



ARTHUR HENRIQUE PEZZO KMIT

**“RECEPTORES hP2X₇ REQUEREM ÂNIONS E CÁTIONS
EXTRACELULARES E A CAUDA C-TERMINAL PARA
GERAR ALTAS CORRENTES NÃO SELETIVAS EM
OÓCITOS DE *Xenopus laevis*”**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ARTHUR HENRIQUE PEZZO KMIT

**“RECEPTORES $hP2X_7$ REQUEREM ÂNIONS E CÁTIOS
EXTRACELULARES E A CAUDA C-TERMINAL PARA GERAR ALTAS
CORRENTES NÃO SELETIVAS EM OÓCITOS DE *Xenopus laevis*”**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp para obtenção do Título de **Mestre** em Ciências, área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO ARTHUR HENRIQUE
PEZZO KMIT E ORIENTADA PELO PROF. DR. ANTÔNIO
FERNANDO RIBEIRO

Assinatura do orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha Catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos – crb 8/8402

K719r Kmit, Arthur, 1987-
Receptores hP2X₇ requerem ânions e cátions extracelulares e a cauda C-terminal para gerar altas correntes não seletivas em oócitos de *Xenopus laevis*.
Arthur Henrique Pezzo Kmit – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Prof^o Antônio Fernando Ribeiro
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Receptores purinérgicos P2X₇. 2. Trifosfato de adenosina. 3. *Xenopus laevis*.
4. Técnicas de Voltage-Clamp. I. Ribeiro, Antônio Fernando, 1948-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Receptores hP2X₇ requerem ânions e cátions extracelulares e a cauda C-terminal para gerar altas correntes não seletivas em oócitos de *Xenopus laevis*.

Palavras-chaves em inglês:

Receptors, Purinergic P2X₇

Adenosine triphosphate

Xenopus laevis

Voltage-Clamp techniques

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Ciências

Banca Examinadora:

Antônio Fernando Ribeiro [Orientador]

Margarida Duarte Amaral

Alexandre César Santos de Rezende

Data da defesa: 29-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

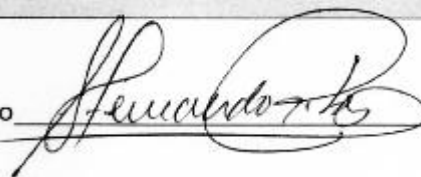
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ARTHUR HENRIQUE PEZZO KMIT

Orientador PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO

MEMBROS:

1. PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO



2. PROFA. DRA. MARGARIDA DUARTE AMARAL



3. PROF. DR. ALEXANDRE CÉSAR SANTOS DE REZENDE



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: vinte e nove de agosto de dois mil e treze

Aos meus pais, Luiz e Vania, minha irmã Maria Carolina,
ao meu sobrinho Luca e a minha namorada Cínthia
pelo amor incondicional, carinho e apoio,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Antônio Fernando Ribeiro, por ter me aceitado como seu aluno e pela confiança em mim depositada. Agradeço por ter me proporcionado as bases necessárias para iniciar este mestrado, e também pela supervisão.

I would like to thank Professor Karl Kunzelmann for accepting me in his lab in Regensburg and for all his dedication to the work I developed there. I am grateful for his guidance and support. The knowledge and experience that I have gain made me also grown more as a person.

A Capes por ter possibilitado a concessão de uma bolsa de mestrado de outubro de 2012 a setembro de 2013.

To everyone in and outside the lab in Regensburg with whom I shared so many good moments during my Mater: dear Ji, Aim, Brigitte, Julia, Tina and Tini thank you for your friendship and for the help and fun I had in the lab. Thank you Rainer, for all your help, patience and guidance in the lab and for the valuable scientific discussions. Um enorme beijo à Ana Marta, a Joana Raquel e a Diana por toda a alegria que trouxeram ao lab. Thanks to my cuban friends David and Nesty for being part of my “family” in Regensburg.

A Adriana Vinagre pela ajuda e suporte no LACIF.

Aos meus amigos e amigas, e especialmente a os meus pais, irmã, sobrinho e namorada que eu tanto os amo, esta tese também é de vocês! Obrigada por toda a força que me transmitem sempre, por todo o incansável apoio, dedicação e confiança!

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O receptor purinérgico P2X₇ é um canal iônico permeável a cátions pertencente da família P2X (P2X₁-P2X₇). Ele é ativado por altas concentrações (100µM – 1000µM) de ATP (Adenosine 5'-triphosphate), apresentando duas distintas respostas: 1) uma rápida ativação do canal, 2) uma segunda ativação, lenta e contínua, que gera largos poros na membrana celular, permeáveis a grande moléculas (900 Da). O receptor P2X₇ está envolvido em processos como morte celular, formação de células gigantes e secreção de citocinas como IL-1β e está predominantemente presente em células imunes. Neste estudo foi examinado como as altas correntes do P2X₇ são geradas e qual o mecanismo necessário para serem ativadas em oócitos de *Xenopus laevis*. Os oócitos foram cirurgicamente retirados de uma rã adulta de *Xenopus laevis* e injetamos o cRNA do P2X₇ para expressá-los na membrana celular. Medimos a condutância através da técnica de Voltage Clamp (TEVC). A incubação dos Oócitos superexpressos com P2X₇ em BABTA-AM demonstrou que o Ca²⁺ extracelular, e não intracelular, é necessário para gerar altas correntes não seletivas através do P2X₇, e a reposição de íons extracelular (Cl⁻ e Na⁺) demonstrou regula-las. A mutação de truncamento da cauda C-terminal na proteína P2X₇ gerou uma corrente menor após a estimulação com 1mM de ATP. E ainda três bloqueadores de canais o Ácido Tânico, o AO1 e o NPPB inibiram significativamente as correntes geradas pelo P2X₇. Nós concluímos que (i) Os oócitos de *Xenopus* que expressam P2X₇ produzem altas correntes não seletivas após estimulação com ATP, (ii) A ativação do P2X₇ requer tanto o influxo de Ca²⁺ e a cauda C-terminal, e (iii) as correntes do P2X₇ são regulados por cátions e ânions extracelulares.

Termos de Indexação: Receptores Purinérgicos P2X₇; *Trifosfato de Adenosina*; *Xenopus laevis*; Voltage Clamp.

ABSTRACT

The purinergic P2X₇ receptor is an ion channel permeable to cations which belong to the P2X family (P2X₁-P2X₇). It is activated by high concentrations (100μM - 1000μM) of ATP (adenosine 5'-triphosphate), presenting two distinct responses: 1) a rapid activation of the channel, 2) a second activation, slow and continuous, which generates a large pore in the cell membrane permeable to large molecules (900 Dalton). The P2X₇ receptor is involved in processes such as cell death, giant cell formation and secretion of cytokines such as IL-1β and is present predominantly on immune cells. In this study we examined how the P2X₇ high currents are generated and what is the mechanism required to be activated in *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes were surgically removed from an adult frog *Xenopus laevis* and injected with cRNA to express the P2X₇ in the cell membrane. We measure the conductance through the Voltage Clamp technique (TEVC). Incubation of oocytes overexpressed with P2X₇ receptors in BABTA-AM demonstrated that extracellular Ca²⁺, and do not intracellular, it is necessary to generate nonselective high currents through P2X₇, and replacing extracellular ions (Cl⁻ and Na⁺) showed regulate them. The truncation mutation in C-terminal tail of the P2X₇ protein generated a smaller current after stimulation with 1 mM ATP. And three channel blockers Tannic Acid, AO1 and NPPB significantly inhibited the generated currents by P2X₇. We conclude that (i) *Xenopus* oocytes expressing P2X₇ produce a nonselective high currents after stimulation with ATP (ii) Activation of the P2X₇ requires both the influx of Ca²⁺ and C-terminal tail, and (iii) the currents of the P2X₇ are regulated by extracellular cations and anions.

Index Terms: Purinergic Receptors P2X₇; Adenosine Triphosphate; *Xenopus laevis*; Voltage Clamp

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representação esquemática da estrutura das proteínas Adenosina/P1 e P2Y composto por: 7 domínios transmembranares (TM1 e TM2E), cauda Amina Terminal (H ₃ N ⁺) extracelular e a cauda Carboxílica Terminal (COO ⁻) intracelular que liga-se a Proteína G.	22
Figura 2: Representação esquemática da estrutura das proteínas P2X composta por: dois domínios transmembranares (TM1 e TM2E), a cauda Amina Terminal (H ₃ N ⁺) e a cauda Carboxílica Terminal (COO ⁻) e um loop extracelular.	24
Figura 3: Receptor P2X ₇ funcional em trímeros. Após ativado pelo ATP gera um influxo de Na ⁺ e Ca ²⁺ e um efluxo de K ⁺	26
Figura 4: Proteína cristalizada do receptor P2X ₄ . a. Vista lateral; b. Vista superior; c. Vista inferior	27
Figura 5: Sinalização do receptor P2X ₇ . O ATP extracelular pode atuar como um sinal de perigo para ativar o inflamassoma NLRP3 e promover a ativação da caspase-1 e libertação de uma IL-1β madura. Também a hipótese da cauda C-terminal do P2X ₇ interagir com a Panexina.	28
Figura 6: a. Imagem representativa da Rã de <i>Xenopus laevis</i> ; b. Sacos contendo oócitos recém retirados de um Rã de <i>Xenopus laevis</i> ; c. Oócito único com 1.0-1.2 mm; d. Oócitos únicos incubados em uma placa de petri.	34

Figura 7: Imagem representativa do oócito com a micropipeta empalando-o na parte vegetal, local aconselhável para o empalhamento, para injetar o cRNA. 35

Figura 8: Bancada de injeção de cRNA em Oócitos de *Xenopus laevis*. **a.** Instrumentos para pegar os oócitos e peça de acrílico para esses manter-se imóveis, assim facilitar a injeção; **b.** Mecanismo para injeção da solução com o cRNA (47nL por oócito); **c.** Microscópio para auxiliar na injeção. 36

Figura 9: Esquema do TEVC (do inglês: Two Electrode Voltage Clamp), dois eletrodos de clamp de voltagem. O oócito foi colocado em um banho contendo a solução tampão ND96 e empalado por duas micropipetas, com os eletrodos de corrente (esquerda) e de voltagem (direita) imersos em KCl. Outros dois eletrodos de referência foram colocados no banho. 37

Figura 10: Dois Setups de TEV 1 e 2. **(a)** Sistema de perfusão contínua contendo um béquer adaptado e seringas ligadas a válvulas para abrir e fechar o fluxo, ainda plugados em tubos de silicone para chegar ao **(b)** banho, e plugados ao sistema de **(c)** sucção para descartar as soluções em um erlenmeyer de dois litros adaptado em uma bomba de sucção (não mostrada). No banho o oócito era colocado e visualizado pelo **(d)** microscópio (Zeiss) para ser empalado e. pelos dois eletrodos fixados nos suportes de empalhamento. **(e)** Gaiola de Faraday para reduzir ruídos e interferências externas. 39

Figura 11: Oócito empalado pelos dois eletrodos (corrente e voltagem), no banho contendo a solução tampão, com o influxo e efluxo da solução. 39

Figura 12: Dois setups completos de TEVC. **a.** Setup de perfusão e empalamento descrito na figura 10; **b.** Power Lab., aparelho para transformar os dados analógicos em digitais; **c.** Aparelhos para reduzir ruídos e interferências internas dos sinais coletados; **d.** Amplificadores de clamp de oócitos, aparelho principal, com ele checa-se as correntes e voltagem dos oócitos empalados, aplica o clamp de voltagem e lê todos os dados gerado; **e.** Computador usando o programa Chart Recorder para leitura e análise de dados. 40

Figura 13: Início de um experimento em oócitos no programa Chart Recorder. **a.** Mostra-se a escala de Voltagem em mV (milivolts); **b.** voltagem transmembranar do oócito pré-clamp; **c.** pós-clamp (-40 +60 mV); **d.** A voltagem em mV lida pré-clamp; **e.** Mostra-se a escala da correntes nA (nanoamper); **f.** corrente próxima de nula em pré-clamp; **g.** corrente pós-clamp; **h.** corrente em nA lida em pré-clamp. 41

Figura 14: Ativação do P2X₇ após estimulação pelo ATP 1mM e inibição das correntes pelo Ácido Tânico, na solução com 100µM de Ca²⁺ e sem MgCl₂. **(a)** Correntes/Voltagem obtidas em controle negativo e **(b)** P2X₇. Traçados originais do **(c)** controle negativo e **(d)** P2X₇. **(e)** Resumo em barras das condutâncias geradas pela estimulação do ATP. Média ± S.E.M. (número de células). “*” Denota aumento significativo, p< 0,05, teste t pareado. “#” Denota aumento significativo quando comparado à ativação pelo ATP entre os grupos. P< 0,05, teste t independente. 45

Figura 15: Inibição das condutâncias geradas pelo P2X₇ com dois antagonistas **(a)** HMA (40µM); **(b)** AZ11645373 (40µM); **(c)** dois bloqueadores de canais de cloreto AO1 (20µM) e o NPPB (100µM); **(d)** Uma mutação na cauda C-terminal E496AK2 gerando uma condutância do ATP significativamente menor do que o grupo controle

positivo; **(e)** P2X₇ His, uma tag colocada na cauda C-terminal e P2X₇ His Tr uma tag e o truncamento da cauda C-terminal “*” Denota uma redução, p< 0,05, teste t pareado, “#” Denota uma redução significativa quando comparado à condutância do controle positivo, p< 0,05, teste t independente.

