cells with either pannexin-1 or pannexin-3 spontaneously take up SR-B without the addition of exogenous ATP any reported changes in the whole-cell conductance (Penuela et al., 2007), a data that is consistent with the possible association of pannexins with an pore-independent mechanism of uptake of cationic dyes.

Therefore, the possible identification of pannexin-1 with the Z pores and the uptake of cationic and anionic dyes induced by ATP_e in macrophages deserve further experimental analysis and the involvement of other candidate pore-forming proteins and transporters should also be taken into account. In this regard, the possible involvement of connexins should be readdressed due to their diversity, the possibility that they form hemi-channels (Saez et al., 2005), and the recent description their physical (Fortes et al., 2004) and functional (Iacobas et al., 2007) association with P2 receptors.

Irrespective to the molecular identity of Z pores and the role they play in the phenomena of ATP_e-induced dye transport, its role in P2X₇-associated phenomena and in

macrophage physiology also deserves further investigation. Their large and non-selective conductance together with their strong voltage dependence make them potential regulators of membrane potential, osmotic balance and transport of small molecules.

Our results raise the need that in any studies aimed to elucidate P2X₇-associated phenomena and their roles in macrophage physiology, the transport of large cationic and anionic molecules, as well as Z pores and the small cation channels should be independently analyzed. It should also be interesting to investigate to what extent these observations could be applied to other P2X₇-expressing cells such as lymphocytes, astrocytes, mastocytes and dendritic cells.

These results open new possibilities in the planning of P2-based strategies to intervene in the immune as each one of these phenomena could have different consequences in different situations such as differentiation, cell death, drug transport through cell membranes, cytokine secretion and the activation of the inflammasome.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum penicillin and streptomycin were obtained from Gibco/BRL (São Paulo, SP, Brasil). Thioglycollate medium was from Difco (Detroit, MI, USA). NaCl, MgCl₂, CaCl₂, KCl, methanol, Trizma-base, glycine, and glycerol were from Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Adenosine-5-Triphosphate (ATP), EGTA, EDTA, Tween 20, sodium dodecyl sulfate (SDS), periodate-oxidized ATP (oxATP), ethidium bromide, sucrose, Poly-L-Lysine, HEPES, dimethyl sulfoxide (DMSO), sulforhodamine B (SR-B), and Lucifer yellow lithium salt, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). BAPTA-AM, YO-PRO-1, Fura-2-AM, MQAE (N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide) and probenecid were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Lipofectamine-2000, pcDNA6/V5-His A and Blastidina S HCl were from Invitrogen (São Paulo, SP, Brazil). Bovine serum albumin was from USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA), and 5(6)-Carboxyfluorescein from Eastman Kodak (Rochester, NY, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse-IgG antibody, Bradford reagent and Enhanced Chemiluminescence (ECL-Plus) kit were from Amersham Pharmacia Biosciences (São Paulo, SP, Brazil). Nonfat dry milk was obtained from Molico (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Anti P2X₇ antibody was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin and aprotinin were from Biochemica Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, was from Bio-Rad (São Paulo, SP, Brazil).

Animals: *Swiss-Webster* mice were obtained from the animal facilities of the Instituto de Microbiologia Paulo de Goes and from the Transgenic Animal Facility of the Instituto de

Biofísica Carlos Chagas Filho of the Federal University of Rio de Janeiro. All animals were eight to twelve week-old, weighed approximately 16-30 g and were handled according to the guidelines for animal use in scientific experiments of the Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho of the Federal University of Rio de Janeiro.

Macrophage isolation and culture: Thioglycollate-elicited macrophages were obtained from the intra-peritoneal cavity of mice, collected 4 days after thioglycollate injection, as previously described (Coutinho-Silva and Persechini, 1997). In brief, cells were washed in DMEM and kept on ice at a concentration of 10^6 cells/mL. For permeabilization assays and electrophysiological experiments, cells were plated on 35 mm culture dishes at a concentration of 2×10^5 cells/dish in 2 mL DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 g/L sodium bicarbonate, 0.3 mg/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (complete medium) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Non adherent cells were then removed after 1 hr and the macrophages were kept for 4 days under the same culture conditions. For calcium measurements, cells were plated on glass cover slips at a concentration of 5×10^5 cells/dish.

Stable expression of P2X₇ in HEK 293 cells: The rat P2X₇ cDNA (Surprenant et al., 1996) (a generous gift from Dr. David Julius at the Departments of Anatomy and Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco, CA, USA) was sub cloned into pcDNA6/V5-His A. For transfection, HEK 293 cells were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum and plated at 70-80% confluence. About 30 μ g of linearized plasmid was used to transfect cells with Lipofectamine 2000, following the manufacturer's instructions. Next day the medium was replaced and 5 μ g/mL Blasticidin S HCl was introduced to select for transfected cells. One week after transfection, with the

medium being replenished every 2 days, a few clones were picked with a sterile tip and placed individually in a well of a 12-well plate. After expansion of the clones they were assayed for permeabilization with ATP and ethidium bromide and the best responses selected.

Culture of HEK 293 cells: Cells were plated in Poly-L-Lysine coated 35 mm culture dishes in 2 mL DMEM complete medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The HEK-X₇ cell medium was supplemented with 5 µg/mL Blasticidin S HCl.

Cellular extracts: Cells were lysed in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 250 mM sucrose, 17 µg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 25 µg/mL leupeptin and 25 µg/mL aprotinin) by 30 passages through a 28 gauge needle and kept on ice for a few minutes until used as described bellow.

