

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Dinarte Neto Moreira Ferreira

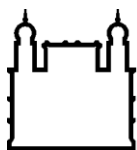
Vias de permeabilização da membrana plasmática ativadas pelo ATP
extracelular

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador(a): Prof^o Dr. Luiz Anastácio Alves

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Dinarte Neto Moreira Ferreira

Vias de Permeabilização da Membrana Plasmática Ativadas pelo
ATP Extracelular

Orientadores: Prof^o Dr. Luiz Anastácio Alves

REVISOR:

Prof^o Dr Robson Coutinho e Silva (UFRJ)

EXAMINADORES:

Dr Vinícius Cotta de Almeida (FIOCRUZ) – Presidente

Prof^o Dr Guido Lenz (UFRGS)

Prof^o Dr Ricardo Augusto de Mello Reis (UFRJ)

Rio de Janeiro, 20 de Setembro de 2018

Neto Moreira Ferreira, Dinarte.

Vias de Permeabilização da Membrana Plasmática Ativadas pelo ATP Extracelular / Dinarte Neto Moreira Ferreira. - Rio de Janeiro, 2018.
144 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Luiz Anastácio Alves.

Bibliografia: f. 104-144

1. Receptores Purinérgicos. 2. P2X7. 3. ATP extracelular. 4. Permeabilização. 5. Macroporo. I. Título.

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil, mas é a coisa mais preciosa
que temos.*

Albert Einstein

Agradecimentos

Gostaria de agradecer e dedicar essa tese a todas as pessoas que ajudaram a torna-la possível.

Primeiramente aos meus meus orientadores e minha família pelos anos de paciência e dedicação na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Comunicação Celular da FIOCRUZ, pela disposição em ajudar e pela boa convivência durante todos esses anos.

Aos colegas da sala E10 do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, que fazem parte do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas Virais e do Laboratório de Biologia Estrutural de Vírus por me receberem bem no espaço de vocês e promover um excelente ambiente de trabalho durante esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Agregação de Proteínas Amilóides, por me receberem e me ajudarem diversas vezes em seu espaço.

Ao meu colega Rafael Soares Ferreira, pelas boas conversas, a sempre presente vontade de ajudar e por gentilmente ceder seu modelo estrutural do receptor P2X7 para esse estudo.

Ao Professor João Menezes do Instituto de Ciências Biomédicas, por se dispor a me ensinar a fazer imunofluorescência em seu laboratório, mesmo sendo a semana do Natal, onde não havia ninguém no laboratório e pelos reagentes doados com muita boa vontade.

A professora Elvira do Instituto de Microbiologia da UFRJ por abrir as portas seu laboratório para os longos experimentos no leitor de placas a partir do momento que o nosso quebrou. Gostaria de estender esse agradecimento aos seus alunos, que sempre me receberam e me trataram com bastante gentileza e disposição para ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca: professor Emiliano pela empolgação em colaborar e discutir o projeto, e aos seus alunos Paulo César, pela ajuda com os experimentos de patch-clamp, e Thábata Duque, pela ajuda nos experimentos de imunofluorescência e pela conversas revigorantes nos momentos mais difíceis.

A minha namorada Luiza, pela paciência de me aturar esses anos, em especial nos momentos mais difíceis da tese.

Ao meu pai e minha mãe por prover todo apoio logístico e emocional que foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar a tese.

Ao Anael Viana, por sempre acreditar em mim e me indicar para dar aula em diferentes ocasiões, em especial durante os longos meses sem bolsa.

A Liana Monteiro, pelos anos de companheirismo e no laboratório e pela gentil ajuda nos experimentos de viabilidade celular.

A Alejandra Carreño pelas conversas, pela vontade constante de ajudar e pelos cafés trazidos da Colômbia.

Ao Rodrigo Bisaggio, pelas boas conversas e ajuda intelectual constante no projeto.