47

Figura 16: Correntes geradas em oócitos superexpressos com cRNA do P2X₇ estimulada por 1mM de ATP em 4 grupos, i) com 100µM de Ca²⁺ extracelular, ii) com 100µM de Ca²⁺ extracelular e incubados com BAPTA AM, iii) com 0 de Ca²⁺ extracelular e iv) com 0 de Ca²⁺ extracelular e incubados com BAPTA AM. (a) Traçados originais e (b) resumo em barras das condutâncias. “#” Denota uma redução significativa quando comparado aos grupos sem Ca²⁺ extracelular p< 0,05, teste t independente.

48

Figura 17: Efeito da substituição dos íons Cloreto e Sódio por Gluconato e NMDG na solução tampão em correntes geradas em oócitos superexpressos com cRNA do hP2X₇ estimulada por 1mM de ATP. a) Traçado original G=Gluconato e N=NMDG; b) Curvas I/V; c) Resumo em barras das condutâncias do ATP na reposição iônica. “*” Denota uma redução significativa quando comparado com o controle, p< 0,05, teste t pareado.

50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características dos receptores de purinas e pirimidinas	23

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Ampere;

ADP: Adenosina difosfato;

AO1: Inibidor de canais de cloreto ativados pelo cálcio;

ATP: Adenosina trifosfato;

AZ11: AZ11645373 – 3-[1-[[[(3'-nitro[1,1'-bifenil]-4-il)oxi]metil]-3-(4-pirimidil)propil]-2,4-Tiazolidinediona;

BAPTA-AM: 1,2-Bis (2-aminofenoxi) ethane-N,N,N',N'-tetraacetico ácido tetrakis (acetoximetil ester);

CaCCs: Canais de Cloretos ativados pelo Cálcio

cAMP: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico;

G: Condutância;

HMA: 5-(N,N-Hexametileno) amilorida;

TM: Transmembranar;

I: Corrente;

IL-1 β : Interleucina - 1 β ;

IOCR: Condutância intermediária retificada exteriormente;

IP₃: Inositol trifosfato

M: Mols;

NMDG: N-Metil-D-Glucamina;

NPPB: 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) Ácido benzoico;

NTS: Núcleo do trato solitário;

ORCC: Canais de cloreto com retificação exterior;

PLC: Fosfolipase C;

R: Resistência;

Rpm: Rotações por minuto;

SNC: Sistema Nervoso Central;

TA: Ácido Tânico;

TEVC: Dois eletrodos de clamp de voltagem (do inglês: Two Electrodes Voltage Clamp);

UDP: Uracila difosfato;

UTP: Uracila trifosfato;

V: Voltes;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Preparação do cRNA.	34
3.2	Preparações dos Oócito	34
3.2.1	Cirurgia	34
3.2.2	Defoliculando os oócitos	35
3.2.3	Injeção de cRNA	35
3.3	Eletrofisiologia: Voltage-Clamp	36
3.4	Análise de dados	40
4	RESULTADOS	43
4.1	Ativação do P2X ₇ superexpressos em Oócitos gera altas correntes iônicas através da estimulação de 1mM de ATP	44
4.2	Inibindo as correntes geradas pelo P2X ₇	46
4.3	A cauda C-terminal é necessária para o receptor P2X ₇ gerar altas correntes iônicas	46
4.4	O Ca ²⁺ extracelular é necessário para o receptor P2X ₇ gerar altas correntes iônicas	47
4.5	Substituições de íons Na ⁺ e Cl ⁻ regulam as correntes geradas pelo P2X ₇	49
5.	DISCUSSÃO	51
5.1	Ativação do P2X ₇ superexpressos em Oócitos gera altas correntes iônicas através da estimulação de 1mM de ATP	52
5.2	Inibindo as correntes geradas pelo P2X ₇	52
5.3	A cauda C-terminal é necessária para o receptor P2X ₇ gerar altas correntes iônicas	53
5.4	O Ca ²⁺ extracelular é necessário para o receptor P2X ₇ gerar altas correntes iônicas	54
5.5	Substituições de íons Na ⁺ e Cl ⁻ regulam as correntes geradas pelo P2X ₇	55
6.	CONCLUSÕES	57
7.	REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

Na década de 70 do século passado foram descritos receptores para nucleotídeos e nucleosídeos, conhecidos como receptores purinérgicos e também como purinoceptores. São uma família de moléculas presente na membrana plasmática celular, que são encontrados em quase todos os tecidos de mamíferos. Diversas funções fisiológicas têm sido relacionadas à sinalização intercelular por esses receptores. Podemos destacar as seguintes: secreção exócrina e endócrina; respostas imunes; inflamação; transdução mecanosensitiva; agregação plaquetária e vasodilatação endotelial, proliferação celular, diferenciação, migração e morte. Estes são subdivididos em duas famílias de receptores: P1 ou adenosina e P2 (Dubyak & el-Moatassim, 1993; Harde *et al.*, 1995; Fredholm *et al.*, 1997; Ralevic *et al.*, 1997; Burnstock, 2006.).

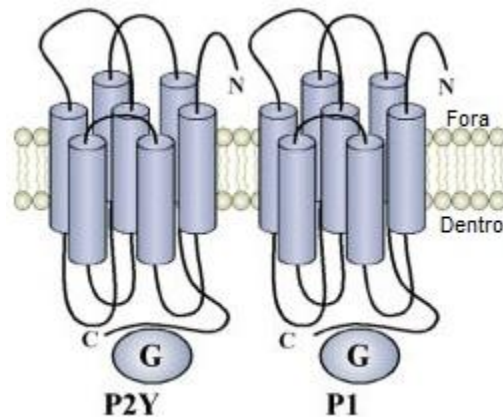


Figura 1: Representação esquemática da estrutura das proteínas Adenosina/P1 e P2Y composto por: 7 domínios transmembranares (TM1 e TM2), a cauda Amina Terminal ($H3N^+$) extracelular e a cauda Carboxílica Terminal (COO^-) intracelular que liga-se a Proteína G (Adaptado de Fileds & Burnstock, 2006).

Os receptores de adenosina/P1 ainda subdividem-se em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos esses receptores ligam-se em proteínas G (Tabela 1), que são uma família de proteínas envolvidas na transmissão de sinais a partir de uma variedade de diferentes estímulos externos de uma célula para o interior da célula. Estes subtipos em sua estrutura apresentam sete domínios putativos transmembranares (TM) de aminoácidos hidrofóbicos, o N-terminal da proteína está localizado no lado extracelular e o C-terminal do lado da membrana citoplasmática (Figura 1). Eles têm sido clonados a partir de uma variedade de

espécies e caracterizados pela expressão funcional nas células de mamíferos ou em oócitos de *Xenopus* apresentando afinidades bem distintas para o agonista endógeno (adenosina), com EC₅₀ de 73µM até 6500µM, sendo que mais de um desses receptores podem ser expressos pela mesma célula. Este fato levanta dúvidas sobre a importância funcional da colocalização dos mesmos (Burnstock, 2006; Fredholm *et al.*, 1997; Ralevic *et al.*, 1997; Burnstock *et al.*, 2009; Abbracchio, 1994).

Tabela 1: Características dos receptores de purinas e pirimidinas.

Receptor	Distribuição Principal	Mecanismos de Transdução
P1 A1	Cérebro, medula espinhal, testículos, coração, terminais nervosos autonômicos	G _{i1} , G _{i2} e G _{i3} , ↓cAMP
P1 A2_A	Cérebro, coração, pulmões, baço	G _s , ↑cAMP
P1 A2_B	Intestino grosso, bexiga	G _s , ↑cAMP
P1 A3	Pulmão, fígado, cérebro, testículos, coração	G _{i2} , G _{i3} e G _{q/11} , ↓cAMP, ↑Ins(1,4,5)P ₃
P2X₁	Músculo liso, as plaquetas, cerebelo, dorsal chifre neurônios espinhais	Canal de cátions Intrínseco (Ca ²⁺ e Na ⁺)
P2X₂	Músculo liso, SNC, retina, células cromafins, gânglio autônomo e sensorial	Canal iônico intrínseco (particularmente Ca ²⁺)
P2X₃	Neurônios sensoriais, NTS, alguns neurônios simpáticos	Canal de cátions Intrínseco
P2X₄	SNC, testículos, cólon	Canal iônico intrínseco (particularmente Ca ²⁺)
P2X₅	Células em proliferação na pele, intestino, bexiga, timo, medula espinhal	Canal iônico intrínseco
P2X₆	SNC, neurônios motores na medula espinhal	Canal iônico intrínseco
P2X₇	Células apoptóticas, por exemplo, células do sistema imunológico, pâncreas, pele	Canal de cátions intrínseco e um largo poro com ativação prolongada
P2Y₁	Células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células do sistema imunológico, osteoclastos	G _q /G ₁₁ ; PLC-β ativação
P2Y₂	Células imunes, células epiteliais e endoteliais e dos túbulos renais, osteoblastos	G _q /G ₁₁ e, possivelmente, G _i ; PLC-β ativação
P2Y₄	Células endoteliais	G _q /G ₁₁ e, possivelmente, G _i ; PLC-β ativação
P2Y₆	Algumas células epiteliais, placenta, células T do timo	G _q /G ₁₁ ; PLC-β ativação
P2Y₁₁	Baço, intestino, granulócitos	G _q /G ₁₁ e G _s ; PLC-β ativação
P2Y₁₂	Plaquetas, células gliais	G _i (G _o); inibição da adenilato ciclase
P2Y₁₃	Baço, cérebro, gânglios linfáticos, medula óssea	G _i /G _o
P2Y₁₄	Placenta, tecido adiposo, estômago, intestino delgado, regiões discretas do cérebro	G _q /G ₁₁

(Fonte: Modificado de Burnstock 2006)

Os receptores P2X são canais iônicos ATP-dependente e trabalham como trímeros para formar um canal que medeia uma rápida (dentro de 10 ms) permeabilidade seletiva para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) através da membrana celular, resultando num aumento em Ca^{2+} intracelular e uma despolarização (Bean, 1992; Dubyak and el-Moatassim, 1993; North, 1996).). Isto é apropriado, dado a sua distribuição em células excitáveis (células do músculo liso, neurónios e células da glia) e papel como mediadores da neurotransmissão excitatória rápida em ATP em ambos os sistemas nervosos central e periférico. São constituídos de sete subtipos clonados em mamíferos (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) e apresentam perfis farmacológicos distintos, sendo ativados por ATP, ADP, UTP, e UDP (Burnstock, 2006; Burnstock, 2009; Abbracchio & Burnstock, 1994; Ralevic V & Burnstock, 1998).

A estrutura proteica dos P2X contém 379-472 aminoácidos e acredita-se inserir na membrana da célula, para formar um poro que compreende dois domínios transmembranares hidrofóbicos, sendo grande parte da proteína extracelular como loop hidrofóbico (Figura 2) (Ralevic, 1997).

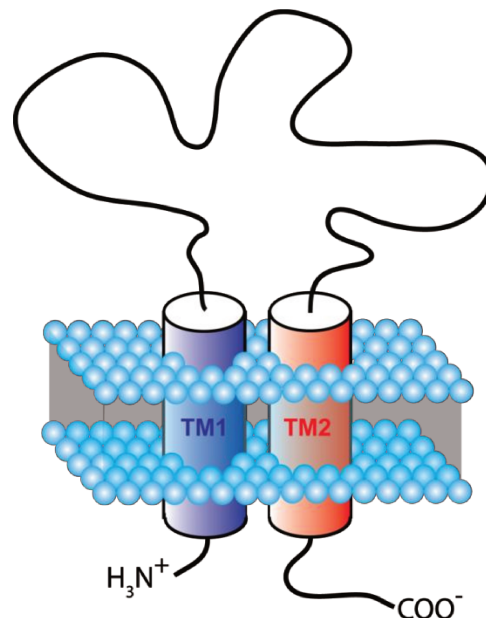


Figura 2: Representação esquemática da estrutura das proteínas P2X composta por: dois domínios transmembranares (TM1 e TM2), a cauda Amina Terminal (H_3N^+) e a cauda Carboxílica Terminal (COO^-) e um loop extracelular. (Adaptado de Wikipedia, 2013).

Cátions podem modular correntes ativadas pelo ATP em receptores P2X nativas e endógena. Mg^{2+} e Ca^{2+} geralmente inibem as correntes de receptores P2X, provavelmente por diminuição da afinidade do sítio de ligação de ATP, por uma alteração alostérica do receptor (Honoré *et al.*, 1989;. Nakazawa *et al.*, 1990;. Li *et al.*, 1997a). Zn^{2+} potencia a condutância catiónica induzida por ATP na maioria dos receptores P2X, o receptor P2X₇ é uma exceção a este respeito, pois é inibida por Zn^{2+} e Cu^{2+} (Virginio *et al.*, 1997).

A modulação da afinidade do sítio de ligação ao ATP ocorre por protóns extracelulares, o pH ácido provoca um aumento, e pH alcalino provoca uma queda na corrente. Isto pode ser particularmente significativos para a sinalização mediada pelo receptor P2X em condições fisiopatológicas onde lesão ou inflamação pode alterar profundamente pH extracelular (King *et al.*, 1996;. Li *et al.*, 1996, 1997b;. Wildman *et al.*, 1997).

A maioria destas proteínas receptoras têm distribuições generalizadas e na maioria dos tecidos expressam mais do que um subtipo de receptor P2X, o que pode levar a hetero polimerização. As exceções são os receptores P2X₃, que apenas estão expressos nos gânglios sensoriais (Chen *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995), P2X₁, que é o principal subtipo expressos em músculo liso (Valera *et al.*, 1994), e P2X₄, que é o único subtipo expresso nas células acinares de glândulas salivares (Buell *et al.*, 1996b). A principal distribuição dos receptores P2X é em tecido excitável tais como o músculo liso e nervos, embora também tenham sido clonadas a partir de, ou têm demonstrado ser expressos por, tecidos endócrinos: P2X₄ (Figura 3) (Wang *et al.*, 1996), plaquetas: P2X₁-like (MacKenzie *et al.*, 1996) e células HL60 promielócito P2X₁-like (Buell *et al.*, 1996a).

