

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

**MARIANA RODRIGUES PEREIRA**

**EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES  
DE ADENOSINA NA RETINA EM  
DESENVOLVIMENTO: MODULADORES, VIAS DE  
SINALIZAÇÃO E MECANISMOS REGULATÓRIOS**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL FLUMINENSE VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
NEUROIMUNOLOGIA

**Orientador: Roberto Paes de Carvalho**



**NITERÓI  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

Trabalho desenvolvido no laboratório de Neurobiologia Celular do  
Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF.

Dissertação de Doutorado submetida à  
Universidade Federal Fluminense como  
requisito parcial para obtenção de grau  
de Doutor em Neuroimunologia

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

Niterói  
2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Programa de Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob orientação do Prof. Roberto Paes de Carvalho e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## AGRADECIMENTOS

Ao Roberto, meu orientador, pelo apoio, incentivo, entusiasmo com os resultados e ensinamentos. Muito obrigada!

À Eliza, que sempre esteve do meu lado. Sua ajuda foi fundamental. Não só te ensinei como também aprendi muito com você. Parte desse trabalho também é seu.

À Octavia e Jainne que sempre me ajudaram. Pelas conversas e pelo apoio, mesmo que à distância.

Ao Rafael, pela companhia, pelas músicas, por me perturbar muito e por alegrar o meu dia. Não dá pra ficar triste do seu lado. Além disso, obrigada pela idéia do NO!

À Luzeli pelo material limpo e pelas conversas. Sempre que eu precisava de algo você estava disposta em me ajudar. E obrigada pelo café.

À Karin e seus alunos: Raquel, Vivian, Elisa e Raul.

Aos colegas de laboratório: Alexandre, Cristiane, Sarah, Nádia, Ivan, Renato, Camila, Marcelo, Willian, Thaísa e Felipe.

Aos professores do departamento:

Paulinha, pelo apoio e pela revisão da tese.

À Ana Ventura pela paciência em me ensinar o RT-PCR. Não tenho nem como te agradecer.

Beth, Cláudio e Priscilla.

Agradeço também aos colegas do departamento.

À minha família: Ana, Max e Carolina que mesmos distantes se preocupam comigo e me ajudam.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	x
Abstract	xi
1) Introdução	1
1.1) A retina	1
1.2) Adenosina	5
1.2.1) Síntese e metabolismo	6
1.2.2) Adenosina na retina	8
1.2.3) Transporte	10
1.2.4) Receptores de adenosina	14
1.2.5) Distribuição e localização celular dos receptores de adenosina no SNC	17
1.2.6) Receptores A1 de adenosina	19
1.2.7) Receptores A2a de adenosina	21
1.2.8) Regulação gênica da expressão dos receptores de adenosina	23
1.3) NFkB	24
1.3.1) Vias de ativação do NFkB	27
1.3.2) Regulação da atividade transcricional do NFkB	30
1.4) ERK	31
1.5) Interleucina-6	34
2) Objetivos	39
3) Materiais e métodos	40
3.1) Materiais	40
3.2) Métodos	42
3.2.1) Culturas complexas	42
3.2.2) Culturas purificadas de glia	42
3.2.3) Culturas purificadas de neurônios	43
3.2.4) Explantes de retina	43
3.2.5) Tratamento com drogas	44
3.2.6) “Binding” em célula viva	45
3.2.7) Dosagem de proteína pelo método de Bradford	45

3.2.8) “Western Blotting”	46
3.2.9) RT-PCR	49
3.2.10) Imunocitoquímica	52
3.2.11) Ensaio de MTT	53
3.2.12) Análises Estatísticas	54
4) Resultados	55
4.1) A ativação crônica do receptor A2a induz aumento do “binding” do A1 de forma dependente de síntese protéica	55
4.2) A ativação crônica de receptores A2a induz aumento da expressão de receptores A1	58
4.3) O tratamento crônico com DPMA aumenta a quantidade de RNAm para receptor A1	63
4.4.) Os receptores A1 são expressos apenas nos neurônios nas culturas mistas	64
4.5) O aumento da expressão de receptores A1 pela ativação crônica de receptores A2a também ocorre em experimento “ex vivo”	66
4.6) O aumento da expressão de receptores A1 induzido por ativação de receptores A2a é dependente do fator de transcrição NFkB	67
4.7) Os receptores A2a aumentam a expressão do receptor A1 através da inibição da ERK e ativação de Src	73
4.8) O aumento da expressão de receptores A1 por ativação dos receptores A2a é dependente de óxido nítrico (NO)	79
4.9) O tratamento crônico com DPMA promove diminuição da expressão de receptores A2a	80
4.10) Interleucina-6 aumenta a expressão de receptores A1 em culturas mistas através da ativação de NFkB	81
4.11) O aumento do “binding” para receptor A1 induzido por inosina é bloqueado por antagonistas de receptores A3 de adenosina	86
4.12) As culturas purificadas de glia expressam receptores A1	91
4.13) Caracterização da expressão e da localização celular dos receptores A2a nas culturas de retinas de embriões de galinha	93
5) Discussão	98

5.1) Modulação da expressão de receptores A1 pela ativação de receptores A2a	98
5.2) Modulação da expressão de receptores A1 por IL-6	107
5.3) Modulação da expressão de receptores A1 por inosina	109
5.4) Culturas purificadas de glia expressam receptores A1	111
5.5) Caracterização da expressão dos receptores A2a em culturas de retina de embrião de galinha	112
6) Conclusões	115
7) Referências bibliográficas	117
8) Artigo	142



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – adenosina deaminase.  
ADP- adenosina difosfato  
Akt – proteína kinase B.  
AMP - adenosina 3'-5' monofosfato.  
AMPc - adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.  
ATP - adenosina 5'-trifosfato.  
BAFF- fator ativador de células B  
BDNF- fator neurotrófico do cérebro  
BME - meio básico de Eagle.  
BSA - albumina de soro bovino.  
C1 - primeiro dia de cultura.  
C4- quarto dia de cultura  
C6 - sexto dia de cultura.  
C21- vigésimo primeiro dia de cultura  
CAMKII - Proteína kinase II dependente de cálcio e calmodulina.  
CBP- proteína de ligação para CREB  
CKII- caseína kinase II  
CLC- citocina do tipo cardiotrofina  
CMF - solução sem cálcio e magnésio.  
CNT- transportador de adenosina concentrativo  
CNTF- fator neurotrófico ciliar  
Cpm - contagens por minuto.  
CREB – proteína ligante a elemento de resposta à AMPc.  
DEPC- dietilpirocarbonato  
EHNA - eritro-9-(2-hydroxi-3-nonil) adenina.  
ENT- transportador de adenosina equilibrativo  
ERK – proteína kinase ativada por sinais extracelulares.  
GABA - ácido gama amino butírico.  
GMPc- guanosina 3'-5' monofosfato cíclico.  
Gs - proteína G estimulatória.

GSK3 $\beta$ - glicogênio sintase kinase 3 $\beta$   
GTP- guanosina trifosfato  
HIF-1- fator induzido por hipóxia 1  
I $\kappa$ B- proteína inibitória kappa B  
IKK- I kappa B kinases  
IL-2- interleucina-2  
IL-6- interleucina-6  
IL-11- interleucina-11  
IL-27- interleucina-27  
IL-31- interleucina-31  
IP<sub>3</sub> – inositol trifosfato.  
JAK- Janus kinase  
JNK – proteína kinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal.  
LIF- fator inibitório de leucemia  
LPS- lipopolissacarídeo  
LT $\beta$ - linfotóxina  $\beta$   
MAPK – proteína kinase ativada por mitógeno.  
MEK – MAP kinase kinase.  
MEM- meio mínimo essencial  
MG-63- linhagem de células osteoblásticas de osteosarcoma humano  
NBMPR - S-(Nitrobenzil)-6-tioinosina.  
NEMO- IKK $\gamma$   
NES- sinal de exportação nuclear  
NF $\kappa$ B – fator de transcrição nuclear kB.  
NGF- fator de crescimento do nervo  
NIK- kinase indutora de NF $\kappa$ B  
NLS- sinal de localização nuclear  
NMDA – N-metil-D-aspartato.  
NO- óxido nítrico  
NOS- óxido nítrico sintase.  
NPN- neuropoietina  
NT-3- neurotrofina-3  
NT-4- neurotrofina-4

OSM- oncostatina M  
PC12- células de feocromocitoma 12  
PI3K – fosfatidil inositol 3 kinase.  
PLC – fosfolipase C.  
PKA – proteína kinase dependente de AMPc.  
PKC – proteína kinase dependente de  $Ca^{+2}$ .  
Raf – MAP kinase kinase kinase  
Ras – subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina (proteína G).  
RHD- domínio de homologia Rel  
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro.  
ROS- espécies reativas de oxigênio  
SAH - S-adenosilhomocisteína.  
SDS - dodecil sulfato de sódio.  
SFB – soro fetal bovino.  
SOS – fator de troca de nucleotídeo.  
Src- proteína tirosina cinase citoplasmática purificada do sarcoma da retina de pinto  
TBS - solução tampão Tris.  
TBS-T - solução tampão Tris acrescida de tween-20.  
TNF $\alpha$ - fator de necrose tumoral

## RESUMO

Adenosina é um neuromodulador no SNC que atua através de receptores metabotrópicos: A1 e A3, que regulam negativamente a adenilil ciclase, e A2a e A2b, que regulam positivamente esta enzima. Resultados prévios mostraram que a ativação crônica de receptores A2a aumenta o “binding” a receptores A1 em culturas contendo neurônios e células gliais de retinas de embriões de galinha de forma dependente de AMPc e PKA. Neste trabalho observamos ainda que, a ativação crônica destes receptores promove um aumento da síntese de RNAm e da proteína do receptor A1. Este aumento depende da ativação do Fator Nuclear kB (NFkB), de óxido nítrico e da inibição da fosforilação da ERK. Em culturas mistas, os receptores A1 estão localizados apenas em células neuronais. O tratamento com Interleucina-6 também promove aumento da expressão de receptores A1 de forma dependente de NFkB e de JAK2. A funcionalidade de receptores A1 também é regulada por inosina que através da ativação de receptores A3, aumenta o “binding”, diminui os níveis de RNAm e não altera os níveis protéicos do receptor. Por outro lado, em cultura de células gliais purificadas, observamos uma expressão elevada do receptor A1. Os receptores A2a são expressos tanto nos neurônios quanto na glia em níveis semelhantes nos diferentes tipos de cultura. Nas culturas de neurônios, o receptor A2a está presente no corpo celular e nos neuritos, inclusive em fotorreceptores. Nossos resultados indicam uma extensa rede de modulação da expressão dos receptores A1 de adenosina na retina em desenvolvimento.

## ABSTRACT

Adenosine is a CNS neuromodulator that acts via G protein-coupled receptors: A1 and A3 that negatively regulate adenylyl cyclase, and A2a and A2b that positively regulate this enzyme. Previous results showed that the chronic activation of A2a receptors promotes an increase of binding to A1 receptors in chick embryo retina cultures containing neurons and glial cells in a cyclic AMP and PKA-dependent manner. In the present work we observed that, besides this effect, chronic activation of A2a receptors leads to an increase of A1 receptor mRNA and protein synthesis. This increase is dependent on the activation of Nuclear factor kB (NFkB), nitric oxide production as well as ERK inhibition. In mixed cultures A1 receptors are localized only in neuronal cells. Interleukin-6 treatment induces an up-regulation in A1 receptor which is dependent of NFkB and JAK2. A1 receptor function was also regulated by inosine which, acting through A3 receptor, increases A1 binding, decreases A1 receptor RNAm and had no effect on receptor protein levels. In purified glial cells cultures we detected high A1 receptor levels. On the other hand, A2a receptors are expressed in similar levels in neurons or glial cells in mixed or purified neuronal or glial cultures. In neuronal cultures, A2a receptors are present in cell bodies and neurites, including photoreceptors. The results indicate an extensive modulatory network regulating A1 receptor expression in the developing retina.

## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) A retina

A retina é um tecido formado, durante o desenvolvimento, a partir do tubo neural. Dessa forma, é uma estrutura pertencente ao sistema nervoso central que contém os receptores sensoriais e toda a circuitaria necessária para o processamento da informação visual pelo encéfalo (revisado por Wässle, 2004). Ela se localiza no fundo do globo ocular, atrás do humor vítreo e sobre o epitélio pigmentar. Este epitélio possui o pigmento melanina e apresenta importantes funções como evitar a reflexão de luz para os fotorreceptores, o que prejudicaria a formação das imagens visuais. Além disso, promove a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores e a reciclagem de cis-retinal, uma molécula derivada da vitamina A, que participa do mecanismo de fototransdução (Young e Bok, 1969).

As células da retina de vertebrados são dispostas em camadas (figura 1). A camada mais externa contém os segmentos externos dos fotorreceptores os quais apresentam o pigmento visual. Assim, é o local onde ocorre a fototransdução. A camada nuclear externa contém os corpos celulares dos fotorreceptores. Já a camada plexiforme externa contém as sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares e horizontais as quais pertencem à camada nuclear interna. Esta, então, contém os corpos celulares das células bipolares, amácrinas e horizontais. Em seguida, encontra-se a camada plexiforme interna formada pelas sinapses entre as células bipolares e

amácrinas localizadas na camada nuclear interna, com as células ganglionares cujos corpos celulares estão na camada de células ganglionares. Os axônios destas células se unem para formar o nervo óptico cuja função é conduzir a informação captada pela retina até regiões mais superiores do sistema nervoso central, onde ocorrerá o seu processamento (revisado por Wässle, 2004).

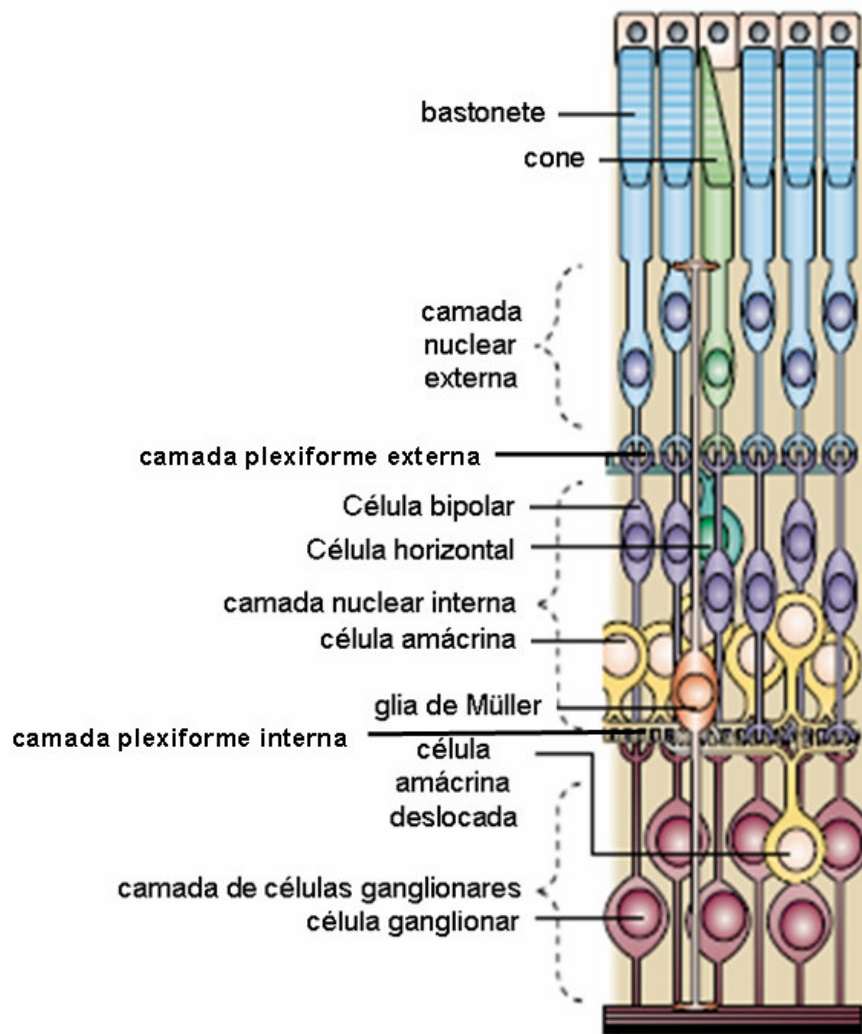


Figura 1: Esquema representativo das camadas da retina (modificado de Dyer e Cepko, 2001).

Os eventos de fototransdução ocorrem no segmento externo dos fotorreceptores. Quando o estímulo luminoso atinge o fotopigmento rodopsina dos bastonetes, este passa da sua conformação inativa (cis-retinal) para ativa (trans-retinal). Em seguida, se acopla à proteína G, transducina, que, por sua vez, leva à ativação de fosfodiesterases de GMPc. Isto promove uma diminuição dos níveis intracelulares deste segundo mensageiro. Canais iônicos dependentes de GMPc são fechados causando uma hiperpolarização do fotorreceptor e a diminuição da liberação de glutamato por essas células (Molday e Molday, 1998).

O sinal que atinge os fotorreceptores é transmitido às células bipolares. Estas, então, passam a informação visual para as células ganglionares através do neurotransmissor excitatório glutamato, formando uma via vertical de transmissão da informação (Tachibana e Okada, 1991; Copenhagen e Jahr, 1989). As células horizontais podem modular os sinais dos fotorreceptores para as bipolares, enquanto que as células amácrinas podem modular os sinais das bipolares para as ganglionares. Essa modulação é promovida pela liberação do neurotransmissor inibitório GABA (Hirasawa *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 1978).

Além disso, a retina possui a glia de Muller que apresenta seu corpo celular localizado na camada nuclear interna e estende seus prolongamentos por todas as camadas, promovendo as interações neurônio-glia. É a principal célula glial da retina. Expressa diversos canais iônicos voltagem-dependentes como os canais retificadores de  $K^+$ . Concentrações aumentadas de  $K^+$  no meio extracelular levam a uma despolarização da glia de Muller através dos canais retificadores. Dessa maneira, esta célula é importante para a regulação das



concentrações de potássio e modulação da atividade neuronal, promovendo a homeostase do tecido (Newman e Zhas, 1998; Newman e Reichenbach, 1996).

Além dos canais retificadores de  $K^+$ , a glia de Müller expressa diversos tipos de receptores de neurotransmissores como  $GABA_A$  e vários tipos de receptores de glutamato (revisto por Newman e Reichenbach, 1996). É importante para a reciclagem de GABA e glutamato por apresentar transportadores que captam esses neurotransmissores. Desta forma, diminui as concentrações de glutamato no meio extracelular conferindo uma proteção aos neurônios (Matsui *et al.*, 1999).

A diferenciação dos diferentes tipos de neurônios da retina de galinha ocorre em períodos distintos do desenvolvimento. As primeiras células a saírem do ciclo celular são as células ganglionares e horizontais. Isto ocorre a partir do segundo dia embrionário (E2) e são seguidas pelos fotorreceptores, em E3, e pelas amácrinas, em E4. A glia de Müller se diferencia em E7 enquanto que as bipolares só se diferenciam a partir de E9. Já a sinaptogênese ocorre a partir de E9 (revisto por Martins e Pearson, 2008).

A retina é um ótimo modelo para estudos neuroquímicos, pois contém a maior parte dos sistemas de neurotransmissores, transportadores, enzimas de síntese e proteínas de transdução de sinal encontrados em outras regiões do sistema nervoso central (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2005; Pootanakit e Brunken, 2001; Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996; Blazynski e Perez, 1991; Hokoç *et al.*, 1990; Ventura e de Mello, 1990).

Além disso, as retinas de embriões de galinha são de fácil dissecação sendo possível o desenvolvimento de vários tipos de culturas de células:

culturas mistas que contêm neurônio e glia, culturas purificadas de neurônio e culturas purificadas de glia (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2005; Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001, Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000). Outro tipo de cultura possível é a de agregados, onde as células dissociadas são mantidas em suspensão por permanecerem sob agitação constante. As células voltam a se agregar e se dispõem em camadas de forma semelhante ao que ocorre no tecido intacto (de Almeida *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 1976).

## 1.2) Adenosina

Adenosina é um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico. Está presente em todos os tecidos de vertebrados, onde atua modulando os diversos processos fisiológicos. Os primeiros estudos que demonstraram que adenosina apresentava efeitos fisiológicos e poderia atuar como uma molécula sinalizadora extracelular foram feitos por Drury e Szent-Gyorgyi, em 1929. Estes pesquisadores utilizavam extratos de músculo cardíaco de mamíferos, e observaram que quando esses extratos eram injetados em outros animais havia uma diminuição da taxa de batimentos cardíacos. O composto que apresentava esse efeito foi isolado e suas propriedades químicas correspondiam aos do AMP. Entretanto, quando adenosina era administrada aos animais ao invés dos extratos cardíacos, os mesmo efeitos eram observados.

Os efeitos mais importantes da adenosina são descritos nos sistemas cardiovascular e nervoso. No tecido cardíaco, a adenosina produz vasodilatação e diminuição da pressão cardíaca (Sato *et al.*, 2005). Já no sistema nervoso central as principais ações descritas são a modulação da liberação de neurotransmissores e a neuroproteção em episódios de isquemia e hipóxia ou de estresse oxidativo (revisto por Cunha, 2001). Além disso, também pode induzir morte celular (Di Iorio *et al.*, 2002; Barth *et al.*, 1997; Wakade *et al.*, 1995). Em outros sistemas a adenosina apresenta diversas funções como modulação da liberação de citocinas, inibição da lipólise e indução de broncoconstrição (Fan *et al.*, 2003; Van der Graaf *et al.*, 1999; Bouma *et al.*, 1994).

### 1.2.1) Síntese e metabolismo

Adenosina pode ser produzida por diferentes vias e sua síntese ocorre tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular. No meio intracelular, a sua produção pode ocorrer a partir de 5'-AMP que, através da ação da enzima 5'-nucleotidase, é convertida em adenosina. Uma das fontes de 5'-AMP advém do metabolismo do AMPc pela ação de fosfodiesterases específicas. A adenosina sintetizada pode ser reconvertida em 5'-AMP através da enzima adenosina kinase. Uma vez produzida no meio intracelular, a adenosina pode ser metabolizada em inosina pela enzima adenosina deaminase (figura 2) (revisto por Latini e Pedata, 2001).

Uma segunda via de síntese ocorre a partir da hidrólise de S-adenosilhomocisteína (SAH) pela S-adenosilhomocisteína hidrolase (Lloyd *et al.*, 1988). Entretanto, não é uma via de grande importância para a produção de adenosina, sendo considerada como principal via a que envolve a atividade da 5'-nucleotidase (figura 2) (Pak *et al.*, 1994).

O AMPc produzido intracelularmente pode ser liberado através de transportadores específicos (Henderson e Strauss, 1991; Brunton e Mayer, 1979). Uma vez no meio extracelular, o AMPc pode ser convertido a 5'-AMP por ecto-fosfodiesterases e, em seguida, ser metabolizado em adenosina pela ecto-5'-nucleotidase. Da mesma maneira que no meio intracelular, a adenosina pode ser metabolizada em inosina no meio extracelular pela ação da enzima ecto-adenosina deaminase (revisito por Latini e Pedata, 2001).

O ATP constitui outra fonte para produção de adenosina no meio extracelular. Este nucleotídeo pode ser encontrado em vesículas contendo neurotransmissores. Uma vez gerado o estímulo para a liberação dessas vesículas, o ATP é liberado no meio extracelular onde pode atuar nos seus receptores específicos ou ser metabolizado em adenosina por ecto-nucleotidases (revisito por Zimmermann, 2000).

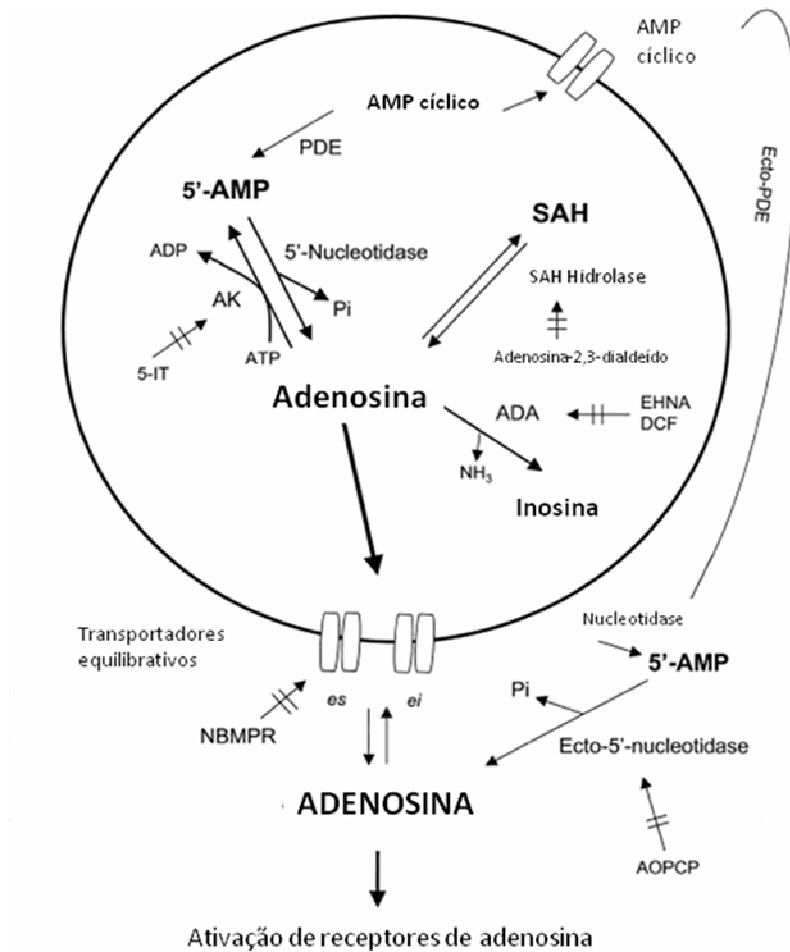


Figura 2: Síntese, metabolismo e transporte de adenosina (modificado de Latini e Pedata, 2001 para revisão).

### 1.2.2) Adenosina na retina

Paes-de-Carvalho e colaboradores, em 1992, demonstraram que retinas ao longo do desenvolvimento apresentam imunomarcção para adenosina endógena. Em retinas de embriões com oito dias de desenvolvimento (E8),

não há marcação para adenosina. Entretanto, em E12, as células ganglionares, a camada nuclear interna e a camada de fotorreceptores passam a expressar adenosina. Em E15 e E18 há aumento da intensidade de marcação, mas não há diferenças quanto às camadas de células marcadas. Em animais pós-eclosão, há um aumento na marcação na camada das células ganglionares. Entretanto, algumas células não apresentam imunorreatividade. Não houve como determinar se essa diferença de marcação se deve a células amácrinas deslocadas ou a populações de células ganglionares que não expressam adenosina. Essas retinas também apresentaram grande marcação na camada plexiforme interna. Uma imunorreatividade mais fraca foi encontrada para células horizontais, fotorreceptores e na porção interna da camada nuclear interna, provavelmente caracterizando células amácrinas.

A presença da adenosina foi caracterizada em retinas de diversas espécies. Utilizando retinas de gatos adultos, adenosina mostrou-se presente na camada de células ganglionares e na camada nuclear interna (Blazynski *et al.*, 1989). Em retinas de coelho também foi observada uma marcação intensa para adenosina na camada de células ganglionares e uma pequena marcação nas células amácrinas da camada nuclear interna. Das células marcadas localizadas na camada de células ganglionares, 50% correspondem às células amácrinas deslocadas que sintetizam acetilcolina. Os outros 50% correspondem às células ganglionares ou amácrinas deslocadas que sintetizam GABA (Blazynski, 1989).

Adenosina apresenta diversas funções, sendo uma delas a modulação da liberação de neurotransmissores (revisado por Cunha, 2001). O mesmo efeito pode ser observado nas retinas. Blazynski e colaboradores, em 1992,

mostraram que adenosina inibe a liberação de acetilcolina estimulada pela luz. Retinas de coelho, quando incubadas com adenosina deaminase, apresentavam um aumento de 30% na liberação do neurotransmissor na presença de luz.

### 1.2.3) Transporte

Apesar da adenosina apresentar mecanismos de síntese e metabolismo tanto no meio intracelular quanto no extracelular, a principal via de regulação de seus níveis se dá através da atividade de seus transportadores. O transporte é feito bi-direcionalmente e os seus transportadores são divididos em equilibrativos e concentrativos (revisto por Thorn e Jarvis, 1996).

Os transportadores equilibrativos (ENTs) são independentes de  $\text{Na}^+$  e transportam adenosina de acordo com o seu gradiente de concentração. Além disso, podem ser subdivididos em relação à sua sensibilidade ao inibidor nitrobenziltioinosina (NBMPR). Assim, são chamados de transportadores equilibrativos sensíveis ao NBMPR (ENT1) ou insensíveis ao NBMPR (ENT2) (Jarvis e Yong, 1986). Já foi demonstrado que esses transportadores são amplamente expressos no sistema nervoso central sendo que o subtipo sensível a NBMPR parece apresentar uma maior expressão (Anderson *et al.*, 1999).

Os transportadores concentrativos (CNTs) são dependentes de  $\text{Na}^+$  e transportam adenosina contra o seu gradiente de concentração (Ritzel *et al.*,

1997). Os transportadores concentrativos já foram descritos em cérebro, macrófagos, timócitos, fígado, pulmão, plexo coróide, intestino e rins de diversos animais (revisto por Griffith e Jarvis, 1996).

O sistema de transportadores de adenosina tem sido estudado pelo nosso grupo onde se observou que as retinas de diversas idades e todos os tipos de culturas de embriões de galinha apresentam a maquinaria necessária para o transporte deste nucleosídeo (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2005; Paes-de-Carvalho *et al.*, 1992; Paes-de-Carvalho *et al.*, 1990).

Utilizando experimentos de “binding” para transportadores sensíveis a NBMPR, foi demonstrado que retinas de E8, E12, E15 e animais pós-eclosão de 5 dias (P5) apresentam transportadores do subtipo ENT1. Além disso, a ligação ao [<sup>3</sup>H]NBMPR era maior em retinas de E8, sugerindo que nessa idade as retinas expressam mais desse tipo de transportador. A localização dos ENT1 também foi investigada. Em E8, a marcação apresentou uma distribuição difusa consistente com o fato de que nessa idade a retina ainda não possui suas células dispostas em camadas. Em E15 e P5, a marcação foi encontrada concentrada nas camadas plexiformes interna e externa (Paes-de-Carvalho *et al.*, 1992).

Em 1990, Paes-de-Carvalho e colaboradores demonstraram que as culturas purificadas de neurônios de retina de embriões de galinha também apresentam sistema para transporte de adenosina. Praticamente todos os fotorreceptores e cerca de 30% dos neurônios possuíam marcação para adenosina endógena e captavam [<sup>3</sup>H]adenosina. Além disso, 50% dos neurônios não apresentaram nenhuma das duas marcações. A captação era completamente bloqueada por NBMPR indicando que essas culturas



apresentam apenas transportadores do subtipo ENT1. Além disso, essas células praticamente só transportam adenosina já que o pré-tratamento de [<sup>3</sup>H]adenosina com adenosina deaminase, o que leva à formação de inosina, reduz a captação. Foi mostrado que adenosina também pode ser liberada nessas culturas, de forma dependente de Ca<sup>2+</sup>, tanto em condições basais quanto estimuladas com K<sup>+</sup>.

Em 2005, Paes-de-Carvalho e colaboradores demonstraram que culturas mistas liberam purinas quando estimuladas com o neurotransmissor glutamato. Este efeito mostrou-se dependente tanto de receptores de glutamato do tipo NMDA quanto do tipo kainato. Os transportadores envolvidos são do tipo equilibrativo sensíveis a NBMPR, pois o tratamento com este inibidor do transportador foi capaz de bloquear completamente a liberação. A análise do material mostrou que grande parte da liberação correspondia à inosina. Provavelmente, a adenosina liberada estaria sendo rapidamente convertida no meio extracelular pela enzima ecto-adenosina deaminase. Além disso, tanto a liberação quanto a captação de purinas é dependente da enzima CAMKII (proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina do tipo 2) já que seu inibidor, KN62, foi capaz de bloquear completamente o transporte. Este efeito parece ser específico para os transportadores de adenosina, pois a captação de GABA e colina não foram afetadas por este inibidor.

Resultados do nosso laboratório também mostram que as culturas purificadas de glia também são capazes de captar e liberar adenosina (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008). O transporte é parcialmente bloqueado por NBMPR, o que demonstra que essas culturas apresentam uma maior quantidade de receptores que não são sensíveis ao inibidor quando

comparado com as culturas mistas ou purificadas de neurônios. Além disso, o transportador é específico para adenosina já que o pré-tratamento de [<sup>3</sup>H]adenosina com adenosina deaminase bloqueou completamente a captação. A incubação das culturas com inibidores da CAMKII, PKC (proteína kinase C) e da via de ativação das ERKs (kinases reguladas por sinais extracelulares) também bloqueou a captação, enquanto que inibidores de receptores do tipo NMDA e kainato não apresentaram qualquer efeito (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008).

Esses resultados indicam que as retinas de embriões de galinha e os seus diferentes tipos de culturas apresentam mecanismos de captação e liberação de adenosina. Entretanto, cada tipo de cultura apresenta diferenças quanto ao sistema de transporte, seja nas diferenças nos tipos principais de transportadores expressos ou nos mecanismos de controle deste transporte.

A captação de adenosina foi observada de forma similar em retinas de mamíferos como coelhos, camundongos e esquilos. Esta captação era localizada na camada de células ganglionares e camada nuclear interna. Além disso, um pequeno acúmulo de adenosina foi observado na camada plexiforme interna enquanto que os fotorreceptores não foram capazes de promover captação (Blazynski *et al.*, 1989).

Em retinas de coelhos foi observado que a captação de adenosina era inibida pela incubação com NBMPR, tanto na camada de células ganglionares quanto na camada nuclear interna. Estes resultados indicam que nas retinas de coelho, assim como nas retinas de embriões de galinha e nas culturas mistas e purificadas de neurônio, o transporte de adenosina também é

completamente dependente dos transportadores equilibrativos sensíveis a NBMPR (Blazynski, 1991).

#### 1.2.4) Receptores de adenosina

Apesar de diversos trabalhos indicarem que adenosina e ATP apresentavam efeitos como moléculas transmissoras, só em 1972 o termo purinérgico foi aceito. Neste ano foi publicado um trabalho demonstrando que o ATP poderia atuar como molécula transmissora nos intestinos e na bexiga e que esses efeitos não eram colinérgicos nem adrenérgicos (Burnstock *et al.*, 1972).

A partir disso, em 1978, Burnstock propôs a existência de receptores purinérgicos e sugeriu, ainda, que fossem divididos em P1, seletivos à adenosina, e em P2, seletivos ao ATP e ADP (revisto por Burnstock, 2009).

Em 1979, Van Calcar e colaboradores, utilizando culturas purificadas de glia, observaram que a adenosina apresentava um efeito dual em relação ao acúmulo de AMPc. Em concentrações baixas, adenosina era capaz de inibir o acúmulo de AMPc induzido por agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Entretanto, em concentrações maiores, produzia aumento no acúmulo de AMPc. Assim, os autores propuseram que os receptores P1 seriam subdivididos em A1, que inibiriam o acúmulo de AMPc, e A2, que produziriam esse acúmulo.

Além disso, preparações de córtex de rato quando incubadas com análogos de adenosina apresentaram diminuição da atividade da adenilil ciclase. Este efeito era dependente de GTP e bloqueado por metilxantinas sugerindo a participação de receptores (Cooper *et al.*, 1980).

Os receptores de adenosina são metabotrópicos e, como todos os receptores acoplados à proteína G, apresentam os 7 domínios transmembrana além das 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares. Possuem, ainda, uma porção carboxi terminal intracelular e uma porção amino terminal extracelular (revisto por Olah *et al.*, 1995)

Já foram clonados quatro subtipos de receptores de adenosina: A1, A2a, A2b e A3 (Pierce *et al.*, 1992, Stehle *et al.*, 1992, Zhou *et al.*, 1992; Mahan *et al.*, 1991). Os receptores A1 e A3 estão acoplados à proteína Gi ou Go, inibindo os níveis intracelulares de AMPc, enquanto que os receptores A2a e A2b estão acoplados à proteína Gs, aumentando os níveis intracelulares de AMPc (revisto por Ribeiro *et al.*, 2002) (figura 3).

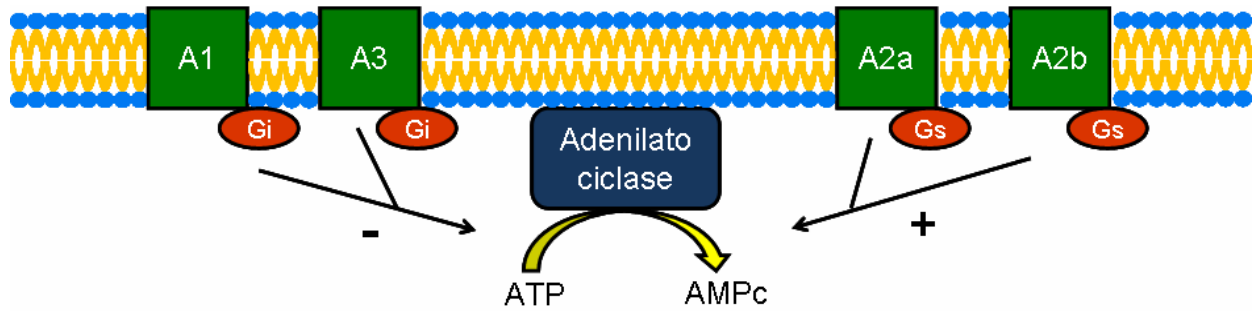


Figura 3: Os receptores de adenosina são divididos em 4 subtipos: A1 e A3, que inibem o acúmulo de AMPc, e A2a e A2b, que promovem acúmulo de AMPc.

Entretanto, os receptores de adenosina podem ativar outras vias de sinalização. Já foi demonstrado que os 4 subtipos podem ativar a via da PLC (fosfolipase C),  $Ca^{2+}$  e PKC (Gao *et al.*, 1999; Biber *et al.*, 1997; Abbracchio *et al.*, 1995; Offermanns e Simon, 1995).

Os receptores A1 e A2 estão presentes em retinas de diversas espécies (Blazynski e Perez, 1991, para revisão). Já foi demonstrado que retinas de coelhos estimuladas com adenosina, norepinefrina ou dopamina promoviam um aumento do acúmulo de AMPc. Entretanto, apenas o efeito da adenosina era bloqueado por IBMX, antagonista de receptores de adenosina. Além disso, o acúmulo de AMPc induzido por adenosina era aditivo ao efeito da norepinefrina ou dopamina. Este fato indica que os sistemas purinérgicos, dopaminérgicos e adrenérgicos são independentes nessas retinas (Blazynski *et al.*, 1986).

O tratamento de retinas de embriões de galinha com adenosina foi capaz de promover acúmulo de AMPc. Entretanto, esse acúmulo variava de acordo com o desenvolvimento. Em retinas de E8 até E13, adenosina não promoveu aumento de AMPc. A partir de E14, começa a haver aumento nos seus níveis intracelulares com um máximo em E17. Em retinas de animais pós-eclosão, o acúmulo ainda ocorria, mas de forma mais reduzida. Nas culturas mistas, também foi observado um acúmulo já com 1 dia. O máximo foi alcançado em 4 dias e se manteve até 8 dias em cultura (Paes-de-Carvalho e de Mello, 1982).

Em retinas de embriões de galinha de 16 dias foi observado que o tratamento com dopamina ou 2-cloroadenosina (análogo de adenosina não hidrolisável) promovia acúmulo de AMPc. Concentrações saturantes ou subsaturantes de ambas as drogas não foram capazes de produzir efeitos somatórios no aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Estes resultados indicavam que as retinas, além de possuírem receptores A2 de adenosina, apresentavam, também, um receptor de adenosina do tipo inibitório (Paes-de-Carvalho e de Mello, 1985).

#### 1.2.5) Distribuição e localização celular dos receptores de adenosina no SNC

Os receptores de adenosina apresentam uma larga distribuição pelo sistema nervoso central. Os receptores A1 estão expressos em altas concentrações no córtex, cerebelo e hipocampo (revisto por Fredholm *et al.*,

2000). Além disso, já foi mostrado que estes receptores estão presentes tanto em neurônios quanto nas células de glia: astrócitos, microglia e oligodendrócitos (Othman *et al.*, 2003; Biber *et al.*, 1997; Gebicke-Haerter *et al.*, 1996). Nos neurônios, sua localização é abundante nas regiões de sinapses. Nos terminais pré-sinápticos atua modulando a liberação de alguns neurotransmissores como glutamato, acetilcolina e serotonina. Entretanto, o receptor também é encontrado em terminais pós-sinápticos. (revisto por Cunha, 2001; Tetzlaff *et al.*, 1987).