Anti-P2X₇ Western Blots: Cell extracts prepared as above, were mixed with a gel loading solution boiled and 10 µg of total protein per lane were separated by electrophoresis on a 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes using standard protocols. The protein concentration in the extracts was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. Membranes were then incubated with a blocking buffer consisting of TTBS (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) containing 5% nonfat dry milk for 2 h at room temperature and then incubated overnight with anti-P2X₇ C-terminal antibody (diluted 1:200) at 4°C. After three rinses in TTBS for 5 min each, membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-IgG (1:2000) diluted in blocking buffer. Membranes were then washed three times for 10 min in TTBS, and bound antibodies were detected by ECL-plus reaction according to the manufacturer's instructions.

Dye uptake and efflux assays: ATP-induced dye uptake was measured by detecting the fluorescence of an intracellular dye in a Axiovert 100 microscope (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a HBO lamp and appropriate filters. Unless otherwise specified, cells were kept at 37°C for 5 min, in a solution containing in mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, and 10 Na-HEPES, pH 7.4 (normal extracellular solution). Ethidium bromide (10 μM final concentration) or YO-PRO-1 (25 μM), carboxyfluorescein (5 mM), or LY (3 mM) and ATP (5 mM) were then added and the cells were kept under the same conditions for an additional period of 10 minutes. The dye uptake was then determined by fluorescence microscopy using a Axiovert 100 microscope equipped with a digital camera. In assays requiring BAPTA-AM loaded cells, macrophages were first prepared as described below for "Intracellular calcium measurements". In experiments using the Cl⁻ indicator MQAE, glutamate was substituted for Cl⁻ in the bathing solution and a microscope equipped with appropriated filters were used. In all fluorescence observations, cells were also observed using a clear field illumination (not shown in the figures) and at least 50 macrophages were present in each microscope field studied.

Electrophysiology: Macrophages and HEK 293 cells were plated in 35 mm plastic culture dishes for 3-5 days as described above. Before the experiment, the culture medium was exchanged for one of the salt solutions described below: Unless otherwise specified, experiments were performed in normal solution (composition defined above) at -40 mV holding potential. In some experiments, NaCl was substituted for Tris-Cl (low Na⁺ solution) or 10 mM EDTA was added to the normal solution (divalent-free solution), as specified in the text and legends. Ionic currents were recorded in whole cell or cell-attached configurations, using an EPC-7 amplifier (List Electronic, Darmstadt, Germany) according to standard patch-

clamping techniques (Hamill et al., 1981). Giga-ohm seals were formed after offset potential compensation, using heat-polished micropipettes of 5–10 M Ω filled with an intrapipette solution (in mM: 135 KCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 0.1 K-EGTA, and 10 K-HEPES, pH 7.4) in the whole cell experiments and with the same extracellular solution in cell attached experiments. ATP was applied onto the cell surface by pneumatic injection, using a second micropipette filled with ATP, at the indicated concentration, dissolved in extracellular solution and connected to a PPM-2 pneumatic pump (NeuroPhore BH-2 system, List). Data were collected using pClamp and Fetchex software, version 6.0, and a Digidata 1200 interface (Axon Instruments, USA) and plotted using Origin software (Microcal Inc, USA, version 4.0).

Intracellular calcium measurements: Macrophages were plated on glass cover slips for 3-5 days were loaded with 5 μ M Fura-2 AM with or without 10 μ g/mL BAPTA-AM for 30 min at room temperature in HEPES-buffered culture medium containing 2.5 mM probenecid. The cells were then washed twice and accommodated in a three-compartment superfusion chamber whose base was formed by the cover slip containing the cells. The central chamber containing the cells had a volume of 200 μ L, and was perfused at a rate of 1 mL/min. The perfusion solution contained, in mM: 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 10 Na-HEPES, pH 7.4; and either 1 mM CaCl₂ or 1 mM EGTA. This solution was pre-heated to reach 37°C at the perfusion chamber. Intracellular calcium concentrations of groups of 20-40 cells were monitored continuously at 37°C with the use of a fluorescence photometer (Photon Technology, Princeton, NJ). Fura-2 was excited alternately at 340 and 380 nm, and the emission at 510 nm was measured. The ratio measurement, which is proportional to the intracellular calcium concentration, was determined every 100 ms. ATP application was via continuous perfusion of the same solution containing the indicated concentrations of the drug (Bisaggio et al., 2001).

Data analysis: Differences between experimental groups were evaluated by the two-tailed unpaired Student's *t* test. Each experiment was performed at least thrice in duplicates. Data were analyzed using GraphPad Instat software (GraphPad Software Inc., version 4.0). Values are presented as mean \pm s.d. The quantification of the fluorescence intensity was performed using the program ImageJ 1.38X (National Institute of Health, USA). The calculation of the concentration of ATP⁴⁻ was performed using the program Sliders v2.00 (Chris Patton, Stanford University, CA, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Drs Eliana Scemes for reviewing a preliminary version of the manuscript and for helpful discussions, Dr. Rosalia Mendez Otero, Dr. Regina Goldemberg and for the help with the use of the fluorescence microscopes and to Vandir da Costa and Hercules Antonio da Silva Souza for technical assistance. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq).

ABBREVIATIONS USED IN THIS PAPER

ATP_e: Extracellular ATP

CF: Carboxyfluorescein

HEK-X₇ cells: HEK 293 cells transfected with P2X₇ receptors;

LY: Lucifer Yellow.

oxATP: Periodate-oxidized ATP

PVDF: polyvinylidene difluoride.

SDS: sodium dodecyl sulfate.

SR-B: sulforhodamine B

Table I

Solution	Open probability^a	Open time^b (sec)
Normal	0.110 ± 0.02	1.87 ± 0.01
Divalent-free	0.070 ± 0.04	3.7 ± 1

Open probability and open time of Z pores. Cell-attached recordings of macrophages were performed using the same solution in the pipette and in the extracellular medium at 37°C in the presence of 1 mM ATP at a holding potential of -40 mV. Results are represented as mean ± s.d. (n=5)

(a) Time opened/ total time of recording.