Dentre os receptores P2X, o receptor P2X₇ se destaca por possuir características peculiares em ativação e estrutural. Ele é estruturalmente semelhante a outros receptores de P2X exceto para o fato de que ele apresenta uma cauda C-terminal intracelular significativamente mais longo (240 aminoácidos) do que a outros receptores P2X, dos quais, pelo menos, o últimos

177 aminoácidos são essenciais para a indução do poro não selectivo (Surprenant *et al.*, 1996).

A proteína e o mRNA do receptor P2X₇ são distribuídos geralmente nas células de origem hematopoiética como: células da medula óssea, incluindo granulócitos, monócitos/macrófagos, linfócitos B, macrófagos no cérebro (Collo *et al.*, 1997), mastócitos (Cockcroft & Gomperts, 1980; Tatham *et al.*, 1988; Tatham e Lindau, 1990), macrófagos (Steinberg *et al.*, 1987. ; Greenberg *et al.*, 1988, el Moatassim e Dubyak, 1992, 1993; Murgia *et al.*, 1992, 1993,. Hickman *et al.*, 1994,. Falzoni *et al.*, 1995), a linha celular de monócitos humanos THP-1. (Humphreys & Dubyak, 1996), fibroblastos (Weisman *et al.*, 1989; Erb *et al.*, 1990,. Pizzo *et al.*, 1992.), eritrócitos (Parker & Snow, 1972), células de eritroleucemia (Chahwala & Cantley, 1984) e os linfócitos (Wiley *et al.*, 1994;. Gargett *et al.*, 1996;. Jamieson *et al.*, 1996, Markwardt *et al.*, 1997) hepatócitos (Zoetewij *et al.*, 1996) e células acinares da glândula parótida e salivares (Sasaki & Gallacher, 1990; McMillian *et al.*, 1993, Soltoff *et al.*, 1992, 1993).

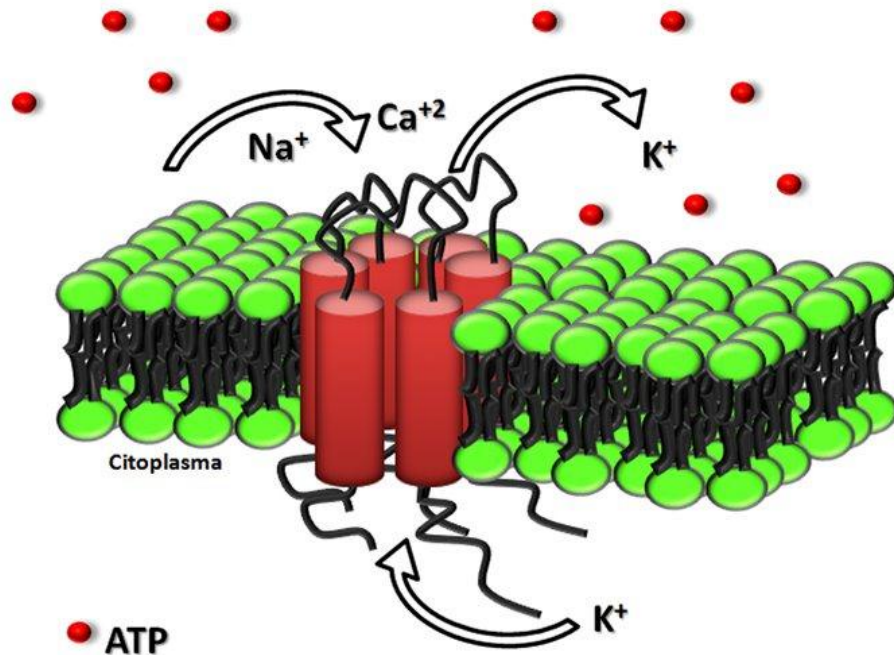


Figura 3: Receptor P2X₇ funcional em trimeros. Após ativado pelo ATP gera um influxo de Na⁺ e Ca²⁺ e um efluxo de K⁺ (Facebook, 2013a).

A ativação do receptor P2X₇ requer altas concentrações (100µM – 1000µM) de seu ligante natural, ATP (Adenosine 5'-triphosphate), diferente das necessárias para outros membros deste grupo. Após ativo, provoca uma despolarização da membrana e um influxo rápido de cátions e é um processo reversível. No entanto, uma ativação contínua, provoca um aumento da permeabilidade bidirecional, assim formando um largo poro, permitindo o transporte de uma variedade de íons incluindo Na⁺, K⁺, e Ca²⁺ e pequenas moléculas com um peso molecular inferior ou igual a 900 Daltons, exceto nos linfócitos onde o limite é de 200 - 300 Daltons. A natureza desse poro, bem como os mecanismos responsáveis por sua abertura, é em grande parte desconhecida (Ohlendorff *et al.*, 2007, Burnstock, 2009; Ralevic *et al.*, 1997).

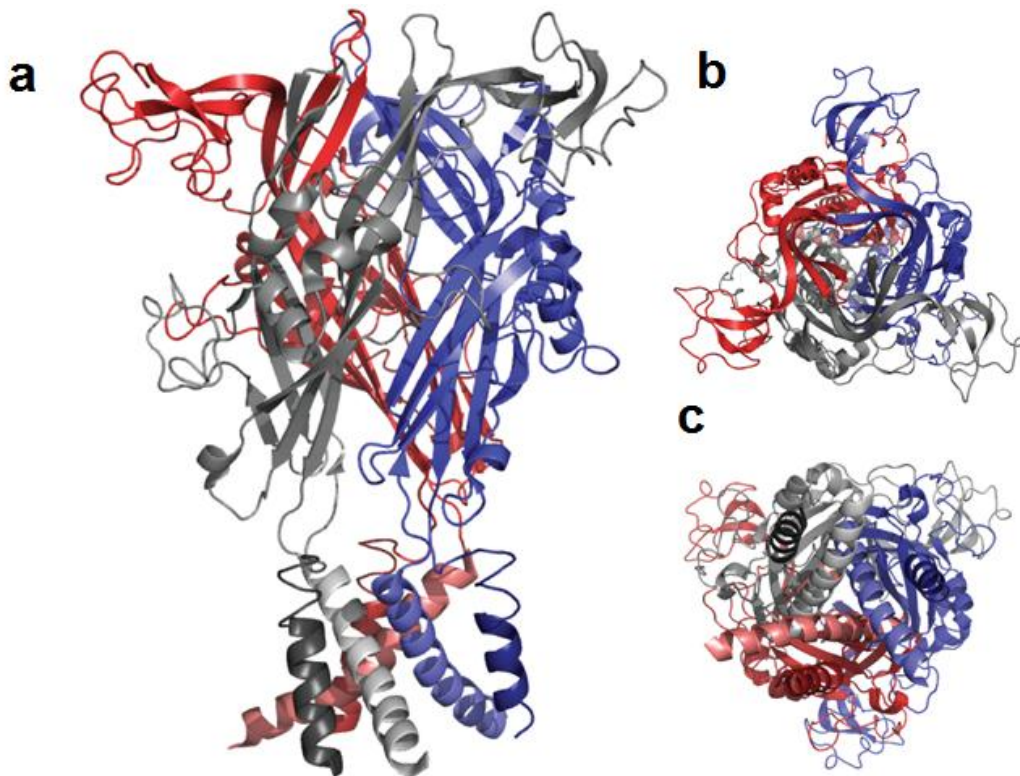


Figura 4: Proteína cristalizada do receptor P2X₄ do peixe Zebra. **a.** Vista lateral. **b.** Vista superior **c.** Vista inferior (Wikipedia, 2012).

Existem duas hipóteses de como esse largo poro é formado. A primeira é que o alto influxo de Ca²⁺, despolarizando a membrana e podendo ativar outras

proteínas de membrana. A segunda hipótese é que a longa cauda C-terminal interage com outras proteínas de membrana gerando assim o poro (Smart *et al.*, 2002; Smart *et al.*, 2003; Riedel *et al.*, 2007), alguns grupos acreditam que essa proteína é a Panexina (Figura 5) (Locovei *et al.*, 2007; Alberto *et al.*, 2013). Sabe-se que este efeito está associado com a sua citotoxicidade e que a permeabilização envolve o C-terminal citoplasmático da proteína (Surprenant *et al.*, 1996, Smart *et al.*, 2003).

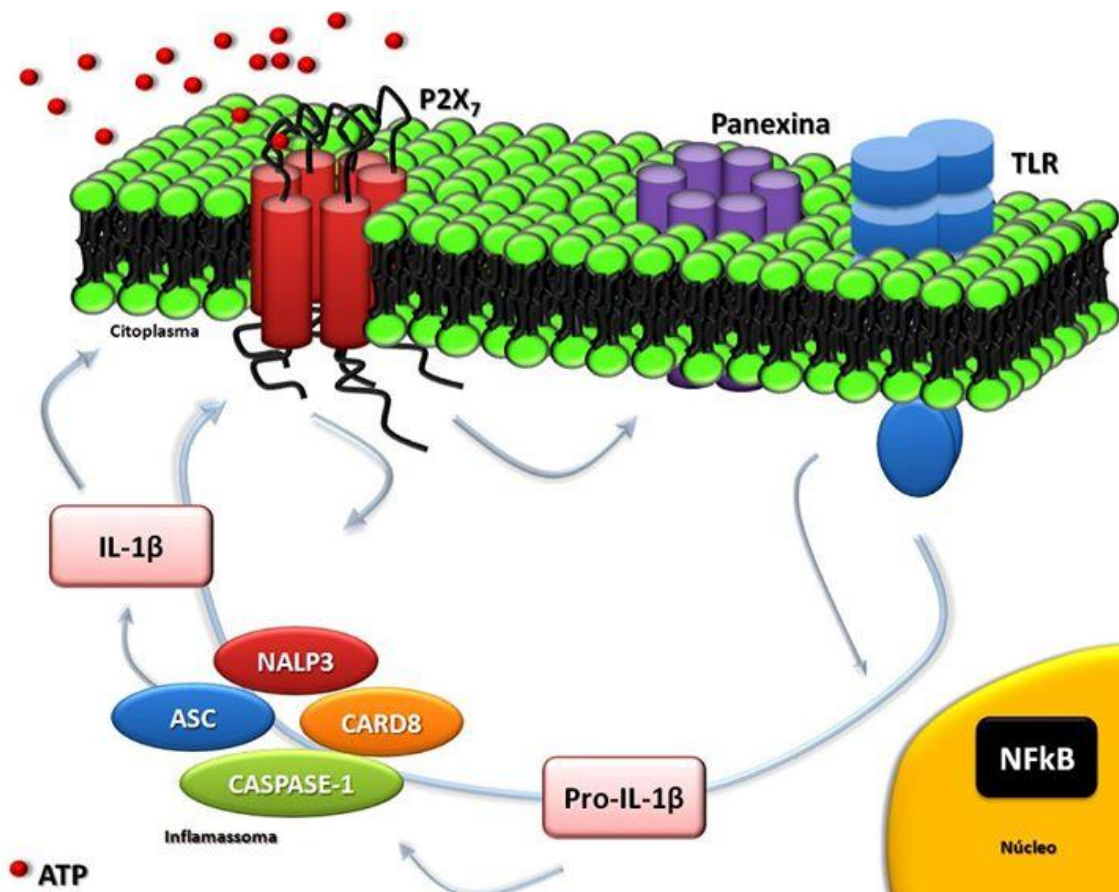


Figura 5: Sinalização do receptor P2X₇. O ATP extracelular pode atuar como um sinal de perigo para ativar o inflamassoma NLRP3 e promover a ativação da caspase-1 e liberação de uma IL-1β madura. Também a hipótese da cauda C-terminal do P2X₇ interagir com a Panexina. (Facebook, 2013b)

De um modo geral, o receptor P2X₇ é referido como um receptor citotóxico. Sua ativação, seguida da formação de um canal de alta condutância, da ativação de enzimas e da reorganização do citoesqueleto, resulta em apoptose ou necrose em diversos tipos celulares (Figura 5) (Deli *et al.*, 2008). No entanto, essa

citotoxicidade é em geral, resultado de grande estimulação farmacológica, fato que deve ocorrer *in vivo*, somente em condições patológicas extremas (Di Virgilio *et al.*, 2009). A ativação do receptor P2X₇ em macrófagos humanos desencadeia a liberação da citocina inflamatória IL-1 β , o que pode proporcionar uma pista para o papel fisiológico e/ou fisiopatológico deste receptor (Griffiths *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1997; Adinolfi *et al.*, 2012). Além disso, vários relatórios revelaram uma intrigante atividade da promoção do crescimento deste receptor, o que parece ser indispensável para alguns tipos de células, tais como linfócitos T e células microgliais de rato primários. Uma das características mais intrigantes do efeito trófico de P2X₇ é a sua capacidade para suportar a sobrevivência e o crescimento na ausência de soro (Adinolfi *et al.*, 2012). Nessa perspectiva, o receptor P2X₇ é superexpresso em diversos tumores malignos, como, por exemplo, neuroblastomas, câncer de próstata, pâncreas, leucemia linfocítica crônica, fato que torna este receptor um possível alvo farmacológico (Bianco *et al.*, 2006; Adinolfi E *et al.*, 2012; Sun, 2010; Raffaghello *et al.*, 2006).

Há esperanças, de que existam intervenções terapêuticas úteis baseadas nesses receptores, e principalmente no P2X₇, para uma variedade de distúrbios neurológicos, incluindo doenças neurodegenerativas, dor, enxaqueca e doenças dos sentidos especiais, será desenvolvido em um futuro não muito distante.