Os receptores A2a são altamente expressos no estriado e no bulbo olfatório (revisto por Fredholm *et al.*, 2000). São localizados em neurônios, microglia e oligodendrócitos. Entretanto, sua presença em astrócitos ainda é controversa (Melani *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2001). Já foram descritos em espinhas dendríticas e regiões pós-sinápticas nos gânglios da base (Rodrigues *et al.*, 2005; Hettinger *et al.*, 2001). Já no hipocampo estão mais presentes nas sinapses, particularmente nas regiões pré-sinápticas onde regulam a liberação de neurotransmissores como glutamato, acetilcolina, GABA e noradrenalina (Rebola *et al.*, 2005; Rebola *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2000; Barraco *et al.*, 1995).

Os receptores A2b estão expressos em baixas concentrações no sistema nervoso central (revisto por Fredholm *et al.*, 2000). São encontrados em neurônios, microglia e astrócitos (Allaman *et al.*, 2003; Sebastião e Ribeiro, 1996).

Os receptores A3 estão expressos em baixas concentrações no hipocampo, córtex, cerebelo e estriado (revisto por Fredholm *et al.*, 2000).

Estão presentes em neurônios, astrócitos e microglia (Wittendorp *et al.*, 2004; Hammarberg *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2001).

#### 1.2.6) Receptores A1 de adenosina

Os receptores A1 estão classicamente acoplados à proteína Go ou Gi, inibindo a atividade da enzima adenilil ciclase e, conseqüentemente, diminuindo os níveis intracelulares de AMPc (revisto por Ribeiro *et al.*, 2002; Van Calker *et al.*, 1979). Entretanto, podem também se acoplar a outros tipos de proteínas G, estimulando a via da PLC/Ca<sup>2+</sup>/PKC (Biber *et al.*, 1997).

Como citado anteriormente, em 1985, Paes-de-Carvalho e de Mello sugeriram a presença de um receptor inibitório para adenosina nas retinas de embriões de galinha. Em 1990, Paes-de-Carvalho demonstrou que as retinas intactas apresentavam receptores A1 de adenosina. Em retinas de 10 dias, adenosina foi capaz de inibir o acúmulo de AMPc estimulado por dopamina de forma dose-dependente. Através de experimentos de “binding”, o receptor já se mostrou presente em E10, com um máximo em E17. Em retinas de animais pós-eclosão o receptor ainda está presente, mas em níveis mais baixos.

Experimentos de autorradiografia foram utilizados para o estudo da localização dos receptores A1 nas retinas ao longo do desenvolvimento. Em E8, não foi encontrada a presença desses receptores. As marcações foram detectadas a partir de E12 com aumento de intensidade em E18. Em P5 a intensidade de marcação foi menor. Esses resultados são consistentes com os



previamente obtidos (Paes-de-Carvalho, 1990). Em todas as idades as marcações estavam presentes principalmente nas camadas plexiformes externa e interna. Marcações menores foram obtidas nas camadas nucleares interna e externa, e também na camada de células ganglionares (Paes-de-Carvalho *et al.*, 1992).

Já foi demonstrado que receptores A1 modulam a liberação de acetilcolina em culturas mistas de embriões de galinha de 8 dias. Nessas culturas, a estimulação de receptores A1, com agonistas específicos, diminuiu a liberação de acetilcolina estimulada por KCl (Santos *et al.*, 1998).

A presença de receptores A1 já foi demonstrada em retinas de outras espécies. Em retinas de coelhos e camundongos estes receptores estão presentes em todas as camadas da retina com alta densidade na camada plexiforme interna e camada nuclear interna (Blazynski, 1990). Nas retinas de coelhos, a estimulação de receptores A1, com agonistas específicos, produz inibição da atividade da adenilil ciclase estimulada por forskolina (ativador direto da adenilil ciclase) (Blazynski, 1987). Retinas de bovinos também foram utilizadas para estudos da presença destes receptores com resultados similares aos observados com as retinas de coelhos. Os receptores A1 são expressos nestas preparações e inibem a atividade da adenilil ciclase estimulada por forskolina (Woods e Blazynski, 1991).

### 1.2.7) Receptores A2a de adenosina

Os receptores A2a de adenosina estão classicamente acoplados à proteínas Gs, estimulando a atividade da enzima adenilil ciclase e, conseqüentemente, aumentando os níveis intracelulares de AMPc (revisito por Ribeiro *et al.*, 2002; Van Calker *et al.*, 1979). Entretanto, esses receptores podem também se acoplar à via da PLC/Ca<sup>2+</sup>/PKC (Offermanns e Simon, 1995).

Os receptores A2a estão presentes nas retinas de galinha ao longo do desenvolvimento, quando detectados por “western blot”. Estes receptores já estão presentes em E6, mas o nível de expressão decai a partir de E11 e se mantém até E16. Em animais P1 os níveis voltam aos mesmos observados no período inicial do desenvolvimento. Além disso, a estimulação das retinas com agonistas de receptores A2a promove aumento da fosforilação do fator de transcrição CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc) tanto em E9 (período embrionário antes da formação de sinapses) quanto em E16 (período embrionário após a formação de sinapses). Este efeito é dependente da ativação de PKA, mas não da PLC. (Vardiero *et al.*, Fesbe, 2009).

Nas culturas purificadas de neurônios de embriões de galinha de 8 dias foi mostrado que o tratamento crônico com glutamato provocava uma extensa morte celular. Este efeito era dependente de receptores NMDA e AMPA/kainato. O pré-tratamento com adenosina era capaz de resgatar as células da morte induzida por glutamato. Este efeito era mimetizado por

NBMPR (inibidor do transportador de adenosina) ou por análogos permeáveis de AMPc. Além disso, foi demonstrado que o efeito da adenosina era dependente da ativação de receptores A2a e não de receptores A1 (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001).

Foi mostrado nestas mesmas culturas purificadas que a troca do meio de cultura também provocava uma extensa morte celular. Este efeito era bloqueado pelo pré-tratamento das culturas com NBMPR. O resgate da morte era observado tanto em fotorreceptores quanto nos outros neurônios presentes nas culturas. Além disso, o efeito era mimetizado por análogos permeáveis de AMPc e pela ativação dos receptores A2a, mas não dos receptores A1. A troca do meio de cultura por meio condicionado de culturas purificadas de neurônios irmãs não promovia morte celular. Este fato indica que os próprios neurônios em cultura liberam fatores que vão promover a sua sobrevivência (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2003).

Além disso, foi observado que o tratamento das culturas mistas de neurônio com agonistas de receptores A2a promove alteração das subunidades que compõem os receptores NMDA. Este efeito poderia estar envolvido na proteção induzida por receptores A2a dos neurônios em culturas purificadas tratadas cronicamente com glutamato (Caversan *et al.*, Fesbe, 2007).

### 1.2.8) Regulação gênica da expressão dos receptores de adenosina

Vários trabalhos demonstram a indução da expressão gênica de receptores A1 em diversas condições (revisão por St Hilaire *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que stress oxidativo é capaz de aumentar a expressão de receptores A1 utilizando linhagens celulares de músculo liso. O tratamento destas linhagens com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promoveu aumento dos níveis de receptores A1 (Nie *et al.*, 1998). Além disso, a indução de hipóxia nestas mesmas linhagens celulares também libera ROS aumentando a expressão de receptores A1 (Hammond *et al.*, 2004). Ambos os efeitos são dependentes da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB). Ramkumar e colaboradores, em 2004, demonstraram que chinchilas expostas a sons elevados por longos períodos de tempo apresentaram aumento dos níveis de receptores A1 na cóclea, também de forma dependente de liberação de ROS e de ativação de NFkB.

Óxido nítrico (NO) é outro fator capaz de aumentar a expressão de receptores A1. Células de feocromocitoma 12 (PC12) tratadas com doadores de NO apresentaram aumento dos níveis de RNAm e de proteína para receptor A1. Além disso, este efeito foi completamente bloqueado pela inibição de NFkB. (Jhaveri *et al.*, 2006). Assim, o NFkB parece ser o principal fator de transcrição envolvido na expressão de receptores A1.

Diversos estudos têm sido feitos sobre a regulação gênica da expressão dos receptores A2a (revisão por St Hilaire *et al.*, 2009). Em macrófagos, o tratamento com LPS promoveu aumento de RNAm para receptor A2a através

da ativação de NFkB (Murphree *et al.*, 2005). Também foi observado que este fator de transcrição estava envolvido no aumento da expressão de receptores A2a em células epiteliais de pulmão (Morello *et al.*, 2006). Outros fatores de transcrição como CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc) e HIF-1 (fator induzido por hipóxia 1) já foram detectados regulando a expressão de A2a (revisto por St Hilaire *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2005).

Os receptores A2b e A3 parecem ter a sua expressão regulada por processos inflamatórios e hipóxia. Fibroblastos de pulmão quando submetidos à hipóxia apresentaram aumento de RNAm para receptor A2b (Zhong *et al.*, 2005). Kong e colaboradores, em 2006, demonstraram que células endoteliais humanas submetidas à hipóxia aumentavam a expressão de receptores A2b via HIF-1. Já os receptores A3 têm a sua expressão aumentada por fatores que induzem inflamação como IL-2 (interleucina-2) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) através da ativação de NFkB (revisto por St Hilaire *et al.*, 2008; Madi *et al.*, 2007).

### 1.3) NFkB

O fator nuclear kappa B (NFkB) é um fator de transcrição envolvido em diversos processos como inflamação, resposta imune, proliferação e apoptose (revisto por Viatour *et al.*, 2005; Hoeflich *et al.*, 2000; Sen e Baltimore, 1986). Foi descrito pela primeira vez, em 1986, como um fator nuclear necessário à indução da expressão de genes para imunoglobulinas em células B do sistema

imune (Sen e Baltimore, 1986). Entretanto, já foi descrito estar envolvido com a expressão gênica de diversas outras proteínas como citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocinas, proteínas de estresse, moléculas de adesão e proteínas de resposta imune (revisto por May e Ghosh, 1998).

Consiste em uma família de proteínas que, em mamíferos, é composta por 5 membros: p65 (ou RelA), RelB, Rel (ou c-Rel), NFkB1 (p50 e seu precursor p105) e NFkB2 (p52 e seu precursor p100). Todos possuem um domínio N-terminal de aproximadamente 300 aminoácidos altamente conservados, o qual é chamado de domínio de homologia Rel (RHD). Este é responsável pela sua ligação ao DNA, dimerização, translocação para o núcleo e associação com a proteína inibitória IkB. As proteínas da família do NFkB se dimerizam em diversos padrões de combinações para atuarem como fatores de transcrição (revisto por Ghosh e Karin, 2002). Entretanto, enquanto a maioria dos dímeros é capaz de ativar transcrição gênica, os homodímeros p50-p50 e p52-p52 podem reprimi-la (Zhong *et al.*, 2002). O primeiro heterodímero descrito era formado pelas subunidades p50 e p65. Além disso, este é o dímero mais comumente associado aos efeitos do NFkB (Kopp e Ghosh, 1995).

As proteínas p50 e p52 são produzidas pelo processamento de seus precursores p105 e p100, respectivamente. A p50 e a p52 são produzidas através do processamento proteolítico após fosforilação dos seus precursores (Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2009; Dejardin *et al.*, 2002). A região N-terminal da p105 e p100 contém as seqüências de aminoácidos correspondentes à p50 e p52, respectivamente. Além disso, a região C-terminal contém várias repetições ankirina, as quais também são encontradas nas proteínas inibitórias

I $\kappa$ B (revisto por Ghosh *et al.*, 1998). Enquanto o processamento da p105 ocorre constitutivamente, o da p100 é dependente de sinalização química (Xiao *et al.*, 2001; Karin e Ben-Neriah, 2000).

Quando não estimulado, o NF $\kappa$ B está principalmente localizado no citoplasma associado à proteína I $\kappa$ B (proteína inibitória kappa B). As proteínas I $\kappa$ B são uma família que, em mamíferos, consiste de 7 membros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3 e os precursores p100 e p105. São caracterizadas por uma cadeia C-terminal contendo repetições de 30 a 33 aminoácidos chamados de repetições ankirina que são importantes para sua interação com o NF $\kappa$ B via RHD (revisto por Ghosh *et al.*, 1998). Essa associação impede a exposição das seqüências de sinal de localização nuclear (NLS) localizadas no NF $\kappa$ B, bloqueando a sua migração para o núcleo. Quando a célula recebe um estímulo que ative a via de sinalização do NF $\kappa$ B, há fosforilação da proteína I $\kappa$ B o que induz a sua ubiquitinação e seguinte degradação pelo proteassoma 26S. Dessa maneira, as NLS do NF $\kappa$ B ficam expostas e o fator de transcrição migra para o núcleo, onde induz a expressão de genes específicos (Ghosh e Baltimore, 1990).

Entretanto, já foi demonstrado que I $\kappa$ B $\alpha$  apresenta seqüências de exportação nuclear ricas em leucina (NES) (Rodriguez *et al.*, 1999). Esta seqüência não foi encontrada no I $\kappa$ B $\beta$  (Malek *et al.*, 2001; Tam e Sen, 2001; Rodriguez *et al.*, 1999). Isto sugere que apenas novas proteínas de I $\kappa$ B $\alpha$  sintetizadas podem migrar para o núcleo e transportar o NF $\kappa$ B de volta ao citoplasma. O mecanismo de importação de I $\kappa$ B $\alpha$  para o núcleo ainda é controverso. Enquanto alguns trabalhos sugerem que a proteína possui as NLS, outros indicam que I $\kappa$ B $\alpha$  se associa a outras proteínas que apresentam

as NLS (Turpin *et al.*, 1999; Sachdev *et al.*, 1998). Além disso, outros estudos indicam que o I $\kappa$ B $\alpha$  mascara as NLS apenas das subunidades p65 enquanto que as da p50 permanecem expostas. Assim, o complexo p65-p50-I $\kappa$ B $\alpha$  poderia migrar para o núcleo mas seria imediatamente exportado para o citoplasma devido às NES presentes no I $\kappa$ B $\alpha$  (Malek *et al.*, 2001; Huxford *et al.*, 1998; Jacobs e Harrison, 1998).

A fosforilação do I $\kappa$ B é feita por kinases específicas: as IKKs (I kappa B kinases). As IKKs são um complexo protéico composto por 3 subunidades: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  (ou NEMO) (Karin e Bem-Neriah, 2000). Enquanto IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  apresentam atividade catalítica, IKK $\gamma$  é a subunidade regulatória e não apresenta atividade catalítica. Entretanto, é essencial para a ativação do complexo IKK (Rudolph *et al.*, 2000; Yamaoka *et al.*, 1998).

### 1.3.1) Vias de ativação do NF $\kappa$ B

A ativação do NF $\kappa$ B ocorre por duas vias distintas: a via canônica e a via não-canônica. A via canônica (Figura 4) é a via clássica e é ativada por vários fatores como, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias. Esta via envolve a ativação do complexo IKK através da fosforilação da IKK $\alpha$  e da IKK $\beta$ . O complexo IKK ativado leva à fosforilação da I $\kappa$ B $\alpha$  nas serinas 32 e 36 ou da I $\kappa$ B $\beta$  nas serinas 19 e 23. Estas fosforilações levam à ubiquitinação da I $\kappa$ B e, conseqüentemente, sua degradação pelo proteassoma 26S. Em seguida, o



NFkB livre (relA e p50) migra para o núcleo onde ativa a transcrição de genes específicos (revisto por Yamamoto e Gaynor, 2004).

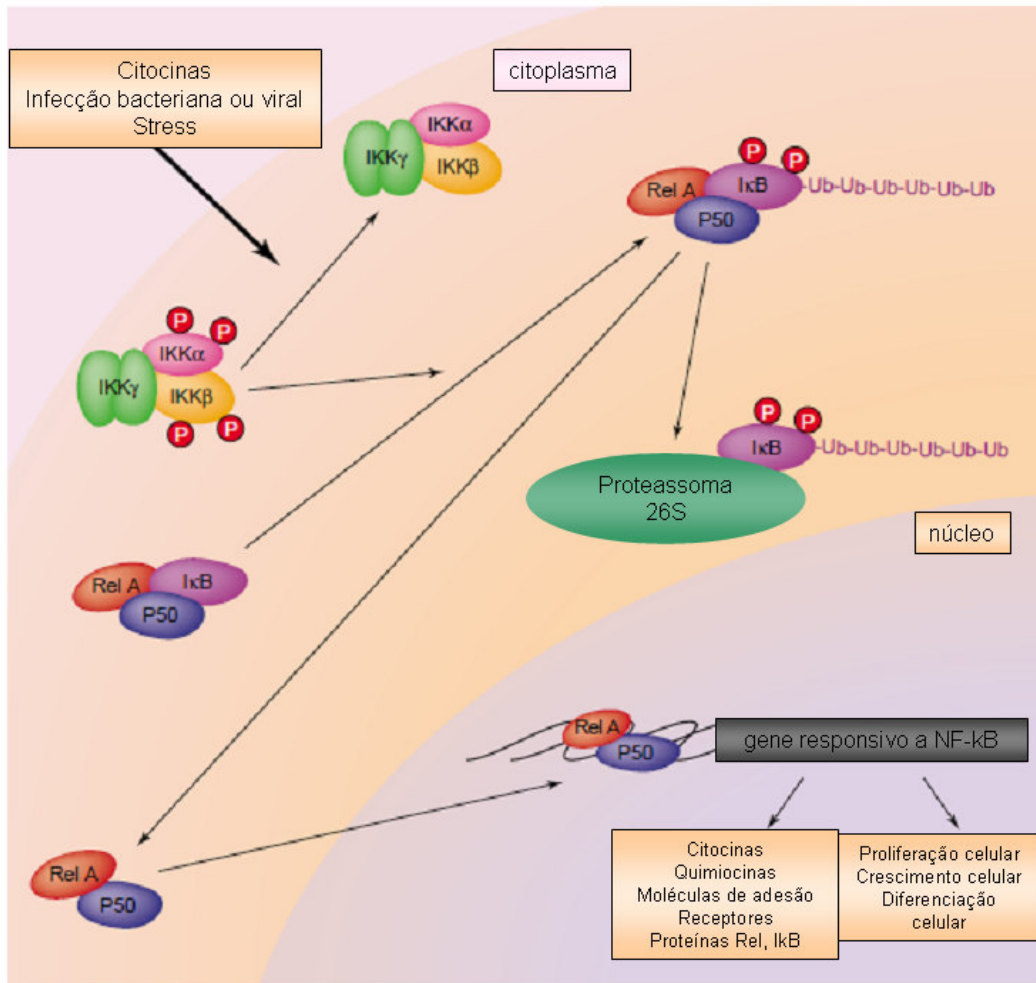


Figura 4: Via canônica de ativação do NFkB (modificado de Yamamoto e Gaynor, 2004).

A via não canônica (figura 5) é a via que regula o processamento da p100 e pode ser ativada por citocinas como o fator ativador de células B (BAFF), linfotóxina β (LTβ) e CD40. Esta via de sinalização ativa a cinase indutora de

NFkB (NIK) que ativa homodímeros de IKK $\alpha$  os quais, utilizando uma via independente de NEMO (IKK $\gamma$ ), fosforilam a p100. Em seguida, esta proteína é ubiquitinada e processada originando a p52. Assim, o heterodímero RelB-p52 migra para o núcleo onde ativa a transcrição de genes específicos (Xiao *et al.*, 2001).

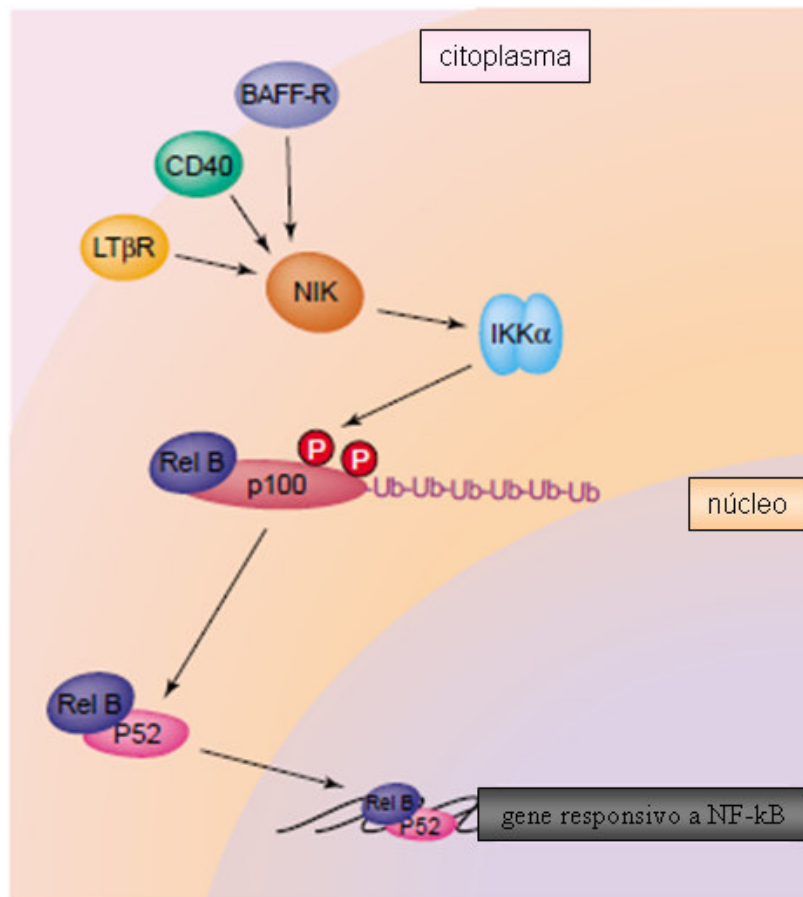


Figura 5: Via não canônica de ativação do NFkB (modificado de Yamamoto e Gaynor, 2004).

### 1.3.2) Regulação da atividade transcricional do NFκB

O principal mecanismo de regulação da atividade transcricional do NFκB ocorre através da fosforilação da IκB, com conseqüente liberação do fator de transcrição e sua migração para o núcleo. Entretanto, a regulação da sua atividade transcricional também envolve modificações pós-transducionais. Estas consistem em fosforilações que modulam a capacidade de transcrição do NFκB. Os primeiros trabalhos que demonstraram que a subunidade p65 poderia ser fosforilada, foram feitos por Naumann e colaboradores (Naumann e Scheidereit, 1994). Algumas proteínas já foram relacionadas a este processo como a subunidade catalítica da PKA (PKAc), a caseína kinase II (CKII), a PKCζ e o glicogênio sintase kinase 3β (GSK3β) (Schwabe e Brenner, 2002; Leitges *et al.*, 2001; Hoeflich *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1997).

Já foi demonstrado que a PKAc pode estar ligada ao complexo IκB-NFκB através de uma ligação com IκBα ou IκBβ. Esta ligação mantém a atividade catalítica da PKA inibida. Entretanto, quando há estímulo para ativação do NFκB e a IκB é degradada, a PKAc fica livre e fosforila a p65 na serina 276 de maneira independente de AMPc (Zhong *et al.*, 1997). Esta fosforilação aumenta a capacidade de ligação do fator ao DNA. Além disso, gera um sítio de ligação para o CBP (proteína de ligação para CREB) e p300, que são histonas acetiltransferases e participam da transcrição gênica. Quando a p65 não está fosforilada, a sua cauda C-terminal interage com o seu RHD (domínio de homologia Rel), o que interfere com a sua ligação ao DNA e

ao CBP/p300. Assim, a fosforilação da p65 facilita a ligação do NFkB ao DNA e aumenta a sua atividade transcricional (Zhong *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 1998).

De maneira semelhante à da PKAc, GSK3 $\beta$ , PKC $\zeta$  e CKII também são capazes de fosforilar a p65. Enquanto o sítio de fosforilação da PKC $\zeta$  encontra-se na serina 311, o da CKII é localizado na serina 529 da p65 o que aumenta a sua interação com CBP de forma semelhante ao descrito acima (Duran *et al.*, 2003; Schwabe e Brenner, 2002; Wang *et al.*, 2000).

#### 1.4) ERK

As ERKs (quinasas reguladas por sinais extracelulares) são proteínas pertencentes à família das MAP kinases (proteínas kinases ativadas por mitógenos) que incluem, ainda, a JNK (kinase c-Jun amino terminal) e a p38. Apresentam duas isoformas, ERK1 e ERK2, que possuem 83% de homologia entre si e estão envolvidas com proliferação e diferenciação celular. Além disso, são ativadas por diferentes estímulos como fatores de crescimento e receptores metabotrópicos (revisto por Krishna e Narang, 2008).

Os fatores de crescimento se ligam e ativam receptores tirosina kinase (figura 6). A ligação promove fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor e o ancoramento da Grb-2 através dos domínios SH2. Em seguida, a proteína SOS (fator trocador de guanina) se liga ao receptor através da Grb-2. Isto promove a associação da Ras, uma proteína G monomérica, que é ativada quando a SOS promove a troca de GDP por GTP. A Ras ativada induz, em

seqüência, a ativação da Raf, MEK e ERK. A ERK pode fosforilar substratos no citoplasma ou migrar para o núcleo onde ativa fatores de transcrição (Fukuda *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1992).

Diversos fatores de transcrição podem ser ativados pela ERK como c-fos, CREB e AP-1 (revisto por Krishna e Narang, 2008). Em culturas mistas de retinas de embrião de galinha a ativação de receptores de AMPA e kainato promove aumento da fosforilação de CREB de forma dependente da ativação de ERK e da liberação de NO (óxido nítrico) (Socodato *et al.*, 2009).

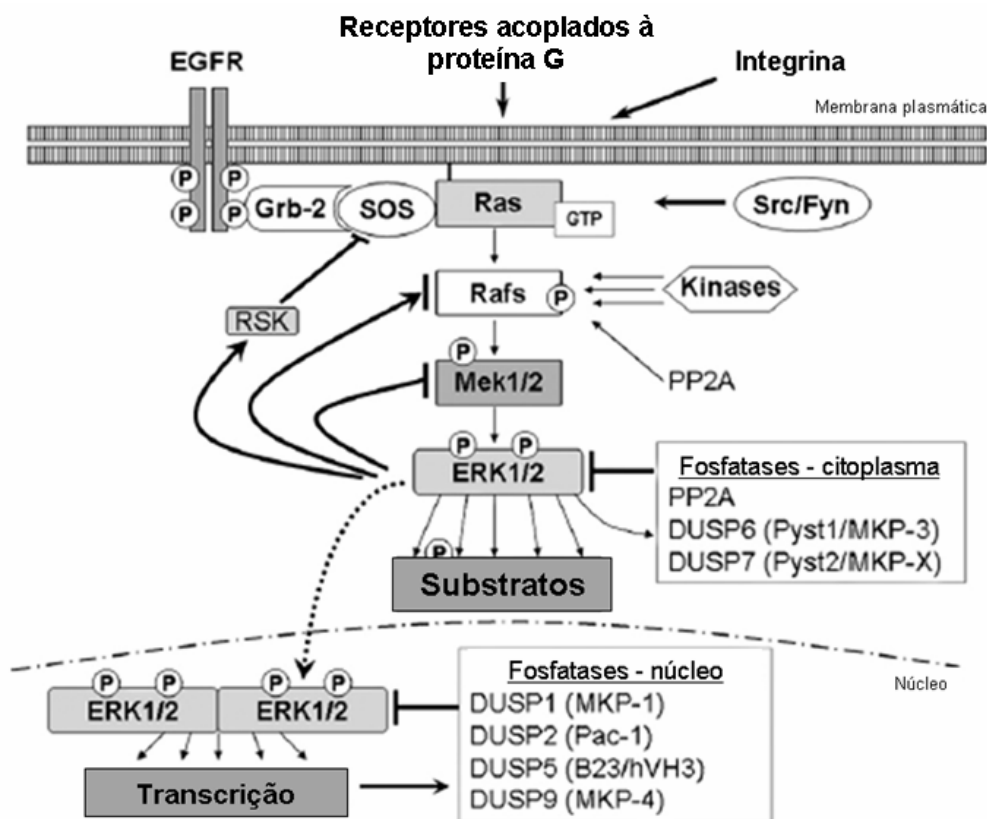


Figura 6: Vias de sinalização que promovem a ativação das ERKs (modificado de Ramos, 2008, para revisão).

Receptores metabotrópicos também podem ativar a via das ERKs. Faure e colaboradores, em 1994, demonstraram que receptores acoplados às proteínas Gq, Gs ou Gi, em células COS-7, podem estimular a ERK. A ativação via Gq é dependente de PLC, enquanto que via Gs é dependente de AMPc. Foi observado que receptores acoplados a proteína Gi, como receptores A1 de adenosina e D2 de dopamina, também foram capazes de ativar a ERK. Este efeito não é via subunidade  $\alpha_i$ , pois a sua transfecção não alterou a atividade da ERK. Entretanto, ocorre via subunidade  $\beta\gamma$ , a qual é conhecida por ativar a adenilil ciclase do tipo II (Federman *et al.*, 1992).

A ativação da ERK via PLC pode ocorrer por um mecanismo dependente ou independente de PKC (Charlesworth e Rozengurt, 1997; Hawes *et al.*, 1995). Assim, a participação desta proteína na via de sinalização pode ser dependente do tipo de receptor ativado, da isoforma de PKC expressa e/ou do tipo celular (revisto por Heuss e Gerber, 2000).

A PKA modula a atividade da ERK. Ela pode modular negativamente se a célula expressar Raf-1 ou pode modular positivamente se a célula expressar B-Raf. O efeito inibitório da PKA é via Rap-1. Ela pode ativar diretamente a Rap-1 ou pode ativar a Src (tirosina kinase citoplasmática) e esta ativar a Rap-1 (revisto por Stork e Schmitt, 2002).

Outra via de ativação das ERKs dependente de receptores metabotrópicos envolve a ativação de Src. Já foi mostrado que essa proteína é necessária para ativar a ERK através de receptores acoplados à Gi ou Gq (Igishi e Gutkind, 1998). Diversos receptores metabotrópicos, como muscarínicos, glutamatérgicos e adrenérgicos, podem ativar a Src. Entretanto, o mecanismo pelo qual os receptores metabotrópicos ativam a Src ainda não é

bem compreendido (revisto por Heuss e Gerber, 2000). Entretanto, Luttrell e colaboradores, em 1999, mostraram que receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos se associam à Src via  $\beta$ -arrestina. Assim, como outros receptores também podem se associar à  $\beta$ -arrestina, este pode ser um mecanismo geral de ativação da Src.

Os receptores de adenosina também podem ativar a via de sinalização das ERKs (revisto por Schulte e Fredholm, 2003). O estímulo de receptores A1 em culturas purificadas de glia de retinas de embriões de galinha promove aumento da fosforilação da ERK. Este efeito é dependente de PKC e Src (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008).

### 1.5) Interleucina-6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que foi originalmente identificada como um fator indutor de síntese de imunoglobulina por linfócitos B (Hirano *et al.*, 1986). Entretanto, além das suas funções no sistema imune, a IL-6 também apresenta efeitos no SNC como proteção dos neurônios em cultura da morte induzida por NMDA (Ali *et al.*, 2000) e inibição da liberação de glutamato no córtex (D'arcangelo *et al.*, 2000). Além disso, o tratamento crônico com a citocina aumenta a sobrevivência de neurônios ganglionares de retina de rato em cultura (Mendonça Torres e de Araújo, 2001). A IL-6 pode ser produzida por células endoteliais, gliais e neuronais e já

foi demonstrada a presença de RNAm para IL-6 em diversas regiões do sistema nervoso central (revisto por Jüttler *et al.*, 2002).

IL-6 pertence a uma família de citocinas que contém, ainda, interleucina-11 (IL-11), interleucina-27 (IL-27), interleucina-31 (IL-31), fator neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1), citocina do tipo cardiotrofina (CLC), fator inibitório de leucemia (LIF), neuropoietina (NPN) e oncostatina M (OSM) (revisto por Rose-John *et al.*, 2006).

A sua via de sinalização é iniciada quando a IL-6 se liga a receptores específicos de membrana (subunidade  $\alpha$  de receptor de IL-6) formando um complexo protéico que, em seguida, se associa com a proteína gp130 (ativação clássica). Essa associação promove a homodimerização da gp130 e, como conseqüência, ativação da JAK (Janus kinase). A IL-6 pode ativar a proteína JAK a qual fosforila os fatores de transcrição STAT1 e STAT3. A STAT fosforilada se dimeriza, migra para o núcleo e ativa transcrição gênica (figura 7) (Guschin *et al.*, 1995).

Entretanto, a IL-6 pode ativar uma outra via de sinalização que envolve a via das ERKs. Após a homodimerização da gp130, ocorre a ativação da Ras e, conseqüentemente, da ERK (figura 7) (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998).

O receptor de IL-6 pode também ser encontrado em uma forma solúvel. O receptor solúvel consiste na porção extracelular do receptor de membrana que pode ser gerado por dois mecanismos: proteólise do receptor de membrana ou *splicing* alternativo (revisto por Heinrich *et al.*, 2003). Dessa maneira, a IL-6 ao se ligar ao seu receptor solúvel pode estimular células que expressem apenas a gp130 (trans-sinalização) (Lust *et al.*, 1992).



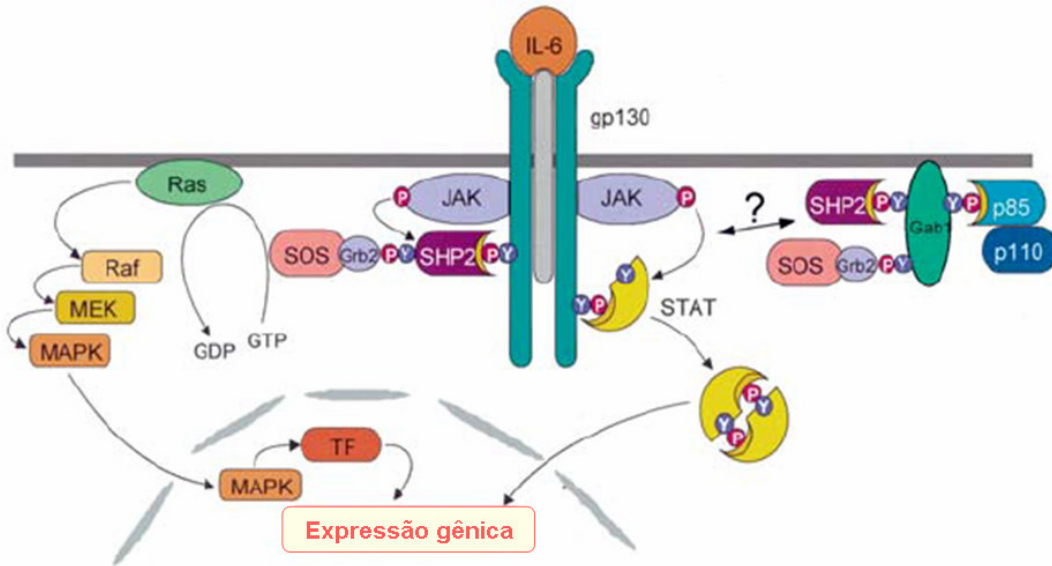


Figura 7: Vias de sinalização que são ativadas por IL-6 (modificado de Heinrich *et al.*, 2003 para revisão).

Entretanto, há evidências de que vias de sinalização adicionais podem ser ativadas pela IL-6 como a da p38 e a da Akt (Quintanilla *et al.*, 2004; Kunioku *et al.*, 2001).

A expressão de receptores de adenosina pode ser regulada por IL-6. Biber e colaboradores, em 2001, mostraram que a incubação de culturas de astrócitos ou slices de córtex de rato com IL-6, era capaz de aumentar o RNAm para receptor A1. Além disso, o tratamento das culturas com CPA, um agonista A1, gerou um aumento no acúmulo de IP3 (inositol trifosfato).

Resultados similares foram observados em slices de hipocampo de camundongos. O tratamento destas preparações com IL-6 aumenta a síntese de receptores A1 e potencializa o efeito de inibição da transmissão sináptica induzida pelo receptor (Biber *et al.*, 2008).

Culturas de neurônios corticais quando submetidos ao tratamento com glutamato apresentam uma extensa morte celular. Entretanto, o tratamento com IL-6 promove sobrevivência neuronal por um mecanismo dependente da ativação de receptores A1. Além disso, a incubação das culturas com a citocina aumenta o RNAm e a síntese de proteína para o receptor (Biber *et al.*, 2008).

Os receptores de adenosina também podem regular a síntese e liberação de IL-6. Em camundongos *knockout* para receptor A2a que foram submetidos à isquemia, foi observado um aumento da lesão na substância branca, ativação de microglia e um aumento na quantidade de astrócitos. Além disso, houve aumento na expressão de citocinas inflamatórias como TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e IL-6. Esses resultados indicam que o receptor A2a pode ter um papel neuroprotetor na isquemia por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Duan *et al.*, 2009). Em células MG-63 (linhagem de células osteoblásticas derivadas de osteosarcoma humano) a ativação de receptores A2a inibe a liberação de IL-6 induzida por LPS. Essa inibição se mostrou ser dependente de AMPc (Russell *et al.*, 2007).

Adenosina também estimula a liberação de IL-6 através da ativação de receptores A2a em células epiteliais. O bloqueio dos receptores P2 inibe este efeito da adenosina mostrando o envolvimento dos receptores de ATP neste processo. Além disso, a incubação com o adenosina leva a um aumento da

fosforilação da CREB dependente tanto de PKA quanto de PKC, e também da ativação de ERK nessas células (Sun *et al.*, 2008).

Os receptores A2b de adenosina também podem aumentar a liberação de IL-6. Este efeito foi observado em estriado de camundongo (Vazquez *et al.*, 2008). Além disso, a ativação de receptores A2b aumenta o RNAm e a síntese de IL-6 em culturas de astrocitoma humano (Fiebich *et al.*, 1996), e estimula a sua liberação em culturas de astrócitos (Schwaninger *et al.*, 1997).

Assim, esses resultados indicam que os efeitos na modulação da sobrevivência celular dependentes de IL-6 e que envolvem os receptores de adenosina são duais. A IL-6 pode ter um papel benéfico, gerando um efeito neuroprotetor, ou prejudicial, por induzir morte celular. Isto parece ser determinado pelo tipo de receptor de adenosina envolvido (Duan *et al.*, 2009; Biber *et al.*, 2008).

## 2) OBJETIVOS

Dados anteriores do laboratório mostraram que o “binding” para o receptor A1 em culturas mistas em monocamada era quase nulo. Entretanto, o tratamento crônico com DPMA, agonista de receptor A2a, foi capaz de aumentar o “binding” de [<sup>3</sup>H]DPCPX, um antagonista A1. Esse efeito é dependente de PKA e é mimetizado por análogos permeáveis de AMPc, como Sp-AMPc e 8 BrAMPc. O mesmo efeito foi observado após a incubação com adenosina deaminase ou inosina (Pereira *et al.*, Neurolatam, 2008).

A IL-6, uma citocina pró-inflamatória, também aumenta a expressão de receptores A1 e a sobrevivência de neurônios corticais da morte induzida por glutamato (Biber *et al.*, 2008; Biber *et al.*, 2001).