(b) Mean time of a channel in the open state.

Figure 1

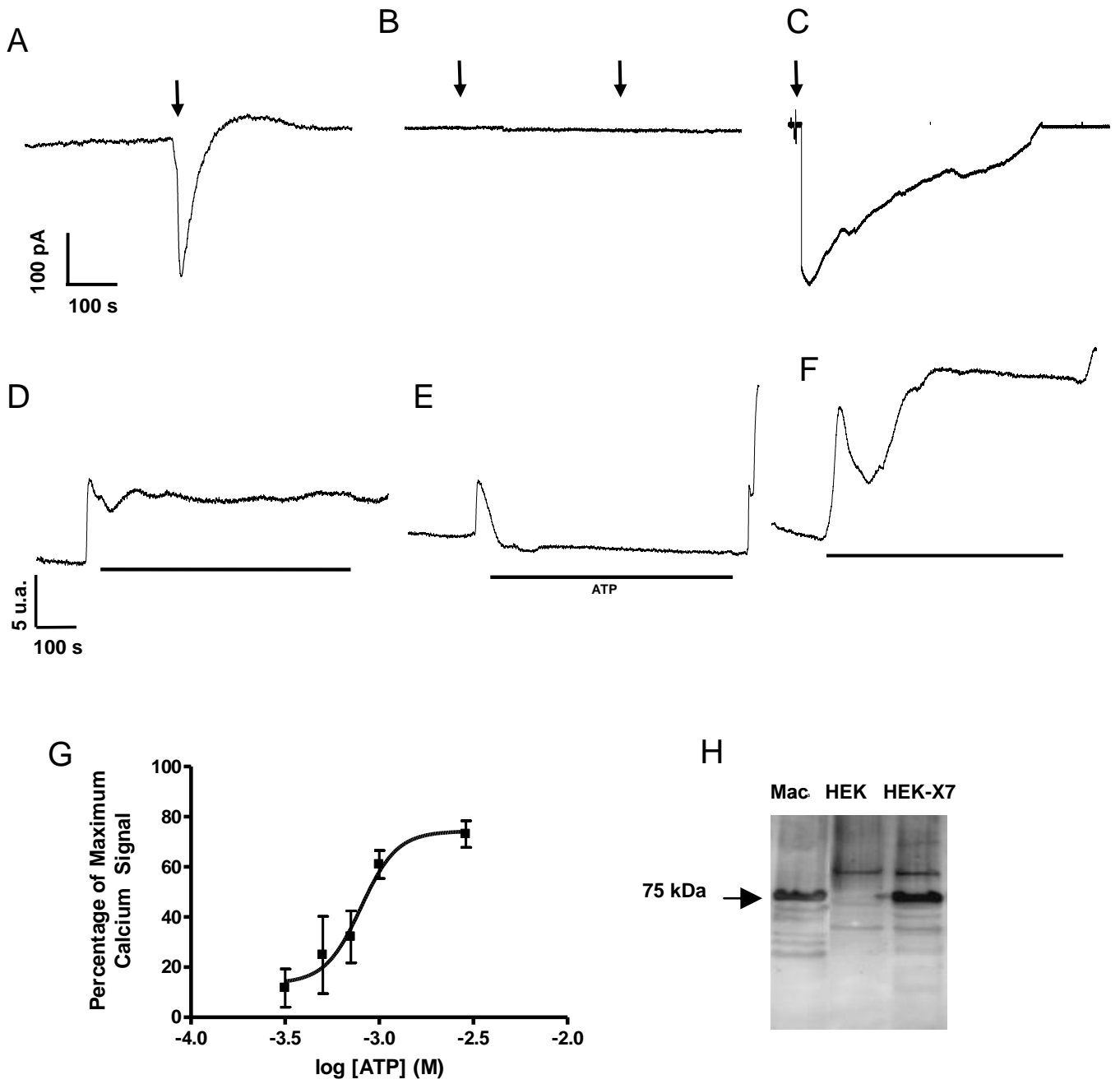


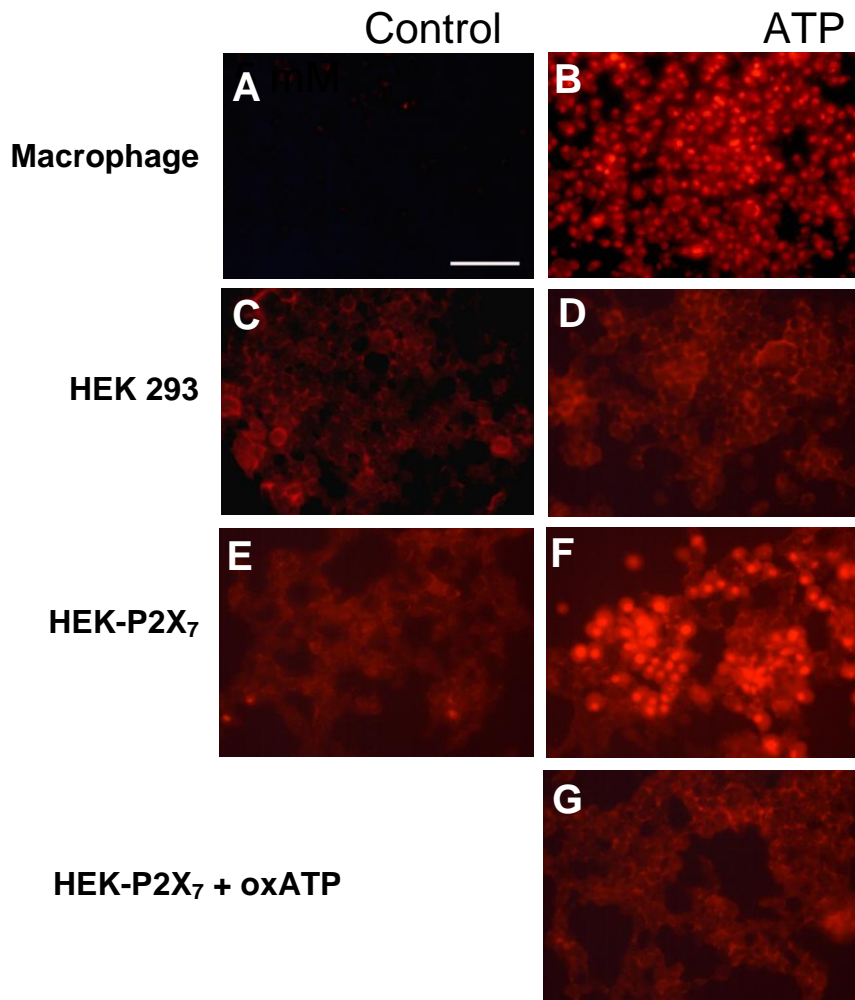
Figure 2

Figure 3

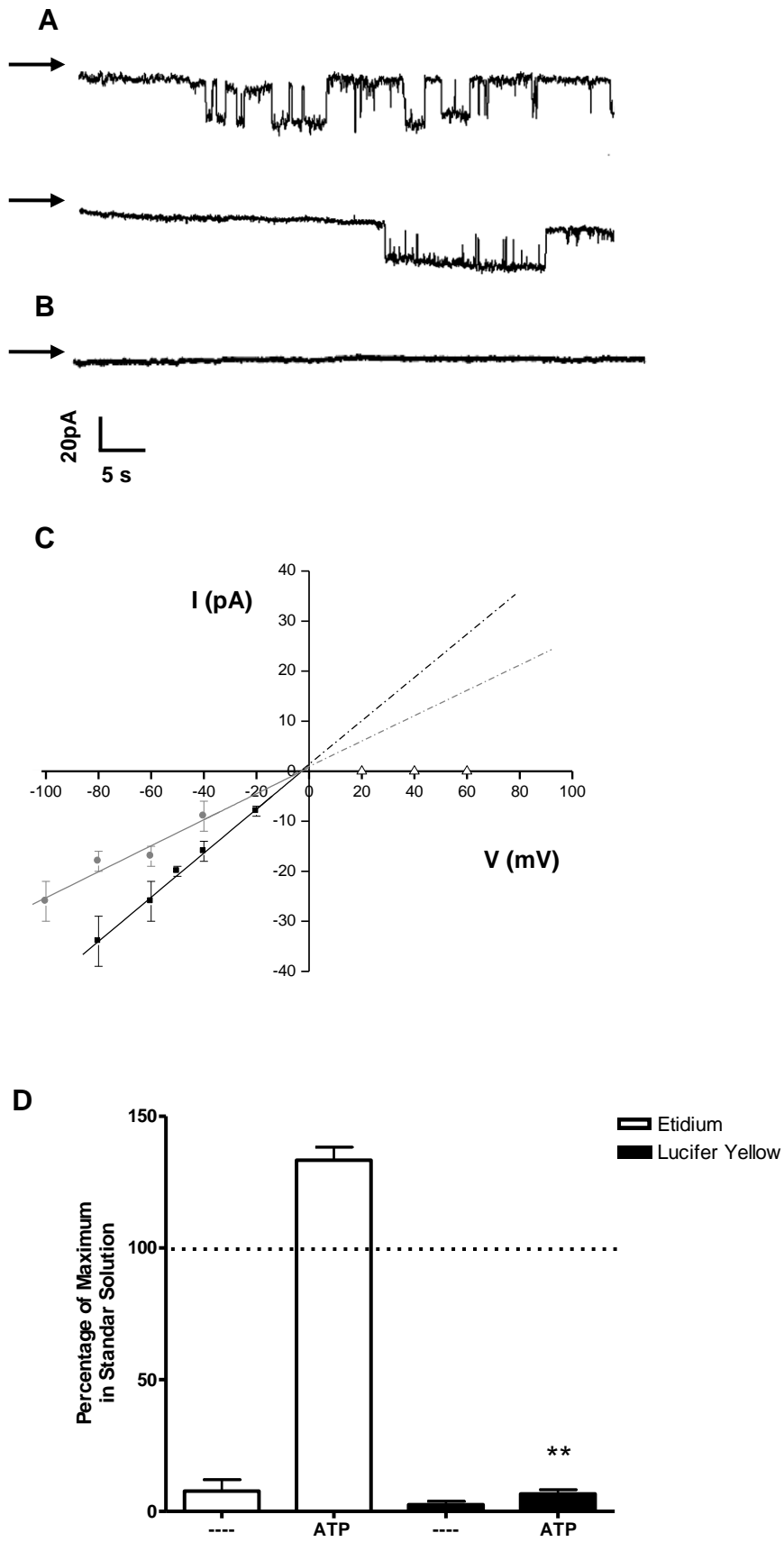


Figure 4

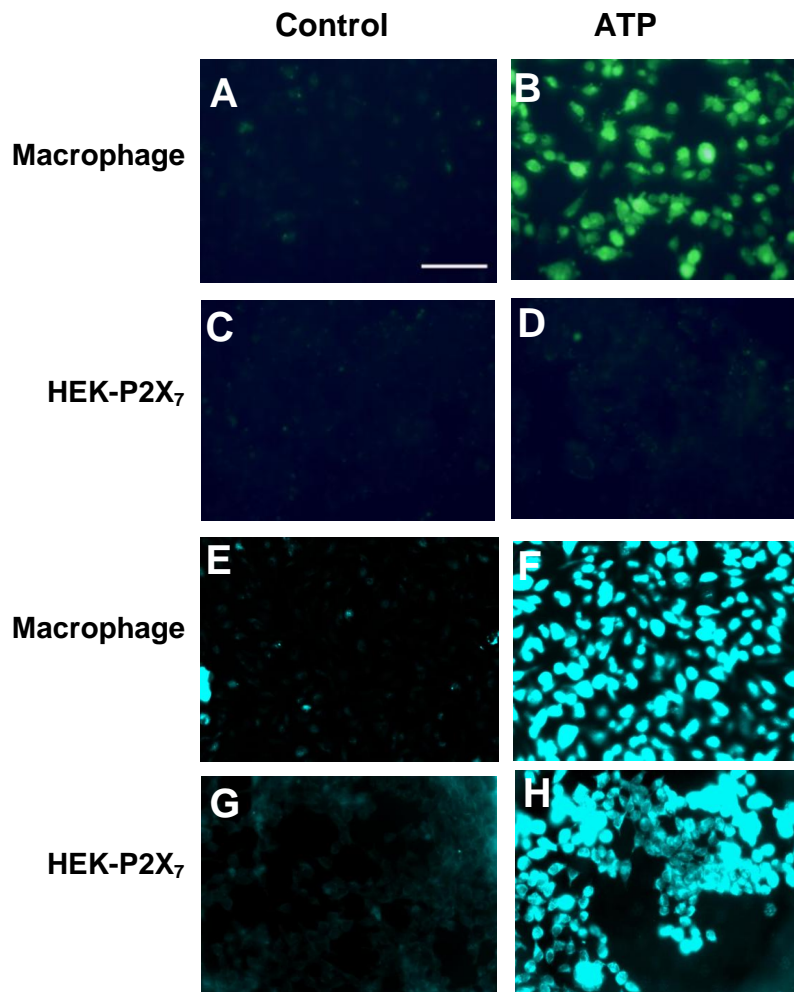


Figure 5

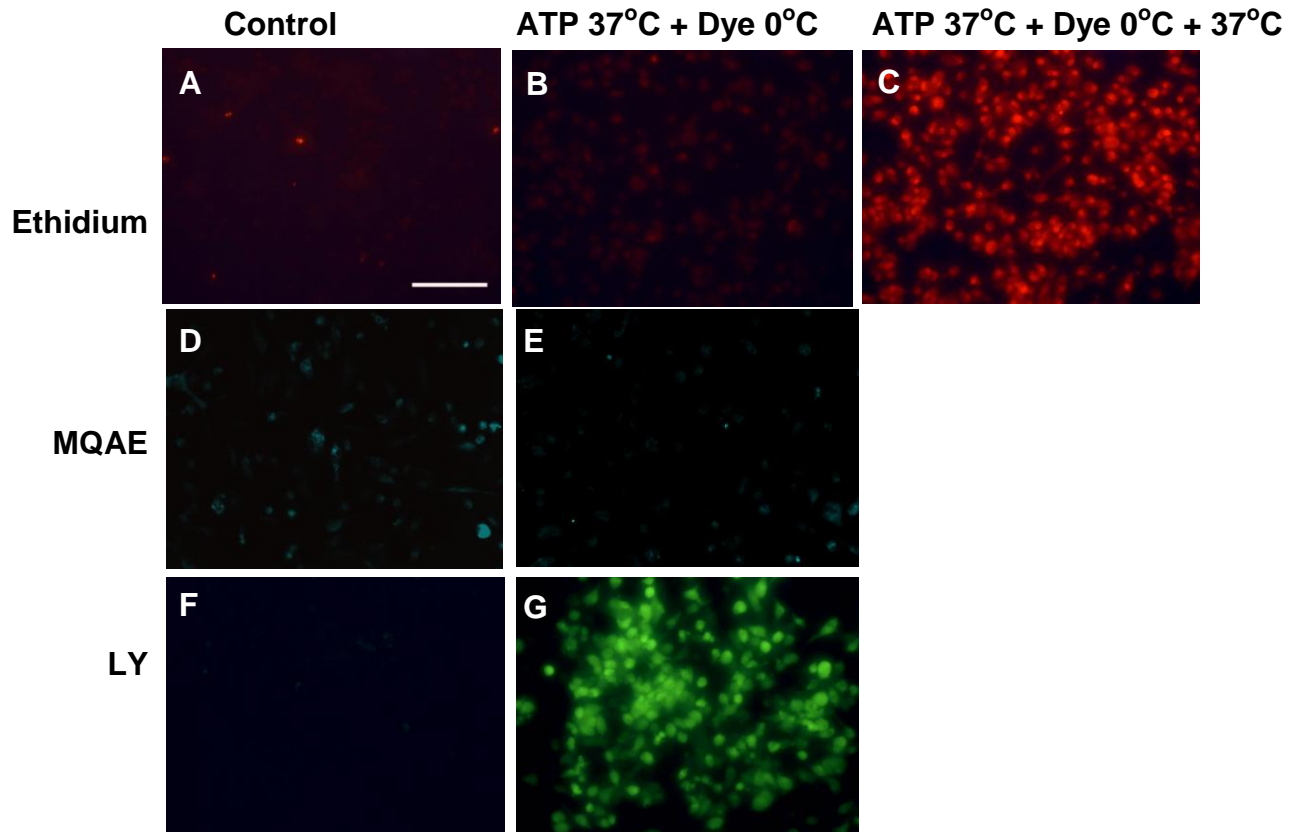


Figure 6

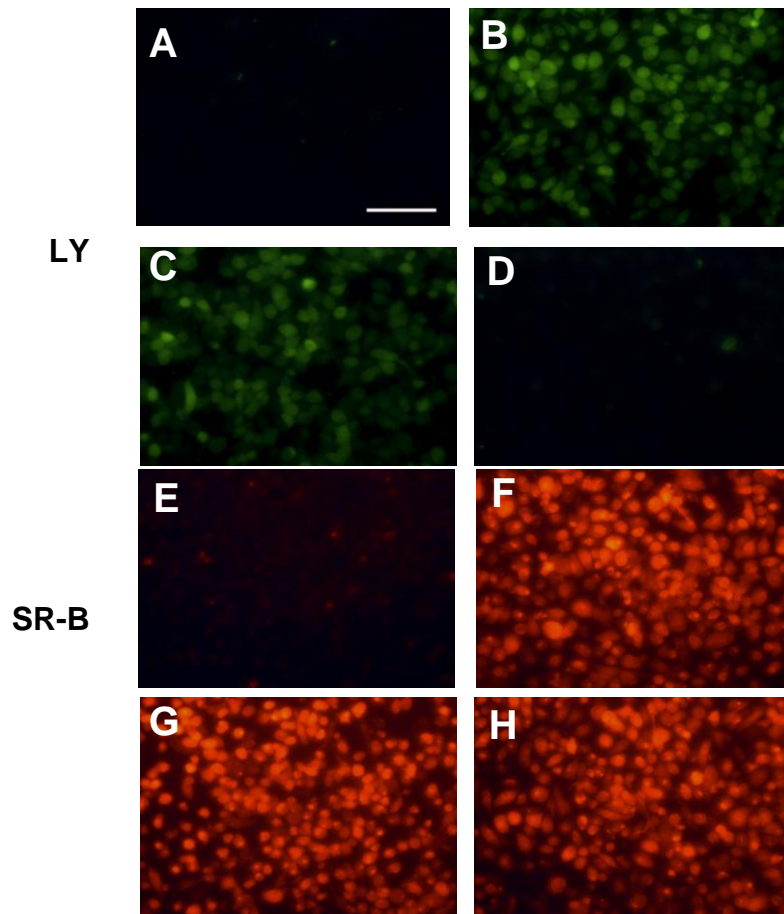


FIGURE LEGENDS

Figure 1: ATP_e-induced inward currents and Ca²⁺ signaling in HEK-X₇ cells and macrophages. (A-C) Whole cell voltage clamp recordings of macrophages (A), HEK 293 cells (B), and HEK-X₇ cells (C). Cells were kept at room temperature and ATP (1 mM) was applied pneumatically (arrows). (D-G) Changes in free intracellular Ca²⁺ concentration of macrophages (D), HEK 293 cells (E), and HEK-X₇ cells (F) loaded with Fura-2-AM. Cells were kept at 37 °C and 5 mM ATP (final concentration) was applied as indicated by the