O modelo usado para este estudo foi a expressão de cRNA da proteína hP2X₇ em oócitos de *Xenopus laevis*. Esse tem sido as primeiras espécies utilizadas por pesquisadores, que proporcionam grandes quantidades de ovos e embriões com um material ideal para trabalhos embrionários e bioquímicos. O *Xenopus* é usado extensivamente em biologia celular, biologia molecular, biologia de desenvolvimento e neurobiologia, por apresentarem abundantes embriões, que são resistentes e fornecem grandes quantidades de material para análises de biologia moleculares e bioquímicas. Além disso, eles podem ser injetados com produtos de genes, construções em fases iniciais de clivagem ou manipulado cirurgicamente, como também é um sistema poderoso para as atividades de

monitoramento de genes, como a identificação ou ensaio de atividades de canais iônicos (Kashiwagi *et al.*, 2010; Nutt, 2012; Pearl *et al.*, 2012) .

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Estudar a ativação do receptor hP2X₇ em oócitos de *Xenopus laevis*.

Objetivos Específicos:

- Analisar quais íons estão presente nessas altas correntes iônicas geradas;
- Analisar se a cauda C-Terminal é necessária para as altas correntes iônicas geradas;
- Analisar a importância do Cálcio nessas altas correntes iônicas geradas;
- Analisar diferentes bloqueadores na tentativa de inibir essas altas correntes iônicas geradas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Preparação do cRNA

cRNA complementares foram sintetizados por transcrição *in vitro*. Para este efeito, o cDNA que codifica cada proteína a ser expressa foi linearizado na extremidade 3' da inserção utilizando as enzimas de restrição. Este cDNA foi utilizado como molde para a transcrição *in vitro* utilizando T7, T3 ou SP6 promotor e polimerase (Promega), de acordo com o vetor em que a inserção foi clonada.

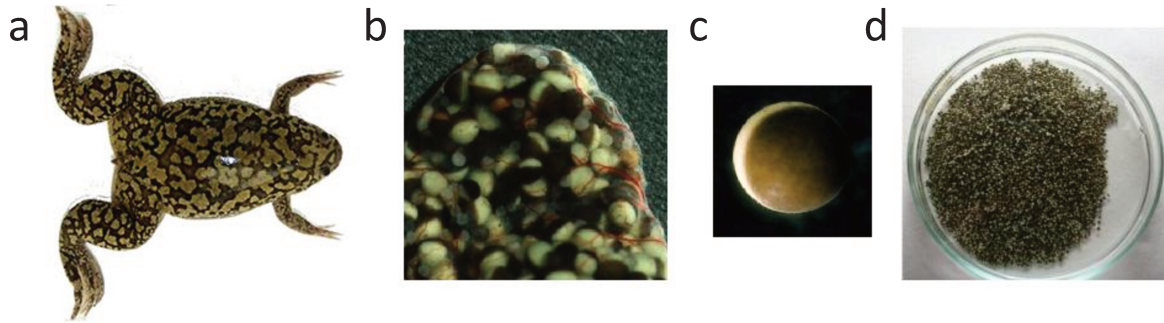


Figura 6: a. Imagem representativa da Rã de *Xenopus laevis* (Ruhr Universität Bochum, 2013) b. Sacos contendo oócitos recém retirados de um Rã de *Xenopus laevis* c. Oócito único com 1.0-1.2 mm (cRNA micro injection into *Xenopus oocytes*, 2013) d. Oócitos únicos incubados em uma placa de petri (Lohres, 2013).

3.2 – Preparações dos Oócitos

3.2.1 – Cirurgia

Os oócitos foram isolados a partir de uma cirurgia em rãs adultas de *Xenopus laevis* fêmea (Figura 6a). A rã foi anestesiada em uma caixa (0,0045m³) contendo dois litros de água com o etil 3-aminobenzonato metanosulfonato (3,8mM) por 15 minutos. Depois de anestesiada a rã foi colocada com a parte anterior para cima em um caixa de isopor contendo gelo e papel toalha imergido em anestésico, para a rã não ficar em contato direto com o gelo. Na região anterior próximo a virilha, um corte de aproximadamente 1cm foi feito na pele e no músculo com uma tesoura cirúrgica esterilizada, escolhendo um lado (esquerdo ou direito), pois uma rã adulta pode ser operada para retirada dos oócitos até 6 ou 8 vezes com intervalos de um mês. Com o auxílio de uma pinça esterilizado, os sacos contendo os oócitos (figura 6b) foram retirados e incubados em solução OR2 (em mM: NaCl 82,5; KCl 2; MgCl₂ . 6 H₂O 1; HEPES 5), em uma placa de

petri (figura 6d). Ao pegar a quantidade necessária de oócitos, o corte foi suturado com uma agulha de sutura (atraumatic sutures; atraumatisches Nahtmaterial; Ethicon, Prolen, nicht resorbierbar, 6x0, 45 cm, firma: Johnson & Johnson) em duas etapas: a primeira o músculo e segundo a pele. A rã foi lavada gentilmente e água corrente, e coloca de volta na caixa (pré lavada e preenchida com apenas água), com o nariz para fora da água para não correr o risco dela morrer. Após 4h, em média, a rã já acordada era devolvida para o aquário.

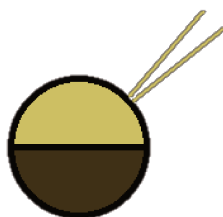


Figura 7: Imagem representativa do oócito com a micropipeta empalando-o na parte vegetativo, local aconselhável para o empalhamento, para injetar o cRNA.

3.2.2 – Defoliculando os oócitos

Após a retirada os oócitos, esses foram incubados em solução OR2 em uma placa de petri. Esses foram defoliculados por um tratamento de uma hora com colagenase (tipo A; Boehringer – Alemanha) em uma incubadora por 1h a 16°C a 240 rpm. Subseqüentemente, foi retirada a colagenase, e os oócitos foram lavados, com o auxílio de um tubo falcon de 50ml, com uma solução tampão ND96 (em mM: NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1, HEPES 5, piruvato de sódio 2,5, pH 7,55) contendo Soro fetal bovino (5% Sigma aldrich), para parar a ação da colagenase. Essa solução foi descartada e os oócitos foram novamente lavados em solução ND96 por 10 vezes. Após obter oócitos únicos, esses foram incubados em uma placa de petri contendo ND97 (em mM NaCl 96; KCl 2; CaCl₂ . 2 H₂O 1,8; MgCl₂ . 6 H₂O 1; HEPES 5; Na-Piruvato 2,5; Teofilina 0,5; Gentamicina (50 mg/ml) 1mL) na incubadora a 16°C.

3.2.3 – Injeção de cRNA

Oócitos viáveis e maduros foram escolhidos (Figura 6c) e injetados, 47 nL de solução por oócito, contendo o cRNA e água livre de nucleasse, na parte vegetativa do oócito (Figura 7), com o auxílio de um microinjetor (Figura 8b), e do

microscópio (Zeiss). O cRNA foi injetado, em média em quarenta oócitos por grupo, para que esses codifiquem as proteínas diferentes de acordo com o experimento, no estudo, isso incluiu: receptor purinérgico - P2X₇ (controle positivo), P2X₇ E496AK2 (mutação na cauda C-terminal), P2X₇ -his tag (tag colocado ao final da cauda C-terminal) e P2X₇ -truncado (foi cortada parte da cauda C-terminal). Oócitos também foram injetados com água livre de nuclease para servirem como controles negativos. Após a injeção os oócitos foram separados em diferentes placas de petri (de acordo com o cRNA injetado) e incubados em ND97 a 16°C por 2 a 4 dias.



Figura 8: Bancada de injeção de cRNA em Oócitos de *Xenopus laevis*. **a.** Instrumentos para pegar os oócitos e peça de acrílico para esses manter-se imóveis, assim facilitar a injeção; **b.** Mecanismo para injeção da solução com o cRNA (47nL por oócito); **c.** Microscópio.

3.3. – Eletrofisiologia: Voltage-Clamp

Dois a quatro dias após a injeção do cRNA, oócitos viáveis, pois alguns acabavam por morrer, foram separados para os experimentos. O setup de perfusão (Figura 10a) foi preenchido com as soluções requeridas, no béquer a solução tampão ND96 e nas seringas as demais soluções, e ligado. O setup perfusão deve estar funcionando perfeitamente sem bolhas, pois essas interferem

no experimento. Logo após imergir as duas micropipetas preenchidas com 3mM de KCl e dois eletrodos (Clark Instruments Ltd, Salisbury, Reino Unido), um de corrente e o outro de voltagem, no banho para calibrar o amplificador, tendo que deixar em zero a voltagem e a corrente e as pipetas devem apresentar resistências menores que $1M\Omega$. Retiramos os eletrodos do banho e inserimos o oócito e com o auxílio do microscópio empalmo-os com as duas micropipetas, nesse passo é necessário atenção, pois as duas micropipetas devem-se estar inseridas no oócito (Figuras 9, 10, 11, 12).

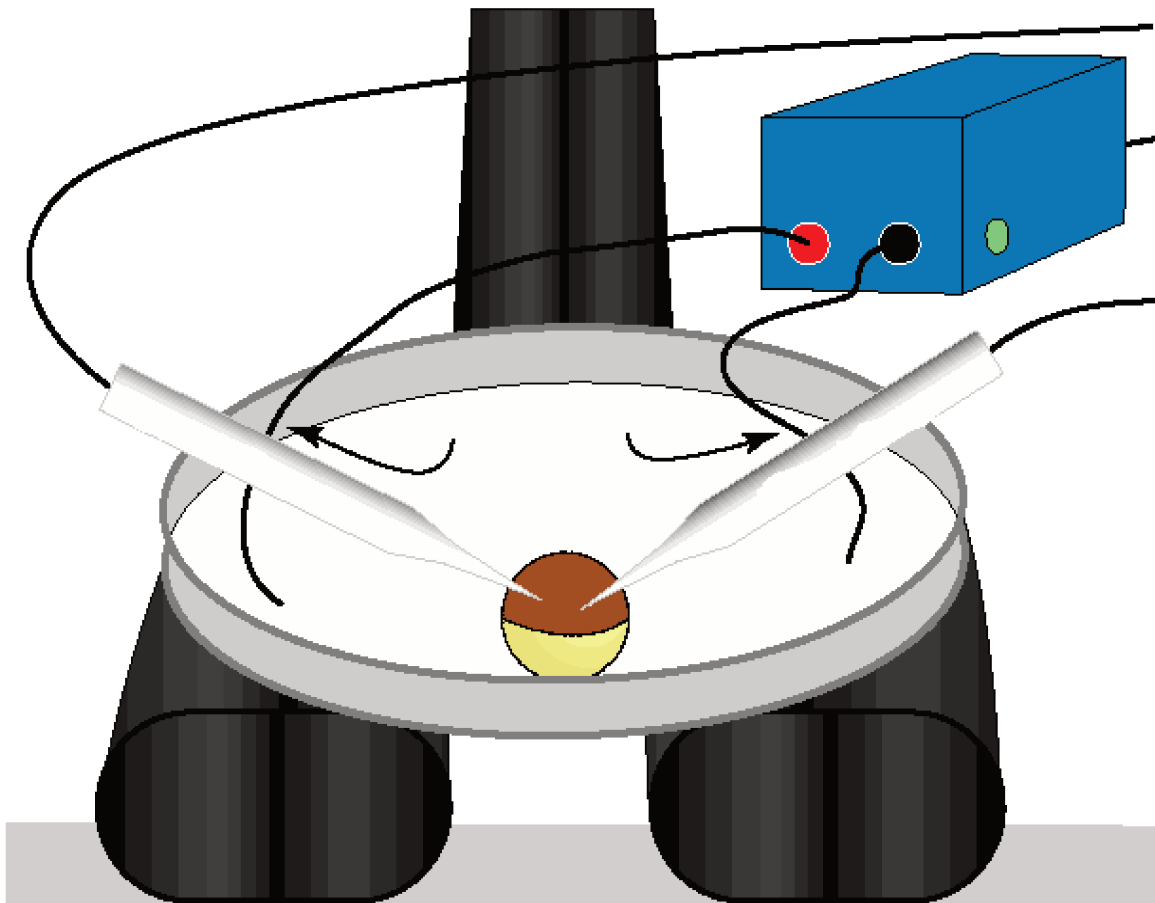


Figura 9: Esquema do TEVC (do inglês: Two Electrode Voltage Clamp), dois eletrodos de clamp de voltagem. O oócito foi colocado em um banho contendo a solução tampão ND96 e empalado por duas micropipetas, com os eletrodos de corrente (esquerda) e de voltagem (direita) imergidos em KCl. Outros dois eletrodos de referência foram colocados no banho.