Ao Samir Campos, por ser um dos caras mais legais que eu tive contato na vida acadêmica, que além de estar sempre disposto a ajudar, sempre tem uma resposta muito bem embasada para praticamente qualquer coisa.

A Giulia Ferretti, por me aturar conversar todos os dias sobre *Western Blot* enquanto eu tinha problema com esses resultados. Mesmo com a insistência diária do mesmo assunto ela sempre me atendeu com bastante gentileza.

A Cristina Souza e Pedro Teixeira, por serem meus primeiros orientadores na vida acadêmica e me prepararem para a longa jornada que vinha pela frente.

Ao Luiz Anastácio Alves, por ser meu orientador informal na iniciação científica e formal no mestrado e doutorado. Sua dedicação em discutir tanto temas acadêmicos quanto sobre a vida será sempre lembrada.

A Mônica Santos de Freitas por me permitir a honra de ser seu primeiro aluno de pós-graduação. Agradeço sua ativa presença na orientação e por sempre acreditar em mim.

Lista de abreviações

2Me-S-ADP – 2-metiltioadenosina difosfato

2Me-S-ATP – 2-metiltioadenosina trifosfato

5-OMe-UDP – 5-metiloxiuridina difosfato

ADP – difosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

BPTU – N-[2-[2-(1,1-Dimetil-etil) fenoxi]-3-piridinil]-N'-[4-(trifluorometóxido)fenil] uréia

BSA – *bovine serum albumin* (albumina bovina sérica)

Bz-ATP – Benzoil ATP

CFTR - *cystic fibrosis transmembrane regulator*

DAPI – diamino fenilindol

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ENaCs - *Epithelial sodium channel*

LDH – lactato desidrogenase

MTSEA – etilamina metanotiosulfonada

MTSEA-biotina - etilamina metanotiosulfonada conjugada a biotina

MTSES – sulfoetil metanotiosulfonado

MTS-rodamina – sulforodamina metanotiofulfonada

MTT – brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazolil)-2,5-Difeniltetrazolium)