Assim, a partir destes resultados, os objetivos do nosso trabalho são:

- 1- Verificar se o tratamento com DPMA altera os níveis de RNAm e de proteína para receptor A1;
- 2- Estudar quais vias de sinalização estão envolvidas na regulação da expressão de receptores A1 induzido por pelo receptor A2a;
- 3- Verificar se o tratamento com inosina ou adenosina deaminase altera a expressão de receptores A1;
- 4- Investigar se o tratamento com IL-6 modula a expressão de receptores A1 e quais as vias de sinalização envolvidas;
- 5- Estudar a expressão e a localização celular do receptor A2a nos diferentes tipos de culturas de retinas de embriões de galinha.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1) Materiais

Ovos de galinha fertilizados da espécie White Leghorn foram obtidos de um aviário local. N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)-etil]adenosina (DPMA), hidrocloreto de 2-p-(carboxietil)fenetilamino-5'-N-etilcarboxiamoadenosina (CGS 21680), adenosina deaminase, gliotoxina, ácido salicílico 5-[4-(2-piridilsulfamoil)fenilazo] (sulfasalazina), pirrolidinacarboditioato de amônio (PDTC), L-Nitro-arginina (L-NAME), monoetanolato de 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(o-aminofenilmercapto)butadieno (U0126), anticorpo anti-actina, 3-propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2 fenil-4-propil-3-piridina carboxilato (MRS 1523), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), penicilina, streptomina, glutamina, albumina sérica bovina (BSA), Triton X-100 e dimetil sulfóxido (DMSO) foram obtidos da Sigma (Missouri, Estados Unidos). (4-(2-[7-amino-2-(2-furil) [1,2,4]-triazolo [2,3-a] [1,3,5] triazina-5-ilamino] etil) fenol) (ZM 241385) (Tocris Bioscience, Missouri, Estados Unidos) foi uma gentileza de Rodrigo A. Cunha (Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal). Anticorpos anti-A2a e anti-A1, e peptídeo controle anti-A1 foram obtidos de Chemicon International (Califórnia, Estados Unidos). Interleucina-6 (Peprotech, New Jersey, Estados Unidos), (E)-2-ciano-3-(3,4-dihidrofenoil)-N-(fenilmetil)-2-propenamida (AG490) e K252a (Biomol, Pensilvânia, Estados Unidos), foram gentilmente cedidos

pela professora Elizabeth Giestal de Araujo (Universidade Federal Fluminense, Niterói). [propil-<sup>3</sup>H]8-ciclopentil-1,3-dipropil-xantina ([<sup>3</sup>H]DPCPX), atividade específica de 130 Ci/mmol, anticorpo secundário anti-rabbit, glicina, SDS, Tris, acrilamida, metilenobisacrilamida, mercaptoetanol, hyperfilm, kit ECL, first-strand cDNA synthesis kit, DNase I, Taq DNA polimerase, PCR nucleotide mix, padrão de 100 pares de base e água tratada com DEPC foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, Inglaterra). OptiPhase HiSafe foi obtido da PerkinElmer (Boston, Estados Unidos). BME, MEM, tripsina e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da GIBCO (Nova York, Estados Unidos). PP1 foi obtido da Biomol (Pensilvânia, Estados Unidos). DAPI (Sigma) foi cedido pela professora Ana Lúcia M. Ventura (Universidade Federal Fluminense, Niterói). Anticorpo monoclonal 2M6 foi gentilmente cedido por B. Schlosshauer (NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Markwiesenstr. 55, D-72770 Reutlingen, Germany). Reagente de Trizol e primers específicos para receptor A1 e proteína L27 foram obtidos da Invitrogen Corporation (Califórnia, Estados Unidos). Anticorpos anti-ERK total, anti-p-ERK, anti-NFκB e anti-p-NFκB foram obtidos de Cell Signaling (Boston, Estados Unidos). Anticorpos secundários fluorescentes anti-mouse e anti-rabbit conjugados a Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 568 foram obtidos de Nanoprobes Incorporated (Nova York, Estados Unidos). Os outros reagentes utilizados eram de pureza analítica.

## 3.2) Métodos

### 3.2.1) Culturas complexas

Retinas de embriões de 8 dias foram dissecadas em CMF (salina sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e incubadas em 0,1% de tripsina a 37°C. Em seguida, a solução foi retirada e as retinas dissociadas em pipeta Pasteur com BME ou MEM contendo 3% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomicina e 2mM de glutamina. As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^6$  células por mL. As culturas foram incubadas a 37°C por 4 ou 6 dias (C4 – C6) em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado no dia seguinte ao preparo da cultura e depois a cada 48 horas.

### 3.2.2) Culturas purificadas de glia

Retinas de embriões de 11 dias foram submetidas a procedimento de cultivo semelhante ao das culturas mistas. Porém, a densidade empregada era de  $1,5 \times 10^6$  células por mL de MEM. A cada 3 dias o meio de cultivo era trocado e os experimentos eram realizados após 21 dias de cultura. As culturas apresentam uma pureza de aproximadamente 99%.

### 3.2.3) Culturas purificadas de neurônios

Antes do preparo das culturas, as placas foram pré-tratadas por 24 horas com poli-ornitina. As retinas de embriões de 8 dias foram dissecadas em CMF e transferidas para um tubo onde o tecido era incubado em tripsina 0,1% a 37°C. Em seguida, a tripsina era aspirada e o tecido lavado com MEM contendo 5% de soro. A dissociação das células era feita com pipeta Pasteur de ponta afilada com MEM contendo 5% de soro. Ao fim da dissociação adicionava-se MEM sem soro, e uma alíquota desta suspensão de células era recolhida e diluída 10 vezes, e, então, levada ao microscópio para contagem de células. Feito o cálculo de diluição, a suspensão de células era diluída adequadamente em MEM sem soro e plaqueada em placas com MEM contendo 10% de soro. Assim, a porcentagem final de soro na placa era de 5%. As culturas foram utilizadas para os experimentos em C4. As culturas apresentam uma pureza de 99,9%.

### 3.2.4) Explantes de retinas

Retinas de embriões de 8 dias foram dissecadas em CMF e transferidas para frascos de Erlenmeyer com BME contendo 3% SFB. Os explantes foram mantidos em agitação em incubador orbital a 80 rotações por minuto a 37°C



em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. A troca do meio foi feita no dia seguinte (C1) e os experimentos foram feitos em C3.

### 3.2.5) Tratamento com drogas

O tratamento crônico com drogas foi realizado em culturas mistas como demonstrado na tabela abaixo:

<b>Droga</b>	<b>Ação</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>
DPMA	Agonista A2a	C1	C2, C3 ou C6
CGS 21680	Agonista A2a	C1	C6
ZM 241385	Antagonista A2a	C1	C6
Anisomicina	Inibidor de síntese protéica	C1	C6
Sulfasalazina	Inibidor de NFkB	C1	C3 ou C6
Gliotoxina	Inibidor de NFkB	C1	C3 ou C6
PDTC	Inibidor de NFkB	C1	C3
PP1	Inibidor de Src	C1	C6
AG490	Inibidor de JAK2	C1	C3
L-NAME	Inibidor da NO sintase	C1	C6
K252a	Inibidor de receptor Trk	C1	C6
U0126	Inibidor da MEK	C1	C6
IL-6	interleucina pró-inflamatória	C1	C3
Inosina	Metabólito da deaminação da adenosina	C5	C6
MRS 1523	Antagonista A3	C5	C6
Adenosina deaminase	Enzima que metaboliza adenosina	C5	C6

Os antagonistas e inibidores foram adicionados 15 minutos antes da adição de DPMA, inosina ou IL-6.

### 3.2.6) “Binding” em célula viva

Foram feitas incubações no volume final de 250  $\mu$ L por poço de 16 mm de diâmetro a 37°C. No sexto dia de cultura, o meio foi retirado e cada poço lavado 2 vezes com Hanks'. Em seguida, todos os poços foram incubados com Hanks' + adenosina deaminase 1 U/mL por 10 minutos a 37°C. Em seguida, CHA, na concentração final de 100 $\mu$ M, foi adicionado a alguns poços para a determinação da ligação inespecífica por mais 10 minutos a 37°C. Logo após, foi adicionado [<sup>3</sup>H]DPCPX, na concentração final de 5 nM, em todos os poços e as células incubadas por 1 hora a 37°C. Ao final da incubação, a solução foi retirada, cada poço lavado com Hanks' e, em seguida, foi adicionado água Milli-Q para a lise das células. A placa foi congelada por 24 horas. Alíquotas do material lisado foram colocadas nos vials contendo o líquido de cintilação OptiPhase HiSafe e levados para contagem no cintilador. A proteína contida na placa foi dosada pelo método de Lowry *et al.*, 1951.

### 3.2.7) Dosagem de proteína pelo método de Bradford

As amostras de proteína foram recolhidas em tampão de amostra (SDS, glicerol, 2-mercaptoetanol, tris (0,5M, pH 6,8) e H<sub>2</sub>O e a dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford. Foram colocados em tubos de vidros 2 $\mu$ L das amostras acrescidos de foram acrescentados 3mL de

reagente de Bradford. Para realização da curva padrão foram adicionados nos tubos de vidro 0, 2, 4, 6 e 10 µg de BSA (albumina de soro bovino). Em seguida, foram adicionados 2µL do tampão de amostra (usado nos experimentos) e ainda 3mL de reagente de Bradford. Posteriormente, as misturas foram agitadas em vortex e a leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595nm (Bradford, 1976).

### 3.2.8) “Western Blotting”

No dia do experimento, o meio de cultura das placas foi removido e as células lavadas com solução salina, Hanks' por duas vezes. O tampão de amostra foi adicionado a cada placa. O material celular foi extraído, fervido por 5 minutos a 100°C e estocado a -20°C, a fim de solubilizar e desnaturar todas as proteínas celulares. Após a dosagem da proteína, foi aplicado no topo do gel de poliacrilamida-SDS a 10%, volume de amostra equivalente a 60µg de proteína. O procedimento para a eletroforese em gel de poliacrilamida foi baseado na técnica descrita por Laemmli *et al.*, 1970. O gel de separação foi preparado para um volume de 9 ml a uma concentração final de acrilamida de 10%. O gel de concentração foi preparado para um volume de 3 ml a uma concentração final de acrilamida de 4,5%. O tampão de corrida utilizado tinha em sua composição Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 g%). Durante a corrida a amperagem foi mantida constante em 30 mA por 2 horas.

O gel foi retirado da placa onde ocorreu a polimerização e em seguida foi posto em contato com uma membrana de PVDF para onde as proteínas eram transferidas. A transferência das proteínas para membranas PVDF foi baseada na técnica descrita por Towbin *et al.*, 1979. Imediatamente após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (2,91g de Tris-base, 1,47g de glicina, 1,88mL de SDS 10%, 100mL de metanol em um volume final de 500mL) junto com a membrana por 20 minutos (Hybond-P, Amersham), após esta ter sido hidratada por 10 minutos em metanol a 100%. Em seguida, o sistema de transferência ("Semi-Dry Transfer Unit" da BioRad) foi montado de acordo com as instruções do fabricante. Sobre a grade do aparelho foram colocados, nesta ordem: 1 folha de papel de filtro, membrana de PVDF, gel, 1 folha de papel de filtro. Durante a montagem, tinha-se o cuidado de remover todas as bolhas entre os componentes do sistema. A transferência foi realizada durante 20 minutos em voltagem constante de 15 V.

A membrana de PVDF foi incubada inicialmente em solução tampão TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação suave. Com este procedimento era prevenida a ligação de anticorpos a sítios não específicos na membrana de PVDF. Após este período, a membrana foi lavada uma vez por cinco minutos com tampão TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada "overnight" a 4°C com o anticorpo anti-A2a (anticorpo policlonal anti-rato feito em coelho) diluído na proporção de 1:2500 ou anticorpo anti-A1 (anticorpo policlonal anti-rato feito em coelho) diluído na proporção de 1:100. Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T contendo leite em pó desnatado (5%).

A membrana, previamente incubada com anticorpo primário, foi lavada em solução TBS-T três vezes por 10 minutos e então incubada com o anticorpo secundário anti-coelho diluído na proporção de 1:1000 (A2a) ou 1:500 (A1) em solução TBS-T, conjugados à peroxidase, contendo 5% de leite em pó desnatado, por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas eram lavadas da seguinte maneira: 2 lavagens com TBS-T por 10 minutos e por último uma lavagem com TBS 10 minutos.

A imunodeteção foi promovida pela reação quimioluminescente do sistema ECL para western blotting. Após a incubação da membrana com uma mistura de soluções de detecção por 4 minutos a temperatura ambiente, o excesso do reagente foi retirado e a membrana exposta imediatamente a filme Hiperfilm. Em seguida, o filme era revelado para obtenção de uma imagem autorradiográfica adequada.

Após a revelação as membranas foram lavadas em TBS. Em seguida, foram incubadas com glicina 0,2M, pH=2,2, por 30 minutos para a retirada dos anticorpos primário e secundário. Depois, elas foram lavadas em TBS e incubadas em solução tampão TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora à temperatura ambiente para bloquear as ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-actina na diluição de 1:2000 ou anti-ERK-T na diluição de 1:1000, "overnight". Depois, foram lavadas em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase na proporção de 1:2000 (anti-actina) ou 1:1000 (anti-ERK-T) por 1 hora. Logo após, foram lavadas, novamente, 2 vezes com TBS-T por 10 minutos e 1 vez em TBS por

10 minutos. Em seguida, as membranas eram incubadas com ECL e reveladas como descrito anteriormente.

### 3.2.9) RT-PCR

#### - Extração do RNA total

As células extraídas das placas com reagente de Trizol foram transferidas para tubo eppendorf e centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf novo e 1 mL de clorofórmio foi adicionado. Após agitação em vortex por 15 segundos, o tubo foi mantido à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida e 1 mL de isopropanol foi adicionado. O tubo foi mantido por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado com etanol 75%. Após a lavagem, etanol 100% foi adicionado e o RNA foi armazenado a -70°C.

#### - Tratamento dos RNAs precipitados com DNase I

O RNA foi centrifugado a 12000g por 5 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 25 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi aquecido a 55°C por 10 minutos. A absorbância da amostra foi medida

em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, a quantidade de RNA foi estimada e a amostra foi tratada com 0,5U DNase I/μg de RNA por 10 minutos a 37°C. Após o período de incubação, foi adicionado 100μL de fenol e a amostra foi centrifugada a 20000g por 10 minutos. À fase aquosa foi adicionado 100μL de clorofórmio e a amostra centrifugada a 20000g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida novamente e adicionados 1/10 de volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100%. A amostra foi incubada por 20 minutos em freezer – 70°C e centrifugada a 20000g por 20 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 20μL de água DEPC.

#### - Síntese da primeira fita de cDNA

O RNA foi diluído para 1μg / 20μL de água DEPC, incubado por 10 minutos a 65°C e armazenado em gelo. Em seguida a reação foi preparada adicionando-se ao RNA 11μL do “Bulk first-strand cDNA reaction mix”, 1μL de DTT 200mM e 0,2μg de oligonucleotídeos randômicos pd(N)<sup>6</sup> (First-Strand cDNA Synthesis Kit). A amostra foi incubada por 60 minutos a 37°C e guardada na geladeira.

#### - Seleção de oligonucleotídeos

A seleção de oligonucleotídeos para a reação de polimerase em cadeia é obtida através de programas de computação que os modelam levando em consideração a razão G/C e as homologias das seqüências. Os “primers” para

o receptor A1 apresentavam as seguintes seqüências: (seqüência GenBank número S78192) 5'-CTTCTTCGTCTGGGTCCTG-3' (posição de base 1032) e 5'-ATCTGCAGGAAGGCTGTCC-3' (posição de base 1367) tendo um produto de amplificação de 344 pares de base. Os "primers" para a proteína ribossomal L27 apresentavam as seguintes seqüências: (seqüência GenBank número X56852) 5'-AAGCCGGGAAGGTGGTG-3' (posição de base 42) e 5'-GGGTGGGCATCAGGTGGT-3' (posição de 276) tendo um produto de amplificação de 235 pares de base.

#### - Reação de polimerase em cadeia – PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando 5µL da reação de primeira fita de cDNA, 50pmol de cada nucleotídeo específico, 200µM de cada dNTP, 2,5U de Taq polimerase no tampão da enzima (100mM de Tris, 500mM KCl) e MgCl<sub>2</sub> 3mM em um volume final de 50µL. Após 4 minutos de desnaturação a 94°C, o PCR era feito em 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 1 minuto de polimerização a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão a 72°C.

#### - Eletroforese em gel de agarose

Foi dissolvida 0,5g de agarose em 50mL de tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA pH 8,0) a uma temperatura de 100°C. Em seguida, foram adicionados 2,5µL de brometo de etídio ao gel que foi montado na cuba. Após a polimerização do gel, as amostras foram aplicadas e a corrida



foi iniciada. O padrão de peso molecular utilizado é o 100pb “DNA ladder”. Após o término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e as amostras foram visualizadas em uv. A quantificação foi realizada após fotografar os géis de agarose com a câmera digital. A abundância de cada banda do gel foi determinada por densitometria e a análise realizada utilizando o Scion Image Software.

### 3.2.10) Imunocitoquímica

As culturas em lamínulas com 4, 6 ou 21 dias foram fixadas com 1% de paraformaldeído por 1 hora e depois armazenadas em tampão fosfato 0,16M. Após a visualização das culturas em microscópio, as células foram incubadas com a solução de bloqueio (3% de SFB (soro fetal bovino) + 3% de BSA em TBS/Triton 1 %) por 60 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário anti-A2a (1:500 ou 1:250), anti-A1 (1:100), anti-NFkB (1:50) ou anti-p-NFkB (1:50) e guardadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário fluorescente anti-coelho, Alexa 568 ou 488 (1:200) por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas e incubadas com anticorpo primário 2M6, marcador de proteínas de citoesqueleto de células da glia de Müller (Schlosshauer *et al.*, 1991), na diluição de 1:200, a 4°C *overnight* e protegido da luz. Depois, as lamínulas foram novamente lavadas e incubadas com o

anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo, Alexa 568 ou 488 (1:200) por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com DAPI, marcador de núcleo celular, na diluição de 1:1000, por 30 segundos seguidos de lavagem com PBS. Depois, as lâminas foram montadas e as células visualizadas em microscópio de fluorescência.

### 3.2.11) Ensaio de MTT

A morte celular era estimada através do ensaio colorimétrico de viabilidade celular (Mosmann, 1983). Neste método, o reagente MTT é reduzido para formazan púrpura pela enzima reductase apenas de mitocôndrias de células vivas. Após o tratamento das culturas mistas com gliotoxina ou sulfasalazina de C1 até C6, o MTT foi adicionado na concentração de 1,5 mg/mL por 4 horas. Em seguida, as culturas foram lavadas com Hank's a 37°C e a camada de células da placa contendo o formazan insolúvel foi dissolvida numa mistura de HCl 12N e álcool isopropílico na proporção de 6:1. Após isso, a absorbância do material foi determinada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 650nm.

### 3.2.12) Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls usando o software Graph Pad Prism. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) para  $n \geq 3$  ou como média  $\pm$  desvio da média para  $n = 2$ .

#### 4) RESULTADOS

4.1) A ativação crônica do receptor A2a induz aumento do “binding” do A1 de forma dependente de síntese protéica.

Resultados anteriores demonstraram que o tratamento crônico com DPMA, agonista A2a, é capaz de aumentar o “binding” para receptor A1, de forma dependente de AMPc e PKA, em culturas mistas (Pereira *et al.*, 2010). Para verificar se este efeito era específico, as culturas foram pré-tratadas com ZM 241385, antagonista A2a. O bloqueio do receptor com seu antagonista foi capaz de inibir completamente o aumento induzido por DPMA (figura 8).

A fim de investigar se o aumento do “binding” para o receptor A1 promovido por DPMA é dependente de síntese protéica, as culturas foram pré-tratadas com anisomicina, um inibidor de síntese de proteína. Observou-se que o tratamento inibiu o aumento de “binding” induzido pela ativação crônica de A2a (figura 9).

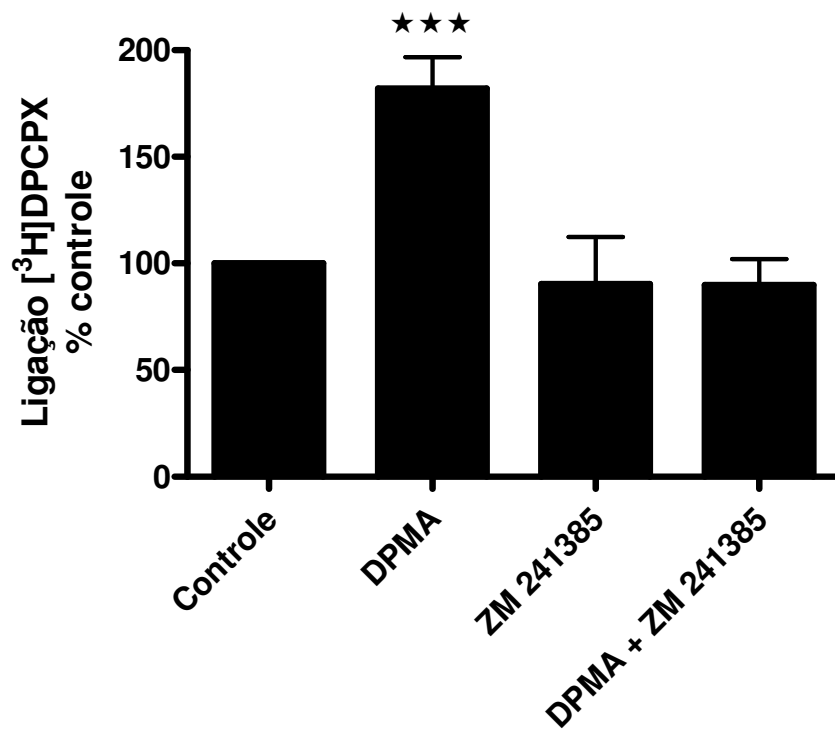


Figura 8: Ligação de [<sup>3</sup>H]DPCPX ao receptor A1 em culturas complexas em monocamada de embriões de 8 dias tratadas com DPMA (agonista A2a) e ZM 241385 (antagonista A2a). As culturas foram tratadas com 100nM de DPMA e/ou 100nM de ZM 241385 desde C1. Em C6 as células foram incubadas com 2nM de [<sup>3</sup>H]DPCPX (antagonista A1) na presença ou ausência de 100μM de CHA (agonista A1). Os resultados obtidos como fmoles/mg de proteína foram normalizados para 100% do controle ( $4.1 \pm 1.4$  fmoles/mg de proteína) e representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

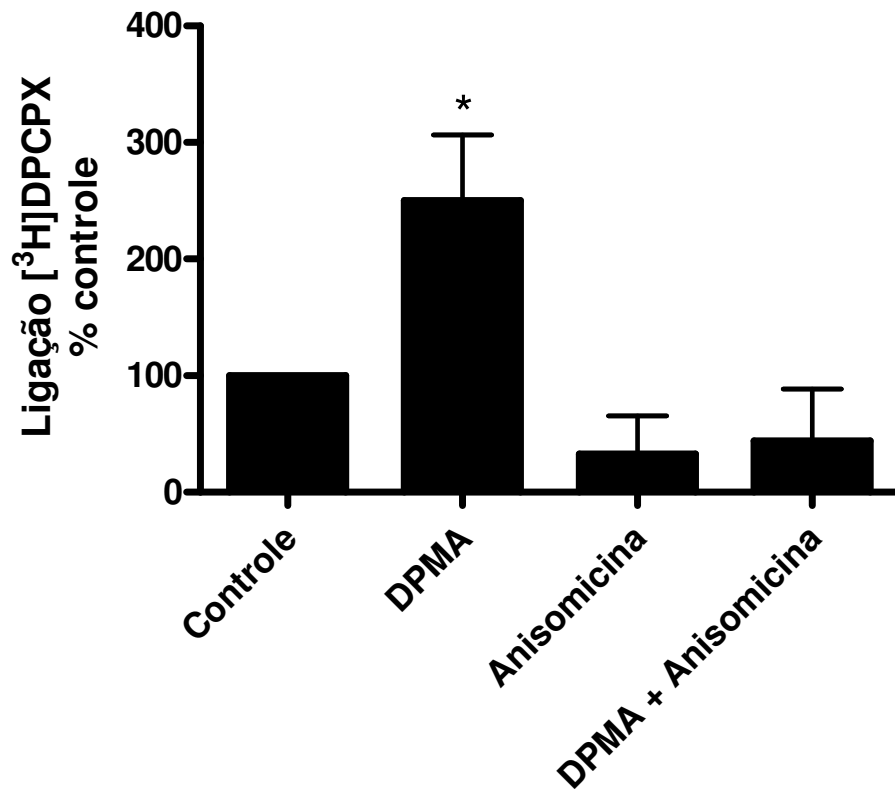


Figura 9: Ligação de [<sup>3</sup>H]DPCPX (antagonista A1) ao receptor A1 em culturas complexas em monocamada de embriões de 8 dias tratadas com DPMA e anisomicina (inibidor de síntese protéica). As culturas foram tratadas com 100nM de DPMA (agonista A2a) e/ou 100nM de anisomicina desde C1. Em C6 as células foram incubadas com 5nM de [<sup>3</sup>H]DPCPX na presença ou ausência de 100µM de CHA (agonista A1). Os resultados obtidos como fmoles/mg de proteína foram normalizados para 100% do controle (13.1 ± 8.1 fmoles/mg de proteína) e representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (\* p < 0.05).

#### 4.2) Aumento da expressão dos receptores A1 pela ativação de receptores A2a

Como o aumento de “binding” de [<sup>3</sup>H]DPCPX é dependente de síntese protéica, o tratamento com DPMA poderia estar estimulando a síntese de novos receptores A1 e, conseqüentemente, aumentando a sua expressão. Para verificar esta hipótese, foram feitos experimentos de “Western Blotting” utilizando anticorpos específicos contra o receptor A1. Foram encontradas 2 bandas marcadas pelo anticorpo tanto em culturas mistas (C6) quanto em retinas intactas de embriões de 14 dias (E14) que foram bloqueadas utilizando o peptídeo controle anti-A1 (figura 10). Para isso, o peptídeo (1:10) foi incubado com o anticorpo primário (1:100) por 24 horas a temperatura ambiente. A banda inferior próxima de 42KDa foi a utilizada para as análises seguintes, pois está de acordo com o peso molecular do receptor A1 que é encontrado na literatura.

Os resultados mostraram que DPMA promove um aumento da expressão de A1 em C6, o qual é iniciado a partir de C3 (figura 11). Além disso, CGS21680, outro agonista de receptor A2a, também foi usado e apresentou resultados semelhantes aos encontrados com DPMA (figura 12).

Para verificar se a ativação constante do receptor A2a é necessária para promover o aumento da expressão de A1, as culturas foram tratadas de C1 até C3 com DPMA. No terceiro dia de cultura o meio foi retirado, adicionou-se meio fresco sem o agonista A2a e as culturas foram mantidas até C6. Observou-se que neste caso não há aumento da expressão de A1. Isto demonstra uma dependência de ativação de receptores A2a para que o receptor A1 se mantenha expresso (figura 13).

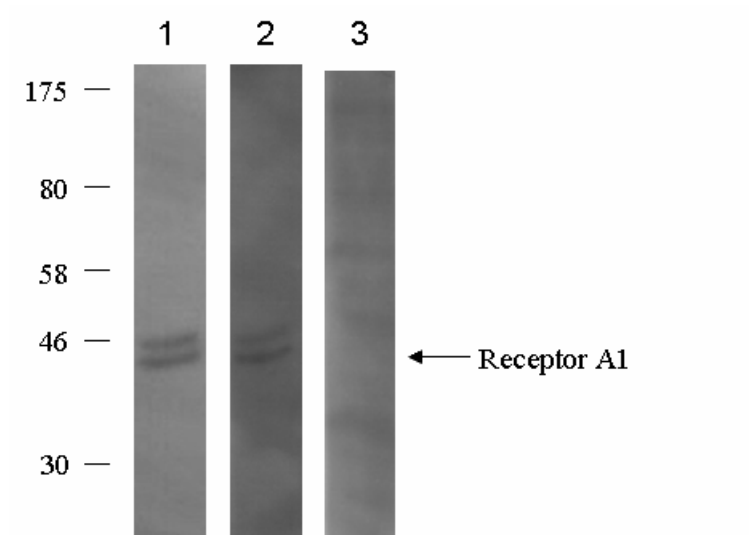


Figura 10: Imunoblots mostrando a presença de receptor A1 em E14 (1), culturas mistas de 6 dias (2) e culturas mistas de 6 dias incubadas com peptídeo controle anti-A1 (3).



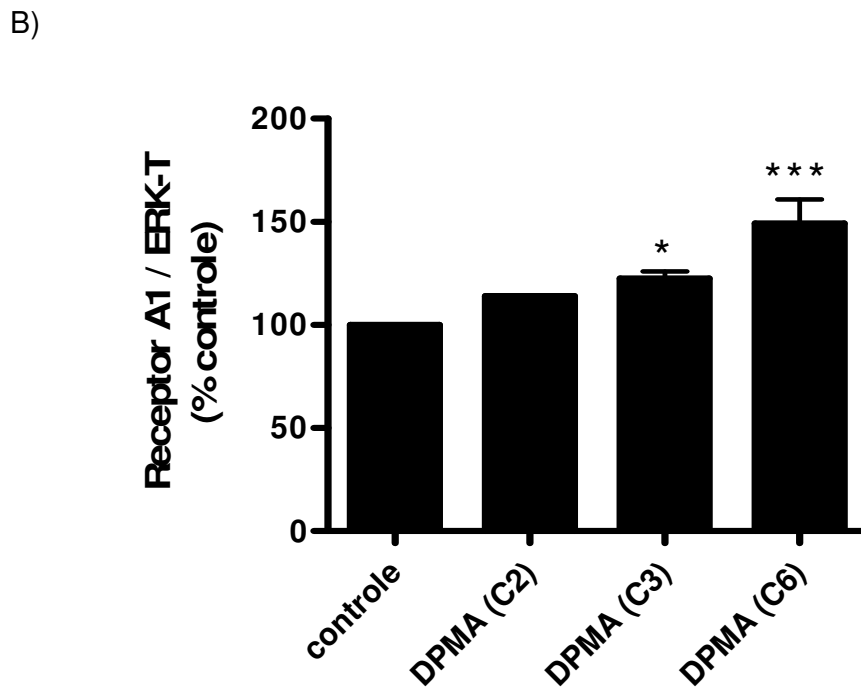
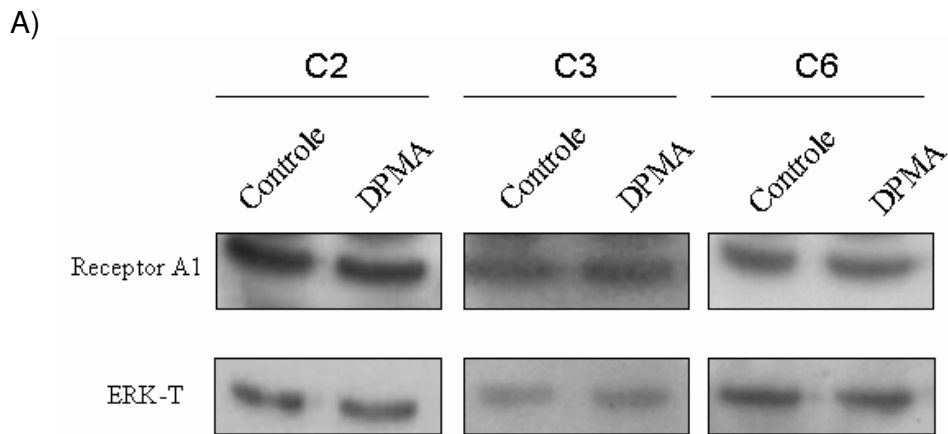
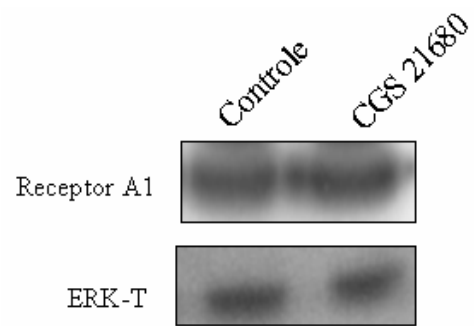


Figura 11: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (100nM) de C1 até C2 (C2), C1 até C3 (C3) ou C1 até C6 (C6). B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ ).

A)



B)

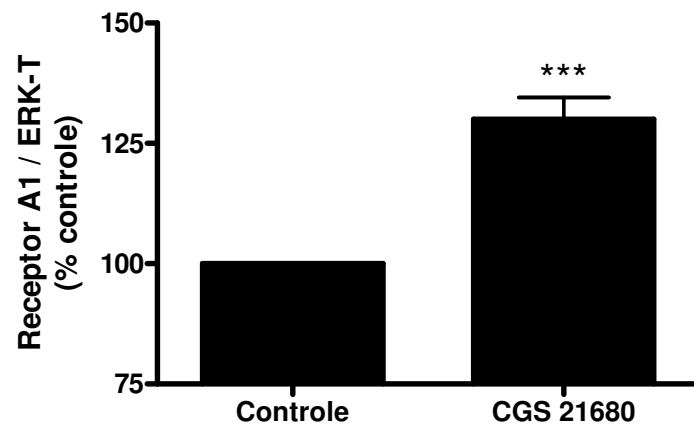
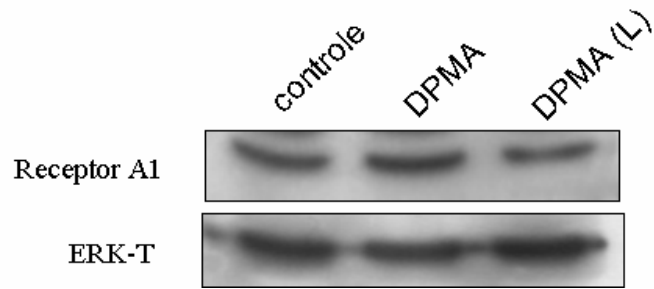


Figura 12: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com CGS21680 (agonista A2a) 100nM de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos 3 experimentos independentes (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

A)



B)

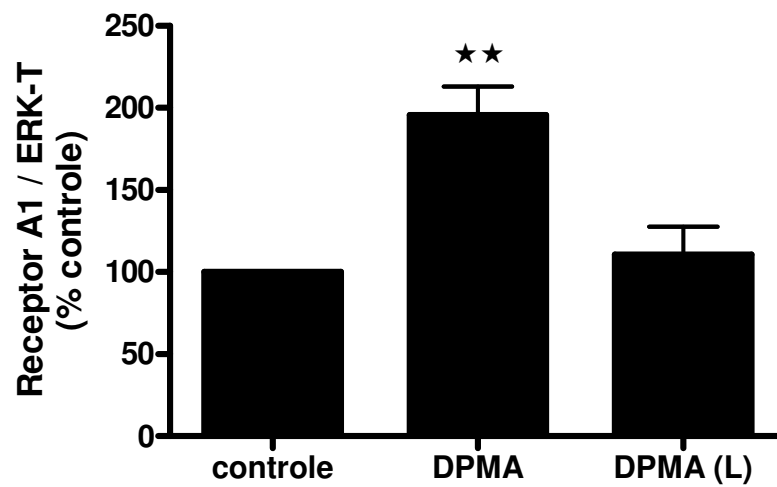


Figura 13: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM de C1 até C6 ou tratadas com DPMA 100nM de C1 até C3, lavadas e mantidas até C6 (DPMA L). B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos 3 experimentos independentes ( $p < 0.01$ ).

4.3) O tratamento crônico com DPMA aumenta os níveis de RNAm para receptor A1

Para verificar se o aumento da quantidade de proteína para receptor A1 é acompanhado por um aumento de RNAm para A1, as culturas mistas foram utilizadas para experimentos de RT-PCR. Foi observado que a ativação crônica do receptor A2a induz a um aumento dos níveis de RNAm para o receptor A1. Como controle positivo do experimento utilizou-se primers para L27, uma proteína ribossomal (figura 14)

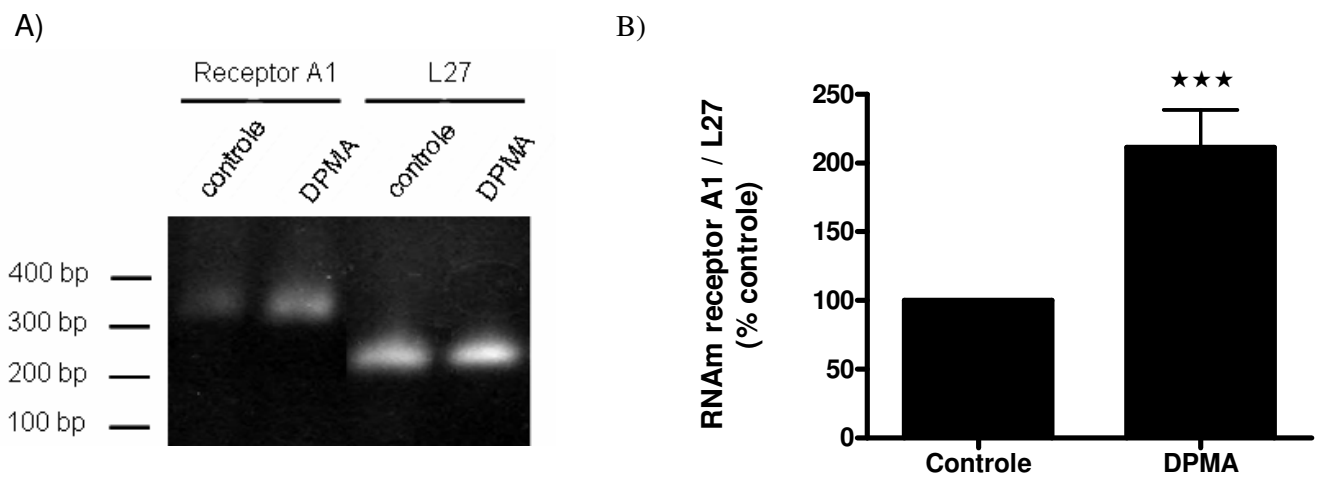


Figura 14: A) RT-PCR em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonistas A2a) 100nM de C1 até C6. As bandas de RNAm para receptor A1 correspondem a 344 pares de base e as bandas de RNAm para L27 correspondem a 235 pares de base. B) Quantificação dos RNAm para receptor A1 utilizando o RNAm para L27 como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 5 experimentos independentes (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

4.4) Os receptores A1 são expressos apenas nos neurônios nas culturas mistas

Experimentos de imunocitoquímica foram feitos para se determinar a localização celular do receptor A1 nas culturas mistas e se a estimulação dos receptores A2a poderia produzir alguma diferença na distribuição celular destes receptores. Para isso, utilizou-se o anticorpo 2M6, um marcador específico de células da glia de Müller. Nas culturas controle foi observado que os neurônios expressam receptores A1 enquanto que a glia não apresentou marcação significativa. Além disso, o tratamento com DPMA promoveu um aumento da intensidade de marcação e uma translocação de receptores para a membrana plasmática apenas nos neurônios (figura 15). Assim, a estimulação crônica dos receptores A2a induz um aumento da expressão dos receptores A1 e sua translocação para a membrana plasmática em neurônios retinianos.

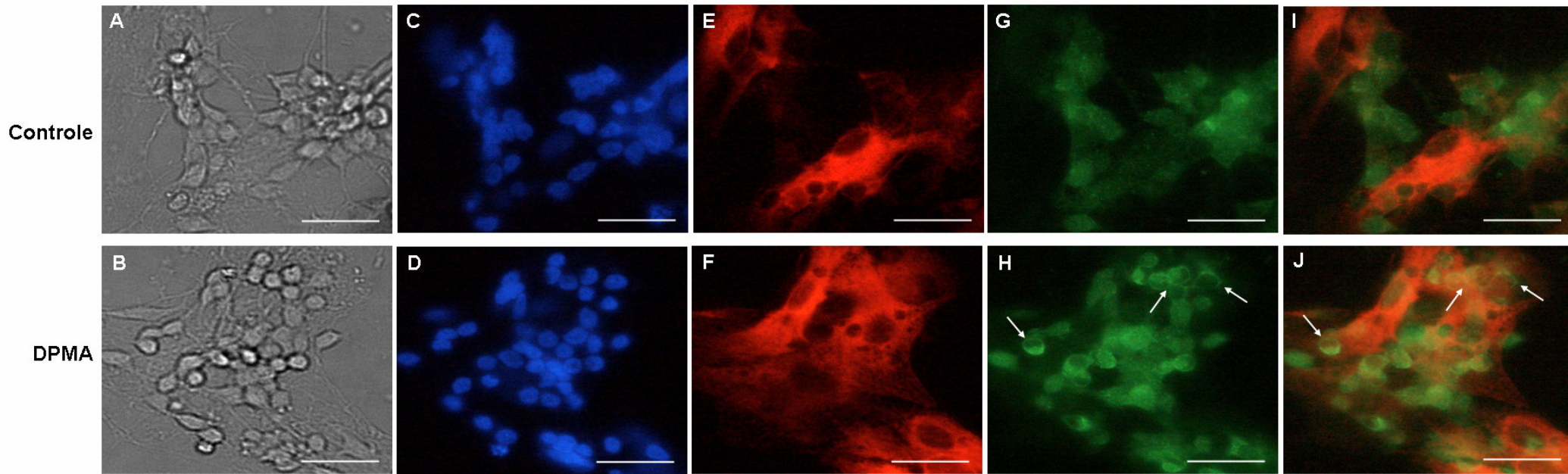


Figura 15: Imunocitoquímica para receptores A1 em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM de C1 até C6. A-B) Fotomicrografia de contraste Nomarsky. C-D) Núcleos celulares marcados com DAPI. E-F) Glia de Müller marcada com anti-2M6 (vermelho). G-H) Receptores A1 (verde). I-J) Sobreposição da marcação para 2M6 e receptores A1. As setas demonstram a presença de receptores A1 na membrana plasmática de neurônios em culturas tratadas com DPMA. Os experimentos foram repetidos 3 vezes com resultados similares. A barra representa 10 $\mu$ m.