horizontal bars. Ca²⁺ concentration was measured for 10-20 cells in the same microscope field using arbitrary fluorescence ratio units (a.u.). (G) Dose-effect curve of ATP_e in HEK-X₇ cells. Cells were exposed to different ATP_e concentrations in the same conditions as in (F) and the fluorescence signal was normalized taking the maximum fluorescence obtained after the addition of 0.1% saponin. (H) Anti P2X₇ Western blotting of macrophages (lane 1) HEK 293 cells (lane 2), and HEK-X₇ cells (lane 3) Each result is a representative result of at least three independent experiments. In (G), the bars represent the mean ± s.d. of at least 3 measurements per data point.

Figure 2: ATP_e-induced ethidium uptake in HEK-X₇ cells and in macrophages. Fluorescence images of cells incubated for 15 min at 37°C in the presence (B, D, F, G) or not (A, C, E) of 5 mM ATP. Ethidium bromide (10 μM) was added in all preparations. (A-B) Macrophages; (C-D) HEK 293 cells; (E-F) HEK-X₇ cells. (G) HEK-X₇ cells pre-incubated during 2 hrs with 300 μM oxATP before the addition of ATP. Each result is representative of at least three independent experiments. Calibration bar shown in (A): 100 μm.

Figure 3: Large non-selective channels observed in macrophages but not in HEK-X₇ cells correlates with ATP_e-induced anion uptake. Cell-attached recordings (A-C) and dye uptake assays (D) were performed in macrophages (A, C, and D) and in HEK-X₇ cells (B). For patch-clamping experiments, cells were kept at 37°C and cell-attached recordings were performed with a holding potential of -40 mV in the pipette. ATP was applied manually with a micropipette (1 mM final concentration) and all the recordings were performed between within 1 min after ATP application. Each result is a representative recording of at least 10 independent experiments. (A): Cell attached recordings of macrophages. Upper trace: normal extracellular solution. Lower trace: divalent-free extracellular solution.; (B): Cell attached recording of a HEK-X₇ cell. (C): I versus V curves of the macrophage channels obtained in the same conditions as in the upper trace of (A). (D): ATP_e-induced uptake of ethidium and LY in macrophages using the same solutions as in (A). Data in (D) was obtained by analyzing the fluorescence intensity of the cells as described in “Methods”. The values were normalized for each dye by subtracting the non-specific fluorescence, obtained in normal solution in the absence of ATP, from all values and taking the specific fluorescence, obtained in normal solution in the presence of ATP, as 100%. Data points and bars represent the mean ± s.d. of at least four independent experiments.