Assim iniciamos o experimento, ligando o clamp que foram calibrados para gerar pulsos de -60 a +40 mV, em passos de 10 mV, cada um segundo por um Gerador de pulso 5.1 (AD-Elektronik®). O banho foi continuamente

perfundidos a uma taxa de 5 ml/min com ND96 e ND96 com 100 μ M Ca^{2+} e livre de MgCl_2 (em mM: NaCl 96; KCl 2; EGTA 1; Ca-Gluconat . 1 H_2O 1,24; HEPES 5; Na-Piruvato 2,5) para todas os experimentos, pois segundo Kubick *et al.* (2011) cátions como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} inibem o receptor P2X_7 , com isso reduzimos a concentração do Ca^{2+} e retiramos o Mg^{2+} de nossa solução tampão (ND96) . O TA (20 μ M), bloqueador de canais de Cloreto, CaCCs e um potente inibidor do receptor de fator de crescimento epidérmico tirosina-quinase (Yang *et al.* 2006; Martins *et al.*, 2011; Kmit *et al.*, 2013); o NPPB (100 μ M), um bloqueador de canais de cloreto, bloqueador de bombas de bicarbonato, assim modificando o pH, e bloqueador de IOCR e de ORCC e de receptores Fas (Tilman *et al.*, 1991; Kaunitz & Akiba, 2001; Martins *et al.*, 2011; Kmit *et al.*, 2013); e AO1 (20 μ M), bloqueador de CaCCs (Martins *et al.*, 2011; Szteyn *et al.*,2012; Kmit *et al.*, 2013); foram utilizados como inibidores e dois antagonistas do receptor P2X_7 : HMA (40 μ M) (Hibell *et al.*, 2001), que também atua como um inibidor antiporte Na^+/H^+ (Aredia *et al.*, 2013) e AZ11 (40 μ M)(Stokes *et al.* 2006), esse último foi dissolvido em ND96 e usado na incubação dos oócitos por 12 horas. Ainda foi utilizado o BAPTA-AM (Wei *et al.*, 2001), um quelante intracelular de Ca^{2+} em ND96, que incubamos os oócitos nessa solução 30 minutos antes dos experimentos.

As correntes foram lidas e analisadas no programa Chart Recorder® pelo sistema de aquisição de dados: Power Lab (AD Instruments®), o sinal foi amplificado por um amplificador (Warner Instruments, Hamden, CT). Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (22°C).

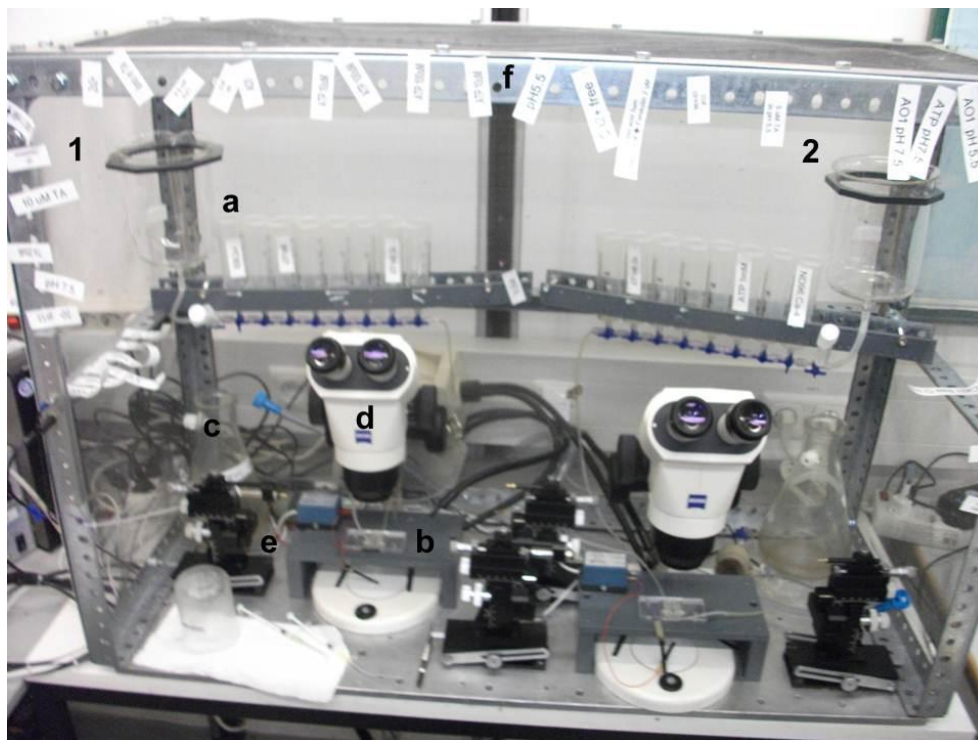


Figura 10: Dois Setups de TEV 1 e 2. (a) Sistema de perfusão contínua contendo um béquer adaptado e seringas ligadas a válvulas para abrir e fechar o fluxo, ainda plugados em tubos de silicone para chegar ao (b) banho, e plugados ao sistema de (c) sucção para descartar as soluções em um erlenmeyer de dois litros adaptado em uma bomba de sucção (não mostrada). No banho o oócito era colocado e visualizado pelo (d) microscópio (Zeiss) para ser empalado (e), pelos dois eletrodos fixados nos suportes de empalhamento. (f) Gaiola de Faraday para reduzir ruídos e interferências externos.

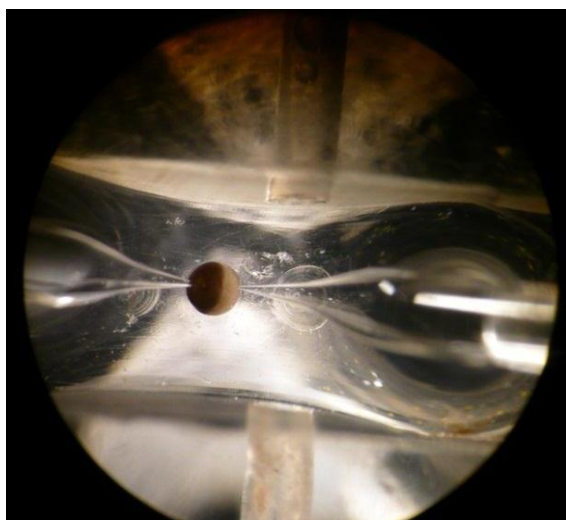


Figura 11: Oócito empalado pelos dois eletrodos (corrente e voltagem), no banho contendo a solução tampão, com o influxo e efluxo da solução.

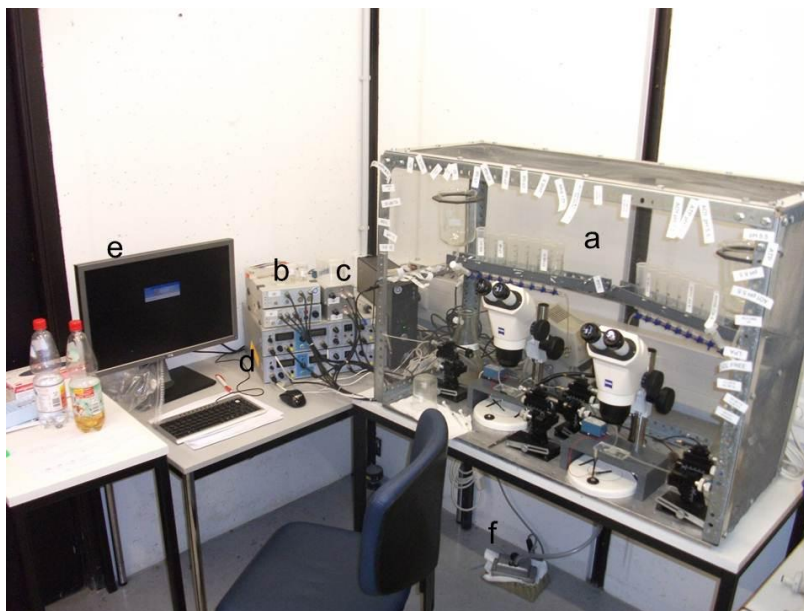


Figura 12: Dois setups completos de TEVC; **a.** Setup de perfusão e empalamento descrito na figura 10; **b.** Power Lab., aparelho para transformar os dados analógicos em digitais; **c.** Aparelhos para reduzir ruídos e interferências internas dos sinais coletados; **d.** Amplificadores de clamp de oócitos, aparelho principal, com ele checa-se as correntes e voltagem dos oócitos empalados, aplica o clamp de voltagem e lê todos os dados gerados; **e.** Computador usando o programa Chart Recorder para leitura e análise de dados.

3.4 – Análise de dados

As correntes geradas foram analisadas no programa Chart Recorder (Figura 13), lidas como deltas de correntes (Figura 13g) (ΔI), e transferidas a uma tabela em Excel e transformadas em condutância ($G\text{-}\mu\text{S}$) calculadas pela lei de Ohm: $V=IR$. De todos os experimentos foram calculadas as médias (\bar{x}) e os erros padrões (SEM) das condutâncias. O Teste T de student, pareado e independente, foram aplicados para análise estatística.

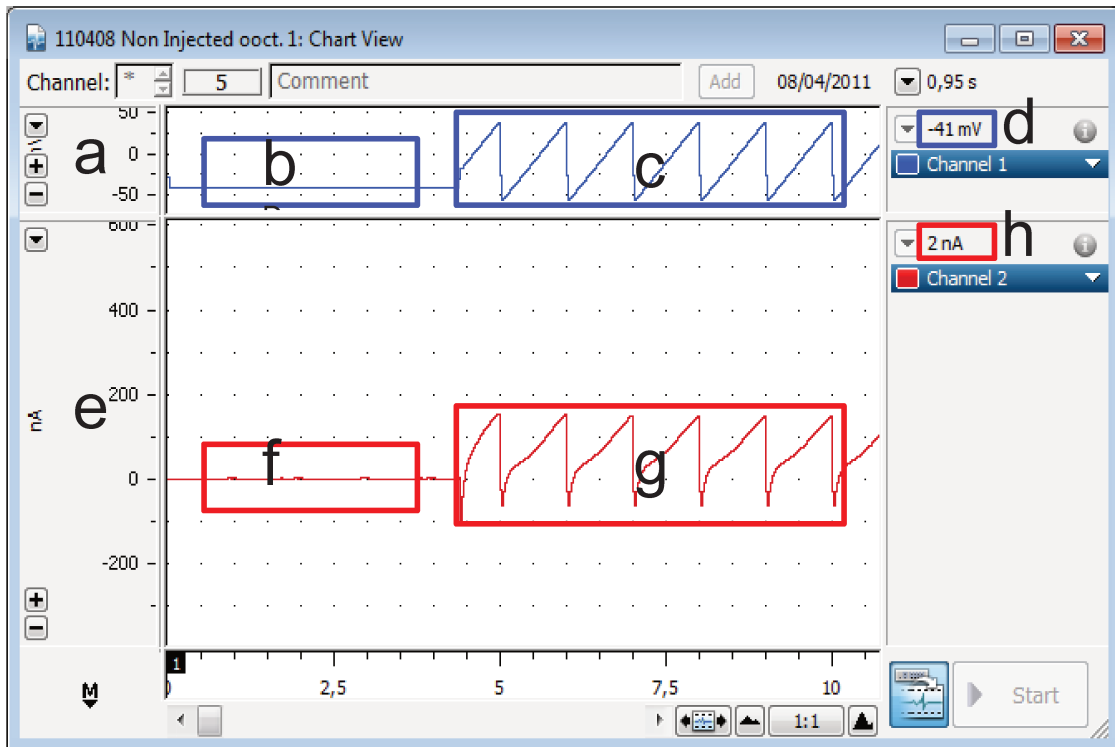


Figura 13: Início de um experimento em oócitos no programa Chart Recorder. **(a)** Mostra-se a escala de Voltagem em mV e **(b)** a voltagem transmembranar do oócito pré-clamp e **(c)** pós-clamp (-40 +60 mV). **(d)** A voltagem em mV lida pré-clamp. **(e)** Mostra-se a escala da correntes nA (nanoamper) e **(f)** a corrente próxima de nula em pré-clamp e **(g)** a corrente pós-clamp. **(h)** A corrente em nA lida em pré-clamp.

RESULTADOS

4.1 – Ativação do P2X₇ superexpressos em oócitos gera altas correntes iônicas através da estimulação de 1mM de ATP

Após o preparo de bons cRNA do hP2X₇ e a injeção dos mesmos em oócitos já preparados, foram estimulados com o ATP em concentrações de 10μM, 100μM, 1mM, mostrou-se o 1mM eficiente para gerar altas correntes iônicas em menor tempo. As soluções fisiológicas foram modificadas para uma melhor ativação do receptor, retirando o MgCl₂ . 6H₂O e diminuindo a concentração do CaCl₂ . 2H₂O para 100μM, com isso tendo em mM: NaCl 58,44; KCl 74,56; CaCl₂ . 2H₂O 14,702; HEPES 238,3; Na-Pyruvat 110,0. Utilizando 2 grupos, o controle negativo, com oócitos injetados com H₂O destilada e livre de nuclease e o grupo positivo injetado com o mRNA do P2X₇, em diferentes tempos de expressão, (2-4 dias), foram estimulados com ATP 1mM e o grupo controle não gerou correntes. Em contraste, o grupo positivo gerou altas correntes iônicas, que foram fortemente inibidas pelo TA a 20μM (Figura 14).