4.5) O aumento da expressão de receptores A1 pela ativação crônica de receptores A2a também ocorre em experimento “ex vivo”

Para investigar se a regulação da expressão de receptores A1 pela ativação de receptores A2a também ocorre em preparações “ex vivo”, foram feitos experimentos com explantes de retinas de embriões de galinha de 8 dias. Neste caso, o tratamento com DPMA também aumentou os níveis de receptor A1 demonstrando que esta regulação também pode ocorrer nas retinas durante o desenvolvimento (figura 16).

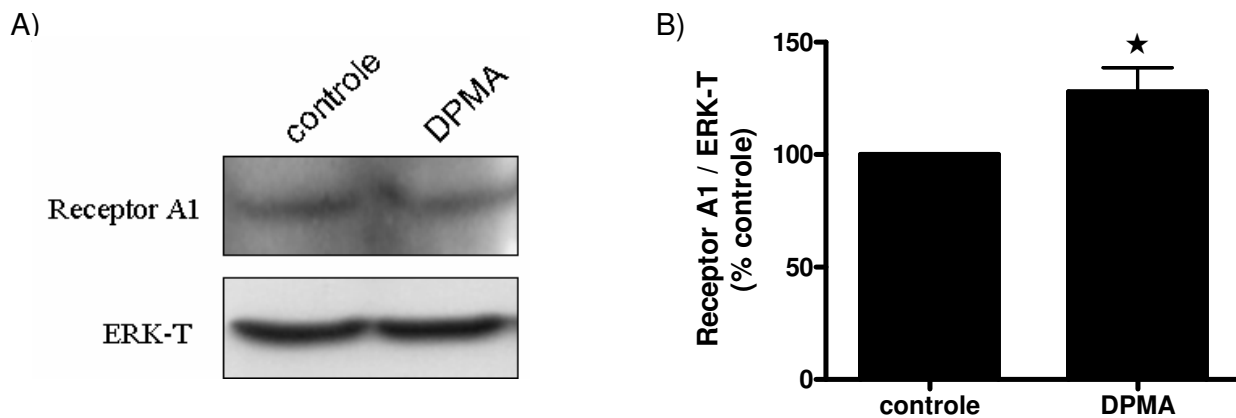


Figura 16: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em explantes de retina de embriões de 8 dias tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM de C1 até C3. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

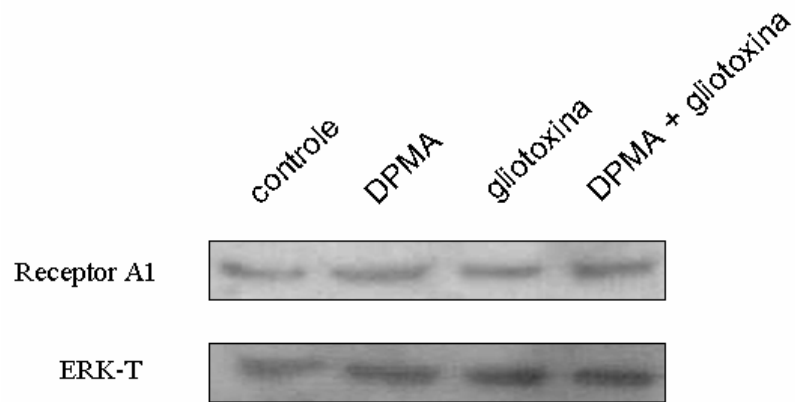
4.6) O aumento da expressão de receptores A1 induzido por ativação de receptores A2a é dependente do fator de transcrição NFkB

Os receptores A1 podem ter a sua expressão induzida pelo fator de transcrição NFkB (revisto por St Hilaire *et al.*, 2009; Jhaveri *et al.*, 2006; Prabhakar e Kumar, 2004; Ramkumar *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 1998). Assim, o aumento da expressão dos receptores A1, induzido pela ativação crônica do receptor A2a, poderia ser dependente de NFkB. Para verificar essa possibilidade, as culturas foram pré-tratadas com gliotoxina ou sulfasalazina, dois inibidores deste fator de transcrição. Este tratamento bloqueou completamente o efeito do DPMA (figuras 17 e 18). Para determinar se o efeito das drogas ocorre por inibição do NFkB e não por provocar morte celular, foram feitos ensaios de MTT onde se avaliou o número de células viáveis. Na figura 19 pode-se observar que os inibidores utilizados não alteraram significativamente a viabilidade celular.

Para investigar em que tipo celular o NFkB estaria sendo ativado, foram feitos experimentos de imunocitoquímica para este fator de transcrição e para sua forma fosforilada em culturas tratadas ou não com DPMA 100nM em C1 por 1 hora. Tanto nas culturas controle quanto nas tratadas com o agonista A2a, observou-se marcações para NFkB e p-NFkB nos neurônios, as quais são mais intensas no citoplasma dessas células nas situações controle. Entretanto, não foram encontradas marcações significativas nas células gliais (figuras 20 e 21). Já o tratamento com DPMA induziu uma diminuição da marcação tanto para NFkB quanto para p-NFkB no citoplasma dos neurônios (figuras 20 e 21). Além disso, a estimulação dos receptores A2a aumentou a marcação de p-NFkB nos núcleos neuronais (figura 21)



A)



B)

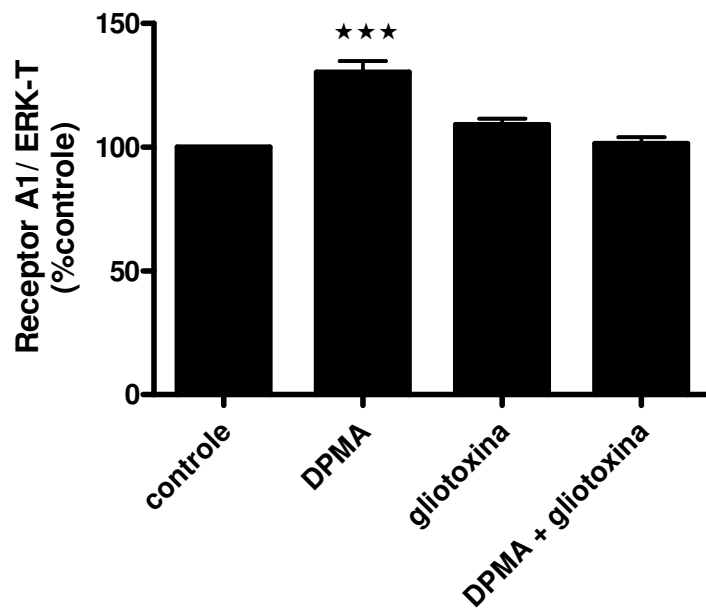
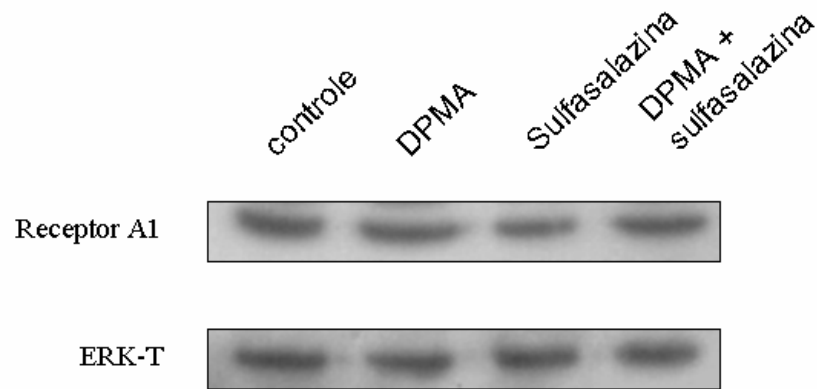


Figura 17: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou gliotoxina (5 ng/mL), inibidor de NFkB, de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

A)



B)

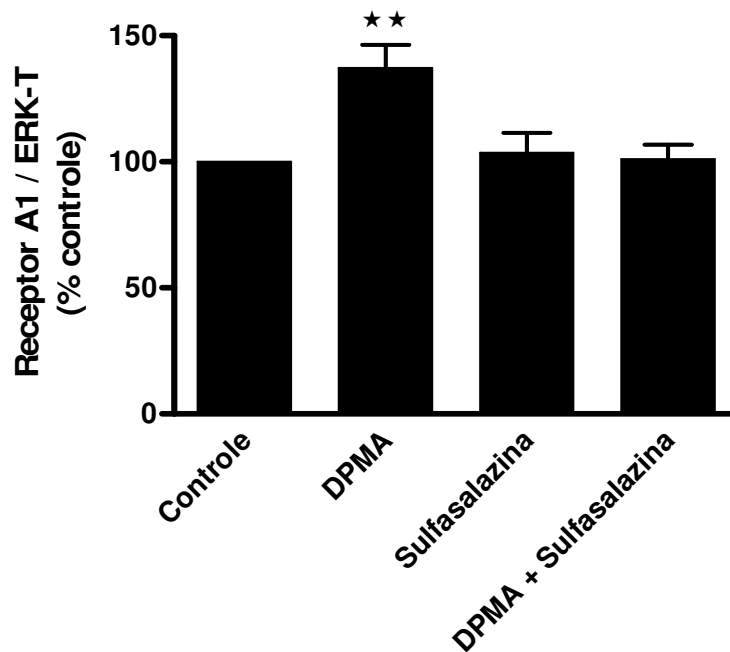


Figura 18: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou sulfasalazina (100µM), inibidor de NFκB, de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes (\*\* p < 0.01).

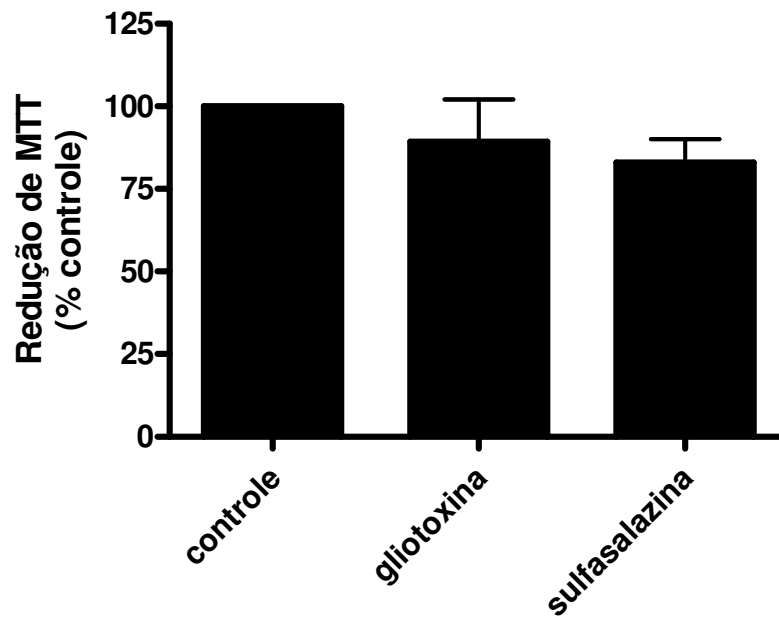


Figura 19: Número de células viáveis após o tratamento com gliotoxina (5 ng/mL) ou sulfasalazina (100 $\mu$ M), inibidores de NF $\kappa$ B, de C1 até C6. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes ( $p > 0.05$ ).

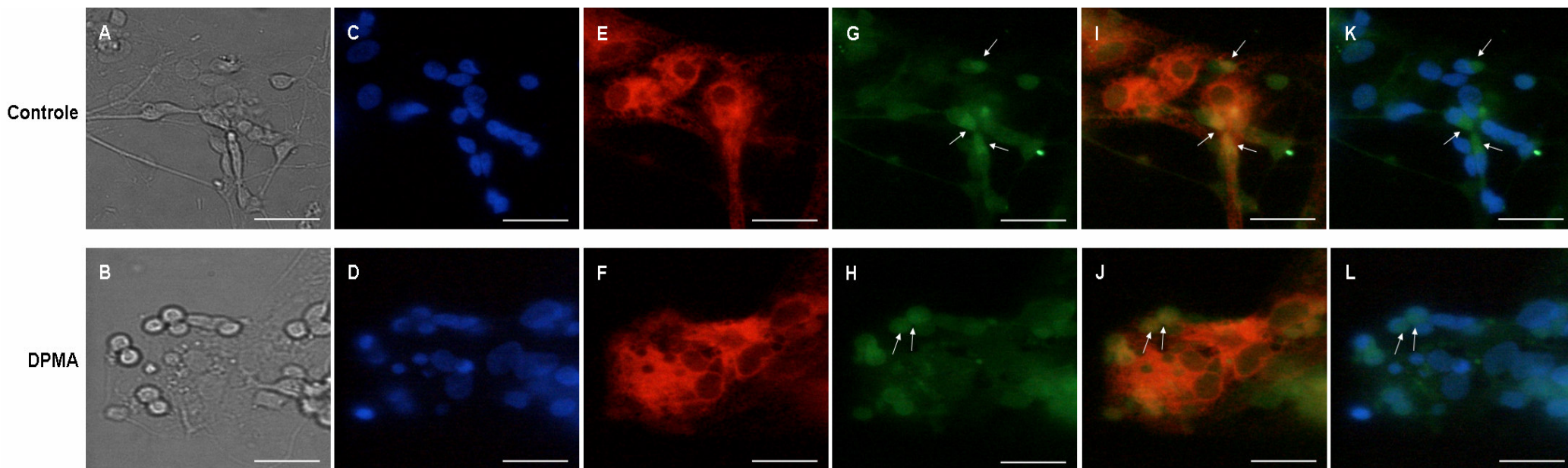


Figura 20: Imunocitoquímica para NFκB em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM em C1 por 1 hora. A-B) Fotomicrografia de contraste Nomarsky. C-D) Núcleos celulares marcados com DAPI. E-F) Glia de Müller marcada com anti-2M6 (vermelho). G-H) NFκB (verde). I-J) Sobreposição da marcação para 2M6 e NFκB. K-L) Sobreposição da marcação para DAPI e NFκB. As setas demonstram a presença de NFκB no citoplasma de neurônios que diminui nas culturas tratadas com DPMA. Os experimentos foram repetidos 3 vezes com resultados similares. A barra representa 10μm.

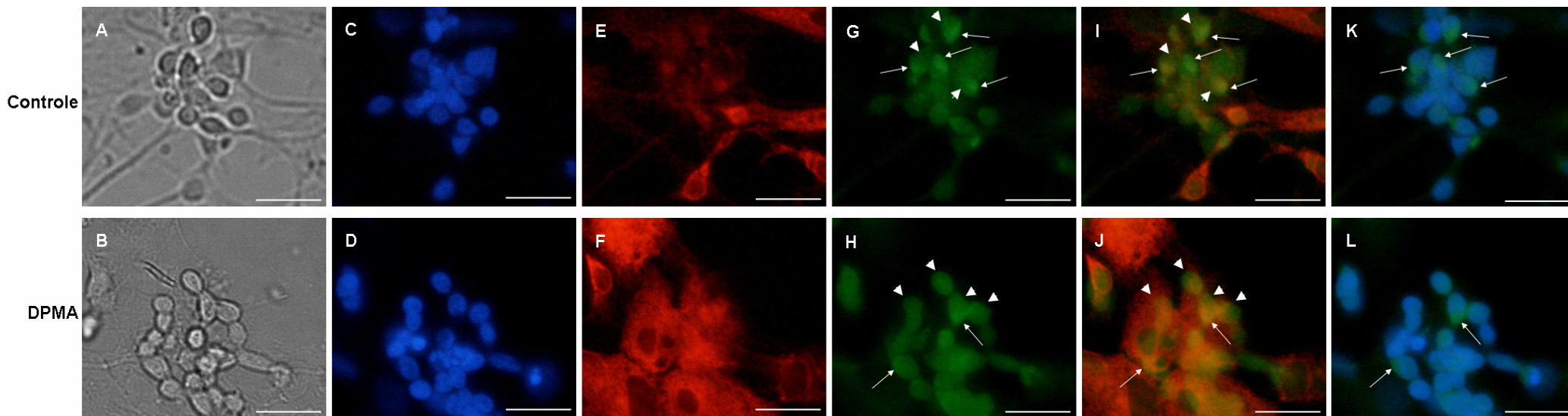


Figura 21: Imunocitoquímica para p-NFkB em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM em C1 por 1 hora. A-B) Fotomicrografia de contraste Nomarsky. C-D) Núcleos celulares marcados com DAPI. E-F) Glia de Müller marcada com anti-2M6 (vermelho). G-H) p-NFkB (verde). I-J) Sobreposição da marcação para 2M6 e p-NFkB. K-L) Sobreposição da marcação para DAPI e p-NFkB. As setas demonstram a presença de p-NFkB na citoplasma de neurônios que diminui nas culturas tratadas com DPMA. As cabeças de seta demonstram a presença de p-NFkB nos núcleos que aumenta nas culturas tratadas com DPMA. Os experimentos foram repetidos 3 vezes com resultados similares. A barra representa 10 $\mu$ m.

4.7) Os receptores A2a aumentam a expressão do receptor A1 através da inibição da ERK e ativação de Src

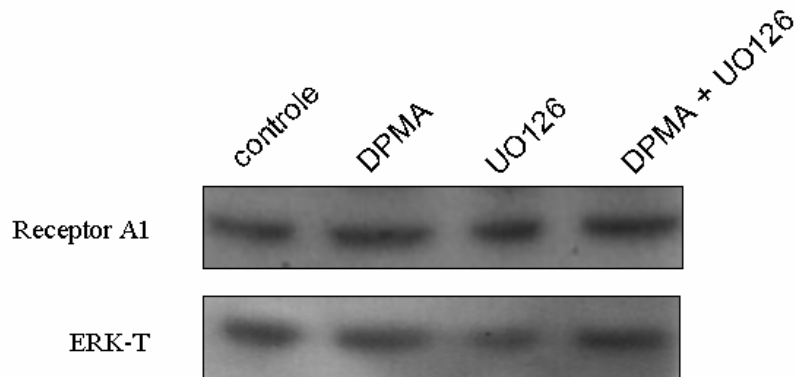
Resultados anteriores mostraram que o aumento de “binding” para receptor A1 é dependente de PKA (Pereira *et al.*, 2010). Assim, investigamos que outras proteínas participariam desta via de sinalização. A ativação de receptores de adenosina pode levar à estimulação da via das ERKs (revisado por Schulte e Fredholm, 2003). Além disso, a ativação de receptores A1 aumenta a p-ERK em culturas purificadas de glia de retinas de embriões de galinha (Rodrigues *et al.*, NeuroReport, 2008). Dessa maneira, fomos verificar se as ERKs estariam envolvidas no aumento da expressão de receptores A1 através da incubação das culturas com U0126, inibidor da MEK. O simples bloqueio da ERK foi capaz de aumentar a expressão do receptor A1, mas não teve nenhum efeito significativo sobre o estímulo por DPMA (figura 22). Estes resultados indicam que a ativação da ERK estaria envolvida na inibição da expressão do receptor A1 nas culturas mistas. Entretanto, a ativação do receptor A2a poderia estar inibindo a ERK, o que permitiria que os receptores A1 tivessem a sua expressão aumentada. Para determinar se os receptores A2a modulam a atividade da ERK, foram feitos experimentos para detectar os níveis de p-ERK nas culturas tratadas ou não com DPMA. A ativação dos receptores A2a de C1 até C6 promoveu uma diminuição dos níveis de p-ERK. Entretanto, o tratamento com DPMA de C1 até C3, seguido de troca do meio para um livre de DPMA de C3 até C6 manteve a p-ERK no mesmo nível do controle (figura 23). Assim, a ativação constante dos receptores A2a é

necessária para manter os níveis de p-ERK baixos. Uma hipótese é que estes níveis baixos de p-ERK levam a um aumento de receptores A1.

A ativação de receptores A2a também pode levar a uma transativação de receptores tirosina kinase, ou seja, ativação destes receptores na ausência de fatores tróficos (Lee e Chao, 2001). Para determinar se estes receptores tirosina kinase estão envolvidos na modulação da expressão de receptores A1, culturas mistas foram tratadas com K252a, inibidor de receptores tirosina kinase. Observou-se que o tratamento com o inibidor promoveu aumento da expressão de receptores A1 e não bloqueou o efeito do DPMA (figura 24). Assim, os receptores tirosina kinase parecem modular negativamente a expressão dos receptores A1.

A ativação de receptores metabotrópicos pode levar à ativação da PKA que, via tirosina kinase Src, promove inibição da ERK (revisado por Stork e Schmitt, 2002). Para investigar se a modulação da expressão de receptores A1 por ativação de receptores A2a ocorre por este mecanismo, as culturas foram tratadas com PP1, um inibidor de Src. Observou-se que o pré-tratamento com este inibidor bloqueou completamente o efeito do DPMA (figura 25).

A)



B)

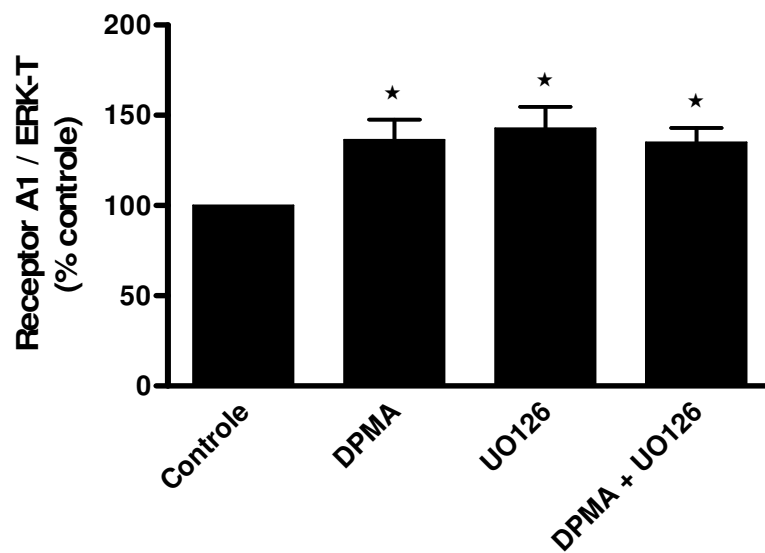
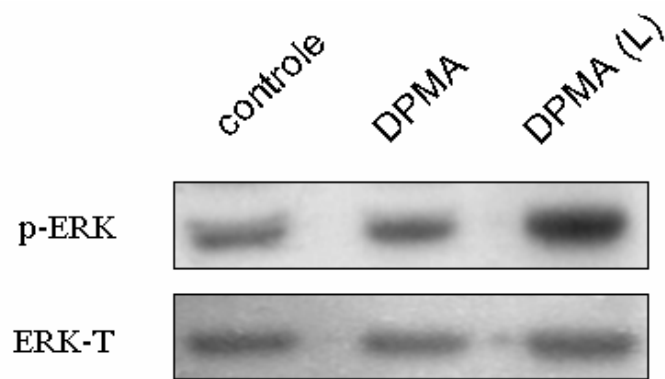


Figura 22: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou UO126 (10 $\mu$ M), inibidor da MEK, de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\* p < 0.05).



A)



B)

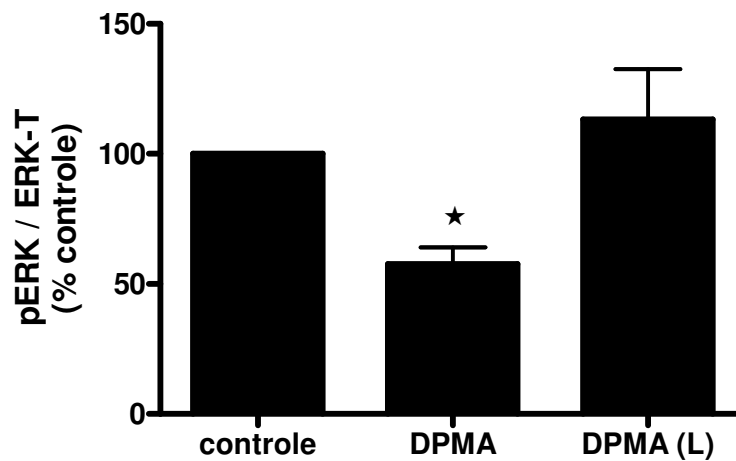
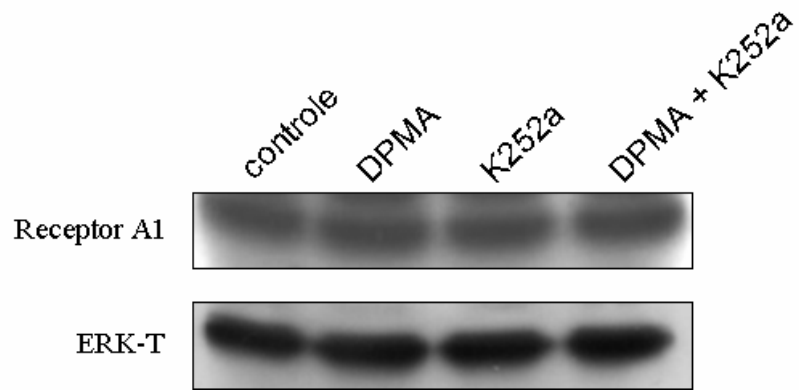


Figura 23: A) Imunoblots para p-ERK e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA 100nM de C1 até C6 ou tratadas com DPMA (agonista A2a) 100nM de C1 até C3, lavadas e mantidas até C6 (DPMA L). B) Quantificação de p-ERK utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

A)



B)

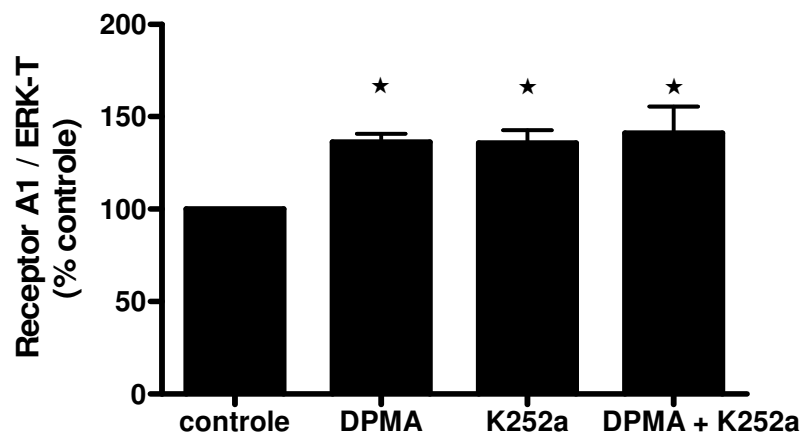
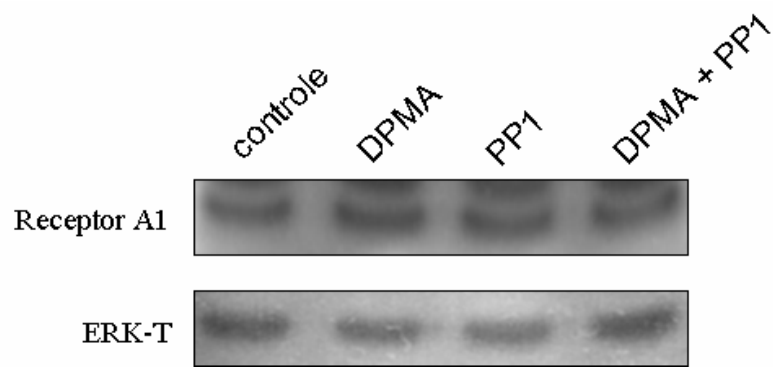


Figura 24: A) Imunoblots para receptor A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou K252a (50nM), inibidor de receptores tirosina kinase de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

A)



B)

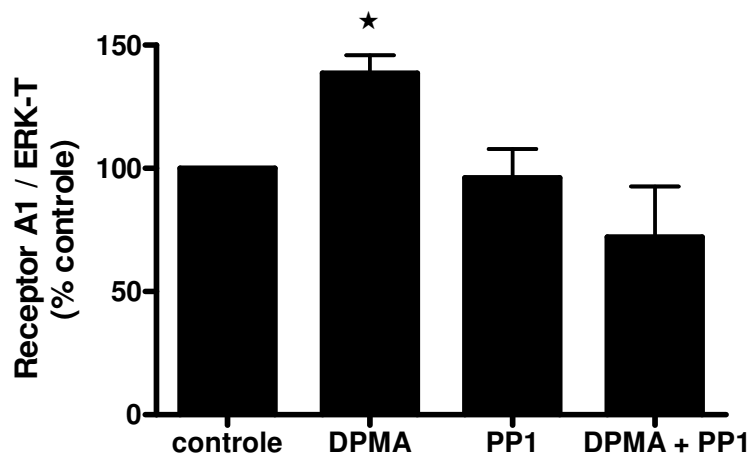


Figura 25: A) Immunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou PP1 (inibidor da Src) 5 $\mu$ M. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

4.8) O aumento da expressão de receptores A1 por ativação dos receptores A2a é dependente de óxido nítrico (NO)

A ativação de receptores A2a pode levar à síntese e liberação de óxido nítrico (NO) (Ray e Marshal, 2006; Lee *et al*, 2005; Saura *et al.*, 2005). Além disso, NO pode regular a expressão de receptores A1 (Jhaveri *et al.*, 2006). Para verificar se o efeito do DPMA é dependente de NO, as culturas mistas foram pré-tratadas com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase. Como observado na figura 26, L-NAME foi capaz de bloquear completamente o aumento da expressão de receptores A1.

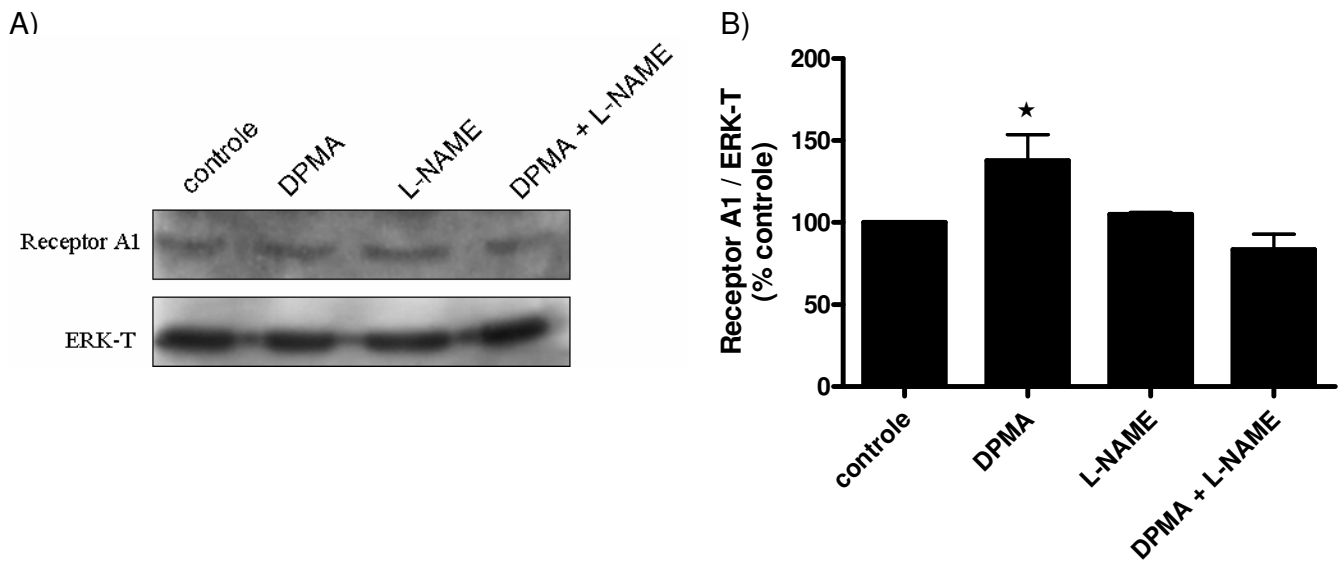


Figura 26: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM e/ou L-NAME (inibidor da NO sintase) 100 $\mu$ M. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4.9) O tratamento crônico com DPMA promove diminuição da expressão de receptores A2a

Como o tratamento com DPMA é feito por um longo período, os receptores A2a poderiam estar sendo dessensibilizados. Assim, experimentos foram feitos para avaliar se a expressão de receptores A2a é diminuída após a estimulação crônica com DPMA. Observou-se uma diminuição dos níveis proteicos de A2a (figura 27). Assim, o tratamento com DPMA promove aumento da expressão de receptores A1 e diminuição da expressão de receptores A2a.

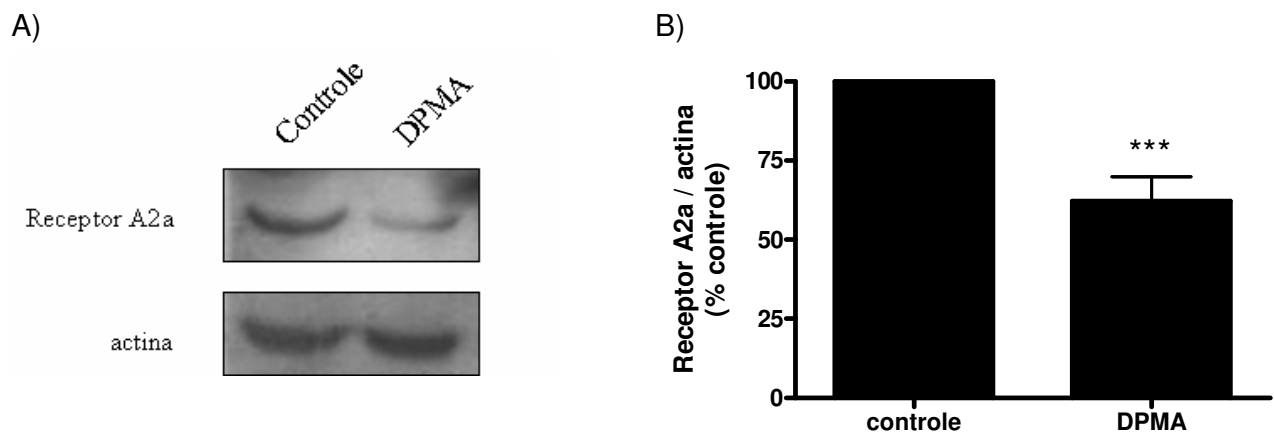
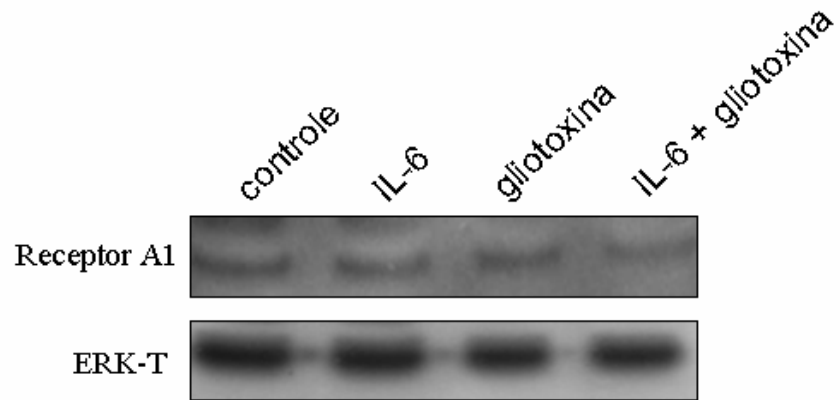


Figura 27: A) Imunoblots para receptores A2a e actina em culturas mistas tratadas ou não com DPMA (agonista A2a) 100nM de C1 até C6. B) Quantificação de receptores A2a utilizando actina como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

#### 4.10) Interleucina-6 aumenta a expressão de receptores A1 em culturas mistas através da ativação de NFkB

Já foi mostrado que a IL-6 é capaz de aumentar a expressão de receptores A1 (Biber *et al.*, 2008; Biber *et al.*, 2001). Para verificar se nas culturas mistas os receptores A1 poderiam ser modulados de forma semelhante, as células foram tratadas com IL-6 de C1 até C3. Os resultados obtidos demonstram que os receptores A1 têm a sua expressão aumentada por IL-6 e este efeito é bloqueado pelos inibidores de NFkB gliotoxina, sulfasalazina e PDTC (figuras 28, 29 e 30). Além disso, o aumento induzido por IL-6 é bloqueado pelo inibidor da JAK2, AG490, indicando que esta proteína está envolvida nesta via de sinalização (figura 31).

A)



B)

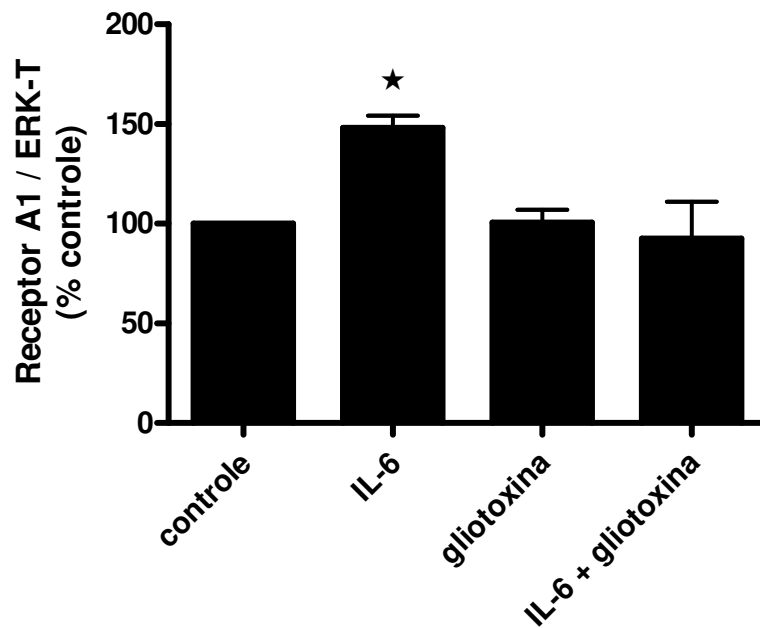
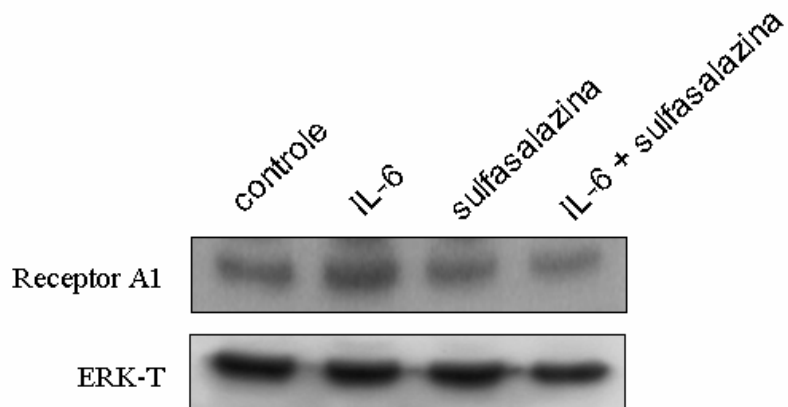


Figura 28: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com IL-6 50ng/mL e/ou gliotoxina (inibidor do NFkB) 5ng/mL de C1 até C3. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

A)



B)

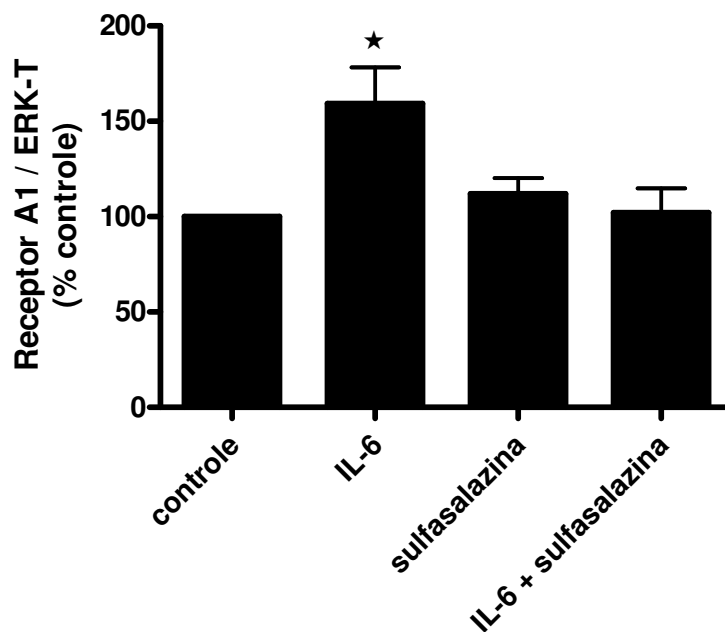
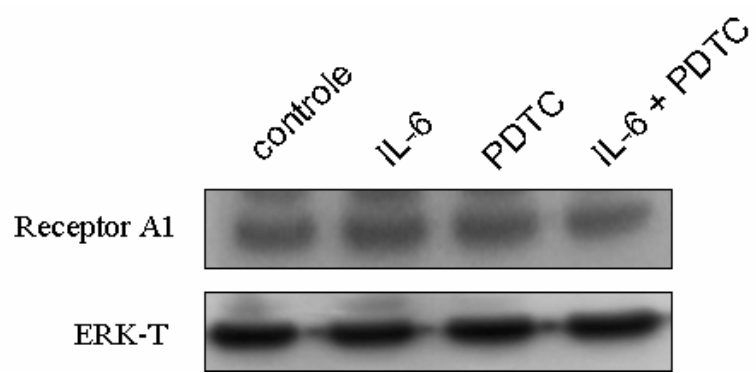


Figura 29: A) Immunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com IL-6 50ng/mL e/ou sulfasalazina (inibidor de NFkB) 100µM de C1 até C3. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média ± EPM de 3 experimentos independentes (\* p < 0.05).