NAC – N-acetilcisteína

NAD⁺ - Dinucleótideo de nicotinamida e adenina oxidado

NADH - Dinucleótideo de nicotinamida e adenina reduzido

NKCC – cotransportador de K⁺, Na⁺ e Cl⁻

PPADS - ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico

SV40 – Vírus símio 40

TBS – Tampão tris salino

TBST – Tampão tris salino com Tween20

TM - Transmembrana

TNP-ATP – Trinitrofenil adenosina trifosfato

UTP – uridina difosfato

UTP-G - uridina difosfato conjugada a glicose



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Resumo

Vias de Permeabilização da Membrana Plasmática Ativadas pelo ATP Extracelular

Dinarte Neto Moreira Ferreira

O ATP, encontrado em altas concentrações dentro das células, pode ser liberado para o meio extracelular através de vesículas, proteínas formadoras de canal ou devido ao comprometimento da membrana plasmática. Em tecidos inflamados e no microambiente tumoral sua concentração pode elevar cerca de 100 vezes em comparação a tecidos saudáveis. No meio extracelular, o ATP exerce a função de mensageiro e ativa receptores denominados receptores P2. Estes são subdivididos em P2Y, metabotrópicos associados a proteínas G, e P2X, formadores de canal catiônico não seletivo. A ativação do subtipo P2X7 (P2X7R) pelo ATP produz uma corrente não dessensibilizante, levando a despolarização da membrana plasmática e elevação do Ca^{++} intracelular. Contudo, quando exposto de maneira prolongada a altas concentrações de ATP (>300 μ M) ocorre um progressivo aumento da permeabilidade da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular, como o Yo-Pro-1 e o iodeto de propídio. Existem duas possíveis explicações para esse fenômeno: o canal iônico entraria em um estado dilatado permitindo assim a passagem de moléculas de alto peso molecular ou sua ativação desencadearia sinais intracelulares que ativariam uma segunda proteína formadora de poro na membrana plasmática. Evidências recentes apontam que é possível que o próprio canal se dilate, contudo, o bloqueio gênico ou farmacológico da proteína formadora de poro panexina diminui a permeabilização de moléculas de alto peso molecular em alguns tipos celulares e sob certas condições experimentais. Assim, esse trabalho tem como objetivo investigar a capacidade de dilatação do canal do P2X7R. Para tanto, propomos que resíduos no segundo domínio transmembrana no receptor P2X7R (presumivelmente na luz do canal iônico) estariam acessíveis ao composto metanotiofulfonado MTSEA-Biotina. Utilizamos mutagênese sítio dirigida para inserir um resíduo de cisteína na região transmembrana 2 do P2X7R (G345C), uma vez que esse resíduo possui a capacidade de se ligar covalentemente ao MTSEA-biotina e assim bloquear parte da permeabilização. Para esse fim, criamos um método de evidenciar a permeabilidade da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular, como o Yo-Pro-1 e o iodeto de propídio, em um leitor de placas. O método se mostrou reprodutível e possui passos de normalização dos resultados que permitem comparar corantes diferentes e evitar artefatos devidos a variações entre os poços. Além disso, o método usado nesse trabalho evita passos de lavagem do poço, uma possível problemática em certos tipos celulares. Adicionalmente foi criado um sistema de expressão heteróloga do P2X7R para ser aplicado nos ensaios com o mutante G345C e determinadas as melhores condições de expressão tanto pela atividade, quanto pela imunodeteção do P2X7R. Durante o desenvolvimento desse trabalho, foi observado que o tratamento com 5 mM de ATP aumenta a permeabilidade da membrana ao iodeto de propídio nas células HEK293T que não expressam o P2X7R. Quando essa célula é transfectada com o P2X7R a permeabilização aumenta cerca de duas vezes, sugerindo haver duas vias distintas: uma dependente e outra independente do P2X7R. A via independente do P2X7R também promove a abertura de um canal iônico e a permeabilidade da membrana plasmática ao iodeto de propídio pode ser bloqueada parcialmente com probenicida, um antagonista da panexina. A via dependente do P2X7R parece envolver a dilatação do canal, uma vez que nossos experimentos sugeriram a acessibilidade do resíduo G345C ao composto MTSEA-biotina. Contudo, ajustes no protocolo são necessários para se obter uma evidência mais clara quanto a acessibilidade desse resíduo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Abstract

ATP-activated plasma membrane permeabilization pathways

Dinarte Neto Moreira Ferreira

ATP molecule, found at high concentration within cells, can be released to extracellular milieu through: vesicles, membrane channels or due plasma membrane rupture. In inflammation tissues and tumors microenvironment, ATP concentration can change 100-fold in comparison to health tissues. At extracellular environment, ATP acts as a chemical messenger leading to the activation of membrane proteins known as P2 receptors. There are two classes of P2 receptors: metabotropic P2Y receptors or ionotropic P2X receptors. P2X7 subtype opens a non-desensitized cationic channel, when activated by ATP, leading to plasma membrane depolarization and intracellular calcium increase. However, prolonged exposition to high ATP concentrations leads to progressive increase in membrane permeability to large weight molecules such as propidium iodide and Yo-Pro-1. There are two major explanations to this phenomenon: P2X7 ion channel dilates by itself, allowing the entrance of high weight molecules or P2X7 activation triggers intracellular signalization acting on another pore forming protein on plasma membrane. Recent evidence shed light on the possibility to P2X7 ion channel dilation, however, pharmacological or genetic block of pannexin (a pore forming protein) decrease membrane permeability to large weight molecules on specific cell types and under certain experimental conditions. In this way, our work aim to investigate the possibility of P2X7 channel dilation by itself. We propose that residues in the second transmembrane domain (presumably at the channel lumen) could be accessible to high weight methanethiosulfonate compound MTSEA-Biotin. So, we use site-directed-mutagenesis to create the single mutant G345C, once cysteine residues could bind covalently to MTS-biotin and it can block (at least in part) ATP-induced membrane permeabilization. To this end, we created a method to access plasma membrane permeabilization to fluorescent dyes, such as Yo-Pro1 and propidium iodide, on a plate reader. The method presented here showed good reproducibility and has normalization steps that allow comparison among different dyes and avoid artifacts due variations among different wells. Moreover, the method used in this work avoids washing steps which could be problem to certain cell types. In addition, we created a heterologous expression system for P2X7 receptor on HEK293T cells, in order to express WT and G345C mutants during accessibility experiments. In this way we established the best condition to P2X7 heterologous expression either by P2X7 permeabilization activity or immunodetection. During the course of this work, we observed that 5mM ATP treatment on HEK293T cell, that do not express P2X7 receptor, results on plasma membrane permeabilization to propidium iodide. When HEK293T cells presents P2X7 receptor heterologously expressed and is challenged with 5mM of ATP, the permeabilization increased about two fold in comparison with non-transfected HEK293T cells, indicating at least two different pathways for plasma membrane permeabilization: a P2X7-dependent and a P2X7-independent pathway. The last one is associated to an ion channel e and can be partially blocked by probenecid treatment, a pannexin antagonist. The P2X7 dependent pathway seems to involve P2X7 channel dilation, since our results suggests that G345C residue is accessible to MTS-Biotin, once its treatment blocks part of permeabilization induced by ATP. However, adjusts on protocol are necessary to obtain a clear picture of this residue accessibility.