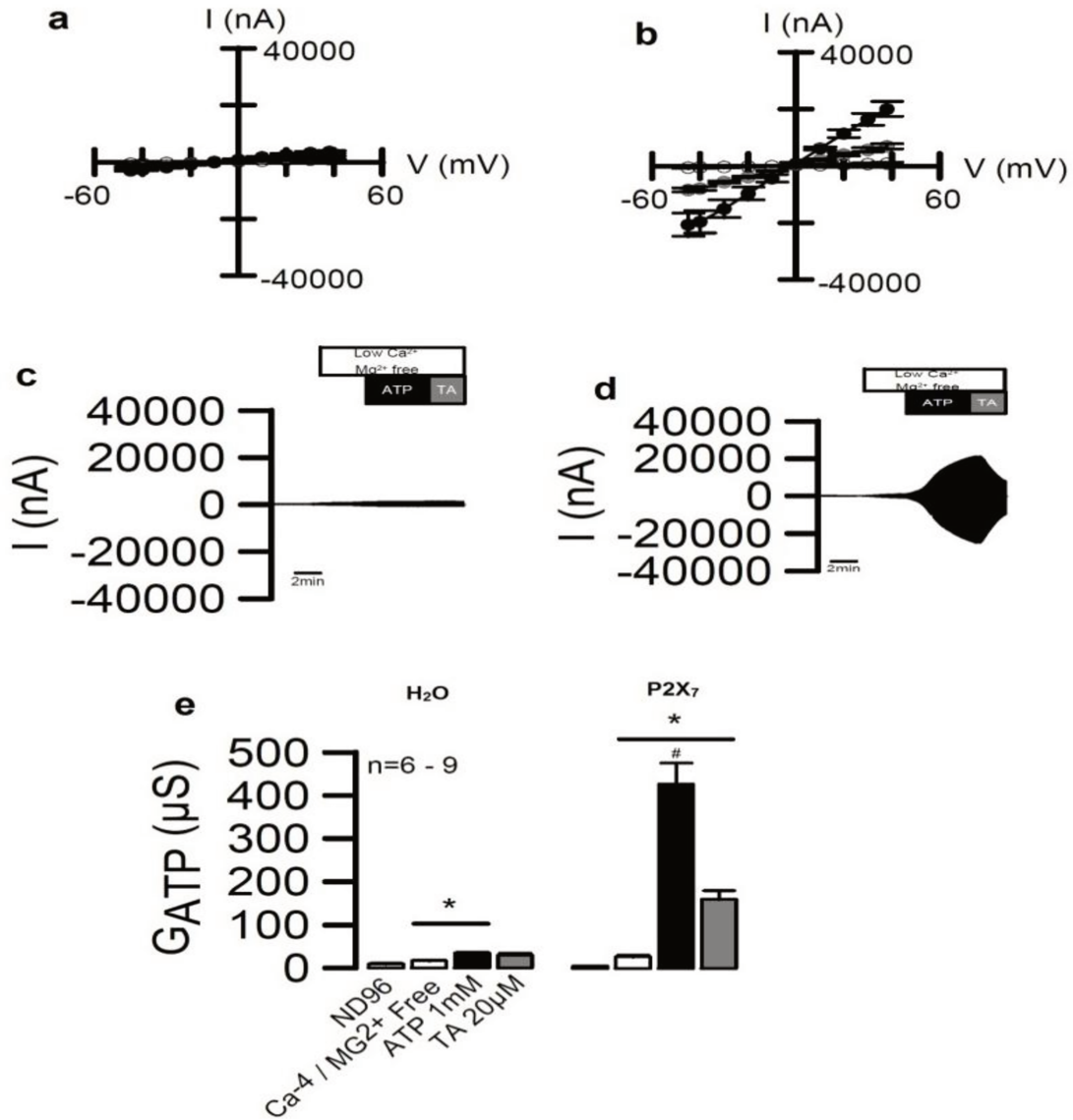


Figura 14: Ativação do P2X₇ após estimulação pelo ATP 1mM e inibição das correntes pelo Ácido Tânico, na solução com 100μM de Ca²⁺ e sem MgCl₂. **(a)** Correntes/Voltagem obtidas em controle negativo e **(b)** P2X₇. Traçados originais do **(c)** controle negativo e **(d)** P2X₇. **(e)** Resumo em barras das condutâncias geradas pela estimulação do ATP. Média ± S.E.M. (número de células). “*” Denota aumento significativo, p < 0,05, teste t pareado. “#” Denota aumento significativo quando comparado à ativação pelo ATP entre os grupos. P < 0,05, teste t independente.

4.2 – Inibindo as correntes geradas pelo P2X₇

Nós testamos dois antagonistas do P2X₇, o HMA a 40μM que inibiu significativamente as correntes geradas após a estimulação pelo ATP (1mM) ($\Delta G = 405,48 \pm 65,97$ versus $154,53 \pm 15,97 \mu S$ (n=4) (Figura 15a), e incubamos os oócitos injetados durante a noite com o antagonista AZ11645373 (40μM) que também inibiu significativamente essas correntes ($\Delta G = 695,26 \pm 96,35$ versus $265,66 \pm 73,07 \mu S$ (n=8-17) (Figura 15b). Foram testamos outros três inibidores promissores para essas correntes geradas, o TA (20μM) ($\Delta G = 427,54 \pm 48,49$ versus $161,18 \pm 20,23 \mu S$ (n=9) (Figura 15), o NPPB a 100μM ($\Delta G = 524,84 \pm 77,56$ versus $256,32 \pm 50,62 \mu S$ (n=8) e também o AO1 a 20μM ($\Delta G = 530,57 \pm 66,68$ versus $531,01 \pm 68,90 \mu S$ (n=8) que mostraram, com exceção do AO1, inibidores significantes para essas correntes (Figura 15c). Esses dados nos mostram que realmente estávamos inibindo correntes geradas pelo P2X₇, utilizando dois potentes antagonistas para o P2X₇: o HMA e o AZ11645373. Dados também representam que o Cloreto esta fortemente presente nelas, pois foram fortemente inibidas por inibidores de Cl⁻, porem não pelo AO1, evidenciando que não ativamos CaCCs.

4.3 – A cauda C-terminal é necessária para o receptor P2X₇ gerar altas correntes iônicas

Analisamos duas mutações do P2X₇ em oócitos, uma de truncamento e uma mutação (E496AK2) na cauda C-terminal, e ainda outra proteína com um tag na cauda C-terminal. Após estimular com o ATP a 1mM, ambas as mutações, truncada e E496AK2 geraram uma corrente significativamente menor do que a do controle positivo, mas ainda significativamente maiores que a do controle negativo (Figura 15d), assim indicando que a cauda C-Terminal é extremamente necessária para gerar essas altas correntes iônicas. Notavelmente, a proteína com o tag gerou também correntes significativamente inferiores do que a do controle positivo, entretanto ainda maiores que a do controle positivo (Figura 15e). Com

isso o C-terminal mostrou-se extremamente necessária para o funcionamento do canal iônico.

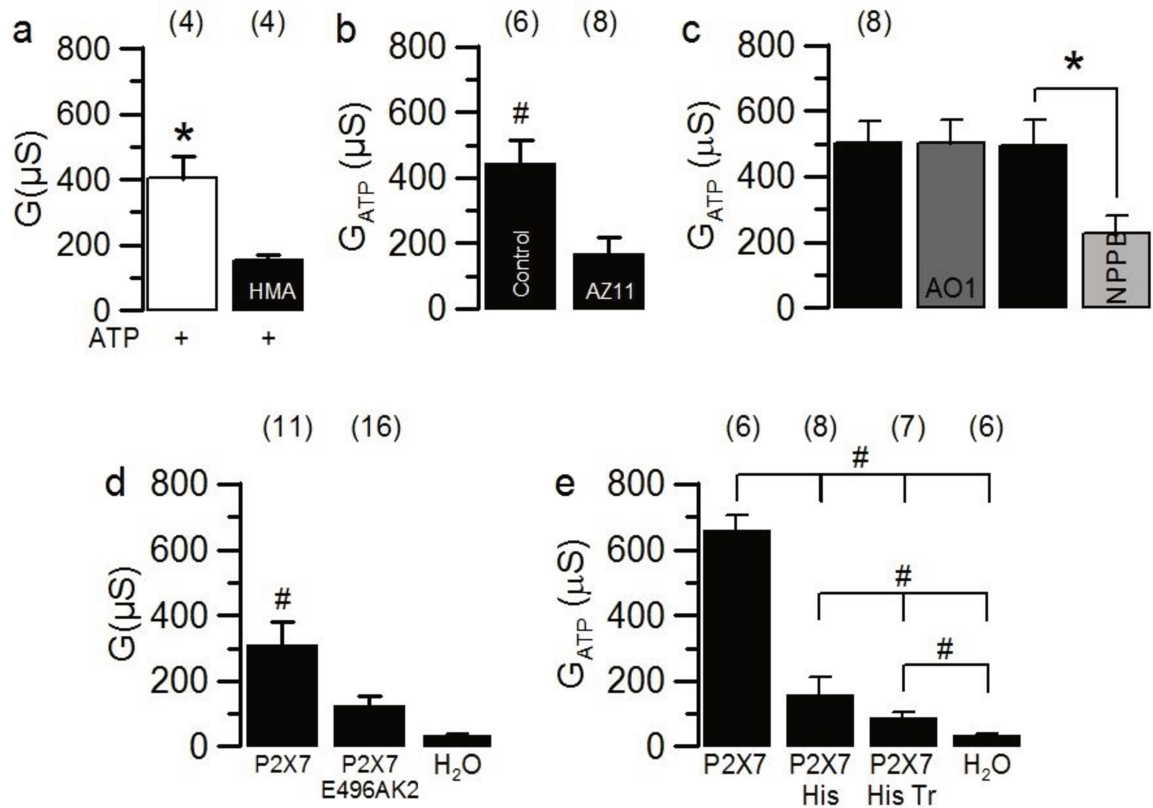


Figura 15: Inibição das condutâncias geradas pelo P2X₇ com dois antagonistas **(a)** HMA (40μM) e **(b)** AZ11645373 (40μM). **(c)** dois bloqueadores de canais de cloreto AO1 (20μM) e o NPPB (100μM). **(d)** Uma mutação na cauda C-terminal E496AK2 gerando uma condutância do ATP significativamente menor do que o grupo controle positivo; e **(e)** P2X₇ His, uma tag colocada na cauda C-terminal e P2X₇ His Tr uma tag e o truncamento da cauda C-terminal “*” Denota uma redução, p< 0,05, teste t pareado, “#” Denota uma redução significativa quando comparado à condutância do controle positivo, p< 0,05, teste t independente

4.4 – O Ca²⁺ extracelular é necessário para o receptor P2X₇ gerar altas correntes iônicas

Incubando os oócitos em BAPTA AM, um quelante de cálcio intracelular, por 30 minutos antes da realização do experimento, mostrou-se não interferir nas correntes geradas pelo P2X₇ pela estimulação do ATP 1mM, entretanto após retirar o Ca²⁺ da solução tampão (ND96) as correntes geradas foram reduzidas significativamente em comparação com o controle positivo, mesmo após a incubação com em BAPTA AM (Figura 16). Nota-se que no resumo de barras

(Figura 16b) ocorreu uma drástica redução nas correntes geradas na ausência do Ca^{2+} extracelular.

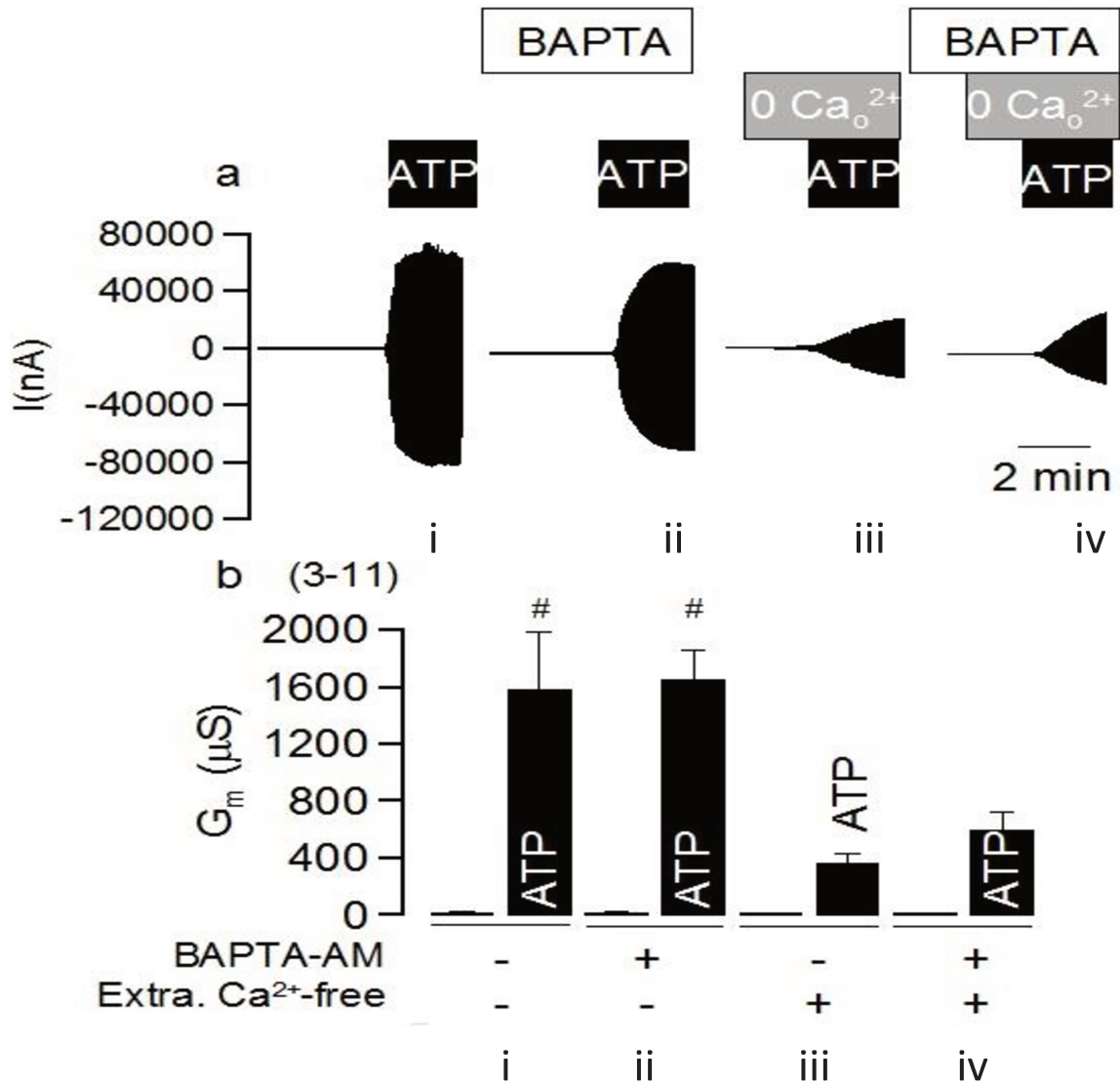


Figura 16: Correntes geradas em oócitos superexpressos com cRNA do P2X_7 estimulada por 1mM de ATP em 4 grupos, i) com 100 μM de Ca^{2+} extracelular, ii) com 100 μM de Ca^{2+} extracelular e incubados com BAPTA AM, iii) com 0 de Ca^{2+} extracelular e iv) com 0 de Ca^{2+} extracelular e incubados com BAPTA AM. **(a)** Traçados originais e **(b)** resumo em barras das condutâncias. “#” Denota uma redução significativa quando comparado aos grupos sem Ca^{2+} extracelular $p < 0,05$, teste t independente.