A)



B)

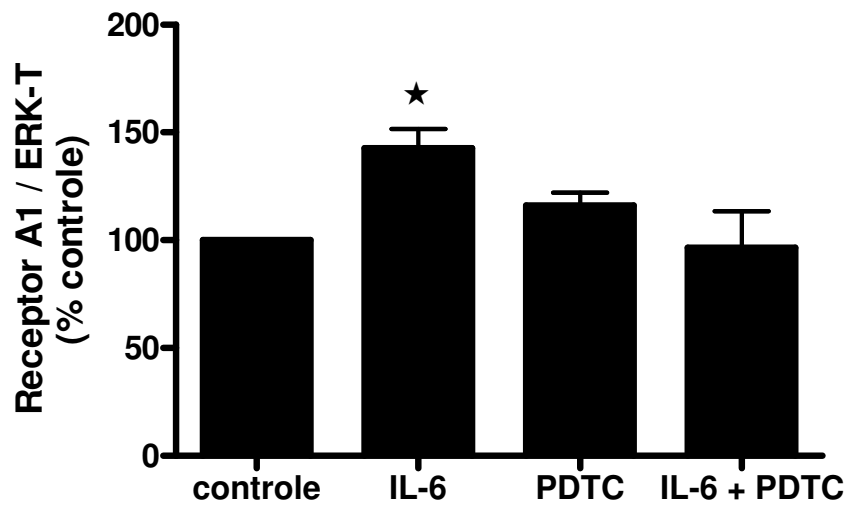
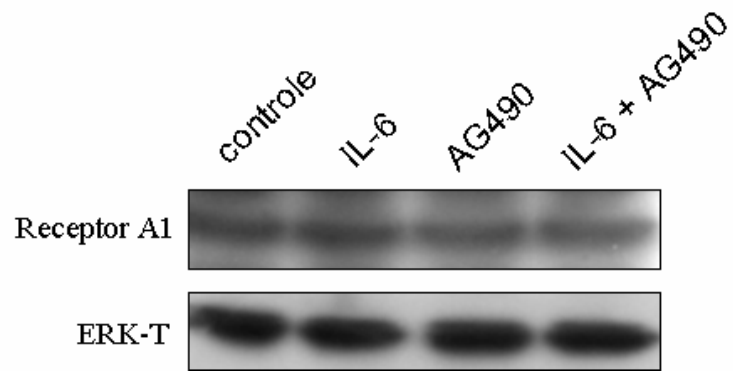


Figura 30: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com IL-6 50ng/mL e/ou PDTC (inibidor de NFkB) 100nM de C1 até C3. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0.05$ ).

A)



B)

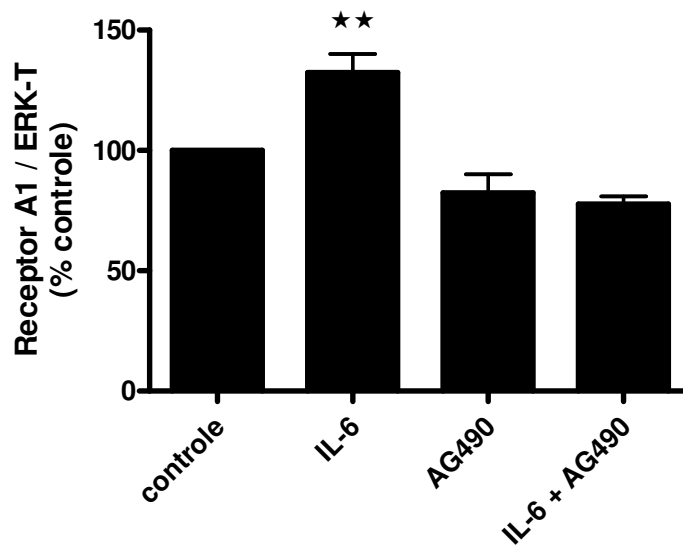


Figura 31: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com IL-6 50ng/mL e/ou AG490 (inibidor da JAK2) 10 $\mu$ M de C1 até C3. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.11) O aumento do “binding” para receptor A1 induzido por inosina é bloqueado por antagonista de receptores A3 de adenosina

Resultados anteriores demonstraram que inosina e adenosina deaminase (ADA) são capazes de aumentar o binding de [<sup>3</sup>H]DPCPX em culturas mistas de embriões de galinha (Pereira, 2005, tese de Mestrado). Vários trabalhos têm mostrado que inosina pode atuar como um agonista para receptores A3 de adenosina ativando-o (Tilley *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 1997). Assim, utilizamos o antagonista de receptores A3 de adenosina, MRS1523, para verificar a possibilidade de que o efeito da inosina era mediado por receptores A3. Como podemos verificar na figura 32, o efeito da inosina foi completamente bloqueado por este antagonista.

Para investigar se inosina poderia também aumentar a expressão de receptores A1, foram feitos experimentos de “Western Blotting”. Foi observado que o tratamento com inosina não alterou o nível de receptores A1. O antagonista MRS1523 também não produziu qualquer efeito (figura 33). O mesmo resultado foi obtido com ADA que não alterou o nível protéico do receptor (figura 34).

Apesar da inosina não alterar os níveis protéicos de A1, o tratamento promoveu uma diminuição marcante na quantidade de RNAm para o receptor (figura 35). Assim, a inosina bloqueia a transcrição de receptores A1.

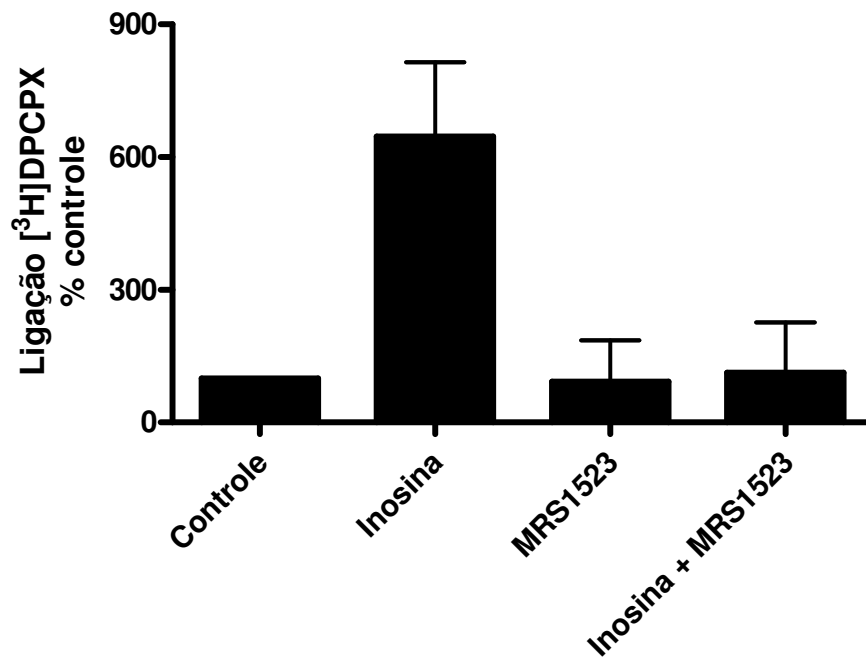
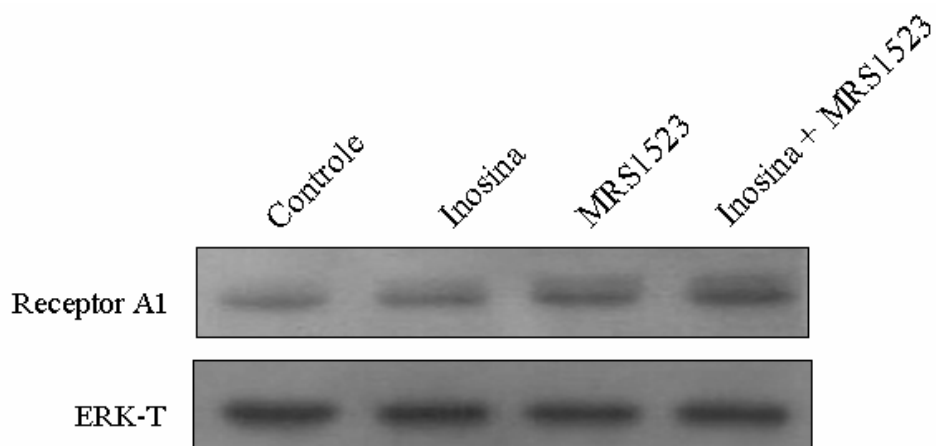


Figura 32: Ligação de [<sup>3</sup>H]DPCPX (antagonista A1) ao receptor A1 em culturas complexas em monocamada de embriões de 8 dias tratadas com inosina e MRS1523. As culturas foram tratadas com 10 $\mu$ M de inosina e/ou 100nM de MRS1523 (antagonista A3) a partir de C5. Em C6 as células foram incubadas com 5nM de [<sup>3</sup>H]DPCPX na presença ou ausência de 100 $\mu$ M de CHA (agonista A1). Os resultados obtidos como fmoles/mg de proteína foram normalizados para 100% do controle (5.8  $\pm$  4.1 fmoles/mg de proteína) e representam a média  $\pm$  desvio da média de 2 experimentos independentes realizados em triplicatas.

A)



B)

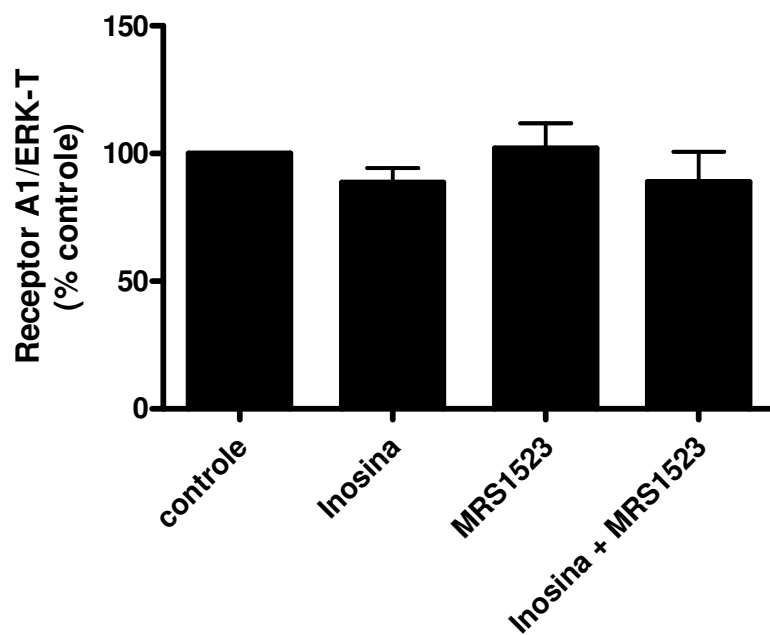
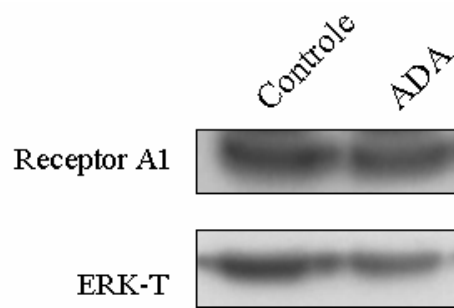


Figura 33: A) Immunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com inosina 10 $\mu$ M e/ou MRS1523 100nM (antagonista A3) de C5 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 4 experimentos independentes ( $p > 0.05$ ).

A)



B)

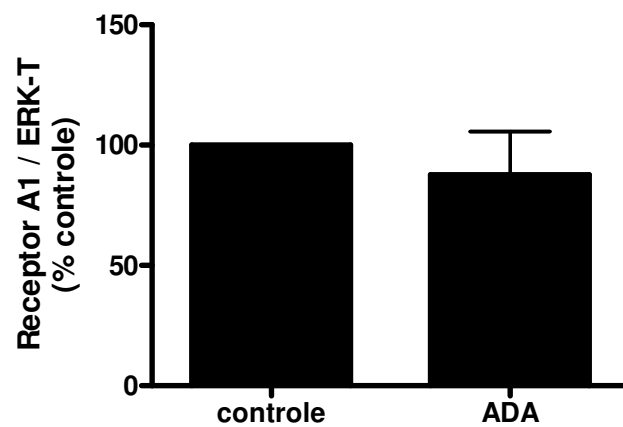
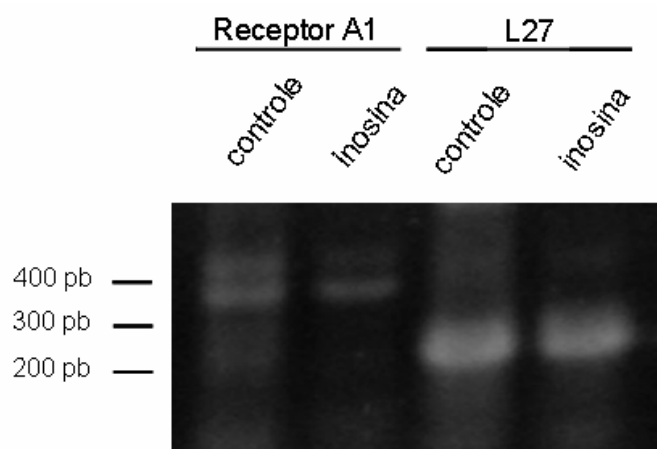


Figura 34: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas tratadas ou não com adenosina deaminase (ADA) 0,1 U/mL de C5 até C6. B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes ( $p > 0.05$ ).

A)



B)

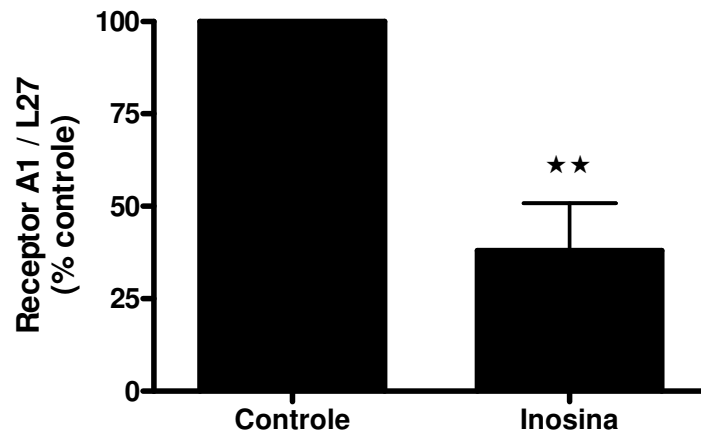


Figura 35: RT-PCR em culturas mistas tratadas ou não com inosina 10 $\mu$ M de C5 até C6. As bandas de RNAm para receptor A1 correspondem a 344 pares de base e as bandas de RNAm para L27 correspondem a 235 pares de base. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes ( $p < 0.01$ ).

#### 4.12) As culturas purificadas de glia expressam receptores A1

Resultados do laboratório mostram que a ativação de receptores A1 em culturas purificadas de glia promove a fosforilação de ERK de forma dependente de PKC e Src (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008). Assim, estes resultados indicam que estas culturas expressam receptores A1 e que estes são funcionais. Então, comparamos a expressão de A1 nas culturas purificadas de glia com a das culturas mistas.

Ao contrário das culturas mistas, as culturas purificadas de glia apresentam “binding” para receptor A1 (figura 36). Além disso, o nível de expressão da proteína também é maior neste tipo de cultura (figura 37).

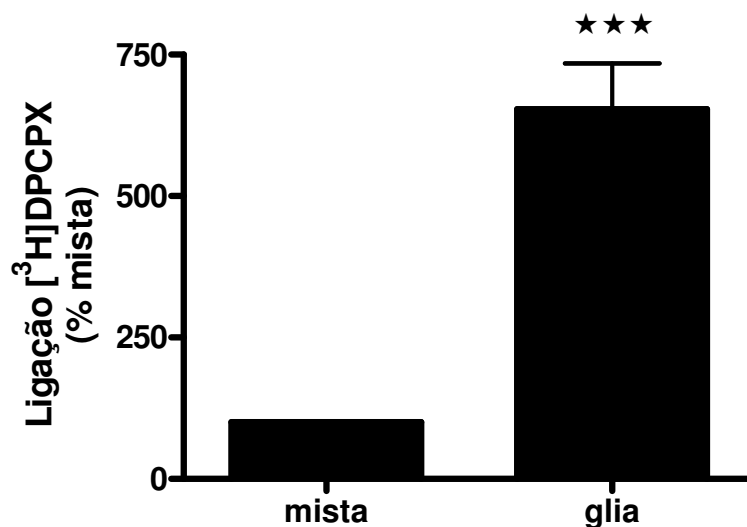
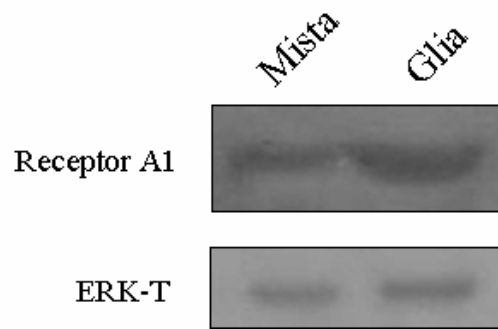


Figura 36: Ligação de [<sup>3</sup>H]DPCPX (antagonista A1) ao receptor A1 em culturas mistas em monocamada de embriões de 8 dias ou purificadas de glia de embriões de 11 dias. Em C6 (culturas mistas) ou C21 (purificadas de glia) as células foram incubadas com 5nM de [<sup>3</sup>H]DPCPX na presença ou ausência de 100μM de CHA (agonista A1). Os resultados obtidos como fmoles/mg de proteína foram normalizados para 100% da mista (7,8 ± 4,2 fmoles/mg de proteína) e representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (\*\*\*) p < 0.001).



A)



B)

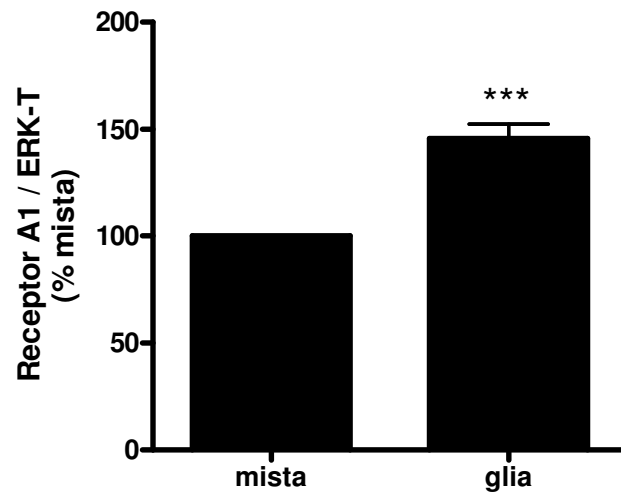


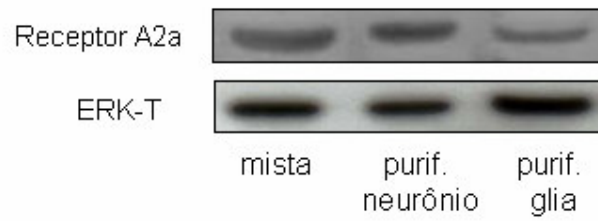
Figura 37: A) Imunoblots para receptores A1 e ERK-T em culturas mistas (C6) ou purificadas de glia (C21). B) Quantificação de receptores A1 utilizando ERK-T como controle. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

#### 4.13) Caracterização da expressão e da localização celular dos receptores A2a nas culturas de retinas de embriões de galinha

Resultados anteriores indicam a presença de receptores A2a de adenosina nas retinas intactas e nas culturas (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2003; Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001; Paes-de-Carvalho e de Mello, 1982). Então, nós estudamos o nível de expressão da proteína nas diferentes culturas. Na figura 38 pode-se observar que as culturas mistas, purificadas de neurônio e de glia apresentam o mesmo nível de expressão de receptores A2a.

Para determinar os tipos celulares que expressam o receptor A2a nas culturas foram feitos experimentos de imunocitoquímica. Nas culturas mistas o receptor está presente tanto nos neurônios quanto nas células gliais (figura 39). As culturas purificadas de neurônio também expressam o receptor A2a (figura 40), estando presente tanto no corpo celular quanto nos neuritos, além de estar presente nos fotorreceptores (figura 40 C e F). Entretanto, nem todos os neurônios expressam este receptor (figura 40 I). Já nas culturas purificadas de glia, o receptor apresenta uma extensa marcação (figura 41).

A)



B)

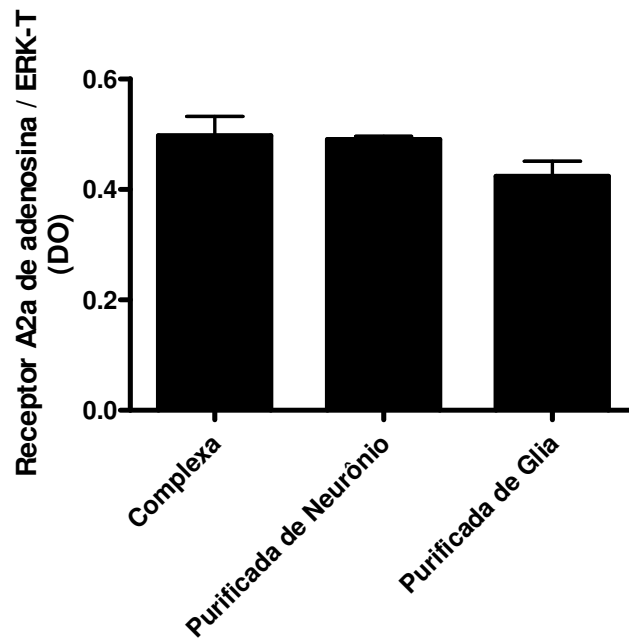


Figura 38: A) Imunoblotting para receptor A2a em culturas de retinas de embrião de galinha. A figura representa o resultado de 1 experimento separado de 3 que apresentam o mesmo resultado. B) Quantificação do imunoblotting para o receptor A2a em razão da ERK total. Os resultados apresentam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes ( $p > 0.05$ ).

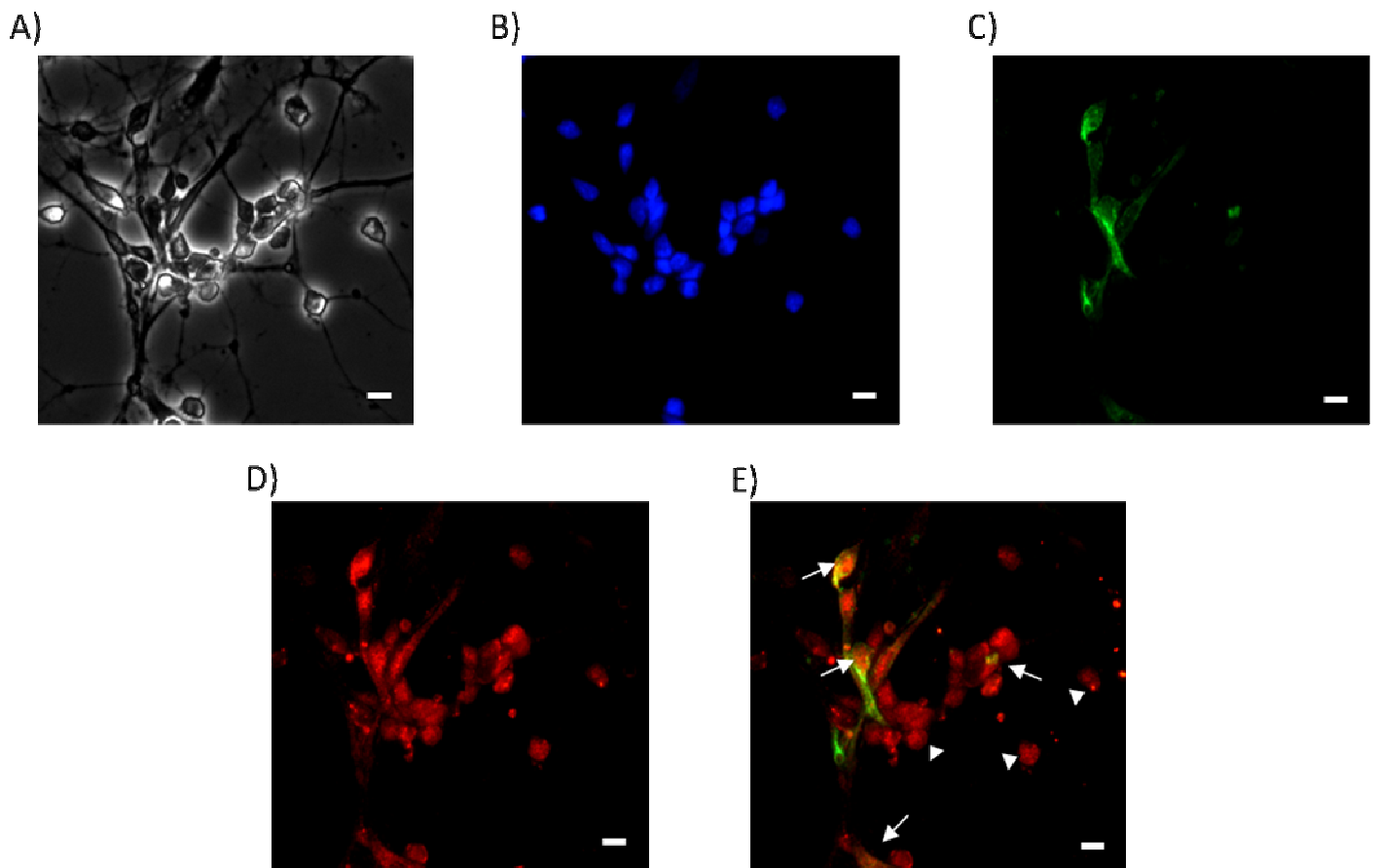


Figura 39: Imunocitoquímica para o receptor A2a. A) Culturas mistas de retinas de embriões de 8 dias, C4 (contraste de fase). B) Marcação com DAPI para os núcleos celulares. C) Marcação em verde para células gliais com anticorpo primário 2M6. D) Marcação em vermelho para receptor A2a de adenosina. E) Colocalização entre receptor A2a de adenosina (D) e células de glia (C). As setas brancas indicam a colocalização entre o receptor e a glia. As cabeças de setas brancas indicam neurônios que contém o receptor A2a. A barra de calibração corresponde a 10 $\mu$ m.

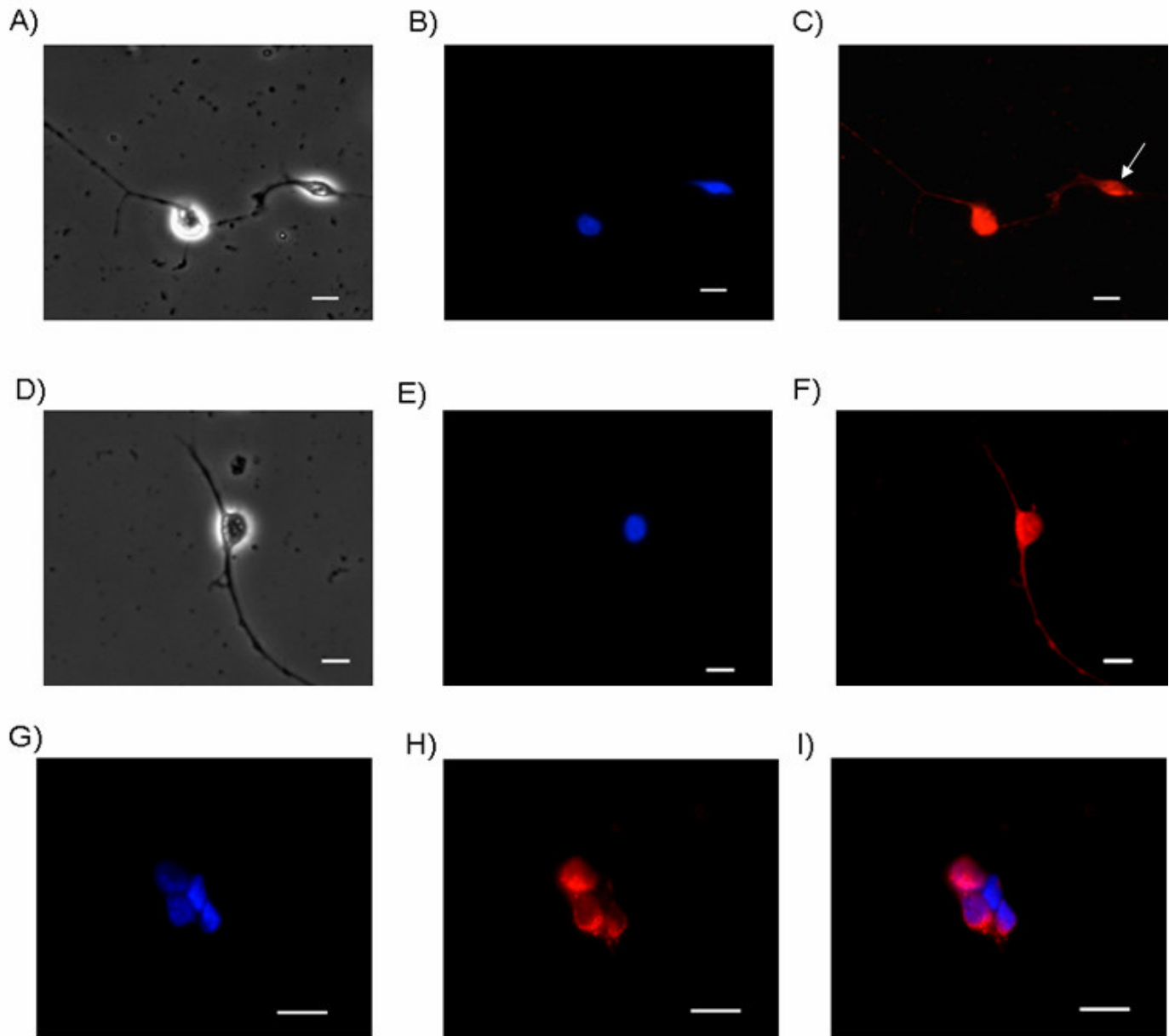


Figura 40: Imunocitoquímica para receptor A2a. A) Culturas purificadas de neurônios de retinas de embriões de 8 dias, C4 (contraste de fase). B), E) e G) Marcação com DAPI para os núcleos celulares. C), F) e H) Marcação em vermelho para o receptor A2a de adenosina (em C e F o aumento é de 40X e a diluição do anticorpo anti-A2a é de 1:250, e em H o aumento é de 100X e a diluição do anticorpo é 1:500). I) Colocalização das imagens de G e H. A seta demonstra um fotorreceptor expressando receptor A2a. A barra de calibração corresponde a 10 $\mu$ m.

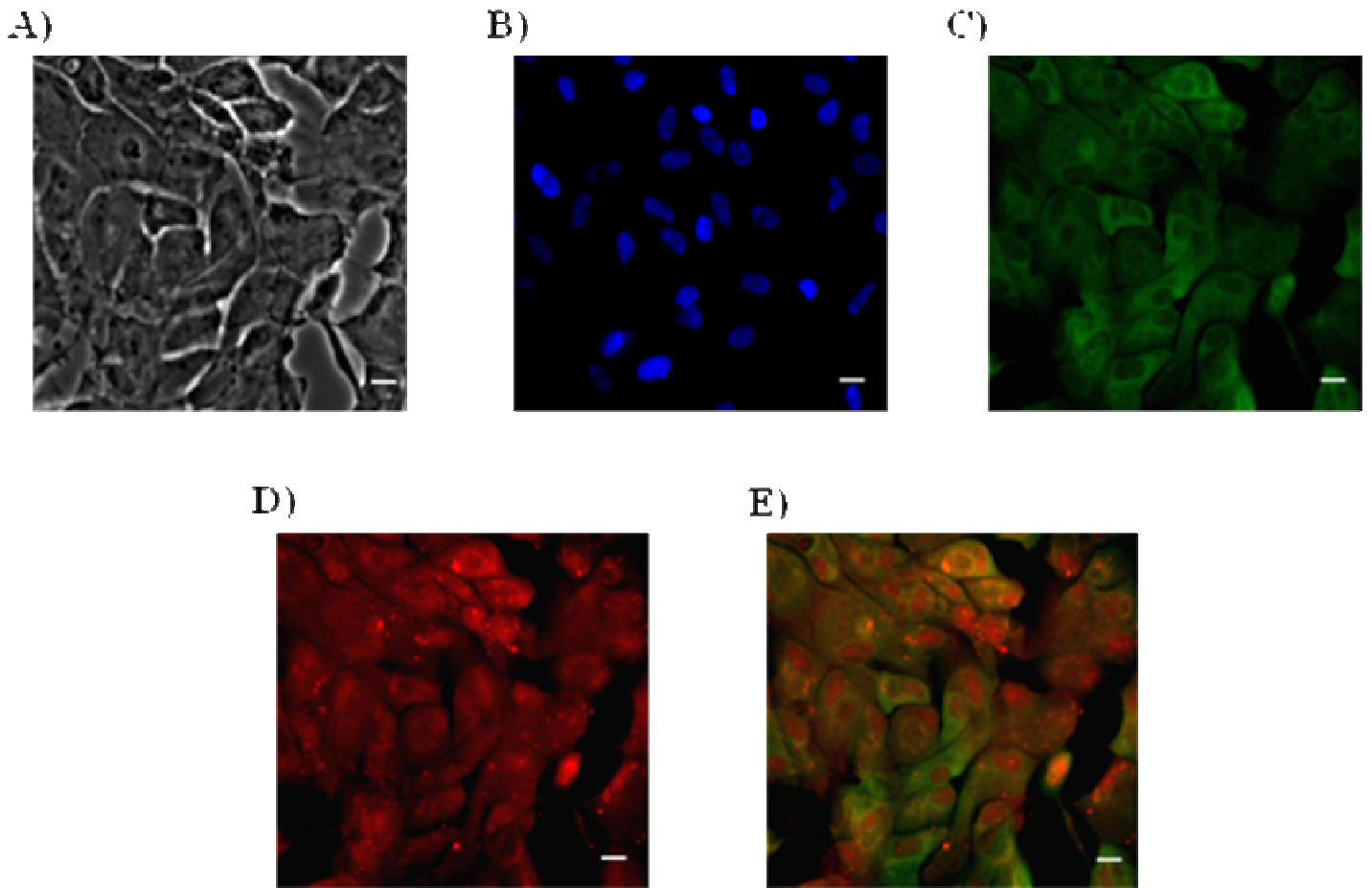


Figura 41: Imunocitoquímica para receptor A2a. A) Culturas purificadas de glia de retinas de embriões de 11 dias, C21 (contraste de fase). B) Marcação com DAPI para os núcleos celulares. C) Marcação em verde para células gliais com anticorpo primário 2M6. D) Marcação em vermelho para receptor A2a de adenosina. E) Colocalização entre receptor A2a de adenosina (D) e células de glia (C). A barra de calibração corresponde a 10 $\mu$ m.

## 5) DISCUSSÃO

### 5.1) Modulação da expressão de receptores A1 pela ativação de receptores A2a

Os receptores A1 estão expressos durante o desenvolvimento de retinas de galinha. Paes-de-Carvalho demonstrou, em 1990, que as retinas passam a apresentar “binding” para receptores A1 a partir de E10, alcançando níveis máximos em E17. Em animais pós-eclosão o “binding” ainda está presente, mas em níveis menores. Além disso, estes receptores estão localizados nas camadas plexiformes externa e interna (Paes-de-Carvalho *et al.*, 1992). No entanto, resultados do laboratório também demonstraram que as culturas mistas de embriões de galinha apresentam uma baixa ligação do antagonista seletivo para receptores A1, [<sup>3</sup>H]DPCPX, a qual é aumentada quando as células são tratadas com análogos permeáveis de AMPc, com DPMA, agonista de receptor A2a e inibida com H89, inibidor de PKA (Pereira *et al.*, 2010). A partir destes resultados investigamos que outras vias de sinalização poderiam estar envolvidas nesta modulação da expressão de receptores A1. Como a ativação do receptor A2a aumenta a expressão de receptores A1, pré-tratamos as culturas com ZM 241385, antagonista A2a. Esta droga bloqueou completamente o efeito do DPMA indicando que o tratamento com DPMA é específico em ativar os receptores A2a (figura 8).

O aumento de “binding” para A1 promovido por DPMA poderia ser explicado por um aumento da síntese de receptores A1. Para verificar esta hipótese, as culturas foram tratadas com anisomicina, um inibidor de síntese protéica, o qual inibiu completamente o aumento da ligação de [<sup>3</sup>H]DPCPX

(figura 9). Estes resultados são confirmados pelos experimentos de “Western Blotting”, onde as culturas mistas apresentaram um aumento da expressão de receptores A1 após o tratamento com DPMA (figura 11). Este aumento só foi observado a partir de C3 sendo maior em C6. Além disso, CGS 21680, outro agonista A2a, também apresentou o mesmo efeito do DPMA (figura 12). A ativação crônica de A2a também levou ao aumento da transcrição de RNAm para receptor A1 (figura 14). Além disso, a ativação dos receptores A2a é necessária durante os 5 dias de incubação, já que o tratamento somente até C3 impediu o aumento da expressão de receptores A1 em C6 (figura 13). Esses dados indicam que é necessária uma ativação dos receptores A2a por um longo período de tempo para que ocorra o aumento da expressão de receptores A1.

Também foi observado que os receptores A1 estão expressos apenas nos neurônios nas culturas mistas e o tratamento com DPMA promove aumento da intensidade da marcação, além de modificar o seu padrão de localização com aumento da sua expressão na membrana plasmática (figura 15). Como os receptores A2a estão expressos tanto em neurônios quanto em células gliais nas culturas mistas (figura 39), a regulação da expressão de receptores A1 pode ser um evento que ocorre apenas nos neurônios ou a ativação de receptores A2a na glia poderia levar à liberação de algum fator que levaria ao aumento de receptores A1 nos neurônios.

A regulação dos receptores A1 pela ativação crônica de receptores A2a também acontece em preparações “ex vivo”. O tratamento dos explantes de retinas de embriões de 8 dias com DPMA de C1 até C3 promoveu aumento dos níveis de receptor A1 (figura 16). Além disso, injeções “intra-ovo” com CGS 21680 em embriões de 14 dias mantidos até 16 dias mostraram que há



aumento tanto do “binding” quanto da proteína para receptores A1 (Brito *et al.*, resultados não publicados). Esses dados indicam que esta regulação da expressão de receptores A1 através da ativação de receptores A2a também ocorre “in vivo”.

Os receptores A1 podem ter a sua expressão induzida pela ativação de NFkB (revisto por St Hilaire *et al.*, 2008; Jhaveri *et al.*, 2006; Prabhakar e Kumar, 2004; Rakumar *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 1998). Assim, o aumento da expressão de receptores A1 nas culturas mistas por ativação de receptores A2a poderia envolver este fator de transcrição. Esta hipótese foi confirmada neste trabalho através do tratamento com os inibidores de NFkB sulfasalazina e gliotoxina, os quais bloquearam completamente o efeito do DPMA (figuras 17 e 18). Além disso, experimentos de imunocitoquímica demonstraram que o tratamento com DPMA induziu um pequeno aumento de NFkB e p-NFkB em núcleos de células neuronais (figuras 20 e 21). Estes resultados estão de acordo com o fato dos receptores A1 serem expressos apenas em neurônios nas culturas mistas. Entretanto, não há nenhuma evidência que demonstre que a ativação de receptores A2a leve à ativação de NFkB. Dessa maneira, a ativação deste fator de transcrição por estimulação de receptores A2a provavelmente ocorre por um mecanismo indireto.