Sumário

Agradecimentos.....	iii
Lista de abreviações.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1- Introdução.....	1
1.1 – Receptores Purinérgicos.....	3
Tabela 1.1.....	3
1.1.1 Receptores P1.....	4
Figura 1.1.....	4
1.1.2 Receptores P2.....	5
1.1.2.1 Receptores P2Y.....	5
Figura 1.2.....	6
Figura 1.3.....	7
Figura 1.4.....	7
Figura 1.5.....	8
Tabela 1.2.....	10
Figura 1.6.....	11
Figura 1.7.....	13
1.1.2.2 Receptores P2X.....	14
Figura 1.8.....	15
Figura 1.9.....	16
Tabela 1.3.....	18
Figura 1.10.....	20
Figura 1.11.....	22
Figura 1.12.....	26
Figura 1.13.....	28
Figura 1.14.....	34
Figura 1.15.....	37
Figura 1.16.....	38
Figura 1.17.....	40

1.1.2.2.1	Receptores P2X em condições patológicas.....	43
	Figura 1.18.....	48
2-	Objetivos.....	49
3-	Métodos.....	50
4-	Resultados.....	58
4.1	– Ensaio de permeabilização da membrana plasmática.....	58
	Figura 4.1.....	61
	Figura 4.2.....	62
	Figura 4.3.....	64
	Figura 4.4.....	65
	Figura 4.5.....	67
	Figura 4.6.....	68
	Figura 4.7.....	69
4.2	- Otimização da expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T.....	70
	Figura 4.8.....	71
	Figura 4.9.....	74
4.3	– Permeabilização celular independente do receptor P2X7	
	Figura 4.10.....	77
	Figura 4.11.....	78
4.4	– Possível dilatação do canal do receptor P2X7.....	78
	Figura 4.12.....	80
	Figura 4.13.....	81
	Figura 4.14.....	82
5-	Discussão.....	83
	Figura 5.1.....	101
6-	Conclusões e Perspectivas.....	102
7-	Referências.....	104