4.5 – Substituições de íons Na^+ e Cl^- regulam as correntes geradas pelo P2X_7

Preparamos duas soluções diferentes, uma com NMDG para substituir o sódio (Na^+), em mM: NMDG 195,2; HCl 1 mol/l; KCl 74,56; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,702; HEPES 238,3; Na-Pyruvat 110,0; e o Gluconato para substituir o Cl^- , em mM: Na-Gluconat 218,13; KCl 74,56; Ca-Gluconat.1 H_2O 21,52; HEPES 238,3; Na-Pyruvat 110,0; e mostraram uma mudança e redução significativa nas correntes geradas, principalmente com a substituição de Na^+ pelo NDMG (Figura 17). Notavelmente a mudança causada na corrente pela substituição iônica, mostra-se interessante, pois a ausência de Cl^- deveria mudar apenas a corrente iônica para fora e ocorre em ambas, e já a ausência de Na^+ deveria mudar a corrente iônica para dentro, o que demonstra maior mudança, mas também ocorreu em ambas.

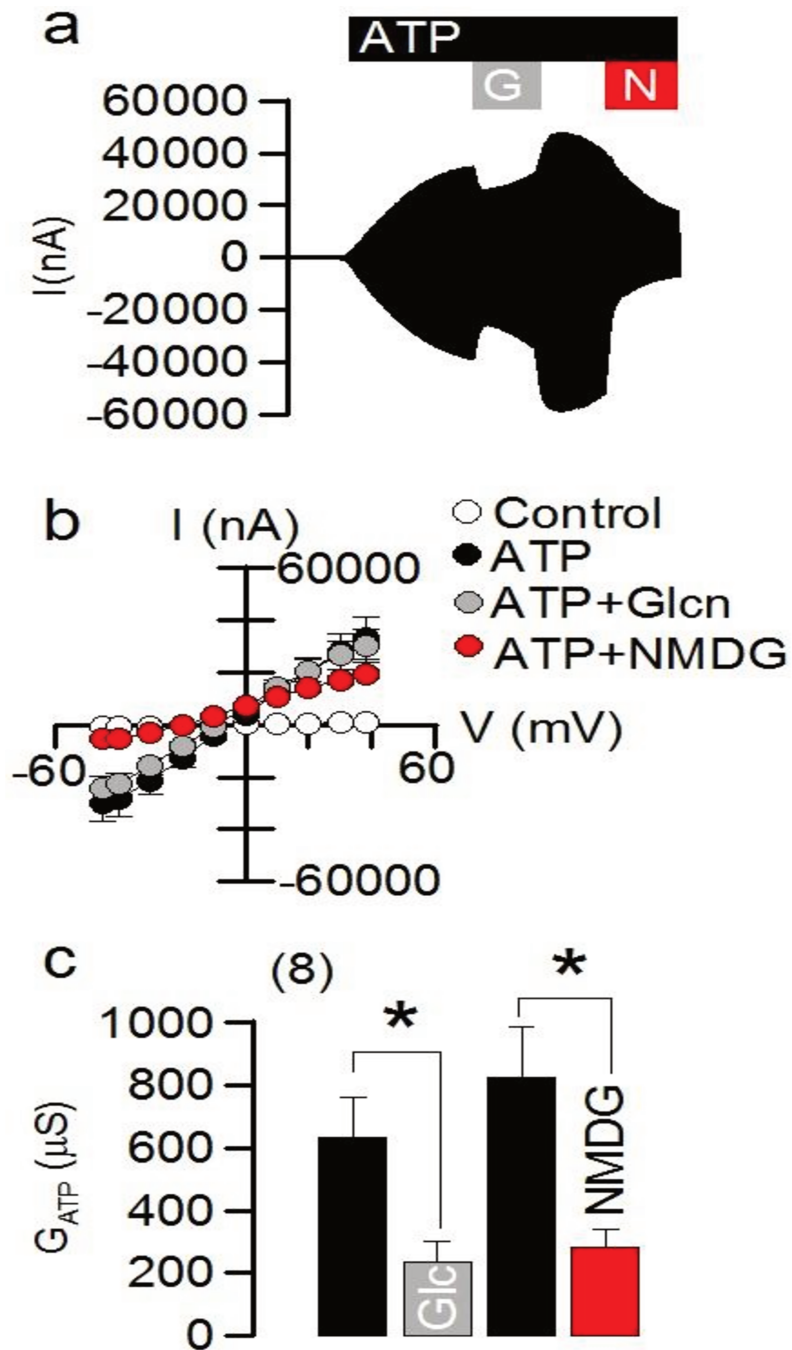


Figura 17: Efeito da substituição dos íons Cloreto e Sódio por Gluconato e NMDG na solução tampão em correntes geradas em oócitos superexpressos com cRNA do hP2X₇ estimulada por 1mM de ATP. **a)** Traçado original G=Gluconato e N=NMDG; **b)** Curvas I/V; **c)** Resumo em barras das condutâncias do ATP na reposição iônica. “*” Denota uma redução significativa quando comparado com o controle, $p < 0,05$, teste t pareado.

DISCUSSÃO

5.1 – Ativação do P2X₇ superexpressos em Oócitos gera altas correntes iônicas através da estimulação de 1mM de ATP

Correntes iônicas geradas através do P2X₇ em oócitos já foram descritas em outros estudos, alegando que é possível gerar o poro (Paukert *et al.*, 2002) ou que não é possível gera-lo (Petrou *et al.*,1997). Neste estudo nós demonstramos que o P2X₇ em oócitos é capaz de gerar altas correntes iônicas e que são bloqueadas por antagonistas do P2X₇ e por outros bloqueadores, como o TA e o NPPB, dois compostos que inibem correntes de cloreto (Martins *et al.*, 2011; Szteyn *et al.*,2012; Kmit *et al.*, 2013). E ainda demonstramos que o Terminal-C da proteína e o cálcio extracelular são importantes para gerar essas correntes. Conforme já foi descrito o Mg²⁺ nas soluções salinas inibi parte do funcionamento canal, como também as concentrações normais de Ca²⁺ (Supernant *et al.*,1996), com isso neste estudo usamos soluções tampões com 0.1mM de Ca²⁺ e 0 Mg²⁺, para termos um melhor funcionamento do canal. Experimentos foram realizados com soluções tampões nas concentrações normais de Ca²⁺ e Mg²⁺ ($\Delta G = 208,51 \pm 58,77$ (n=13) e nas concentrações normais de Ca²⁺ e 0 Mg²⁺ (dados não mostrados) não obtendo melhores resultados do que os encontrados. Já é sabido que baixas concentrações de Ca²⁺ desestabilizam a membrana, porem em células grandes, como os oócitos, não são tão agressivos como em células de mamíferos, apesar de registrarmos um aumento continuo e significativo quando substituímos a solução tampão normal para a com 0.1mM de Ca²⁺ e 0 Mg²⁺ ($\Delta G = 5,03 \pm 0,64$ versus $26,45 \pm 4.47 \mu S$ (t=5min)(n=9).

5.2 – Inibindo as correntes geradas pelo P2X₇

Existem diversos antagonistas do P2X₇ (Kmit *et al.*, 2013; Hibell *et al.*, 2001) e neste estudo usamos dois antagonistas potentes para o P2X₇ humano: o HMA (40 μ M), que inibiu significativamente as correntes geradas pelo estímulo do ATP 1mM e o AZ11645373 (40 μ M), que após incubarmos durante a noite os oócitos expressando o P2X₇, inibiu significativamente as correntes geradas pelo estímulo do ATP 1mM quando comparadas com os oócitos não incubados com o antagonista. Através desses dados concluímos que o hP2X₇ é inibido por esses

potentes antagonistas em oócitos. Outros três compostos foram utilizados na tentativa de bloquear as correntes, o TA (20 μ M) e o NPPB (100 μ M) que significativamente inibiram essas correntes, mesmo sendo descritos como inibidores de canais de cloreto (Martins *et al.*, 2011; Szteyn *et al.*, 2012; Kmit *et al.*, 2013), o que é muito interessante, podendo supor que canais de cloreto podem fazer parte dessas enormes correntes iônicas não seletivas, mas por outro lado o AO1 (20 μ M), um inibidor de CaCCs (Martins *et al.*, 2011), não teve um grande efeito nessas correntes, apenas uma inibição rápida no aumento das correntes (cerca de 10s), porém isso ocorreu apenas quando as correntes ainda não estavam em seu platô. Isso nos trás algumas suposições de como essas correntes são geradas, se partirmos da hipótese de que o P2X₇ comunica-se com outras proteínas para formar o poro, seja através do cálcio ou do C-Terminal, essas proteínas possam ser canais de cloreto, porém não CaCCs. Mas supondo que o poro não foi formado, e apenas o canal iônico P2X₇ está ativo, essa enorme corrente iônica pode ter sido gerada apenas pela grande quantidade de canais expressos na membrana (Paukert *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2008; Smart *et al.*, 2002).

5.3 – A cauda C-terminal é necessária para o receptor P2X₇ gerar altas correntes iônicas

Após testar três morfologias distintas do C-terminal do hP2X₇: o Tag His, o truncamento e uma mutação; levando o fato de que o C-terminal, por ser mais longo no P2X₇ do que comparados com outros de sua família P2X₂ (Supernant *et al.*, 1996), esta diretamente envolvido nas altas correntes iônicas não seletivas geradas. O P2X₇ His Tag gerou uma condutância bem menor do que ao do P2X₇, sendo uma surpresa, já que não esperávamos que uma Tag His no final da proteína mudaria tanto a sua eficiência, porém já foi descrito algo parecido em outro estudo em Becker *et al.* (2008). O mesmo aplica-se para o truncamento His do C-terminal (P2X₇ His Tr), e para a mutação E496AK2, gerando ainda menores condutâncias, porém ainda sim, significativamente maiores que as do controle negativo (Stokes *et al.*, 2006). Segundo Smart *et al.*(2002) o C-terminal é necessário para gerar o poro, e que conseguimos gera-lo em nossos

experimentos, as duas estruturas geraram condutâncias maiores que a do controle negativo devido ao fato do canal estar ativo, e transportar os íons Na^+ , Ca^{2+} (influxo) e K^+ (efluxo), entretanto não foi possível gerar o grande poro, podendo ser pelo fato do P2X_7 precisar do C-terminal para conseguir interagir-se com outras proteínas e gerar o poro, seguindo a hipótese do P2X_7 interagir com outros canais para gerar o poro membranar não seletivo (Smart *et al.*, 2003; Locovei *et al.*, 2007). Como visto em, Smart *et al.* (2002) o C-Terminal é necessário para o P2X_7 ter expressão na superfície da célula, o que essas menores condutâncias seria apenas pelo número reduzido de canais na membrana, explicando assim o fato dos três grupos testados terem menores condutâncias. Dados que serão testados futuramente, para comprovação dessa hipótese levantada.

5.4 – O Ca^{2+} extracelular é necessário para o receptor P2X_7 gerar altas correntes iônicas

O influxo de Ca^{2+} pode ativar diversos mecanismos em uma célula, porém as altas concentrações levam a célula a apoptose, ou morte celular (Bianco *et al.*, 2006; Sun, 2010). Nós demonstramos que diferentemente dos receptores P2Y , que utilizam o Ca^{2+} de estoques intracelular (Ralevic *et al.*, 1997; Deli *et al.*, 2008), o P2X_7 , para gerar altas condutâncias iônicas, necessita principalmente do Ca^{2+} extracelular, já que ao retirar-lo da solução tampão, as correntes geradas foram menores, mesmo incubando os oócitos com o BAPTA-AM. Notavelmente nesse grupo de experimentos obtivemos as maiores condutância quando comparados aos outros dados nos controles positivos (com 0.1mM Ca^{2+}), e no grupo livre de Ca^{2+} as correntes geradas foram semelhantes em correntes geradas com as de outros experimentos que realizamos, mas em comparação com os grupos de controle positivo, mostraram-se bem menores. Este fato das altas correntes pode ser explicado por um grupo de oócitos mais maturados, ou mesmo pela injeção de mais quantidade do cRNA ou mais recente preparado (não estocado à -80°C). Mas apesar dessas altas correntes, não podemos excluir que o Ca^{2+} extracelular é importante para gerar altas correntes iônicas.

5.5 – Substituição de íons Na⁺ e Cl⁻ regulam as correntes geradas pelo P2X₇

Ao substituir os íons de Na⁺ e Cl⁻ por NMDG e gluconato, respectivamente, da solução tampão encontramos uma redução nas correntes, principalmente pelo NMDG (Iglesias *et al.*, 2008; Kubick *et al.*, 2011). Uma possível explicação para este fato é a competitividade iônica para atravessar o canal, ou seja, a dificuldade que íons de diferentes formas e tamanhos levam para atravessar o canal já aberto, já que o NMDG e o gluconato são moléculas maiores do que o Na⁺ e o Cl⁻, porém ao nível do poro, essas moléculas não deveriam ter dificuldades para atravessar a membrana, podendo subentender que o poro não foi gerado. Outra é que nessas corrente iônicas os íons sódio e cloreto estão presentes e a substituição do mesmo causa uma redução da troca de íons.