Estes resultados indicam que a ativação dos receptores A2a, através de um mecanismo envolvendo AMPc e PKA, promove aumento da expressão de receptores A1 através do aumento da transcrição de RNAm via ativação de NFkB, ocorrendo assim síntese de novos receptores A1 e sua inserção na membrana de células neuronais nas culturas mistas de retina de embrião de galinha.

## Envolvimento da ERK

Os receptores de adenosina podem estar acoplados à ativação da via de sinalização das ERKs (Schulte e Fredholm, 2003). Em culturas purificadas de glia de retina de embrião de galinha, a ativação de receptores A1 leva ao aumento da fosforilação da ERK (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008). O efeito promovido pela ativação dos receptores A2a poderia envolver a via das ERKs. De modo interessante, o bloqueio da MEK não foi capaz de inibir o efeito do DPMA (figura 22). Além disso, a própria inibição da via das ERKs já foi capaz de promover aumento da expressão de A1, efeito este que não foi somatório ao do DPMA o que indica um cruzamento de vias de sinalização.

Para confirmar que a ativação de receptores A2a controla os níveis de p-ERK, as culturas mistas foram tratadas com DPMA de C1 até C6 ou tratadas de C1 até C3, lavadas e mantidas na ausência do agonista A2a até C6. Os resultados mostraram que o tratamento até C6 promoveu uma diminuição dos níveis de p-ERK, enquanto que a retirada do agonista em C3 permitiu que os níveis voltassem ao controle (figura 23). Estes resultados demonstraram a necessidade da presença do agonista A2a durante todo o tempo de manutenção da cultura para ocorrer o efeito inibitório sobre a fosforilação da ERK (figura 13).

Já foi demonstrado que a ativação de receptores A2a pode levar à transativação de receptores tirosina kinase (Lee e Chao, 2001). Assim, para verificar se o aumento da expressão de receptores A1 envolve transativação, as culturas foram tratadas com K252a, inibidor de receptores tirosina kinase. O inibidor não foi capaz de inibir o efeito do DPMA, mas promoveu por si só

aumento da expressão de receptores A1 que não foi somatório ao do DPMA (figura 24). Estes resultados sugerem que fatores tróficos ativam os receptores tirosina kinase que, através da via de sinalização das ERKs, mantém a expressão de receptores A1 em níveis baixos. Além disso, a ativação de receptores A2a inibe a via das ERKs o que permite o aumento da expressão de receptores A1.

Receptores metabotrópicos podem inibir a sinalização das ERKs através de PKA de um modo dependente da expressão de Raf-1. A PKA pode ativar diretamente a proteína Rap-1 a qual inibe a Raf-1 ou pode ativar a Src a qual ativa, então, a Rap-1 (revisto por Stork e Schmitt, 2002). Como o aumento da expressão de A1 é dependente de PKA e da inibição das ERKs, a proteína Src poderia estar envolvida. De fato, o efeito do DPMA foi inibido quando as culturas foram tratadas com PP1, um inibidor de Src (figura 25).

#### Envolvimento do NO

Os receptores A1 podem ter a sua expressão aumentada por óxido nítrico (NO) (Jhaveri *et al.*, 2006). Além disso, várias evidências demonstram que a ativação de receptores A2a promove a liberação de óxido nítrico. Entretanto, esta liberação só foi mostrada em células gliais ou endoteliais. (Ray e Marshal, 2006; Lee *et al.*, 2005; Saura *et al.*, 2005). Dessa maneira, o efeito do DPMA poderia ser através da produção de NO. De fato, quando as culturas mistas foram tratadas com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase, ocorreu inibição completa do efeito do agonista A2a, indicando o envolvimento de NO na regulação da expressão de A1 (figura 26).

Já foi mostrado que o fator de crescimento do nervo (NGF) pode inibir a produção de NO em hipocampo de rato (Lam *et al.*, 1998). Além disso, NGF, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4) diminuem a liberação de NO em culturas de microglia (Nakajima *et al.*, 1998). Outros dados demonstram que culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal tratadas com NGF ou motoneurônios de ratos com lesão da medula espinhal têm diminuição da expressão de NO sintase neuronal (Tang *et al.*, 2002; Thippeswamy e Morris, 1997). Assim, estes resultados indicam que os fatores tróficos podem inibir a produção de NO, mas o mecanismo envolvido nesta regulação ainda não foi identificado.

A produção de NO pode ser feita por 3 tipos de óxido nítrico sintase: neuronal, endotelial e induzível (revisado por Kleinert *et al.*, 2004). Entretanto, a expressão da NO sintase induzível têm sido mostrada ser regulada por NFkB (Sinke *et al.*, 2008; revisado por Kleinert *et al.*, 2004; Palomba *et al.*, 2004; revisado por Goldring *et al.*, 1995). Além disso, Kim e colaboradores, em 2002, demonstraram que NO pode levar à ativação de NFkB via p38 (proteína quinase ativada por mitógenos p38). Assim, esses resultados indicam que a síntese de NO pode ser regulada por NFkB e que este fator de transcrição pode ser ativado por NO.

De acordo com estes resultados, nós propomos um mecanismo onde a liberação de fatores tróficos nas culturas mistas inibe a expressão de receptores A1 por inibir a produção de NO. A ativação de receptores A2a estimula a adenilil ciclase que produz AMPc e, conseqüentemente, ativa a PKA. Esta, por sua vez, inibe a via das ERKs através da Src. Assim, a NO sintase perde a inibição produzida pelos fatores tróficos e produz NO. O NO estimula o fator de transcrição NFkB que ativa a transcrição gênica de

receptores A1 que são inseridos na membrana plasmática das células neuronais (figura 44). Entretanto, não determinamos se o NO é produzido e liberado pelas células de glia e aumenta a expressão de receptores A1 nos neurônios, ou se toda a via de sinalização ocorre nos próprios neurônios. Além disso, não se pode descartar uma possível liberação de NO diretamente pela ativação de receptores A2a nas células de glia o qual aumentaria a expressão de receptores A1 nos neurônios através de NFkB.

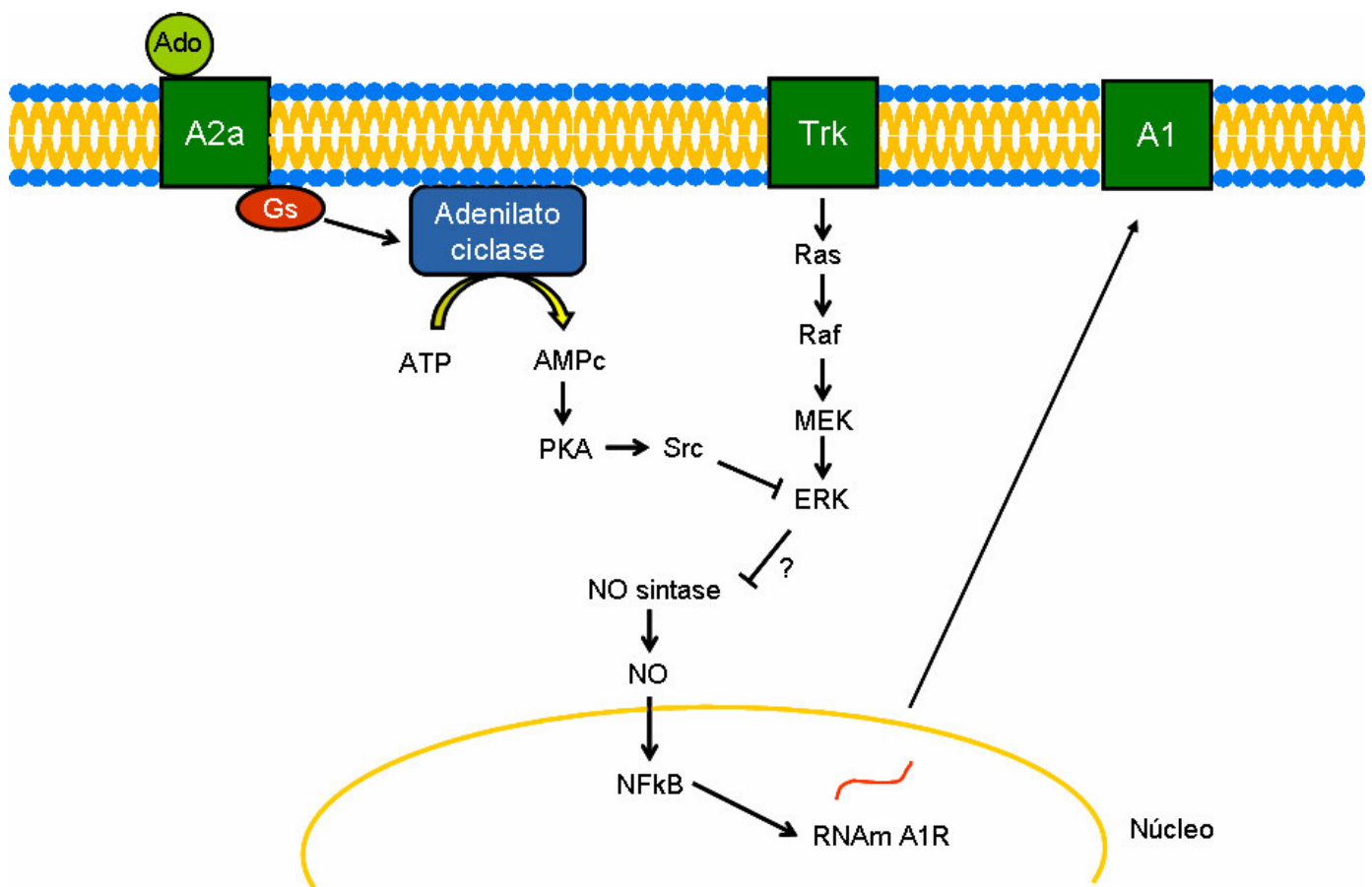


Figura 44: Esquema proposto para a regulação da expressão de receptores A1 por receptores A2a de adenosina.

A inibição da NO sintase não deve ocorrer diretamente pela ERK já que esta MAP kinase é conhecida por estimular a produção de NO (Park *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2008).

Desse modo, outras vias de sinalização devem estar envolvidas nesta regulação, pois a NO sintase pode ser regulada ainda pela p38 (Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2002) ou pela via da PI3 kinase/Akt (Park *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2008). Por outro lado, NO produz aumento marcante da p-ERK e de p-Akt nas nossas culturas, mas esses efeitos parecem ser bastante transitórios (Socodato *et al.*, 2009; Mejia-Garcia e Paes-de-Carvalho, Neurolatam, 2008).

#### Receptores A1 e sobrevivência

Além dos nossos resultados, não há nenhuma outra evidência de que os receptores A1 podem ter a sua expressão aumentada pela ativação de receptores A2a de adenosina. Entretanto, Castillo e colaboradores, em 2008, mostraram que quando culturas de células C6 de glioma são submetidas à hipóxia há uma grande liberação de adenosina no meio extracelular. A adenosina liberada, então, diminui a expressão de receptores A1 enquanto há um aumento da expressão de receptores A2a. Além disso, o aumento da expressão de A2a é dependente da ativação de receptores A1 já que DPCPX, um antagonista A1, é capaz de bloquear o aumento de A2a. Esses resultados mostram que a expressão de receptores A2a pode também ser regulada pelo nível de expressão de receptores A1. De acordo com os nossos dados, o

tratamento com DPMA promoveu uma diminuição da expressão dos receptores A2a (figura 27). Isto poderia ser causado pela incubação crônica do agonista A2a ou ser uma consequência do aumento da expressão dos receptores A1.

Ferreira e Paes-de-Carvalho, em 2001, demonstraram que culturas purificadas de neurônio de retinas de embriões de galinha apresentam uma extensa morte celular quando são incubadas cronicamente com glutamato. Entretanto, o pré-tratamento por 24 horas com DPMA promove o bloqueio da morte induzida por glutamato. Esses resultados indicam que os receptores A2a apresentam um papel neuroprotetor. Entretanto, em função dos nossos resultados, poderíamos propor que o efeito protetor dos receptores A2a ocorre via receptores A1. O tratamento crônico com DPMA promoveria aumento da expressão de receptores A1 que, então, promoveriam a sobrevivência dos neurônios. Experimentos precisam ainda ser realizados para verificar esta hipótese.

## 5.2) Modulação da expressão de receptores A1 por IL-6

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida na regulação da expressão dos receptores A1. Em culturas de astrócitos corticais, a incubação com IL-6 aumenta os níveis de RNAm para o receptor A1. Este tratamento produz receptores funcionais, pois há aumento do acúmulo de IP3 induzido por ativação de receptores A1 (Biber *et al.*, 2001).

Um efeito similar foi observado em slices de hipocampo de rato. Nestas preparações, o tratamento com IL-6 aumentou a inibição da

transmissão sináptica induzida por ativação de receptores A1. Este efeito é dependente de síntese protéica. Além disso, a IL-6 aumentou os níveis de proteína e o “binding” para receptor A1 no hipocampo (Biber *et al.*, 2008).

Assim, para verificar se IL-6 também poderia também aumentar a expressão de receptores A1 nas culturas mistas de retinas de embriões de galinha, as células foram incubadas cronicamente com a citocina. Os resultados observados mostram que a IL-6 aumenta os níveis de proteína para receptor A1 e que este efeito é dependente de NFkB (figuras 28, 29, 30). Além disso, o efeito da IL-6 parece ser via JAK2, pois o seu inibidor foi capaz de bloquear completamente o efeito da citocina (figura 31).

Outras proteínas podem estar envolvidas neste aumento da expressão de A1 induzido por IL-6 já que outras vias de sinalização já foram mostradas ser ativadas por IL-6 como a da p38 e da PI3 kinase/Akt (Quintanilla *et al.*, 2004; Kunioku *et al.*, 2001).

Apesar da maioria das evidências demonstrarem que os receptores A2b é que estão envolvidos na liberação de IL-6, já foi observado que a estimulação de receptores A2a induz a liberação desta citocina em células epiteliais (Fiebich *et al.*, 1996; Schwaninger *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2008; Vazquez *et al.*, 2008).

Em culturas de neurônios corticais, o tratamento com IL-6 também aumenta a expressão de receptores A1. Além disso, a IL-6 promove aumento da sobrevivência dos neurônios contra a excitotoxicidade induzida por glutamato. Este efeito foi demonstrado ser via receptores A1 (Biber *et al.*, 2008). Assim, estes resultados mostram um importante papel da IL-6 na neuroproteção via receptores A1. Então, é possível que esta mesma regulação ocorra nas



culturas purificadas de neurônio e que promova sobrevivência aos neurônios expostos ao glutamato.

### 5.3) Modulação da expressão de receptores A1 por inosina

Resultados prévios mostraram que a incubação com adenosina deaminase, enzima que metaboliza adenosina em inosina, é capaz de aumentar o “binding” para receptor A1 em culturas mistas de retina de embriões de galinha (Pereira, 2005, tese de Mestrado). Para investigar se o efeito da adenosina deaminase seria apenas pela degradação da adenosina endógena que estaria, então, promovendo “down-regulation” dos receptores A1, as culturas foram tratadas com inosina, o metabólito produzido na reação de deaminação da adenosina. De modo interessante, a própria inosina foi capaz de aumentar o “binding” para receptor A1 (Pereira *et al.*, NeuroReport, 2008).

Vários trabalhos demonstram que a inosina pode se ligar a receptores A3 de adenosina em diferentes sistemas como o imune e o nervoso (Shen *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 1997). No sistema imune, a inosina estimula a degranulação de mastócitos, enquanto inibe o aumento de AMPc induzido pela ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos em células HEK293 (Jin *et al.*, 1997). Além disso, no sistema nervoso, a inosina apresenta um papel neuroprotetor durante a isquemia cerebral. O tratamento de ratos com inosina diminuiu a liberação de glutamato no córtex cerebral dos animais, além de minimizar o grau de infarto cerebral (Shen *et al.*, 2005). Em hepatócitos, a inosina estimula

a liberação de glicose de maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Guinberg *et al.*, 2006). Todos estes efeitos ocorrem via ativação de receptores A3 de adenosina.

Para verificar se o efeito da inosina no aumento do “binding” de receptores A1 é dependente da ativação de receptores A3, as culturas foram tratadas com MRS1523, um antagonista A3. Observou-se que o antagonista foi capaz de bloquear completamente o efeito da inosina confirmando a participação desse receptor (figura 32).

Da mesma maneira que o tratamento com DPMA aumenta a expressão de receptores A1, a inosina poderia, também, aumentar os seus níveis protéicos. Entretanto, inosina ou MRS1523 não alteraram a quantidade de proteína para receptores A1 (figura 33). O mesmo efeito foi observado em relação à adenosina deaminase (figura 34). Além disso, ao contrário do DPMA que estimula a transcrição de RNAm para receptores A1, o tratamento com inosina diminuiu os níveis de RNAm para o receptor (figura 35).

Esses resultados indicam que a regulação de receptores A1 por receptores A3 ocorre de maneira diferente da ativação de receptores A2a. Os receptores A3 possivelmente estimulam apenas a translocação de receptores armazenados intracelularmente sem alterar a sua quantidade total. Entretanto, como o tratamento com inosina é apenas por 24 horas, pode não ter havido tempo suficiente para alterar a expressão de receptores A1, já que são necessárias pelo menos 48 horas de tratamento com DPMA para haver alteração dos níveis protéicos de A1.

Não há nenhuma evidência da presença de receptores A3 nas retinas de embriões de galinha. Entretanto, este receptor tem sido caracterizado em retinas de outras espécies (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Em células epiteliais ciliadas, os receptores A3 estimulam correntes de  $\text{Cl}^-$  de forma

dependente de PKC e de ERK (Shi *et al.*, 2003). Além disso, as células ganglionares de retinas de ratos expressam RNAm para receptores A3 os quais inibem o influxo de  $Ca^{2+}$  estimulado por receptores P2X7 (Zhang *et al.*, 2006). Em culturas de células ganglionares, esta inibição é neuroprotetora, pois foi capaz de bloquear a diminuição do número de células promovido pela ativação de receptores P2X7. O fato de que a incubação destas culturas com EHNA, inibidor da adenosina deaminase, diminui o número de células em cultura parece corroborar a hipótese de que o efeito neuroprotetor é mediado por inosina (Zhang *et al.*, 2006).

O aumento de “binding” para receptor A1 nas culturas mistas de retina de embriões de galinha pode envolver a via da PKC, pois os receptores A3 podem ativar a via da PLC (Abbracchio *et al.*, 1995). Entretanto, experimentos necessitam ser realizados para verificar esta hipótese.

#### 5.4) Culturas purificadas de glia expressam receptores A1

Resultados do laboratório demonstram que nas culturas purificadas de glia a estimulação de receptores A1 promove a fosforilação da ERK de forma dependente de PKC e de Src (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008). Esses resultados indicam que este tipo de cultura expressa receptores A1. Em função disso, a expressão de A1 nas culturas purificadas de glia foi comparada com as culturas mistas. Observou-se que as culturas purificadas de glia apresentam um “binding” maior do que as culturas mistas, além de uma maior quantidade de proteína para receptor A1 (figuras 36 e 37).

Recentemente foi mostrado que as culturas purificadas de glia passam a expressar características de uma célula dopaminérgica, um fenótipo exclusivo dos neurônios (Kubrusly *et al.*, 2008). Assim, as células da glia, na ausência de neurônios, podem passar a expressar proteínas que normalmente não estão presentes, como no caso, os receptores A1. Através de experimentos de imunocitoquímica foi mostrado que nas culturas mistas o receptor A1 está presente exclusivamente nos neurônios (figura 15). Entretanto, na ausência das células neuronais, as células de glia passam a expressar este receptor que quando ativo pode aumentar a fosforilação da ERK (Rodrigues *et al.*, Neurolatam, 2008).

#### 5.5) Caracterização da expressão dos receptores A2a em culturas de retina de embrião de galinha

Resultados prévios mostraram que adenosina promove aumento de AMPc nas retinas de embriões de galinha ao longo do desenvolvimento. O acúmulo é observado a partir de E14, alcançando níveis máximos em E17. Em animais pós-eclosão os níveis de AMPc voltaram a ser próximos do basal. (Paes-de-Carvalho e de Mello, 1982).

Os receptores A2a foram detectados por western blot em retinas ao longo do desenvolvimento. Em E6 já é detectada a presença do receptor. Entretanto, o nível de expressão diminui a partir de E11 e se mantém até E16. Em P1, os níveis voltam aos do início do desenvolvimento. A ativação dos receptores A2a é capaz de promover a fosforilação do fator de transcrição

CREB tanto em E9 quanto em E16 de forma dependente de PKA, mas não de PLC (Vardiero *et al.*, Fesbe, 2009).

Foi mostrado, também, que culturas purificadas de neurônios quando incubadas cronicamente com glutamato apresentam uma extensa morte celular. Entretanto, a pré-incubação com agonistas de receptores A2a protege os neurônios da excitotoxicidade induzida por glutamato. Este efeito é mimetizado por análogos permeáveis de AMPc indicando esta via de sinalização como responsável pelos efeitos do receptor A2a (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001).

A troca do meio das culturas purificadas de neurônio também promove uma extensa morte celular que é bloqueada pelo pré-tratamento com agonistas de receptor A2a ou análogos permeáveis de AMPc (Paes-de-Carvalho *et al.*, 2003).

Nas culturas mistas nós mostramos que a ativação de receptores A2a promove aumento da expressão de receptores A1. Além disso, os receptores A2a estimulam a troca das subunidades do receptor NMDA nas culturas mistas, um mecanismo que possivelmente seria responsável pela proteção dos neurônios nas culturas purificadas contra a morte induzida por glutamato (Caversan *et al.*, Fesbe, 2007).

A partir desses resultados caracterizamos a expressão dos receptores A2a nas culturas de retinas de embrião de galinha. Observamos que os níveis de expressão de receptores A2a nas culturas de retina são similares (figura 38). Nas culturas mistas, os receptores A2a, de modo diferente dos receptores A1 que somente estão presentes nos neurônios, estão presentes tanto nos neurônios quanto nas células de glia (figura 39). Nas culturas purificadas de neurônio, os receptores estão presentes tanto no corpo celular quanto nos

neuritos, além de serem expressos em fotorreceptores. Entretanto, nem todos os neurônios expressam o receptor A2a (figura 40). Já nas culturas purificadas de glia, o receptor está amplamente expresso (figura 41).

Assim, estes resultados demonstram que as culturas de retina expressam os receptores A2a onde eles apresentam importantes funções como regulação da expressão de receptores além de efeitos neuroprotetores.

## 6) CONCLUSÕES

Com este trabalho, podemos concluir:

1- A ativação crônica dos receptores A2a aumenta a expressão do receptor A1 por estimular a transcrição e a tradução de novas proteínas. Este efeito é dependente de Src, NO e NFkB.

2- Os receptores A1 estão presentes apenas nos neurônios e o tratamento com DPMA aumenta a sua inserção na membrana plasmática.

3- A ativação de receptores A2a mantém os níveis de p-ERK baixos o que permite que o receptor A1 aumente a sua expressão.

4- Os receptores tirosina kinase, provavelmente via ERK, mantêm os níveis baixos de receptores A1.

5- IL-6 aumenta a expressão de receptores A1 nas culturas mistas de forma dependente de NFkB e de JAK2.

6- A inosina aumenta o "binding", diminui o RNAm, mas não altera os níveis protéicos do receptor A1. O aumento do "binding" é mediado por receptores A3. Adenosina deaminase não altera a expressão do receptor A1.

7- As culturas purificadas de glia apresentam um “binding” maior para receptor A1, além de uma maior quantidade de proteína quando comparado com as culturas mistas.

8- Os receptores A2a estão presentes nas culturas mistas e purificadas de neurônio e glia com o mesmo nível de expressão. Nas culturas purificadas de neurônio estão localizados tanto no corpo celular quanto nos neuritos, inclusive em fotorreceptores.



## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbrachio M.P., Brambilla R., Ceruti S., Kim H.O., von Lubitz D.K., Jacobson K.A. and Cattabeni F. (1995) G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **48**, 1038-1045.
- Ali C., Nicole O., Docagne F., Lesne S., Mackenzie E.T., Nouvelot A., Buisson A. and Vivien D. (2000) Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 956-966.
- Allaman I., Lengacher S., Magistretti P.J. and Pellerin L. (2003) A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C696-704.
- Anderson C.M., Xiong W., Geiger J.D., Young J.D., Cass, C.E., Baldwin S.A. and Parkinson F.E. (1999) Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J. Neurochem.* **73**, 867-873.
- Barraco R.A., Clough-Helfman C., Goodwin B.P. and Anderson G.F. (1995) Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J. Neurochem.* **65**, 1604-1611.
- Barth A., Newell D.W., Nguyen L.B., Winn H.R., Wender R., Meno J.R. and Janigro D. (1997) Neurotoxicity in organotypic hippocampal slices mediated by adenosine analogues and nitric oxide. *Brain Res.* **762**, 79-88.

- Biber K., Lubrich B., Fiebich B. L., Boddeke H. W. and Van Calcker D. (2001) Interleukin-6 enhances expression of adenosine A(1) receptor mRNA and signaling in cultured rat cortical astrocytes and brain slices. *Neuropsychopharmacology* **24**, 86-96.
- Biber K., Pinto-Duarte A., Wittendorp M. C., Dolga A. M., Fernandes C. C., Von Frijtag Drabbe Künzel J., Keijser J. N., de Vries R., Ijzerman A. P., Ribeiro J. A., Eisel U., Sebastião A. M. and Boddeke H. W. (2008) Interleukin-6 upregulates neuronal adenosine A1 receptors: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* **33**, 2237-2250
- Biber K., Klotz K.N., Berger M., Gebicke-Härter P.J. and van Calcker D. (1997) Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J. Neurosci.* **17**, 4956-4964.
- Blazynski C., Kinscherf D.A., Geary K.M. and Ferrendelli J.A. (1986) Adenosine-mediated regulation of cyclic AMP levels in isolated incubated retinas. *Brain Res.* **366**, 224-229.
- Blazynski C., Woods, C. and Mathews G.C. (1992) Evidence for the action of endogenous adenosine in the rabbit retina: modulation of the light-evoked release of acetylcholine. *J. Neurochem.* **58**, 761-767.
- Blazynski C. and Perez M.T. (1991) Adenosine in vertebrate retina: localization, receptor characterization and function. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**, 463-484.
- Blazynski C. (1991) The accumulation of [3H]phenylisopropyl adenosine ([3H]PIA) and [3H]adenosine in to rabbit retinal neurons is inhibited by nitrobenzylthioinosine (NBI). *Neurosci. Lett.* **121**, 1-4.

- Blazynski C. (1990) Discrete distributions of adenosine receptors in mammalian retina. *J. Neurochem.* **54**, 648-655.
- Blazynski C. (1989) Displaced cholinergic GABAergic amacrine cells in the rabbit retina also contain adenosine. *Vis. Neurosci.* **3**, 425-431.
- Blazynski C., Mosinger J.L. and Cohen A.L. (1989) Comparison of adenosine uptake and endogenous adenosine-containing cells in mammalian retina. *Vis. Neurosci.* **2**, 109-116.
- Blazynski C. (1987) Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in rabbit retina. *J. Neurosci.* **7**, 2522-2528.
- Bouma M.G., Stad R.K., van den Wildenberg F.A. and Buurman W.A. (1994) Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J. Immunol* **153**, 4159-4168.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brand A., Vissienon Z., Eschke D. and Nieber K. (2001) Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology* **40**, 85-95.
- Bruton L.L. and Mayer S.E. (1979) Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 9714-9720.
- Burns M.E. and Baylor D.A. (2001) Activation, deactivation and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 779-805.
- Burnstock G. (2009) Purines and sensory nerves. *Handb. Exp. Pharmacol.* **194**, 333-392.
- Burnstock G., Satchell D.G. and Smythe A. (1972) A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve

stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br. J. Pharmacol.* **46**, 234-242.

Charlesworth A. and Rozengurt E. (1997) Bombesin and neuromedin B stimulate the activation of p42(mapk) and p74(raf-1) via a protein kinase C-independent pathway in Rat-1 cells. *Oncogene* **14**, 2323-2329.

Caversan O.M., Ferreira J.M., Pinheiro S., Haganir R. and Paes-de-Carvalho R. (2007) Plasticidade do receptor NMDA em culturas de retina: adenosina e ligantes da subunidade NR2B modulam a expressão das diferentes subunidades e a excitotoxicidade do glutamato. *XXII Reunião Anual da Fesbe*.

Chiang M.C., Lee Y.C., Huang C.L. and Chern Y. (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J. Biol. Chem.* **280**, 14331-14340.

Cooper D.M., London C. and Rodbell M. (1980) Adenosine receptor-mediated inhibition of rat cerebral cortical adenylate cyclase by a GTP-dependent process. *Mol. Pharmacol.* **18**, 598-601.

Copenhagen D.R. and Jahr C.E. (1989) Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature* **341**, 536-539.

Cossenza M. and Paes-de-Carvalho R. (2000) L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* **74**, 1885-1894.

Cunha R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* **38**, 107-125.

- Cunha R.A., Almeida T. and Ribeiro J.A. (2000) Modification by arachidonic acid of extracellular adenosine metabolism and neuromodulatory action in the rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* **275**, 37572-37581.
- D'Arcangelo G., Tancredi V., Onofri F., D'Antuono M., Giovedi S. and Benfenati F. (2000) Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1241-1252.
- de Almeida O.M., Gardino P.F., Loureiro dos Santos N.E., Yamasaki E.N., de Mello M.C., Hokoç J.N., de Mello F.G. (2002) Opposite roles of GABA and excitatory amino acids on the control of GAD expression in cultured retina cells. *Brain Res.* **925**, 89-99.
- Dejardin E., Droin N.M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C., Li Z.W., Karin M., Ware C.F. and Green D.R. (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535.
- Di Iorio P., Kleywegt S., Ciccarelli R., Traversa U., Andrew C.M., Crocker C.E., Werstiuk E.S. and Rathbone M.P. (2002) Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. *Glia* **38**, 179-190.
- Drury A.N. and Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**, 213-237.
- Duan W., Gui L., Zhou Z., Liu Y., Tian H., Chen J.F. and Zheng J. (2009) Adenosine A2A receptor deficiency exacerbates white matter lesions and cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice. *J. Neurol. Sci.* **285**, 39-45.

- Duran A., Diaz-Meco M.T. and Moscat J. (2003) Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J.* **22**, 3910-3918.
- Dyer M.A. and Cepko C.L. (2001) Regulating proliferation during retinal development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 333-342.
- Fan M., Qin W. and Mustafa S.J. (2003) Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **284**, 1012-1019.
- Faure M., Voyno-Yasenetskaya T.A. and Bourne H.R. (1994) cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 7851-7854.
- Federman A.D., Conklin B.R., Schrader K.A., Reed R.R. and Bourne H.R. (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356**, 159-161.
- Ferreira J. M. and Paes-de-Carvalho R. (2001) Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* **900**, 169-176.
- Fiebich B.L., Biber K., Gyufko K., Berger M., Bauer J. and van Calker D. (1996) Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J. Neurochem.* **66**, 1426-1431.
- Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G. and Wasserman W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergers Arch. Pharmacol.* **362**, 364-374.

- Fukuda M., Gotoh Y. and Nishida E. (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* **16**, 1901-1908.
- Gao Z., Chen T., Weber M.J. and Linden J. (1999) A2b adenosine and P2Y2 receptors stimulates mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 5972-5980.
- Gebicke-Haerter P.J., Christoffel F., Timmer J., Northoff H., Berger M and van Calker D. (1996) Both adenosine A1- and A2-adenosine receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* **29**, 37-42.
- Ghosh S. and Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**, S81-96.
- Ghosh S., May M.J. and Kopp E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260.
- Ghosh S. and Baltimore D. (1990) Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* **344**, 678-682.
- Goldring C.E., Narayanan R., Lagadec P. and Jeannin J.F. (1995) Transcriptional inhibition of the inducible nitric oxide synthase gene by competitive binding of NF-kappa B/Rel proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 73-79.
- Griffith D.A. and Jarvis S.M. (1996) Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 153-181.
- Guschin D., Rogers N., Briscoe J., Witthuhn B., Watling D., Horn F., Pellegrini S., Yaukawa K., Heinrich P., Stark G. R. *et al.* (1995) A major role for the

- protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* **14**, 1421-1429.
- Hammarberg C., Schulte G. and Fredholm B.B. (2003) Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J. Neurochem.* **86**, 1051-1054.
- Hammond L.C., Bonnet C., Kemp P.J., Yates M.S. and Bowmer C.J. (2004) Chronic hypoxic up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 421-426.
- Hawes B.E., van Biesen T., Koch W.J., Luttrell L.M. and Lefkowitz R.J. (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 17148-17153.
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G. and Schaper F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J.* **374**, 1-20.
- Henderson G.B. and Strauss B.P. (1991) Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. *J. Biol. Chem.* **266**, 1641-1645.
- Hettinger B.D., Lee A., Linden J. and Rosin D.L. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A2a receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J. Comp. Neurol.* **431**, 331-346.
- Heuss C. and Gerber U. (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **23**, 469-475.
- Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S., Nakajima K., Koyama K., Iwamatsu A., et al. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature* **324**, 73-76.



- Hirasawa H., Puopolo M. and Raviola E. (2009) Extrasynaptic release of GABA by retinal dopaminergic neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 146-158.
- Hoeflich K.P., Luo J., Rubie E.A., Tsao M.S., Jin O. and Woodgett J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature* **406**, 86-90.
- Hokoç J.N., Ventura A.L., Gardino P.F. de Mello F.G. (1990) Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain Res.* **532**, 197-202.
- Huxford T., Huang D.B., Malek S. and Ghosh G. (1998) The crystal structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex reveals mechanisms of NF- $\kappa$ B inactivation. *Cell* **95**, 759,770.
- Igishi T. and Gutkind J.S. (1998) Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 5-10.
- Jacobs M.D. and Harrison S.C. (1998) Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex. *Cell* **95**, 749-758.
- Jarvis S.M. and Young J.D. (1986) Nucleoside transport in rat erythrocytes: two components with differences in sensitivity to inhibition by nitrobenzylthioinosine and p-chloromercuriphenyl sulfonate. *J. Membr. Biol.* **93**, 1-10.
- Jhaveri K.A., Toth L.A., Sekino Y. and Ramkumar V. (2006) Nitric oxide serves as an endogenous regulator of neuronal adenosine A1 receptor expression. *J. Neurochem.* **99**, 42-53.
- Jin X., Shepherd R.K., Duling B.R. and Linden J. (1997) Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.* **100**, 2849-2857.

- Jüttler E., Tarabin V. and Schwaninger M. (2002) Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* **8**, 268-275.
- Karin M. and Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621-663.
- Kleinert H., Pautz A., Linker K. and Schwarz P.M. (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 255-266.
- Kong T., Westerman K.A., Faigle M., Eltzsching H.K. and Colgan S.P. (2006) HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* **20**, 2241-2250.
- Kopp E.B. and Ghosh S. (1995) NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58**, 1-27.
- Kravtsova-Ivantsiv Y., Cohen S. and Ciechanover A. (2009) Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor. *Mol. Cell* **33**, 496-504.
- Krishna M. and Narang H. (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3525-3544.
- Kunioku H., Inoue K. and Tomida M. (2001) Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci. Lett.* **309**, 13-16.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam H.H., Bhardwaj A., O'Connell M.T., Hanley D.F., Traystman R.J. and Sofroniew M.V. (1998) Nerve growth factor rapidly suppresses basal,

- NMDA-evoked, and AMPA-evoked nitric oxide synthase activity in rat hippocampus in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 10926-10931.
- Lam D.M., Lasater E.M. and Naka K.I. (1978) gamma-Aminobutyric acid: a neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 6310-6313.
- Latini S. and Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* **79**, 463-484.
- Lee J.K., Won J.S., Singh A.K. and Singh I. (2005) Adenosine kinase inhibitor attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neuropharmacology* **48**, 151-160.
- Lee F.S. and Chao M.V. (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3555-3560.
- Leitges M., Sanz L., Martin P., Duran A., Braun U., Garcia J.F., Camacho F., Diaz-Meco M.T., Rennert P.D. and Moscat J. (2001) Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol. Cell* **8**, 771-780.
- Li X.X., Normura T., Aihara H. and Nishizaki T. (2001) Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci.* **68**, 1343-1350.
- Lopes L.V., Cunha R.A., Kull B., Fredholm B.B. and Ribeiro J.A. (2002) Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* **112**, 319-329.
- Lust J.A., Donovan K.A., Kline M.P., Greipp P.R., Kyle R.A. and Maihle N.J. (1992) Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96-100.

- Luttrell L.M., Ferguson S.S., Daaka Y., Miller W.E., Maudsley S., Della Rocca G.J., Lin F., Kawakatsu H., Owada K., Luttrell D.K., Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- Madi L., Cohen S., Ochayin A., Bar-Yehuda S., Barer F. and Fishman P. (2007) Overexpression of A3 adenosine receptor in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: involvement of nuclear factor-kappaB in mediating receptor level. *J. Rheumatol.* **34**, 20-26.
- Mahan L.C., McVittie L.D., Smyk-Randall E.M., Nakata H., Monsma F.J.Jr., Gerfer C.R. and Sibley D.R. (1991) Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **40**, 1-7.
- Malek S., Chen Y., Huxford T. and Ghosh G. (2001) I kappa B beta, but not I kappa B alpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappa B dimers by masking both NF-kappa B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 45225-45235. (fora de ordem)
- Martins R.A. and Pearson R.A. (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* **4**, 37-60.
- Matsui K., Hosoi N. and Tachibana M. (1999) Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J. Neurosci.* **15**, 6755-6766.
- May M.J. and Ghosh S. (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* **19**, 80-88.
- Mejia-Garcia T.A. and Paes-de-Carvalho R. (2008) Inibidores da síntese de proteínas induzem produção de óxido nítrico e fosforilação das cinases Akt e ERK 1/2. *I Congresso IBRO-LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica.*

- Melani A., Cipriani S., Vannucchi M.G., Nosi D., Donati C., Bruni P., Giovannini M.G. and Pedata F. (2009) Selective adenosine A2a receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia. *Brain* **132**, 1480-1495.
- Mendonça Torres P.M. and de Araújo E.G. (2001) Interleukin-6 increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. *J. Neuroimmunol.* **117**, 43-50.
- Molday R.S. and Molday L.L. (1998) Molecular properties of the cGMP-gated channel of rod photoreceptors. *Vision Res.* **38**, 1315-1323.
- Morello S., Ito K., Yamamura S., Lee K.Y., Jazrawi E., Desouza P., Barnes P., Cicalla C. and Adcock I.M. (2006) IL-1 beta and TNF-alpha regulation of the adenosine receptor (A2A) expression: differential requirement for NF-kappa B binding to the proximal promoter. *J. Immunol.* **177**, 7173-7183.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Murphree L.J., Sullivan G.W., Marshall M.A. and Linden J. (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem.* **391**, 575-580.
- Nakajima K., Kikuchi Y., Ikoma E., Honda S., Ishikawa M., Liu Y. and Kohsaka S. (1998) Neurotrophins regulate the function of cultured microglia. *Glia* **24**, 272-289.
- Naumann M. and Scheidereit C. (1994) Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* **13**, 4597-4607.
- Newman E. and Reichenbach A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* **19**, 307-312.

- Newman EA and Zahs K.R. (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.* **18**, 4022-4028.
- Nie Z., Mei Y., Ford M., Rybak L., Marcuzzi A., Ren H., Stiles G.L. and Ramkumar V. (1998) Oxidative stress increases A1 adenosine receptor expression by activating nuclear factor kappa B. *Mol. Pharmacol.* **53**, 663-669.
- Offermanns S. and Simon M.I. (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **270**, 15175-15180.
- Olah M.E., Ren H. and Stiles G.L. (1995) Adenosine receptors: protein and gene structure. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **329**, 135-150.
- Othman T., Yan H. and Rivkees S.A. (2003) Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia* **44**, 166-172.
- Paes-de-Carvalho R., Dias B. V., Martins R. A., Pereira M. R., Portugal C. C. and Lanfredi C. (2005) Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem. Int.* **6**, 441-451.
- Paes-de-Carvalho R., Maia G. A. and Ferreira J. M. (2003) Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. *Neurochem. Res.* **28**, 1583-1590.
- Paes-de-Carvalho R., de Mattos J.C. (1996) Development of nitric oxide synthase in the avian retina. *Rev. Bras. Biol.* **56**, 145-152.
- Paes-de-Carvalho R., Braas K. M., Adler R. and Snyder S. H. (1992) Developmental regulation of adenosine A1 receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina. *Develop. Brain Res.* **70**, 87-95.