Figure 4: ATP_e induces the uptake of anionic dyes in macrophages but not in HEK-X₇ cells. Fluorescence microscopy of cells incubated for 10 min at 37°C in the absence (A, C, E, G) or in the presence (B, D, F, H) of 5 mM ATP. LY (3 mM) or MQAE (5 mM) were used as fluorescent dyes. (A-B) Macrophages in the presence of LY; (C-D) HEK-X₇ cells in the presence of LY; (E-F) Macrophages in the presence of MQAE. (G-H) HEK-X₇ cells in the

presence of MQAE. Each result is representative of at least three independent experiments. Calibration bar shown in (A): 100 μm .

Figure 5: Uptake of anions but not cations occurs through a diffusional process.

Fluorescence microscopy of cells incubated for 10 min at 37°C in the absence (A, D, F) or in the presence (B, C, E, G) of 5 mM ATP and cooled down on ice in the absence of any dyes. Ethidium bromide (A-B), MQAE (D-E), or LY (F-G) was then added for 15 min and the cells were immediately transferred to the stage of the microscope. Temperature was kept all the time below 4°C. In (C), cells treated as in (B) were heated up to 37°C and kept in the presence of ATP_e and ethidium for 10 min. Experiments using MQAE were performed in a low chloride solution obtained by substituting Cl⁻ for glutamate in the normal extracellular solution. Each picture is representative of at least three independent experiments performed in duplicates. Calibration bar shown in (A): 100 μm .

Figure 6: ATP_e induces the efflux of anions but not cations from macrophages.

Fluorescence microscopy of macrophages incubated for 10 min at 37°C in the absence (A and E) or in the presence (B-D and F-H) of 5 mM ATP. LY (A-D) or SR-B mM (E-H) was added at 37°C and cells were kept at this temperature until transferred to the stage of the microscope. In (B) and (F), cells were loaded with the dye by incubation for 10 min in the presence of any of the dye and ATP. In (C) and (G) cells were prepared as in (B) and (F) respectively, washed, and kept in normal solution without the dye or ATP for an additional period of 10 min. In (D) and (H) cells were prepared as in (B) and (F) respectively, washed, and kept in normal solution in the presence of 5 mM ATP and without the dye for an additional period of 10 min.

In the LY experiments (A-D), macrophages were pre-incubated for 30 min and kept in the presence of probenecid (5 mM) during all incubations. Each result is representative of at least three independent experiments. Calibration bar shown in (A): 100 μm .

.

REFERENCES

- Adinolfi, E., Pizzirani, C., Idzko, M., Panther, E., Norgauer, J., Di Virgilio, F. and Ferrari, D.** (2005). P2X7 receptor: death or life? *Pur. Sigal.* **1**, 219-227.
- Albuquerque, C., Oliveira, S. M., Coutinho-Silva, R., Oliveira-Castro, G. M. and Persechini, P. M.** (1993). ATP- and UTP-induced currents in macrophages and macrophage-polykaryons. *Am. J. Physiol.* **265**, C1663-C1673.
- Alves, L. A., Coutinho-Silva, R., Persechini, P. M., Spray, D. C., Savino, W. and Campos-de-Carvalho, A. C.** (1996). Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages? *Blood* **88**, 328-334.
- Bao, L., Locovei, S. and Dahl, G.** (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* **572**, 65-68.
- Barbe, M. T., Monyer, H. and Bruzzone, R.** (2006). Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiol.* **21**, 103-114.
- Bisaggio, R. C., Nihei, O. K., Persechini, P. M., Savino, W. and Alves, L. A.** (2001). Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells. *Cell. Mol. Biol.* **47**, 19-31.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bruzzone, R., Barbe, M. T., Jakob, N. J. and Monyer, H.** (2005). Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* **92**, 1033-1043.
- Chessell, I. P., Simon, J., Hibell, A. D., Michel, A. D., Barnard, E. A. and Humphrey, P. P.** (1998). Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett.* **439**, 26-30.
- Cockcroft, S. and Gomperts, B. D.** (1980). The ATP⁴⁻ receptor of rat mast cells. *Biochem. J.* **188**, 789-798.
- Coutinho-Silva, R. and Persechini, P. M.** (1997). P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am. J. Physiol.* **273**, C1793-C1800.
- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M.-N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T. and Ojcius, D. M.** (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* **19**, 403-412.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G. and Baricordi, O. R.** (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**, 587-600.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y. and Swanson, R. A.** (2003). P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* **23**, 1320-1328.

- Dubyak, G. R. and El-Moatassim, C.** (1993). Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* **265**, C577-C606.
- Dwyer, K. M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T. B. and Robson, S. C.** (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Pur. Sigal.* **3**, 171-180.
- Egan, T. M., Samways, D. S. and Li, Z.** (2006). Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**, 501-512.
- Elliott, G. D., Liu, X. H., Cusick, J. L., Menze, M., Vincent, J., Witt, T., Hand, S. and Toner, M.** (2006). Trehalose uptake through P2X(7) purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology* **52**, 114-127.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. and Weisman, G. A.** (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* **452**, 552-562.
- Faria, R. X., de Farias, F. P. and Alves, L. A.** (2004). Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C260-C271.
- Ferrari, D., la Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., Idzko, M., Dichmann, S., Norgauer, J. and Di Virgilio, F.** (2000). The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J.* **14**, 2466-2476.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E. and Di Virgilio, F.** (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* **176**, 3877-3883.
- Fortes, F. S. A., Pecora, I. L., Persechini, P. M., Hurtado, S., Costa, V., Coutinho-Silva, R., Melo-Braga, M. B., Silva-Filho, F. C., Bisaggio, R. C., Pires-de-Farias, F. et al.** (2004). Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J. Cell Science* **117**, 4717-4726.
- Garcia-Marcos, M., Pochet, S., Marino, A. and Dehaye, J. P.** (2006). P2X(7) and phospholipid signalling: The search of the "missing link" in epithelial cells. *Cell Signal.* **18**, 2098-2104.
- Gibbons, S. J., Washburn, K. B. and Talamo, B. R.** (2001). P2X7 receptors in rat parotid acinar cells: formation of large pores. *J. Auton. Pharmacol.* **21**, 181-190.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Eur. J. Physiol.* **391**, 85-100.
- Hibell, A. D., Thompson, K. M., Xing, M., Humphrey, P. P. and Michel, A. D.** (2001). Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 947-957.