CONCLUSÕES

Nós concluímos que os oócitos de *Xenopus laevis* que expressam hP2X₇ produzem altas correntes não seletivas após estimulação com 1mM de ATP. Que a sua ativação requer o Ca²⁺ extracelular e a cauda C-terminal da proteína. O NPPB e o Ácido Tânico mostraram-se potentes inibidores dessas correntes. E finalmente, que as correntes do P2X₇ são reguladas por cátions (Na⁺) e ânions (Cl⁻) extracelulares.

Neste estudo não foi comprovado que o hP2X₇, ao ser estimulado continuamente pelo ATP, é capaz de gerar um poro em oócitos de *Xenopus*, o que nos leva a realizar um estudo mais específico para validar a hipótese de que essas altas correntes foram geradas pela formação do poro ou simplesmente foram geradas pela enorme quantidade de proteínas expressas na membrana.

REFERÊNCIAS

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

Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P *et al.* Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. *Cancer Res.* 2012;72(12):2957-69.

Alberto AV, Faria RX, Couto CG, Ferreira LG, Souza CA, Teixeira PC, *et al.* Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;72(12):2957-69.

Aredia F, Giansanti V, Mazzini G, Savio M, Ortiz LM, Jaadane I, *et al.* Multiple effects of the Na⁺/H⁺ antiporter inhibitor HMA on cancer cells. *Apoptosis.* 2013, 31.

Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;90:13:87.

Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, *et al.* The P2X7 Carboxyl Tail Is a Regulatory Module of P2X7 Receptor Channel Activity. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(37):25725-34

Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C *et al.* A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem.* 2006;99(3):745-58.

Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A. An antagonistinsensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO (Eur Mol Biol Organ).* 1996a;15:55–62.

Buell G, Michel AD, Lewis C, Collo G, Humphrey PP, Surprenant A. P2X1 receptor activation in HL60 cells. *Blood.* 1996b;87:2659–64.

Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(3):166-76.

Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 2009;42(1):3-8.

Chahwala SB & Cantley LC. Extracellular ATP induces ion fluxes and inhibits growth of friend erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 1984;259:13717–22.

Chen C-C, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature (Lond.)*. 1995;377:428–31.

Cockcroft S & Gomperts BD. The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem J.* 1980;188:789–98.

Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* 1997;36:1277–83.

cRNA micro injection into *Xenopus* oocytes. Disponível em: <<http://ibmmsrvlakitu.unibe.ch/sigel/xenopus.html>>. Acesso em: 10 de junho de 2013.

Deli T, Csernoch L. Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathol Oncol Res* 2008;14(3):219-31.

Di Virgilio F, Sanz JM, Chiozzi P, Falzoni S. The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Prog. Brain Res.* 1999 120:355-368.

Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* 2009;5(2):251-6.

Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol.* 1993;265: C577-C606.

el-Moatassim C & Dubyak GR. A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem.* 1992;267:23664–73.

Erb L, Lustig KD, Ahmed AH, Gonzalez FA, Weisman GA. Covalent incorporation of 39-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP into a P2 purinoceptor in transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem.* 1990;265:7424–31.

Facebook . Disponível em:
<https://www.facebook.com/photo.php?fbid=142946579152507&set=a.142946505819181.29632.140344439412721&type=1&relevant_count=3> Acesso em: 10 de julho de 2013a.

Facebook . Disponível em:
<https://www.facebook.com/photo.php?fbid=145393438907821&set=a.145393315574500.30362.140344439412721&type=1&relevant_count=1>. Acesso em: 10 de julho de 2013b.

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

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Di Virgilio F. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology.* 1997 36(9):1295-301.

Fields RD & Burnstock G. Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nature Reviews Neuroscience.* 2006;7:423-36.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(3):79-82.

Gargett CE & Wiley JS. The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 1997;120:1483–90.

Greenberg S, Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC. Extracellular nucleotides mediate Ca²⁺ fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1988;263:10337–43.

Griffiths RJ, Stam EJ, Downs JT, Otterness IG. ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *J Immunol.* 1995;154:2821–8.

Harde TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:541-79.

Hibell AD, Thompson KM, Xing M, Humphrey PPA, Michel AD. Complexities of Measuring Antagonist Potency at P2X7 Receptor Orthologs. *JPET.*2001;296:947–957.

Hickman SE, El-Khoury J, Greenberg S, Schieren I, Siverstein SC. P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood.* 1994;84:2452–6.

Honoré H, Martin C, Mironneau C , Mironneau J. An ATP-sensitive conductance in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Am J Physiol.* 1989;257:C294–C305.

Humphreys BD & Dubyak GR. Induction of the P2Z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol.* 1996;157:5627–37.

Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295:C752–C760.

Jamieson GP, Snook MB, Thurlow PJ, Wiley JS. Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol.* 1996;166:637–42.

Kaunitz JD & Akiba Y. Duodenal Intracellular Bicarbonate and the 'CF Paradox'. *J Pancreas (Online)* 2001; 2(4 Suppl):268-73.

Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, *et al.* *Xenopus tropicalis*: Na Ideal Experimental Animal in amphibia. *Exp. Anim.* 2020;59(4):395-405.

King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G. Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol.* 1996;117:1371–3.

Kmit A, van Kruchten R, Ousingsawat J, Mattheij NJA, Senden-Gijsbers B, Heemskerk JWM, *et al.* Calcium-activated and apoptotic phospholipid scrambling induced by Ano6 can occur independently of Ano6 ion currents. *Cell Death and Disease*. 2013;611:135.

Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F. The effect of anions on the human P2X7 receptor. *Biochimica et Biophysica*. 2011;1808:2913–2922.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature (Lond.)*. 1995;377:432–35.

Li C, Peoples RW e Weight FF. Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol*. 1996;76:3048–58.

Li C, Peoples RW e Weight FF. Mg²⁺ inhibition of ATP-activated current in rat nodose ganglion neurons: Evidence that Mg²⁺ decreases the agonist affinity of the receptor. *J Neurophysiol*. 1997a;77:3391–5.

Li C, Peoples RW, Weight FF. Enhancement of ATP-activated current by protons in dorsal root ganglion neurons. *Pflüeg Arch Eur J Physiol*. 1997b;433:446–54.

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. *FEBS Letters*. 2007;581:483–488.

Lohres. Disponível em: <<http://www.lohres.com>>. Acesso em: 10 de junho de 2013.

Mackenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem*. 1996;271:2879–81

Markwardt F, Löhn M, Böhm T, Klapperstück M. Purinoceptor-operated cationic channels in human B lymphocytes. *J Physiol (Lond)*. 1997;498:143–51.

Martins JR, Faria D, Kongsuphola P, Reischb B, Schreiber R, Kunzelmann K. Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. PNAS. 2011;108(44):18168–72.

McMillian MK, Soltoff SP, Cantley LC, Rudel RA, Talamo BR. Two distinct cytosolic calcium responses to extracellular ATP in rat parotid acinar cells. Br J Pharmacol. 1993;108:453–61.

Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F. Oxidized ATP: An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. J Biol Chem. 1993;268:8199–203.

Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, Di Virgilio F. Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. Biochem J. 1992;288:897–901.

Myrtek D, Müller T, Geyer V, Derr N, Ferrari D, Zissel G, *et al.* Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion. J Immunol. 2008;181:2181-2188.

Nakazawa K, Fujimori K, Takanaka A, Inoue K. An ATP-activated conductance in pheochromocytoma cells and its suppression by extracellular calcium. J Physiol. 1990;428:257–72.

North RA. P2X purinoceptor plethora. Semin Neurosci. 1996;8:187–94.

Nutt LK. The *Xenopus* oocyte: A model for studying the metabolic regulation of cancer cell death. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2012; 23:412– 18

Ohlendorff SD, Tofteng CL, Jensen JE, Petersen S, Civitelli R, Fenger M. Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment. Pharmacogenet Genomics. 2007;17(7):555-67.

Parker JC & Snow RL. Influence of external ATP on permeability and metabolism of dog red blood cells. Am J Physiol. 1972;56:888–93.

Paukert M, Hidayat S, Gründer S. The P2X7 receptor from *Xenopus laevis*: formation of a large pore in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letters*. 2002;513:253-258.

Pearl EJ, Grainger RM, Guille M, Horb ME. Development of *Xenopus* Resource Centers: The National *Xenopus* Resource and the European *Xenopus* Resource Center. *Genesis*. 2012;50:155-63.

Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, John V. Walsh Jr. JV. P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. 1997;411(2-3):339-45.

Pizzo P, Murgia M, Zambon A, Zanovello P, Bronte V, Pietrobon D, *et al.* Role of P2Z purinergic receptors in ATP-mediated killing of tumor necrosis factor (TNF)-sensitive and TNF-resistant L929 fibroblasts. *J Immunol*. 1992;149:3372-8.

Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2006;66(2):907-14.

Ralevic V & Burnstock. Receptors for Purines and Pyrimidines. 1998;50(3):413-92.

Ralevic V, Burrell S, Kingdom J, Burnstock G. Characterization of P2 receptors for purine and pyrimidine nucleotides in human placental cotyledons. *Br. J. Pharmacol*. 1997;121:1121-1126.

Riedel T, Schmalzing G, Markwardt F. Influence of Extracellular Monovalent Cations on Pore and Gating Properties of P2X7 Receptor-Operated Single-Channel Currents. *Biophysical Journal*. 2007;93:846-858.

Ruhr Universität Bochum. Disponível em <<http://www.ruhr-uni-bochum.de/bc1/forschung/xenopus-projekt.html>>. Acesso em: 10 de junho de 2013.

Sasaki T & Gallacher DV. Extracellular ATP activates receptor-operated cation channels in mouse lacrimal acinar cells to promote calcium influx in the absence of phosphoinositide metabolism. *FEBS Lett.* 1990;264:130–4.

Smart ML, Panchal RG, Bowser DN, Williams DA, Petrou S. Pore formation is not associated with macroscopic redistribution of P2X7 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:C77–C84.

Smart ML, Gu B, Panchal RG, Wiley J, Cromer B, Williams DA, *et al.* P2X7 Receptor Cell Surface Expression and Cytolytic Pore Formation Are Regulated by a Distal C-terminal Region. *JBC.* 2003;278(10):8853–8860.

Soltoff SP, McMillian MK, Talamo BR. ATP activates a cation-permeable pathway in rat parotid acinar cells. *Am J Physiol.* 1992;262:C934–40.

Soltoff SP, McMillian MK, Talamo BR, Cantley LC. Blockade of ATP binding site of P2 purinoceptors in rat parotid acinar cells by isothiocyanate compounds. *Biochem Pharmacol.* 1993;45:1936–40.

Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem.* 1987;262:8884–8

Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, *et al.* Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X7 receptors, AZ11645373. *British Journal of Pharmacology.* 2006;149:880–887.

Sun SH. Roles of P2X7 receptor in glial and neuroblastoma cells: the therapeutic potential of P2X7 receptor antagonists. *Mol Neurobiol.* 2010;41(2-3):351-5.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 1996;272(5262):735-8.

Szteyn K, Schmid E, Nurbaeva MK, Yang W, Münzer P, Kunzelmann K, *et al.* Expression and Functional Significance of the Ca²⁺-Activated Cl⁻ Channel ANO6 in Dendritic Cells. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:1319-32.

Tatham PER, Cusack NJ, Gomperts BD, Characterisation of ATP4-receptor that mediates permeabilisation of rat mast cells. *Eur J Pharmacol.* 1988;147:13–21.

Tatham PER & Lindau M. ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. *J Gen Physiol.* 1990;95:459–76.

Tilmann M, Kunzelmann K, Fröbe U, Cabantchik I, Lang HJ, Englert HC, Greger R. Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Pflugers Arch.* 1991 Jul;418(6):556-63.

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, *et al.*) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature (Lond.).* 1994;371:516–19.

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

Wang C-Z, Namba N, Gono T, Inagaki N, Seino S. Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220:196–202.

Wei MB, Koh JY, Won MH, Lee JC, Shin TK, Moon CJ, Ha HJ, *et al.* BAPTA/AM, an Intracellular Calcium Chelator, Induces Delayed Necrosis by Lipoxygenase-mediated Free Radicals in Mouse Cortical Cultures. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Bmi Psychtat.* 2001;25:1641-59.

Weisman GA, De BK, Pritchard RS. Ionic dependence of the extracellular ATP-induced permeabilization of transformed mouse fibroblasts: Role of plasma membrane activities that regulate cell volume. *J Cell Physiol.* 1989;138:375–83.

Wikipedia. Disponivel em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:SchematicP2XRSubunitV2.png>>. Acesso em: 10 de julho de 2013.

Wikipedia.

Disponível

em:

<<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3d/FullStructureV2.png>>.

Acesso em: 30 de janeiro de 2012.

Wildman SS, King BF, Burnstock G. Potentiation of ATP-responses at a recombinant P2X2 receptor by neurotransmitters and related substances. *Br J Pharmacol.* 1997;120:221–4.

Wiley JS, Chen JR, Snook MB, Jamieson GP. The P2Z-purinoceptor of human lymphocytes: Actions of nucleotide agonists and irreversible inhibition by oxidized ATP. *Br J Pharmacol.* 1994;112:946–50.

Yang EB, Wei L, Zhang K, Chen YZ, Chen WN. Tannic acid, a potent inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biochem.* 2006;139(3):495-502.

Zoetewij JP, Van De Water B, De Bont HJ, Nagelkerke JF. The role of a purinergic P2Z receptor in calcium-dependent cell killing of isolated rat hepatocytes by extracellular adenosine triphosphate. *Hepatology.* 1996;23:858–65.