- Paes-de-Carvalho R. (1990) Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina. *J. Neurosci. Res.* **25**, 236-242.
- Paes-de-Carvalho R., Braas K. M., Snyder S. H. and Adler R. (1990) Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake, and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* **55**, 1603-1611.
- Paes-de-Carvalho R. and de Mello F. G. (1985) Expression of A1 adenosine receptor modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* **44**, 845-851.
- Paes-de-Carvalho R. and de Mello F. G. (1982) Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* **38**, 493-500.
- Pak M.A., Haas H.L., Decking U.K. and Schrader J. (1994) Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. *Neuropharmacology* **33**, 1049-1053.
- Palomba L., Persichini T., Mazzone V., Colasanti M. and Cantoni O. (2004) Inhibition of nitric-oxide synthase-I (NOS-I)-dependent nitric oxide production by lipopolysaccharide plus interferon-gamma is mediated by arachidonic acid. Effects on NFkappaB activation and late inducible NOS expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 29895-29901.
- Pereira M.R., Hang, V.R., Vardiero, E., de Mello, F.G. and Paes-de-Carvalho R. (2010) Modulation of A1 adenosine receptor expression by cell aggregation and long-term activation of A2a receptors in cultures of avian retinal cells: Involvement of the cyclic AMP/PKA pathway. *J. Neurochem.*  
Accepted Article Online: Feb 15.

- Pereira, M.R., Ferreira J.M. and Paes-de-Carvalho R. (2008) Regulação da expressão do receptor A1 de adenosina em culturas de retina de embrião de galinha. *I Congresso IBRO-LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica*.
- Pierce K.D., Furlong T.J., Selbie L.A. and Shine J. (1992) Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 86-93.
- Pootanakit K. and Brunken W.J. (2001) Identification of 5-HT(3A) and 5-HT(3B) receptor subunits in mammalian retinae: potential pre-synaptic modulators of photoreceptors. *Brain Res.* **896**, 77-85.
- Prabhakar N.R. and Kumar G.K. (2004) Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. *Biol. Chem.* **385**, 217-221.
- Quintanilla R.A., Orellana D.I., González-Billault C. and Maccioni R.B. (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* **295**, 245-257.
- Ramkumar V., Whitworth C.A., Pingle S.C., Hughes L.F. and Rybak L.P. (2004) Noise induces A1 adenosine receptor expression in the chinchilla cochlea. *Hear Res.* **188**, 47-56.
- Ramos J.W. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2707-2719.
- Ray C.J. and Marshall J.M. (2006) The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J. Physiol.* **570**, 85-96.
- Rebola N., Rodrigues R.J., Oliveira C.R. and Cunha R.A. (2005) Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochem. Int.* **47**, 317-325.



- Rebola N., Oliveira C.R. and Cunha R.A. (2002) Transducing system operated by adenosine A(2A) receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **454**, 31-38.
- Ribeiro J. A., Sebastião A. M. and de Mendonça A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. *Pog. Neurobiol.* **68**, 377-392.
- Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E. and Young J.D. (1997) Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am. J. Physiol.* **272**, C707-714.
- Rodrigues A.S., Silva I.L.A., Ferreira L.R.L. and Paes-de-Carvalho R. (2008) Adenosine modulates ERK activity in cultures of avian retinal glial cells: involvement of A1 receptors, PKC and Src kinase. *I Congresso IBRO-LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica.*
- Rodrigues A.S., Machado A.C.M., Ferreira J.M. and Paes-de-Carvalho P. (2008) Modulation of adenosine uptake and release by inhibitors of ERK1/2 in cultures of avian retinal cells. *I Congresso IBRO-LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica.*
- Rodrigues R.J., Alfaro T.M., Rebola N., Oliveira C.R. and Cunha R.A. (2005) Co-localization and functional interaction between adenosine A(2A) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J. Neurochem.* **92**, 433-441.
- Rodriguez M.S., Thompson J., Hay R.T. and Dargemont C. (1999) Nuclear retention of I $\kappa$ B $\alpha$  protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor  $\kappa$ B transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 9108-9115.

- Rose-John S., Scheller J., Elson G. and Jones S.A. (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 227-236.
- Rudolph D., Yeh W.C., Wakeham A., Rudolph B., Nallainathan D., Potter J., Elia A.J., Mak T.W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes* **14**, 854-862.
- Russell J.M., Stephenson G.S., Yellowley C.E. and Benton H.P. (2007) Adenosine inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion by the osteoblastic cell line MG-63. *Calcif. Tissue Int.* **81**, 316-326.
- Sachdev S., Hoffmann A. and Hannink M. (1998) Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2524-2534.
- Santos P.F., Santos M.S., Carvalho A.P. and Duarte C.B. (1998) Modulation of [3H]acetylcholine release from cultured amacrine-like neurons by adenosine A1 receptors. *J. Neurochem.* **71**, 1086-1094.
- Sato A., Terata K., Miura H., Toyama K., Loberiza F.R.Jr., Hatoum O.A., Saito T., Sakuma I. and Gutterman D.D. (2005) Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, 1633-1640.
- Saura J., Angulo E., Ejarque A., Casado V., Tusell J.M., Moratalla R., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Lluís C., Franco R. and Serratosa J. (2005) Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J. Neurochem.* **95**, 919-929.

- Schlosshauer B., Grauer D., Dütting D. and Vanselow J. (1991) Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development*. **111**, 789-799.
- Schulte G. and Fredholm B.B. (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **15**, 813-827.
- Schwabe R.F. and Brenner D.A. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G204-211.
- Schwaninger M., Nehe M., Viegas E., Schneider A. and Spranger M. (1997) Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J. Neurochem.* **69**, 1145-1150.
- Sebastião A.M. and Ribeiro J.A. (1996) Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **48**, 167-189.
- Sen R. and Baltimore D. (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928.
- Sinke A.P., Jayakumar A.R., Panickar K.S., Moriyama M., Reddy P.V. and Norenberg M.D. (2008) NFkappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J. Neurochem.* **106**, 2302-2311.
- Socodato R.E., Magalhães C.R. and Paes-de-Carvalho R. (2009) Glutamate and nitric oxide modulate ERK and CREB phosphorylation in the avian retina: evidence for direct signaling from neurons to Müller glial cells. *J. Neurochem.* **108**, 417-429.
- Stehle J.H., Rivkees S.A., Lee J.J., Weaver D.R., Deeds J.D. and Reppert S.M. (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* **6**, 384-393.

- St Hilaire C., Carroll S.H., Chen H. and Ravid K. (2009) Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *J. Cell Physiol.* **218**, 35-44.
- Stork P.J. and Schmitt J.M. (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**, 258-266.
- Sun Y., Wu F., Sun F. and Huang P. (2008) Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. *J. Immunol.* **180**, 4173-4181.
- Tachibana M. and Okada T. (1997) Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.* **11**, 2199-22208.
- Tang C., Cao X. and Wang D. (2002) Effects of nerve growth factor on neuronal nitric oxide production after spinal cord injury in rats. *Chin J. Traumatol* **5**, 165-168.
- Takahashi-Tezuka M., Yoshida Y., Fukada T., Ohtani T., Yamanaka Y., Nishida K., Nakajima K., Hibi M. and Hirano T. (1998) Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4109-4117.
- Tam W.F. and Sen R. (2001) I $\kappa$ B family members function by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **276**, 7701-7704.
- Tetzlaff W., Schubert P. and Kreutzberg G.W. (1987) Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* **21**, 869-875.
- Thippeswamy T. and Morris R. (1997) Nerve growth factor inhibits the expression of nitric oxide synthase in neurons in dissociated cultures of rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Lett.* **230**, 9-12.

- Thorn J.A. and Jarvis S.M. (1996) Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* **27**, 613-620.
- Turpin P., Hay R.T. and Dargemont C. (1999) Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 6804-6812.
- Van Calcker D., Müller M. and Hamprecht B. (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **33**, 999-1005.
- Van der Graaf P.H., Van Schaick E.A., Visser S.A., de Greef H.J., Ijzerman A.P. and Danhof M. (1999) Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antilipolytic effects of adenosine A(1) receptor agonists in rats: prediction of tissue-dependent efficacy in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 701-109.
- Vardiero E., Pereira, M.R. and Paes-de-Carvalho (2009) Expressão do receptor A2a de adenosina durante o desenvolvimento da retina. *XXIV Reunião Anual da Fesbe*.
- Vazquez J.F., Clement H.W., Sommer O., Schulz E. and van Calcker D. (2008) Local stimulation of the adenosine A2B receptors induces an increased release of IL-6 in mouse striatum: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* **105**, 904-909.
- Ventura A.L. and de Mello F.G. (1990) D1 dopamine receptors in neurite regions of embryonic and differentiated retina are highly coupled to adenylate cyclase in the embryonic but not in the mature tissue. *Brain Res.* **530**, 301-308.
- Viatour P., Merville M.P., Bours V. and Chariot A. (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 43-52.

- Vogel Z., Daniels M.P. and Nirenberg M. (1976) Synapse and acetylcholine receptor synthesis by neurons dissociated from retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2370-2374.
- Wakade T.D., Palmer K.C., McCauley R., Przywara D.A. and Wakade A.R. (1995) Adenosine-induced apoptosis in chick embryonic sympathetic neurons: a new physiological role for adenosine. *J. Physiol.* **488**, 123-138.
- Wang D., Westerheide S.D., Hanson J.L. and Baldwin A.S. Jr. (2000) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 32592-32597.
- Wässle H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 747-757.
- Wittendorp M.C., Boddeke H.W. and Biber K. (2004) Adenosine A3 receptor-induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia* **46**, 410-418.
- Wood K.W., Sarnecki C., Roberts T.M. and Blenis J. (1992) Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**, 1041-1050.
- Woods C.L. and Blazynski C. (1991) Characterization of adenosine A1-receptor binding sites in bovine retinal membranes. *Exp. Eye Res.* **53**, 325-331.
- Xiao G., Harhaj E.W. and Sun S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* **7**, 401-409.
- Yamamoto Y. and Gaynor R.B. (2004) I kappa B kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 72-79.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J. and Israël A. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappa B kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231-1240.

- Young R.W. and Bok D. (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* **42**, 392-403.
- Zhong H., Belardinelli L., Maa T. and Zeng D. (2005) Synergy between A2b adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 2-8.
- Zhong H., May M.J., Jimi E. and Ghosh S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* **9**, 625-636.
- Zhong H., Voll R.E. and Ghosh S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* **1**, 661-671.
- Zhong H., SuYang H., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Ghosh S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* **89**, 413-424.
- Zhou Q.Y., Li C., Olah M.E., Johnson R.A., Stiles G.L. and Civelli O. (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7432-7436.
- Zimmermann H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 299-309.

# **Modulation of A1 adenosine receptor expression by cell aggregation and long-term activation of A2a receptors in cultures of avian retinal cells: Involvement of the cyclic AMP/PKA pathway**

**Mariana R. Pereira\*, Vanusa R. Hang\*, Eliza Vardiero\*, Fernando G. de Mello<sup>#</sup> and Roberto Paes-de-Carvalho\***

\*Department of Neurobiology and Program of Neurosciences, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil, and

<sup>#</sup>Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence to:

Roberto Paes-de-Carvalho  
Departamento de Neurobiologia  
Instituto de Biologia  
Universidade Federal Fluminense  
Caixa Postal 100180  
Centro, Niterói,  
RJ 24001-970

Brasil

Tel: (55-21) 2629-2263  
Fax: (55-21) 2629-2268  
Email: robpaes@vm.uff.br

Abbreviations: CCPA, 2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; CGS 21680, 2-p-(carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxyaminoadenosine hydrochloride; CHA, N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine; CREB, cyclic AMP-responsive element binding protein; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; DPMA, N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylphenyl)-ethyl]adenosine; ERK, extracellular-regulated kinase; H89, N-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide; ZM 241385, 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl{1,2,4}-triazolo{2,3a}-{1,3,5}triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol; NBMPR, nitrobenzylthioinosine; NFκB, nuclear factor-kappa B; PKA, cyclic AMP-dependent protein kinase.

Keywords: purines; dopamine; neuronal development; chick; protein kinase A; receptor regulation.



## **Abstract**

The expression of A1 and A2a adenosine receptors is developmentally regulated in the chick retina, but little is known about the factors important for this regulation. Here we show that cell aggregation and cyclic AMP analogs promote a dramatic increase in A1 receptor expression. Importantly, a long-term stimulation of A2a receptors also promotes an increase of A1 receptor expression accompanied by a down-regulation of A2a receptors. Chick embryo retina cultures grown in the form of aggregates or dispersed cells accumulate cyclic AMP when stimulated with dopamine or the adenosine agonist 2-chloroadenosine. However, inhibition of dopamine-dependent cyclic AMP accumulation by 2-chloroadenosine was observed in aggregate cultures but not in dispersed cell cultures. Accordingly, A1 receptor binding sites were detected in aggregate cultures, but were low or absent from dispersed cell cultures. Interestingly, an increase of A1 binding sites was detected when dispersed cell cultures were treated for 5 days with permeable cyclic AMP analogs, the adenylyl cyclase activator forskolin or A2a receptor agonists. Although a significant amount of A1 receptor protein was detected in dispersed cell cultures by western blot or immunocytochemistry, the long-term stimulation of A2a receptors also promoted an increase of the A1 receptor protein and mRNA, indicating that A2a receptors and cyclic AMP were regulating transcription and/or translation of A1 receptors. We also found an increase of A1 receptors in locations in or near the membrane after treatment with A2a agonist. The long-term stimulation of retinal explants with A2a agonist also promoted an increase of A1 receptor protein. The results indicate that A2a receptors and the cyclic AMP/PKA pathway are involved in the regulation of A1 receptor expression during retinal development.

## **Introduction**

Adenosine is an important neuromodulator in the CNS playing different functions such as regulation of neurotransmitter release, neuronal survival and differentiation (Cunha, 2001), and its actions are promoted by activation of G protein-coupled receptors. The activation of A1 and A3 adenosine receptors inhibits adenylyl cyclase while A2a and A2b receptors stimulate the enzyme (Ribeiro et al., 2002). The physiological actions of adenosine in the CNS include modulation of neurotransmitter release, neuroprotection and effects on ion channels (de Mendonça et al., 1995; Cunha, 2001). Inhibition of neurotransmitter release by A1 adenosine receptor activation appears to be mediated by the blockade of  $Ca^{2+}$  channels or activation of  $K^+$  channels and hyperpolarization (Gerber et al., 1989; de Mendonça et al., 1995; Mogul et al., 1993), while A2a adenosine receptor activity mediates neuroprotection and facilitation of neurotransmitter release (Ferreira and Paes-de-Carvalho, 2001; Jones et al., 1998).

A1 and A2a adenosine receptors are present in retinas of different species (Blazynski and Perez, 1991). Previous studies from our laboratory showed that adenosine is taken up and released from cultures of chick embryo retina cells. In purified cultures of retinal neurons, the uptake is saturable and can be blocked by NBMPR, an adenosine uptake blocker (Paes-de-Carvalho et al., 1990). In dispersed cell cultures containing neurons and glial cells, the release is stimulated by glutamate and involves NMDA and AMPA/kainate receptors, and is inhibited by NBMPR, an adenosine uptake blocker (Paes-de-Carvalho et al., 2005).

Adenosine-induced cyclic AMP accumulation is first observed in the intact 14 day-old chick embryo retina (E14). This response is maximal at E17 and decreases thereafter up to the post-hatching period when the response to adenosine is very low, suggesting that A2a receptors are developmentally-regulated during this period (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1982). The accumulation of cyclic AMP induced by adenosine is also observed in retinal dispersed cell cultures containing neurons and glial cells. In purified cultures of retinal neurons, a long-term

activation of A2a receptors blocks the cell death induced by glutamate or re-feeding cultures with fresh medium (Ferreira and Paes-de-Carvalho, 2001; Paes-de-Carvalho et al., 2003).

A1 receptors were also detected in the chick embryo retina where they promote inhibition of cyclic AMP accumulation induced by dopamine (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1985). However, the developmental pattern of this response is different from that observed for A2a receptors, as it is detected since E10. Binding sites for [<sup>3</sup>H] Cyclohexyladenosine (CHA), a selective A1 receptor agonist, are also detected at E10, peaking at E17 and decreasing thereafter (Paes-de-Carvalho, 1990). A1 receptors were shown to localize at both outer and inner plexiform layers in the chick retina after E10 and along development (Paes-de-Carvalho et al., 1992). Interestingly, although A1 receptor binding sites are still detected in post-hatching retinas, they are no longer able to regulate the cyclic AMP accumulation induced by dopamine at this period. However, stimulation of adenylyl cyclase with forskolin can still be regulated by A1 receptor agonists at this period, suggesting that the receptors are also coupled to the enzyme after hatching (Paes-de-Carvalho, 1990).

In the present work we have studied the expression of A1 adenosine receptors in cultures from the chick embryo retina. The results show first that A1 receptors and receptor-mediated inhibition of dopamine-dependent cyclic AMP accumulation are undetectable in dispersed cell cultures but present in aggregate cultures at the same developmental stage. The long-term activation of A2a receptors already expressed in the dispersed cell cultures promotes a dramatic increase of the A1 receptor protein, [<sup>3</sup>H]DPCPX binding sites and A1 receptor mRNA. Moreover, a similar increase of A1 receptor protein is also observed in retina explants, supporting the hypothesis that the activation of A2a receptors via cyclic AMP can regulate A1 receptor expression in the retina.

## Materials and methods

### *Materials*

Fertilized White Leghorn chicken eggs were obtained from a local hatchery. Adenosine deaminase was purchased from Calbiochem (Los Angeles, CA, EUA). 8-Bromoadenosine-3'-5'-cyclic monophosphate (8 Br-cAMP), Sp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Sp cAMP), forskolin and N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide (H89) were from Biomol (Plymouth Meeting, PA, EUA). N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine (CHA), 2-p-(carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxyaminoadenosine hydrochloride (CGS 21680), N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylphenyl)-ethyl]adenosine (DPMA), 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (RO20-1724), anti-actin antibody, penicillin, streptomycin, glutamine, bovine serum albumin (BSA), Triton X-100 and dimethyl sulphoxide (DMSO) were from Sigma/RBI (St Louis, MO, EUA). Anti-A2a adenosine receptor antibody, anti-A1 adenosine receptor antibody and control peptide for anti-A1 antibody were from Chemicon International (CA, EUA). [<sup>3</sup>H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine ([<sup>3</sup>H]DPCPX), 130 Ci/mmol, anti-rabbit secondary antibody, glycine, SDS, Tris, acrylamide PAGE, N-methylene-bis-acrylamide, mercaptoethanol, hyperfilm, ECL kit, first-strand cDNA synthesis kit, DNase I, DEPC-treated water were purchased from Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, UK). [<sup>3</sup>H]-2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine ([<sup>3</sup>H]CCPA), 30 Ci/mmol, was from PerkinElmer (Boston, MA, EUA). Eagle's basal medium (BME), trypsin and fetal calf serum were from GIBCO (Grand Island, NY, EUA). DAPI was a gift from Dr. Ana Lúcia M. Ventura (Fluminense Federal University, Niterói, Brazil) and was purchased from Sigma/RBI (St Louis, MO, EUA). Mouse monoclonal 2M6 antibody was kindly supplied by B. Schlosshauer (NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Markwiesenstr. 55, D-72770 Reutlingen, Germany). 4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazolo-5-yl-amino]ethyl)phenol (ZM 241385) was a gift from Dr. Rodrigo A. Cunha (Coimbra

University, Coimbra, Portugal) and was purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, EUA). Trizol reagent was supplied from Invitrogen Corporation (CA, EUA). Anti-Erk-T antibody was from Cell Signaling (Boston, MA, EUA). Fluorescent antibodies, mouse and rabbit secondary coupled to Alexa Fluor 488 and mouse and rabbit secondary coupled to Alexa Fluor 568 were from Nanoprobes Incorporated (NY, EUA). All other reagents were of analytical grade.

#### *Preparation of mixed cultures of retinal neurons*

Dispersed cell cultures of chick retina cells were prepared as previously described (de Mello, 1978). Briefly, retinas from 8-days-old chick embryos (White Leghorn) were dissected from other ocular tissues, including the pigmented epithelium and digested with 0.2% trypsin, in calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution (CMF), for 20 min at 37°C. The cells were suspended in BME supplemented with 3% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and glutamine (2 mM) and seeded in 40 mm or 16 wells tissue culture plastic dishes in a density of  $2 \times 10^4$  cells/mm<sup>2</sup>. The cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed after 1 day in culture (C1) and every 48 hours. The experiments were performed at C6.

#### *Preparation of aggregate cultures of retinal neurons*

Briefly, retinas from 8-days-old chick embryos were dissected from other ocular tissues and digested with 0.2% trypsin, in calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution (CMF) for 20 min at 37°C. The cells were suspended in BME supplemented with 3% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and glutamine (2 mM), seeded in Erlenmeyer flasks and maintained in a shaker bath at 80 rotations per minute at 37°C in a humidified incubator with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed after 1 day in culture (C1) and every 48 hours. The experiments were performed at C6.

#### *Preparation of retinal explants*

Briefly, retinas from 8-day-old chick embryos were dissected from other ocular tissues in calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution (CMF) and transferred to Erlenmeyer flasks containing BME supplemented with 3% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and glutamine (2 mM). Retinal explants were maintained in a shaker bath at 80 rotations per minute at 37°C in a humidified incubator with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. The medium containing or not DPMA was changed after 1 day in culture (C1) and the experiments were performed at C3.

#### *Long-term drug treatment*

For long-term incubations, the drugs (Sp cAMP, 8 Br-cAMP, forskolin, DPMA, ZM 241385, H89, anisomycin, CGS 21680) were added directly to the medium after re-feeding the cultures at C1. The cultures were also re-fed at C3 and the drugs were re-supplied at this stage. The experiments were performed at C6. When ZM 241385, H89 or anisomycin were tested, they were added 30 min before DPMA.

#### *Cyclic AMP assay*

Cultures at C6 were washed twice and incubated with BME supplemented with 20 mM Hepes buffer, 0.5 mM RO20-1724, 0.1 unit/ml adenosine deaminase, 0.1 mM pargyline and 0.1 mM ascorbate. After 10 minutes of incubation at 37°C, drugs were added to the medium and the cultures further incubated for 10 minutes at 37°C. The incubation was stopped with 5% trichloroacetic acid and processed for cyclic AMP separation and assay as described by Matzuzawa and Nirenberg (1975) and Gilman (1970). The protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard.

#### *Binding assays in homogenates*

Cells were homogenized in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) with a Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at 15000g for 40 min at 4°C. The pellet was resuspended and

incubated with adenosine deaminase (2 U/mL) for 30 min at 37°C and centrifuged at 15000g for 15 min at 4°C. The final pellet was resuspended in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) and stored at – 70°C until use. Homogenates containing 0.1 mg protein were incubated for 1 hour at room temperature in a final volume of 100 µL containing 50 mM Tris-HCl and [<sup>3</sup>H]DPCPX 5 nM or [<sup>3</sup>H]CCPA 10 nM. Specific binding was calculated as total binding less non-specific binding in the presence of 100 µM unlabeled CHA. The incubations were terminated by addition of iced Tris-HCl and rapid filtration through glass fiber filters. The filters were rinsed twice with Tris-HCl buffer and radioactivity was determined by scintillation spectroscopy. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951).

#### *Binding assays in living cells*

Before the experiments, the medium was removed and the wells rinsed twice with Hank's Balanced Salt Solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Hepes, 4 mM glucose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Briefly, cells were incubated, in the presence of adenosine deaminase (1 U/mL), with 5 nM [<sup>3</sup>H]DPCPX for 1 hour at 37°C. Specific binding was calculated as total binding less non-specific binding in the presence of 100 µM unlabeled CHA. After the incubation, the cells were washed twice with Hank's solution and lysed with water. The radioactivity was determined by scintillation spectroscopy. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951).

#### *Western Blot*

Briefly, the cells were scraped off from the dishes in sample buffer and the material boiled for 10 min. Total amount of protein in each sample was determined using Bradford reagent (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as standard. Samples containing 60 µg protein were submitted to 10% SDS-PAGE gel electrophoresis and the proteins transferred to PVDF membranes which were incubated overnight with anti-A2a adenosine receptor antibody (1:2500) or anti-A1 adenosine receptor (1:100), washed, incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (A2a) or 1:500 (A1) and revealed by the ECL chemiluminescence. To

load control, after revelation, membranes were washed in TBS (20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.6) and incubated with glycine 0.2 M (pH 2.2) to remove primary and secondary antibodies. Thus, membranes were incubated overnight with anti-ERK 1/2 antibody (1:1000) or anti-actin (1:2000), washed, incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (ERK-T) or 1:2000 (actin) and revealed by the ECL chemiluminescence. In experiments using the control peptide, anti-A1 antibody was incubated with control peptide (1:10) for 2 hours at room temperature before incubation with membranes. Quantitative analysis of blots was performed by scanning images and using the computer program Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

#### *RT-PCR*

Total RNA of cultured cells was extracted using Trizol reagent, according to the protocol of the manufacturer. Extracted RNA samples were treated for 10 minutes at 37°C with RNase-free DNase I 0.5 U/μg of RNA. First-strand synthesis of cDNA was performed in a solution containing RNA, reverse transcriptase, random hexamers and DTT for 1 hour at 37°C. The resulting cDNA was amplified in a PCR reaction medium containing specific oligonucleotides, dNTPs, Taq polymerase and MgCl<sub>2</sub>. After 4 min of denaturation at 94°C, reaction tubes were submitted to 35 cycles of 1 min at 94°C (denaturation), 1 min at 60°C (annealing), and 1 min at 72°C (extension), followed by a final extension of 5 min at 72°C. Specific primer sequences, corresponding base sites, and size of PCR products to A1 adenosine receptor were as follows: (GenBank sequence no S78192), 5'-CTTCTTCGTCTGGGTCCTG-3' (base position 1032) and 5'-ATCTGCAGGAAGGCTGTCC-3' (base position 1367) having a PCR product of 344 bp. Specific primer sequences to L27, ribosomal protein used in all PCR experiments as an internal control (GenBank sequence no X56852) were as follows: 5'-AAGCCGGGGAAGGTGGTG-3' (base position 42) and 5'-GGGTGGGCATCAGGTGGT-3' (base position 276), amplifying a 235 bp.



### *Immunocytochemistry*

To perform these experiments, cells were seeded on coverslips. At C4 or C6, cells in culture were fixed with 1% paraformaldehyde for 1 hour and incubated in a solution containing 3% fetal calf serum, 3% BSA and 1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour at room temperature. After the block, cells were incubated with anti-A2a adenosine receptor antibody (1:500) or anti-A1 adenosine receptor antibody (1:100) and maintained at 4°C overnight. Then, coverslips were washed with PBS and incubated with a rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor 568 or 488 (1:200) for 1 hour and 30 minutes at room temperature. Cells were washed with PBS and incubated with 2M6 antibody (1:200), at 4°C overnight. After, cells were washed and incubated with a mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 or 568 (1:200) for 1 hour and 30 minutes at room temperature. Coverslips were washed with PBS and incubated with DAPI (1:1000) for 30 seconds. Then, the coverslips were mounted and cells visualized using a fluorescence microscope.

### *Statistics*

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni or Newman-Keuls post-test using the software Graphpad Prism.

## Results

### Expression of A1 receptors in retinal dispersed and aggregate cell cultures

Initial studies have demonstrated the presence of A1 adenosine receptors in the developing chick retina and that the activation of these receptors is able to modulate dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in this tissue (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1985; Paes-de-Carvalho, 1990). In order to study the modulation and differentiation of these receptors in culture, we performed experiments measuring cyclic AMP and A1 receptor levels in dispersed and aggregate cell cultures of chick retinal cells. Accumulation of cyclic AMP was observed in both types of culture stimulated by dopamine or 2-chloroadenosine, presumably by activation of D1 or A2a receptors, respectively (table 1). Interestingly, while the stimulation by 2-chloroadenosine was somewhat smaller in dispersed than in aggregate cell cultures, the stimulation by dopamine was very high in dispersed cell cultures and moderate in aggregate cultures at the same stage. As in the intact developing retina, accumulation of cyclic AMP stimulated by both dopamine and 2-chloroadenosine in aggregate cultures was not additive (data not shown), indicating the presence of inhibitory A1 receptors in these cultures (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1985). Comparing dispersed and aggregate cell cultures stimulated with dopamine and increasing concentrations of 2-chloroadenosine (and discounting the accumulation of cyclic AMP induced by 2-chloroadenosine alone), we found that the adenosine agonist was able to promote an inhibition of cyclic AMP accumulation induced by dopamine in aggregate cultures but not in dispersed cell cultures (figure 1A). This suggested that the A1 receptor expression or function was hindered in dispersed but not in aggregate cell cultures. To further clarify these findings, we performed binding studies using homogenates of both types of culture with the A1 agonist [<sup>3</sup>H]CCPA (10 nM). Accordingly, as can be observed in figure 1B, very low levels of A1 receptor binding sites were found in dispersed cell cultures, but approximately 3 times higher receptor levels were observed in aggregate cultures. Indeed, in many experiments no A1 receptor binding sites were

detected and the receptor levels appear to depend on the degree of cell dissociation and the formation of cell clumps in the dispersed cell cultures (not shown). These findings raised the possibility that the expression of A1 receptors are under the control of factors present in aggregate cultures or intact retina but not in dispersed cell cultures.

### **A1 receptor expression is regulated by cyclic AMP and A2a receptor stimulation**

In a search for factors that could be regulating the expression of A1 receptors in the dispersed cell cultures, we observed that the long-term incubation (5 days) of these cultures with permeable cyclic AMP analogs or the adenylyl cyclase activator forskolin promoted a drastic increase in the binding of [<sup>3</sup>H] DPCPX to A1 receptors (figure 2). This increase was observed either using homogenates (figure 2A) or live cells (figure 2B), suggesting an effect on the expression of A1 receptors.

Adenosine-dependent cyclic AMP accumulation is observed in the intact developing retina and in dispersed cell cultures of retinal cells (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1982) as well as in aggregate cultures (table 1). In order to directly show the expression of A2a receptors in the cultures, we have performed immunocytochemistry and western blot experiments (figure 3). A single and strong band was detected in the western blot using the anti-A2a receptor antibody (figure 3F). The immunocytochemistry using the same antibody revealed the presence of these receptors in neurons as well as in glial cells, as shown using double-labeling with anti 2M6, a specific Muller glia cell marker (figures 3B-E). Since we have shown that A2a receptors are expressed in the cultures and modulate cyclic AMP levels, we then asked the question if a selective A2a agonist would also be able to promote an increase of A1 receptor expression. As shown in figure 4, pre-incubation of retinal cultures with 100nM DPMA, an A2a-selective agonist, for 5 days, more than doubled [<sup>3</sup>H] DPCPX binding to A1 receptor sites. Incubation with the selective A2a receptor antagonist ZM 241385 (100nM) had no effect alone but completely blocked the effect of DPMA. To check the involvement of PKA, we have tested the effect of the

selective inhibitor H89 (5 $\mu$ M) and found that while this compound also had no effect alone, it completely abrogated the effect of DPMA (figure 4), strongly indicating that the observed increase of [<sup>3</sup>H] DPCPX binding was mediated by the cyclic AMP/PKA pathway.

### **A2a receptor stimulation promotes an increase of A1 receptor and a decrease of A2a receptor expression**

The increase of [<sup>3</sup>H] DPCPX binding observed after incubation with DPMA was also completely inhibited by anisomycin (figure 4), a protein translation blocker, indicating that the long-term activation of A2a receptors is promoting an increase of A1 receptor protein synthesis. This was further corroborated by western blot studies of A1 receptors. Although binding studies have revealed low levels of receptors in dispersed cell cultures, the A1 receptor protein was detected by western blot. Two bands were observed in both E8C6 cultures or in intact retina samples (figure 5A, panels 1 and 2, respectively), and the specificity of the antibody was tested using a control peptide (figure 5A, panel 3). The lower band with an apparent molecular weight of 42 KDa corresponds to the A1 receptor and is shown in all subsequent experiments. The results clearly show an increase of A1 receptor protein in cultures incubated with DPMA for 48 (C3) or 120 hours (C6) but not for 24 hours (C2) (figures 5B and C). Additionally, cultures treated for 5 days with the A2a agonist CGS 21680 (100nM) also showed an increase of A1 receptor density (figures 5D and E), corroborating that this effect is mediated by A2a receptor stimulation. Furthermore, a striking increase of mRNA for A1 receptors was also detected in DPMA-treated cultures (figure 6), strongly indicating that the increase of A1 receptor protein is preceded by an increase of receptor mRNA transcription.

In order to study the cellular localization of A1 receptors in the cultures and if any difference could be observed after treatment with DPMA, we performed immunocytochemistry studies using the anti A1 receptor antibody. Interestingly, A1 receptor immunoreactivity was found mostly in neurons and not in glial cells (figure 7), as opposed to what was found for A2a

receptors which were found in neurons and glial cells (figure 3). Treatment with 100nM DPMA for 5 days promoted an increase in neuronal labeling and in locations near the cell surface. These results suggest that stimulation of A2a receptors and increase of cyclic AMP levels promote an increase of A1 receptor expression and also an increase of receptor recruitment to the cell surface of neurons in the cultures.

A set of experiments were performed in order to answer the question if the treatment with DPMA for the period in which we found the increase of A1 receptors, was also leading to a decrease of A2a receptors. As can be observed in figures 8A and B, a striking decrease of A2a receptor protein was found after DPMA treatment. These data show that a concomitant decrease of A2a receptors and increase of A1 receptors are occurring when cultured retinal cells are chronically exposed to A2a receptor agonists.

Finally, retinal explants were prepared in order to investigate whether the regulation of A1 receptor expression by A2a receptor stimulation also occurs in an ex- vivo situation. Explants of E8 retinas were treated or not with DPMA for 48 hours. The results show that the chronic treatment with the A2a agonist promoted an increase in the expression of A1 receptor protein (figures 8C and D).

## **Discussion**

To understand the regulation of neurotransmitter receptor expression is of pivotal importance for the knowledge of CNS physiology and pathology as well as the role played by chemical signaling during CNS development. Recent studies on the mechanisms involved in the regulation of adenosine receptor expression have shed light on the participation of transcription factors such as NFkB, hypoxic-inducible factor 1 and CREB (for a review see St. Hilaire et al., 2009). The present work shows that cell aggregation and cAMP/PKA pathways regulate A1 receptor expression in cultured retinal cells. Importantly, the long-term activation of A2a adenosine receptors is also able to regulate A1 receptor expression in retinal cells, suggesting that the regulation of extracellular adenosine levels is a key factor controlling adenosine receptor expression.

### ***Cell aggregation***

Our results indicate a clear participation of cell aggregation on the expression and functionality of A1 adenosine receptors. The binding of [<sup>3</sup>H] CCPA or [<sup>3</sup>H] DPCPX to A1 receptors was low or inexistent in dispersed cell cultures. Accordingly, A1 receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation stimulated by dopamine was also very low in this type of culture. On the other hand, aggregate cultures display much higher levels of receptor binding as well as adenylyl cyclase inhibition. The reasons for these differences are presently unknown but are possibly related to the tissue organization inside the aggregates which is similar to the intact retina (Layer and Willbold, 1989). Several seminal studies have used these cultures as a model for cell developmental studies (Moscona, 1987) and some neurochemical differences between aggregate and dispersed cell cultures were found. One intriguing example is the glial enzyme glutamine synthetase which is inducible by cortisol in aggregate but not in dispersed retinal cell cultures (Vardimon et al., 1988). Also, the stable expression of the enzyme responsible for acetylcholine synthesis choline acetyl transferase in the retina is only observed in the intact tissue or in aggregated cell cultures (de Mello et al., 1990). These observations indicate that intimate cell

contact and/or controlled intercellular communication are important to define and stabilize specific phenotypes of the developing retina.

### ***Involvement of cyclic AMP/PKA***

Several studies have confirmed an important role for the cyclic AMP/PKA pathway in developmental processes in the CNS such as neuronal survival and differentiation (Franke et al., 2000; Li et al., 2000; Sanchez et al., 2001; Szatmari et al., 2007; Gakhar-Koppole et al., 2008; Monaghan et al., 2008). One interesting example is the one described by Meyer-Franke et al. (1998) showing a cyclic AMP and depolarization-dependent recruitment of neurotrophin TrkB receptors to the plasma membrane of retinal ganglion cells in culture. Another important study was performed by Thompson et al. (2000) showing that cyclic AMP and PKA regulate the expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in rat cerebellar granule neurons. These studies have prompted us to verify if cyclic AMP was involved in the regulation of A1 adenosine receptor expression in cultured retinal cells. We found that permeable cyclic AMP analogs or the adenylyl cyclase activator forskolin were able to promote dramatic increases in A1 receptor expression in retinal dispersed cell cultures, as measured by [<sup>3</sup>H] DPCPX binding, western blotting, RT-PCR and immunocytochemistry.

### ***Regulation of A1 receptor expression by A2a receptor activation***

Since cyclic AMP was clearly involved in the increase of A1 receptor binding, we went further asking the question whether the stimulation of A2a receptors, previously shown to promote cyclic AMP accumulation in the intact retina as well as in retinal cultures (Paes-de-Carvalho and de Mello, 1982), was also able to promote this effect. Interestingly, our immunocytochemical data showed the presence of A2a receptors in neurons as well as in glial cells in the dispersed cell cultures. The presence of these receptors in both cell types was previously shown in different CNS areas (Wardas, 2002). The incubation of cultures with the A2a-selective agonist DPMA also promoted very significant increases in [<sup>3</sup>H] DPCPX binding, an effect blocked by the selective A2a antagonist ZM 241385 and the PKA inhibitor H89. These data show that a long-term

activation of A2a receptors promotes an increase of A1 receptor binding and that this effect is mediated by the cyclic AMP/PKA pathway.

### ***Regulation of A1 receptor expression and recruitment to cell surface***

As mentioned above, the cyclic AMP/PKA pathway is involved in many phenomena in the mature as well as in the developing nervous system such as neuronal survival, migration, and differentiation (Franke et al., 2000; Li et al., 2000; Sanchez et al., 2001; Szatmari et al., 2007; Gakhar-Koppole et al., 2008; Monaghan et al., 2008). Many of these phenomena probably involve the transcription factor CREB which regulates the expression of many proteins including anti-apoptotic proteins and neurotrophins (Tao et al., 1998; Pugazhenti et al., 2000; Ciani et al., 2002; Obrietan et al., 2002). However, there is no compelling evidence that CREB is an important factor in the regulation of A1 adenosine receptor expression, although it appears to be involved in A2a and A3 receptor expression (St. Hilaire et al., 2008). On the other hand, putative transcription factor binding sites for NFκB are found in all adenosine receptor genes (St. Hilaire et al., 2008), and several reports showed that different agents and conditions can stimulate A1 receptor expression in a NFκB-dependent manner (Nie et al., 1998; Hammond et al., 2004; Jhaveri et al., 2007). Indeed, our preliminary results show that NFκB inhibitors blocked the increase of A1 receptor expression induced by A2a activation (data not shown). This indicates the existence of a linkage between the cAMP/PKA and the NFκB systems in the regulation of A1 adenosine receptor expression in our cultures.

Our results showing an increase of [<sup>3</sup>H] DPCPX binding after long-term incubation of cultures with cyclic AMP analogs in both retinal homogenates or alive cultured cells suggested that this effect was due to an increase of receptor expression and not only an increase in cell surface expression as shown for Trk receptors (Meyer-Franke et al., 1998). This was further corroborated by the finding that incubation with DPMA also promoted an increase of A1 receptor mRNA as well as of the receptor protein. However, although very few or none [<sup>3</sup>H] DPCPX binding sites have been detected in unstimulated cultures, western blot or immunocytochemistry



revealed the presence of A1 receptors in dispersed cell cultures under these conditions. Treatment of cells with the A2a agonists DPMA or CGS 21680 was able to promote a further increase in receptor density as detected by these methods. Furthermore, stimulation with DPMA appeared to increase the neuronal surface localization of A1 receptors, raising the possibility that stimulation of A2a receptors and increase of cyclic AMP levels also promote the recruitment of A1 receptors to the cell surface. Additional experiments would be necessary to investigate this process.

We have also performed experiments using retinal explants in order to determine if the regulation of A1 receptor expression by stimulation of A2a receptors was also occurring in an *ex vivo* situation. These experiments clearly have shown that this regulation is also observed in an *ex vivo* situation, strongly indicating that the same regulation is occurring *in vivo* during retinal development. Accordingly, initial experiments from our laboratory show that the injection of A2a agonists or antagonists *in ovo* is able to regulate A1 receptor expression in the chick embryo retina *in vivo* (R. Silva, M. R. Pereira, R. Paes-de-Carvalho and K.C. Calaza, unpublished observations).