- Humphreys, B. D., Rice, J., Kertesy, S. B. and Dubyak, G. R.** (2000). Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 26792-26798.
- Iacobas, D. A., Suadicani, S. O., Iacobas, S., Chrisman, C., Cohen, M. A., Spray, D. C. and Scemes, E.** (2007). Gap junction and purinergic P2 receptor proteins as a functional unit: insights from transcriptomics. *J. Membr. Biol.* **217**, 83-91.
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. and Surprenant, A.** (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X(7) receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**, 6347-6358.
- Kornbluth, R. S. and Stone, G. W.** (2006). Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1084-1102.
- Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., Brissette, W., Wicks, J. R., Audoly, L. and Gabel, C. A.** (2002). Absence of the P2X(7) Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response. *J. Immunol.* **168**, 6436-6445.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K.** (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* **64**, 785-795.
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C. and Dahl, G.** (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* **581**, 483-488.
- Locovei, S., Wang, J. and Dahl, G.** (2006). Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* **580**, 239-244.
- Mackenzie, A. B., Young, M. T., Adinolfi, E. and Surprenant, A.** (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 33968-33976.
- Mariathasan, S. and Monack, D. M.** (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 31-40.
- Monteiro-da-Cruz, C., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L., Persechini, P. M. and Ojcius, D. M.** (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 2871-2879.
- Monteiro-da-Cruz, C., Ventura, A. L., Schachter, J., Costa-Junior, H. M., Silva-Souza, H. A., Gomes, F. R., Coutinho-Silva, R., Ojcius, D. M. and Persechini, P. M.** (2006). Activation of ERK1/2 by extracellular nucleotides in macrophages is mediated by multiple P2 receptors independently of P2X7-associated pore or channel formation. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 324-334.
- Munkonge, F., Alton, E. W., Andersson, C., Davidson, H., Dragomir, A., Edelman, A., Farley, R., Hjelte, L., McLachlan, G., Stern, M. et al.** (2004). Measurement of halide efflux from cultured and primary airway epithelial cells using fluorescence indicators. *J. Cyst. Fibros.* **3 Suppl 2**, 171-176.

- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Ripa, M. and Di Virgilio, F.** (1993). Oxidized ATP an irreversible inhibitor of macrophage purinergic P2Z receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 8199-8203.
- North, R. A.** (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013-1067.
- Nuttle, L. C. and Dubyak, G. R.** (1994). Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P-2Z purinergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 13988-13996.
- Paukert, M., Hidayat, S. and Grunder, S.** (2002). The P2X(7) receptor from *Xenopus laevis*: formation of a large pore in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **513**, 253-258.
- Pelegri, P. and Surprenant, A.** (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X(7) receptor. *EMBO J.* **25**, 5071-5082.
- Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X. Q., Cowan, K. N., Celetti, S. J., Cowan, B. J., Bai, D., Shao, Q. and Laird, D. W.** (2007). Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J. Cell Sci.* **120**, 3772-3783.
- Persechini, P. M., Bisaggio, R. C., Alves-Neto, J. L. and Coutinho-Silva, R.** (1998). Extracellular ATP in the lymphohematopoietic system: P2Z purinoceptors and membrane permeabilization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 25-34.
- Pfeiffer, Z. A., Guerra, A. N., Hill, L. M., Gavala, M. L., Prabhu, U., Aga, M., Hall, D. J. and Bertics, P. J.** (2007). Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1506-1516.
- Ralevic, V. and Burnstock, G.** (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492.
- Rassendren, F., Buell, G. N., Virginio, C., Collo, G., North, R. A. and Surprenant, A.** (1997). The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 5482-5486.
- Riedel, T., Lozinsky, I., Schmalzing, G. and Markwardt, F.** (2006). Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophys. J.* **92**, 2377-2391.
- Saez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F. and Bennett, M. V.** (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 215-224.
- Shestopalov, V. I. and Panchin, Y.** (2007). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol. Life Sci. Online* **5 Nov 2007**.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. and Gabel, C. A.** (2001). Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 125-132.

- Steinberg, T. H., Newman, A. S., Swanson, J. A. and Silverstein, S. C.** (1987a). ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8884-8888.
- Steinberg, T. H., Newman, A. S., Swanson, J. A. and Silverstein, S. C.** (1987b). Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* **105**, 2695-2702.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F. and Scemes, E.** (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci.* **26**, 1378-1385.
- Suh, B. C., Kim, J. S., Namgung, U., Ha, H. and Kim, K. T.** (2001). P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J. Immunol.* **166**, 6754-6763.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. and Buell, G.** (1996). The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇). *Science* **272**, 735-738.
- Virginio, C., Church, D., North, R. A. and Surprenant, A.** (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacol.* **36**, 1285-1294.
- Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A. and Surprenant, A.** (1999). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J. Physiol. (London)* **519**, 335-346.
- Wiley, J. S., Chen, R. and Jamieson, G. P.** (1993). The ATP⁴⁻ Receptor-Operated Channel P_{2Z} Class of Human Lymphocytes Allows Ba²⁺ and Ethidium⁺ Uptake - Inhibition of Fluxes by Suramin. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 54-60.
- Worthington, R. A., Smart, M. L., Gu, B. J., Williams, D. A., Petrou, S., Wiley, J. S. and Barden, J. A.** (2002). Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS Lett.* **512**, 43-46.

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](#)