#### ***Regulation of adenosine receptors expression: Implications on long-term treatments and on development***

One question that comes up from the present findings is why a long-term activation of A2a receptors triggers the expression and cell surface localization of A1 receptors. Our results show that DPMA promotes, together with the increase of A1 receptors, a decrease in the amount of A2a receptor protein, suggesting a possible relationship between the two phenomena, namely the down-regulation of A2a receptors and the up-regulation of A1 receptors. In a recent study, Castillo et al. (2008) found that hypoxia is able to modulate A1 and A2a receptor expression in C6 glioma cells. Interestingly, while A1 receptors were down-regulated, A2a receptors were up-regulated by hypoxia in a way dependent of extracellular adenosine levels and also on A1 receptor stimulation. These results together with the present results suggest a possible link between the expression of A1 and A2a receptors. Such a reciprocal regulation of adenosine receptor expression raises questions on what could be its possible mechanism, but probably involves the cyclic

AMP/PKA cascade. Further work is necessary to check if the down-regulation of A2a receptors in our cultures is inhibited by PKA blockers.

Previous work from our laboratory showed that a long-term treatment of purified neuronal cultures from the chick embryo retina with cyclic AMP analogs or adenosine A2a agonists, but not A1 agonists, promotes a large increase of cell survival either when the cultures were challenged with a fresh medium or with glutamate, conditions which promote a dramatic neuronal death in these cultures (Ferreira and Paes-de-Carvalho, 2001; Paes-de-Carvalho et al., 2003). However, many studies relate the neuroprotection by adenosine in different experimental paradigms to the activation of A1 receptors (reviewed in Schubert et al., 1997). Taken together with the present data, our results raise the possibility that the chronic activation of A2a receptors by adenosine in retinal purified neuronal cultures promotes an increase of A1 receptor expression and this increase is in fact the one involved in the neuroprotective action of the nucleoside.

Another important point is concerned to the cell type in which these adenosine receptor subtypes are localized. We found that A2a receptors are localized in neurons and glial cells whereas A1 receptors are localized only in neurons at our cultures. These cultures are enriched in cholinergic amacrine cells (Carvalho et al., 1998), suggesting that the observed increase of A1 receptor expression occurs in amacrine cells. However, the functional consequences of this effect are unknown. On the other hand, the increase of neuronal A1 receptor expression can be triggered by stimulation of A2a receptors in neurons, glial cells or in both cell types. The expression of A2a receptors by glial cells was already demonstrated in different CNS areas (reviewed by Daré et al., 2007) and the activation of these receptors probably produces many effects on these cells, including the secretion of trophic factors (Desfrere et al., 2007; Heese et al., 1997). Then, one possibility is that, while the activation of A2a receptors in neurons directly promotes the increase of A1 receptors in these cells, the activation of A2a receptors in glial cells promotes the release of factors which could indirectly produce the increase of A1 receptors in neurons. A direct transactivation of Trk receptors is also possible to occur after a chronic A2a receptor activation

(reviewed by Sebastião and Ribeiro, 2009). However, our recent preliminary results indicate that the effect of DPMA is not blocked by the Trk antagonist K252a (data not shown).

The findings presented in this paper also raise questions on what would be the results of long-term pharmacological treatments with A2a agonists, since many of the effects could actually be related to the increase of A1 receptors if this phenomenon is also found in other CNS areas. These possible side effects would demand for instance the use of A1 antagonists. On the other hand, the use of A2a agonists could be the elected form of treatment when a chronic stimulation of A1 receptors by endogenous adenosine is required.

Another intriguing question is how these adenosine receptor interactions are regulated during development. Adenosine transport seems to be a critical component to balance intra and extracellular concentrations, since it can be regulated by energy demands and neurotransmitters (Sweeney, 1996; Paes-de-Carvalho et al., 2005). Extracellular concentrations of adenosine could then be regulated in critical periods of development and in different locations. This could have consequences on the activation of receptors and finally their proportion in different neuronal and glial cell types. Further work is indeed necessary to unravel these possibilities.

## **Acknowledgments**

We acknowledge Ms. Luzeli R. de Assis for the technical assistance. This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPERJ and PRONEX/MCT. MRP, VRH and EV were recipients of undergraduate and graduate student fellowships from CNPq and CAPES. FGdM and RPC are research fellows from CNPq.

## References

- Blazynski C. and Perez M. T. (1991) Adenosine in vertebrate retina: localization, receptor characterization, and function. *Cell Mol. Neurobiol.* **11**, 463-484.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Carvalho A. L., Duarte C. B., Faro C. J., Carvalho A. P. and Pires E.V. (1998) Calcium influx through AMPA receptors and through calcium channels is regulated by protein kinase C in cultured retina amacrine-like cells. *J. Neurochem.* **70**, 2112-2119.
- Castillo C. A., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. and Martin M. (2008) Modulation of A1 and A2a receptors in C6 glioma cells during hypoxia: Involvement of endogenous adenosine. *J. Neurochem.* **105**, 2315-2329.
- Ciani E., Guidi S., Bartesaghi R. and Contestabile A. (2002) Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J. Neurochem.* **82**, 1282-1289.
- Cunha R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* **38**, 107-125.
- Daré E., Schulte G., Karovic O., Hammarberg C. and Fredholm B. B. (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol. Behav.* **92**, 5-20.
- de Mello F. G. (1978) The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J. Neurochem.* **31**, 1049-1053.
- de Mello F.G., de Mello M.C., Hudson R. and Klein W.L. (1990) Selective expression of factors preventing cholinergic dedifferentiation. *J. Neurochem.* **54**, 886-892.

- de Mendonça A., Sebatião A. M. and Ribeiro J. A. (1995) Inhibition of NMDA receptor mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport*. **30**, 1097-100.
- Desfrere L., Olivier P., Schwendimann L., Verney C. and Gressens P. (2007) Transient inhibition of astrocytogenesis in developing mouse brain following postnatal caffeine exposure. *Pediatr. Res.* **62**, 604-609.
- Ferreira J. M. and Paes-de-Carvalho R. (2001) Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* **900**, 169-176.
- Franke B., Bayatti N. and Engele, J. (2000) Neurotrophins require distinct extracellular signals to promote the survival of CNS neurons in vitro. *Exp. Neurol.* **165**, 125-135.
- Gakhar-Koppole N., Bengtson C. P., Parlato R., Horsch K., Eckstein V. and Ciccolini F. (2008) Depolarization promotes GAD 65-mediated GABA synthesis by a post-translational mechanism in neural stem cell-derived neurons. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 269-283.
- Gerber U., Greene R. W., Haas H. L. and Stevens D. R. (1989) Characterization of inhibition mediated by adenosine in hippocampus of the rat in vitro. *J. Physiol.* **417**, 567-578.
- Gilman A. G. (1970) A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**, 305-312.
- Hammond L. C., Bonnet C., Kemp P. J., Yates, M. S. and Bowmer C. J. (2004) Chronic hypoxic up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 421-426.
- Heese K., Fiebich B. L., Bauer J. and Otten U. (1997) Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Neurosci. Lett.* **8**, 83-86.
- Jhaveri K. A., Reichensperger J., Toth L. A., Skino Y. and Ramkumar V. (2007) Reduced basal and lipopolysaccharide-stimulated adenosine A1 receptor expression in the brain of nuclear factor-kappaB p50<sup>-/-</sup> mice. *Neuroscience* **146**, 415-426.

- Jones P. A., Smith R. A. and Stones T. W. (1998) Protection against hippocampal kainite excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A2A receptor antagonist. *Brain Res.* **800**, 328-335.
- Layer P. G. and Willbold E. (1989) Embryonic chicken retinal cells can regenerate all retinal layers in vitro, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity. *Cell Tissue Res.* **258**, 233-242.
- Li M., Wang X., Meintzer M. K., Laessig T., Birnbaum M. J. and Heidenreich K. A. (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol. Cell Biol.* **20**, 9356-9363.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Matsuzawa H. and Nirenberg M. (1975) Receptor-mediated shifts in cGMP and cAMP levels in neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 3472-3476.
- Meyer-Franke A., Wilkinson G. A., Kruttgen A., Hu M., Munro E., Hanson M. G. Jr., Reichardt L. F. and Barres B. A. (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* **21**, 681-693.
- Mogul D. J., Adams M. E. and Fox A. P. (1993) Differential activation of adenosine receptors decrease N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* **10**, 327-334.
- Monaghan T. K., Mackenzie C. J., Plevin R. and Lutz E. M. (2008) PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J. Neurochem.* **104**, 74-88.
- Moscona A. A. (1987) Role of cell contact in phenotype stability and modification: Studies on retinal cells. *Am. Zoolog.* **27**, 137-144.

- Nie Z., Mei Y., Ford M., Rybak L., Marcuzzi A., Ren H., Stiles G. L. and Ramkumar V. (1998) Oxidative stress increases A1 adenosine receptor expression by activating nuclear factor kappa B. *Mol. Pharmacol.* **53**, 663-669.
- Obrietan K., Gao X. B. and Van Den Pol A. N. (2002) Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAP-CREB-dependent mechanism – a positive feedback circuit in developing neurons. *J. Neurophysiol.* **88**, 1005-1015.
- Paes-de-Carvalho R., Dias B. V., Martins R. A., Pereira M. R., Portugal C. C. and Lanfredi C. (2005) Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem. Int.* **6**, 441-451.
- Paes-de-Carvalho R., Maia G. A. and Ferreira J. M. (2003) Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. *Neurochem. Res.* **28**, 1583-1590.
- Paes-de-Carvalho R., Braas K. M., Adler R. and Snyder S. H. (1992) Developmental regulation of adenosine A1 receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina. *Develop. Brain Res.* **70**, 87-95.
- Paes-de-Carvalho R. (1990) Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina. *J. Neurosci. Res.* **25**, 236-242.
- Paes-de-Carvalho R., Braas K. M., Snyder S. H. and Adler R. (1990) Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake, and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* **55**, 1603-1611.
- Paes-de-Carvalho R. and de Mello F. G. (1985) Expression of A1 adenosine receptor modulating dopamine-dependent cyclic AMP accumulation in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* **44**, 845-851.
- Paes-de-Carvalho R. and de Mello F. G. (1982) Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* **38**, 493-500.



- Pugazhenth S., Nesterova A., Sable C., Heidenreich K. A., Boxer L. M., Heasley L. E. and Reusch J. E. (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 10761-10766.
- Ribeiro J. A., Sebastião A. M. and de Mendonça A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. *Pog. Neurobiol.* **68**, 377-392.
- Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S and Rudolphi K. (1997) Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann N Y Acad Sci.* **15**, 1-10.
- Sebastião A. M. and Ribeiro J. A. (2009) Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* **193**, 471-534.
- St Hilaire C., Carroll S. H., Chen H. and Ravid K. (2009) Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *J. Cell Physiol.* **218**, 35-44.
- Sweeney M. I. (1996) Adenosine release and uptake in cerebellar granule neurons both occur via an equilibrative nucleoside carrier that is modulated by G proteins. *J. Neurochem.* **67**, 81-88.
- Szatmari E., Kalita K. B., Kharebaya G. and Hetman M. (2007) Role of kinase suppressor of Ras-1 in neuronal survival signaling by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J. Neurosci.* **27**, 11389-11400.
- Tao X., Finkbeiner S., Arnold D. B., Shaywitz A. J. and Greenberg M. E. (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**, 709-726.
- Thompson C. L., Razzini G., Pollard S. and Stephenson F. A. (2000) Cyclic AMP-Mediated Regulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Subunit Expression in Mature Rat Cerebellar Granule Cells. *J. Neurochem.* **74**, 920-931.
- Vardimon L., Fox L. L., Degenstein L. and Moscona A. A. (1988) Cell contacts are required for induction by cortisol of glutamine synthetase gene transcription in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 5981-5985.

Wardas J. (2002) Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol. J. Pharmacol.* **54**, 313-326.

## Legends of figures

Figure 1: A) Inhibition of dopamine-dependent cyclic AMP accumulation induced by increasing concentrations of 2-chloroadenosine in aggregate or dispersed cell cultures. The results obtained as pmoles/mg protein were normalized to 100%. Basal, dopamine (100 $\mu$ M) and 2-chloroadenosine-stimulated levels (100 $\mu$ M) were respectively  $39.9 \pm 14.3$  (n=3),  $1,039.6 \pm 95.8$  (n=4) and  $128.2 \pm 1.4$  (n=2) pmoles/mg protein for dispersed cell cultures; and  $67.4 \pm 6.1$  (n=6),  $348.4 \pm 31.6$  and  $399.4 \pm 56.5$  pmoles/mg protein for aggregate cultures, respectively. The points represent the mean  $\pm$  SEM of four separate experiments (except for the points for  $10^{-3}$  M in dispersed cell cultures and  $10^{-5}$  M in aggregate cultures in which were performed two separate experiments) in which cyclic AMP measurements were performed in triplicate.

B) [ $^3$ H] CCPA binding to homogenates of dispersed or aggregate cell cultures of retinal cells. The cells were cultured for 6 days and incubated with 10nM [ $^3$ H] CCPA in presence or absence of 100 $\mu$ M CHA. The results obtained as fmoles/mg protein were normalized to 100% ( $7.8 \pm 4.2$  fmoles/mg protein) and represent the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments performed in triplicate. The asterisks indicate that the differences are significant ( $p < 0.001$ ) when compared to dispersed cell cultures.

Figure 2: [ $^3$ H] DPCPX binding in dispersed cell cultures treated or not with 8 Br-cAMP, Sp cAMP or forskolin. The cultures were treated with 100 $\mu$ M 8 Br-cAMP, 20  $\mu$ M Sp cAMP or 50  $\mu$ M forskolin from the first day of incubation (C1) up to C6. After washing, homogenates or cultures were incubated with 5nM [ $^3$ H] DPCPX in presence or absence to 100 $\mu$ M CHA. A) Binding to homogenates of cultures treated with Sp cAMP. B) Binding to living cells in cultures treated with 8 Br-cAMP, Sp cAMP or forskolin. The results obtained as fmoles/mg protein in cultures were normalized to 100% ( $7.7 \pm 7.7$  fmoles/mg protein in A and  $3.8 \pm 2.5$  fmoles/mg protein in B) and represent the mean  $\pm$  SEM of at least three separate experiments performed in triplicate. The asterisks indicate that the differences are significant ( $p < 0.001$ ) when compared to control cultures.

Figure 3: Immunocytochemistry of A2a receptors in dispersed cell cultures. A) Phase-contrast photomicrograph. B) Cell nuclei labeled with DAPI. C) Glia cells labeled with 2M6 antibody. D) A2a receptors labeled with red fluorescent antibody. E) Merging of red (A2a receptors) and green (2M6) fluorescence. The arrows indicate A2a receptors in glial cells and arrowheads indicate A2a receptors in neurons. F) Western blotting for A2a receptor in mixed cultures at C6. This experiment was repeated 4 times with similar results. The bars represent 10 $\mu$ m.

Figure 4: [<sup>3</sup>H] DPCPX binding to living cells in dispersed cell cultures of retinal cells treated or not with DPMA and/or ZM 241385, H89 or anisomycin. The cultures were treated with 100nM DPMA and/or 100nM ZM 241385, 5 μM H89 or 100nM anisomycin from C1 to C6 and then incubated with 5nM [<sup>3</sup>H] DPCPX in presence or absence of 100μM CHA. The results obtained as fmoles/mg protein were normalized to 100% (15,5 ± 7.4 fmoles/mg protein) and represent the mean ± SEM of at least three separate experiments assayed in triplicate. The asterisks indicate that the differences are significant (p < 0.001) when compared to control cultures.

Figure 5: (A) Immunoblots showing the presence of A1 receptor in E14 (1), dispersed cell cultures (2) and dispersed cell cultures incubated with control peptide for anti-A1 antibody (3). (B) Immunoblots for A1 receptors and total ERK (ERK-T) in dispersed cell cultures treated or not with 100nM DPMA from C1 to C2 (C2), C1 to C3 (C3) or C1 to C6 (C6) and processed for western blotting. C) Quantification of A1 receptors using total ERK (ERK-T) as control. D-E) Representative immunoblots and quantification of A1 receptor protein in cultures treated or not with 100nM CGS 21680 from C1 to C6. The results represent the mean ± SEM of at least three separate experiments. The asterisks indicate that the differences are significant (\* p < 0.05 and \*\*\* p < 0.001) when compared to control cultures.

Figure 6: A) RT-PCR in dispersed cell cultures of retinal cells treated or not with DPMA. Cultures were treated with 100nM DPMA from C1 to C6. A1 receptor mRNA bands correspond to 344 base pairs and L27 ribosomal protein mRNA bands correspond to 235 base pairs. B) Quantification of A1 receptor mRNA bands using L27 mRNA bands as control. The results represent the mean ± SEM of five separate experiments and the asterisks indicate that the differences are significant (p < 0.001) when compared to control cultures.

Figure 7: Immunocytochemistry for A1 receptors in dispersed cell cultures treated (left panels) or not (right panels) with 100nM DPMA from C1 to C6. A-B) Nomarsky-contrast photomicrograph. C-D) Cell nuclei labeled with DAPI. E-F) Glial cells labeled with 2M6 antibody (red). G-H) A1 receptors (green). I-J) Merging of fluorescence between A1 receptors (green) and 2M6-labeled glia cells (red). Note that A1 receptors are present in neurons but not in glial cells, and that the distribution of A1 receptors appears different in DPMA-treated neurons, with more receptors in the cell surface (arrows). These experiments were repeated 3 times with similar results. The bars represent 10 μm.

Figure 8: Effect of DPMA treatment on A2a receptor protein in dispersed cell cultures and on A1 receptor protein in retinal explants. A) Immunoblots for A2a receptors in cultures incubated in absence (control) or presence of 100nM DPMA from C1 to C6. Actin antibody was used as a loading control. B) Quantification of A2a receptors using actin as control. The results represent the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. The asterisks indicate that the differences are significant ( $p < 0.001$ ) when compared to control cultures. C) Immunoblots for A1 receptor in retinal explants treated or not with DPMA. Retinal explants were obtained from E8 embryos and treated with 100nM DPMA from C1 to C3. ERK-T antibody was used as loading control. D) Quantification of A1 receptors using ERK-T as control. The results represent the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. The asterisks indicate that the differences are significant ( $p < 0.05$ ) when compared to control retinal explants.

**Table 1: Effect of 2-chloroadenosine or dopamine on cyclic AMP levels of aggregate or dispersed cell cultures of chick embryo retina cells**

<b>Condition</b>	<b>Aggregate</b>	<b>Dispersed</b>
basal	59.1 ± 8.7 (3)	44.9 ± 6.9 (9)
2-chloroadenosine	348.4 ± 48.7 (6)	170.1 ± 16.6 (8)
dopamine	345.4 ± 17.5 (5)	1,183.9 ± 105.3 (12)

Cultures of 8-day-old chick embryo retinas were incubated for 6 days (E8C6), stimulated and processed for cyclic AMP measurement as described in Methods. The results are expressed in pmoles cyclic AMP/mg protein and the numbers in parenthesis represent the number of experiments performed in each case.

Figure 1

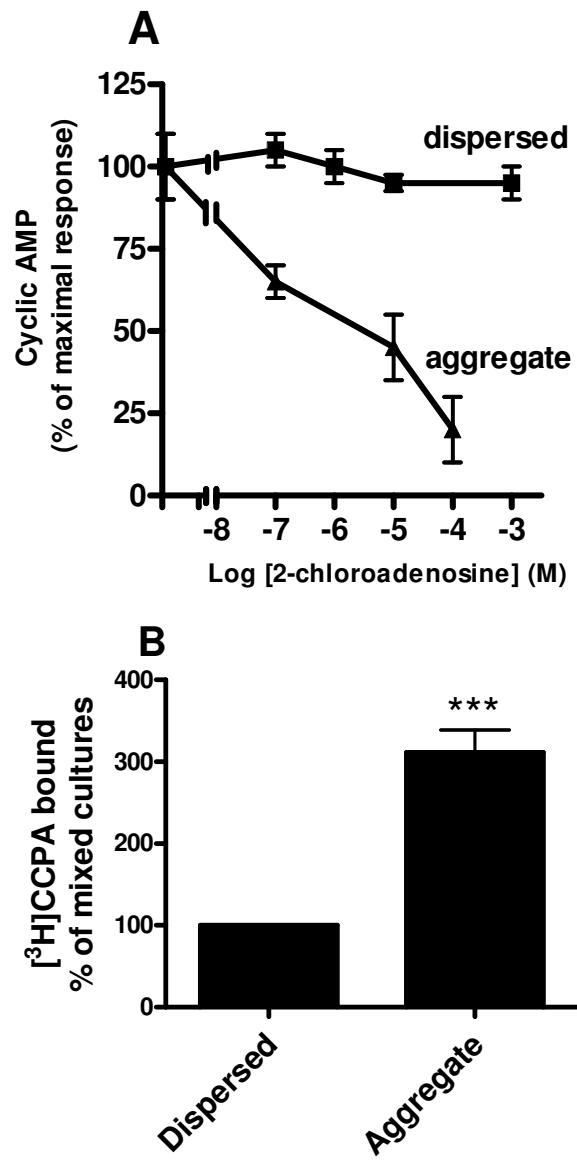


Figure 2

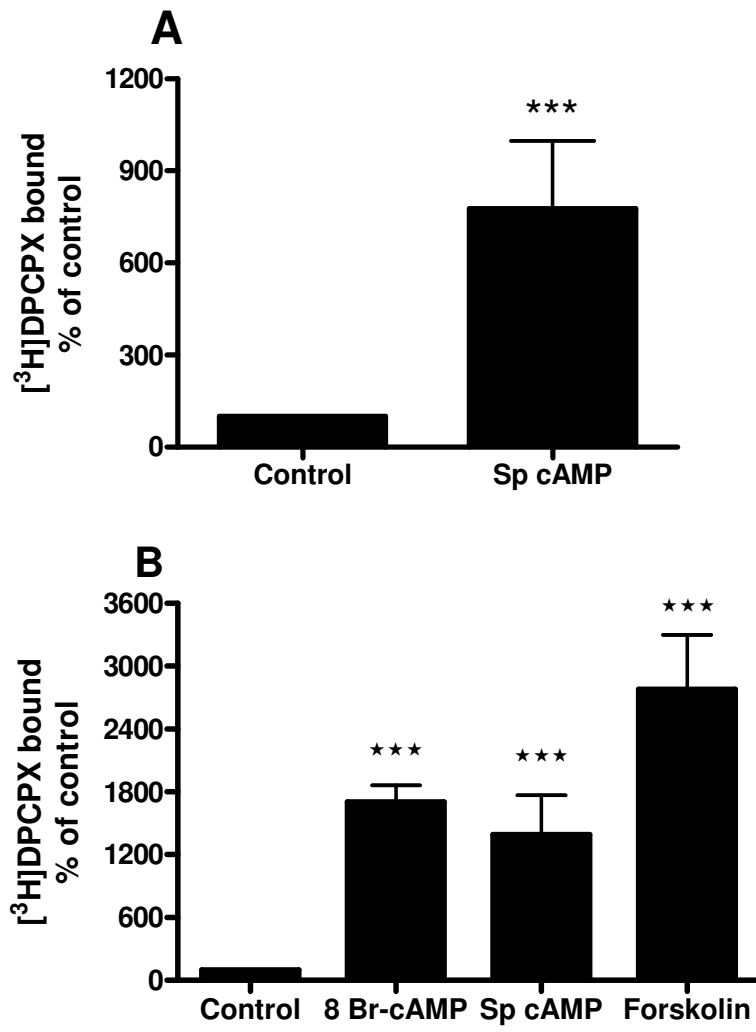




Figure 3...

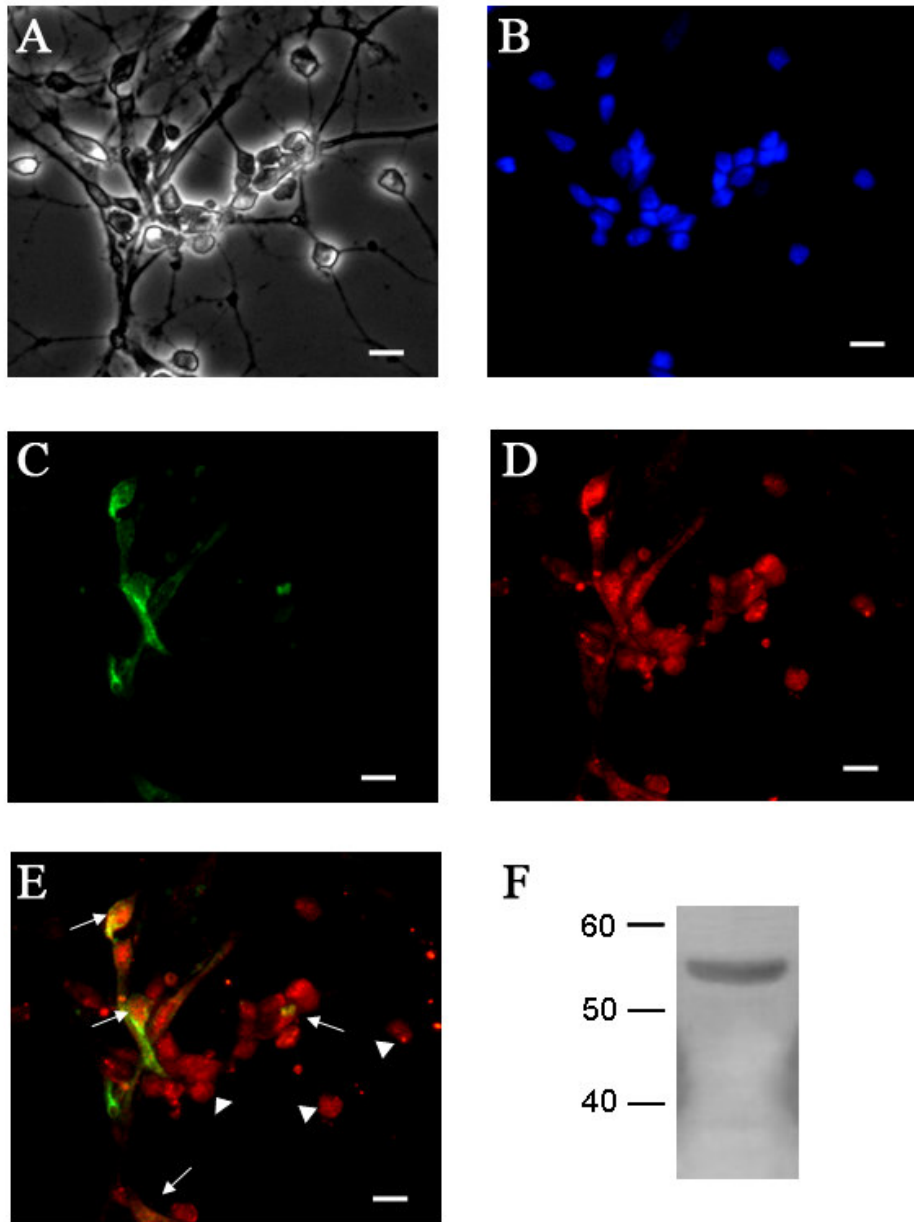


Figure 4

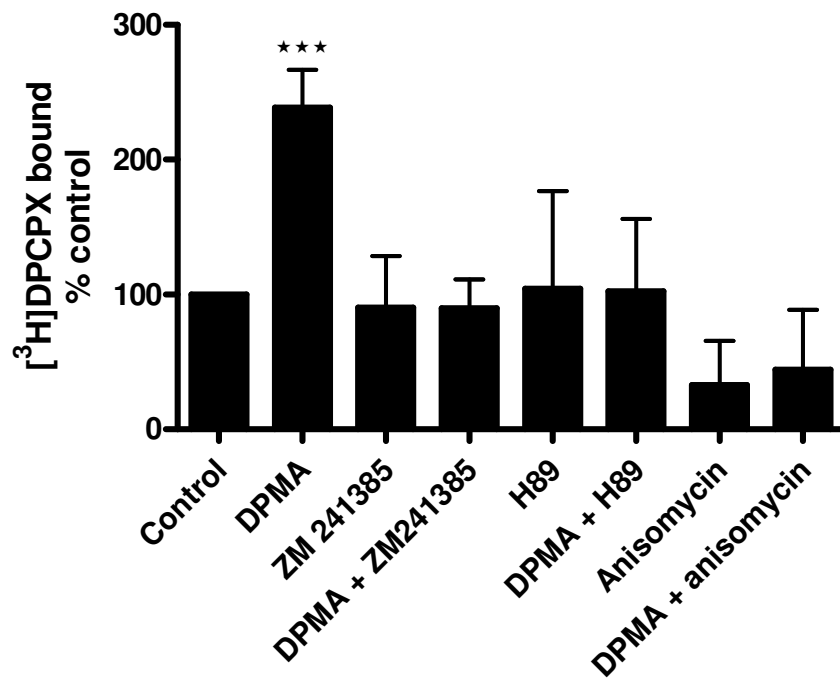


Figure 5

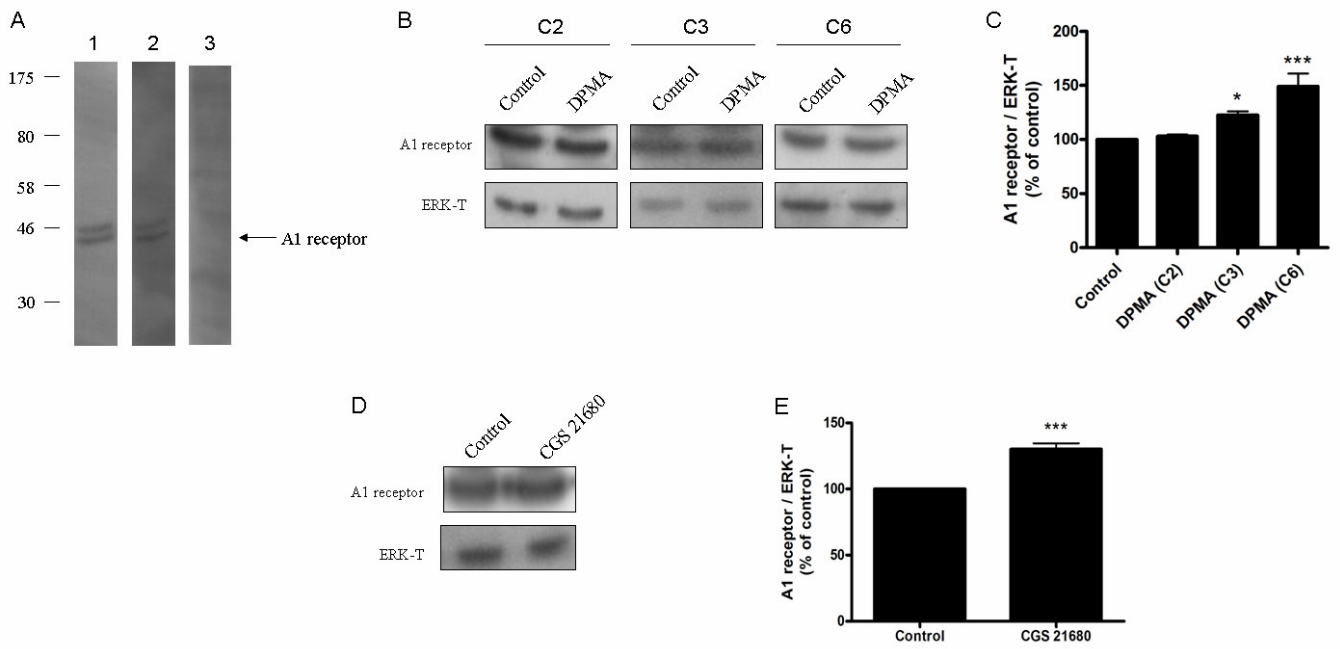


Figure 6

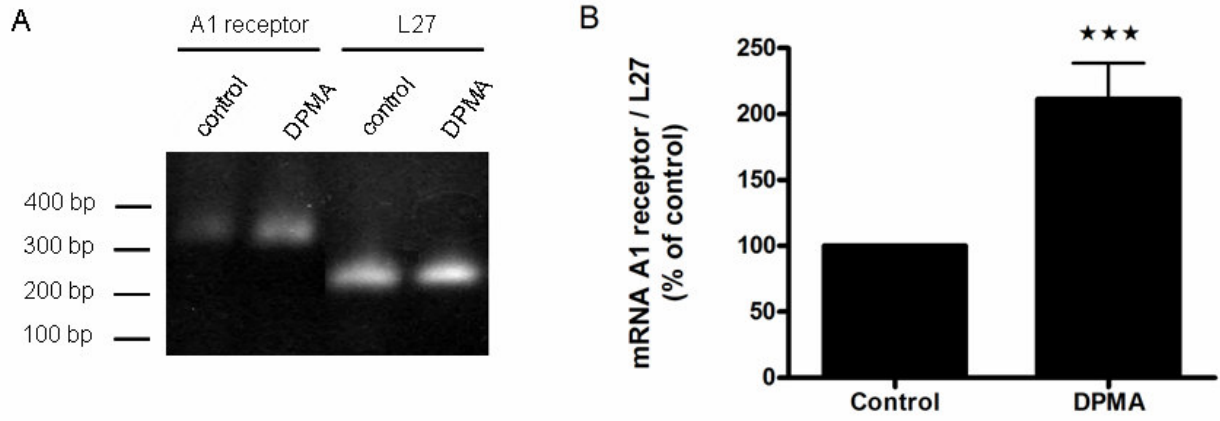


Figure 7

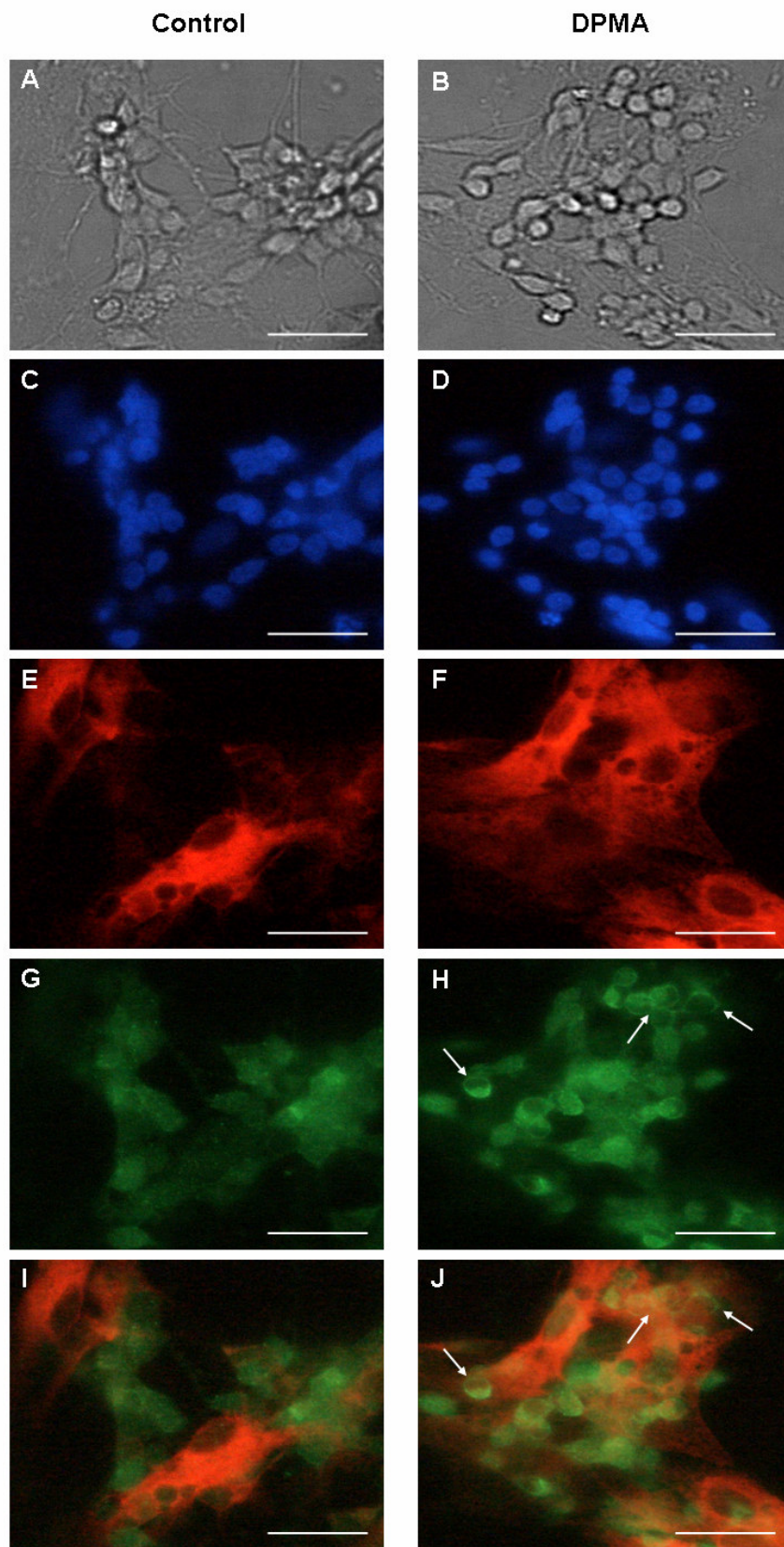
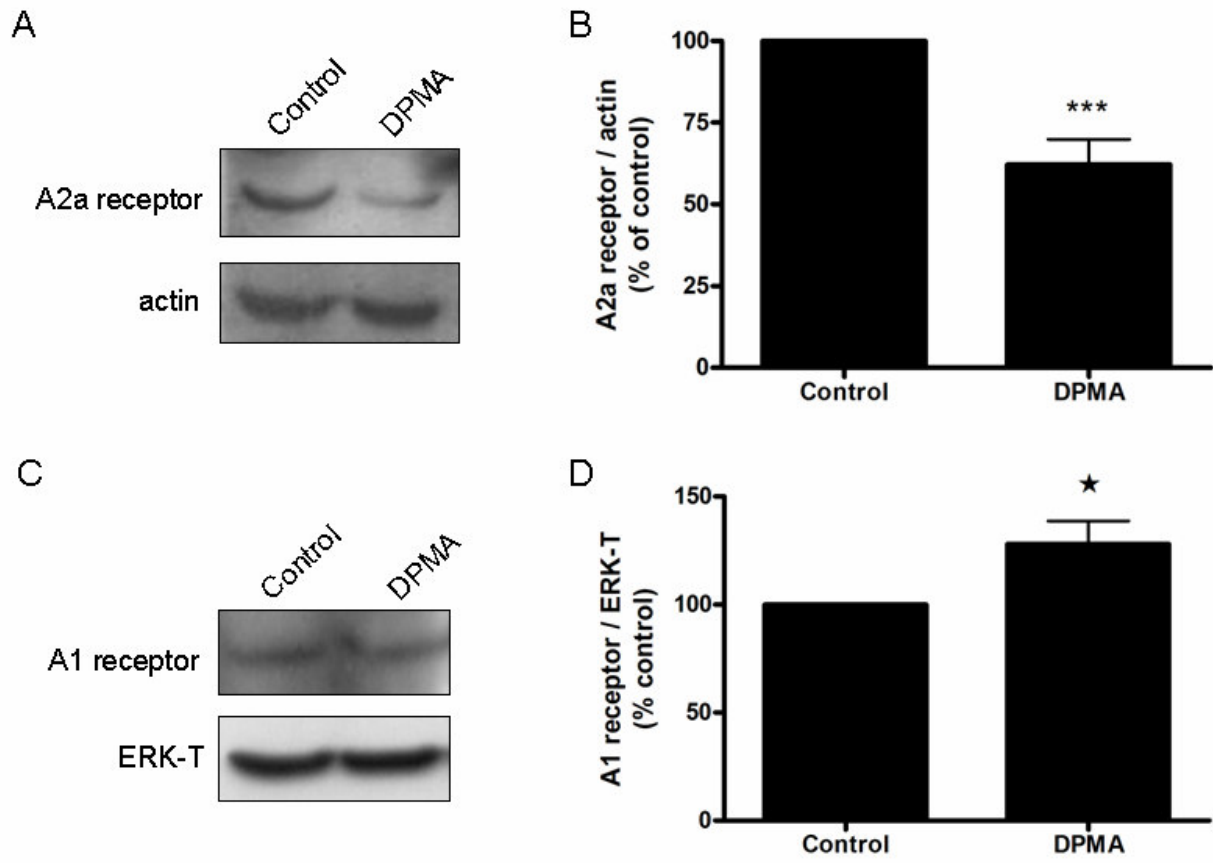


Figure 8



# 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](#)