1- Introdução

Purinas e pirimidinas são moléculas extremamente importantes na manutenção da vida, fazendo parte da estrutura molecular de nucleosídeos e nucleotídeos (1). Estes últimos são as unidades monoméricas do DNA e do RNA, macromoléculas que carregam a informação genética que vão determinar o padrão de produção de proteínas de uma célula ou organismo. Além disso, os nucleotídeos têm funções fundamentais na sua forma monomérica, como a estratégia dos seres vivos de armazenar partes menores de energia, retiradas de monossacarídeos, em ligações químicas na molécula de ATP (trifosfato de adenosina). Dessa maneira, o ATP tem um papel central no fornecimento de energia para inúmeras reações químicas nos seres vivos. Dado ao número e a complexidade de reações químicas no ambiente intracelular, o ATP é encontrado em altas concentrações (na faixa de milimolar) dentro das células (2). Por outro lado, os nucleotídeos presentes no espaço extracelular, embora em baixas concentrações (entre nano em milimolar), desempenham a função de mensageiros extracelulares (3). Essas funções se estendem virtualmente para todas as células em vertebrados (3) e, além disso, diversos papéis dos nucleotídeos extracelulares vem sendo recentemente descritos em eucariotos inferiores (4) e em plantas (5).

As ações dos nucleotídeos extracelulares decorrem da sua ligação em receptores específicos denominados receptores purinérgicos (3). Esses receptores estão presentes na membrana plasmática podendo, em alguns casos, ser encontrados funcionais na membrana de organelas (6), e são bem descritos em mamíferos. A sua classificação é determinada de acordo com os seus agonistas e mecanismos de transdução de sinal. Os receptores denominados P1 são ativados por nucleosídeos e tem a adenosina extracelular como principal agonista fisiológico, tendo a associação com a proteína G como mecanismo de transdução de sinal (7). Os receptores P2 são ativados por nucleotídeos e tem o ATP extracelular como principal agonista fisiológico e, ainda, são subdivididos de acordo com seu mecanismo de transdução de sinal: os receptores P2Y são acoplados à proteína G (8) e os receptores P2X (9) são canais iônicos.

O subgrupo P2X abre um canal catiônico não seletivo quando ativado pelo agonista, promovendo o influxo de Na^+ e Ca^{++} e o efluxo de K^+ (10). Entretanto, alguns subtipos quando ativados por altas concentrações do agonista fazem com que a célula fique permeável a moléculas de alto peso molecular (até cerca de 1kDa) (11). Neste caso, não parece haver seletividade quanto a carga da molécula em questão, uma vez que a célula pode se tornar permeável tanto para moléculas catiônicas, como o NMDG^+ (N-metil-D-glucamina) (12) e o brometo de etídeo (13), quanto para moléculas aniônicas, como o FITC (13) e o *Lucifer Yellow* (14). O mecanismo de entrada das moléculas de alto peso molecular ainda não foi totalmente elucidado, contudo, basicamente duas teorias surgem baseadas nos dados publicados: a primeira seria que os próprios canais iônicos mudariam sua conformação e dilatariam até se formasse uma passagem larga o suficiente para a permeabilização das moléculas de grande volume molecular, e a segunda sugere que a ativação dos receptores P2X desencadearia reações de segundos mensageiros ativando uma segunda proteína, de identidade ainda debatida, presente também na membrana plasmática, que abriria um poro ou ativaria um transportador que permitiria a entrada das moléculas de grande volume molecular (11).

O fenômeno de permeabilização celular induzida pelo ATP extracelular, no contexto fisiológico, permite a liberação de mais ATP para o meio extracelular causando uma retroalimentação positiva da ativação dos receptores purinérgicos (15). Além disso, algumas moléculas como a espermidina também podem ser liberadas para o meio extracelular (16), ressaltando a relevância desse fenômeno de permeabilização no contexto de transporte através da membrana. Entretanto, pouco mais se sabe sobre a participação desse fenômeno no contexto fisiológico, devido ao desconhecimento da entidade molecular permeabilizante. O subtipo P2X7 é o subtipo mais estudado no contexto de permeabilização celular e sua ativação é relacionada com diversos mecanismos patológicos, desde transtornos psicológicos (17) até crescimento tumoral (18), sendo a participação no processo inflamatório (19-21) seu papel melhor elucidado. Diante disso, o receptor P2X7 se configura como um promissor alvo terapêutico para diversas patologias (22).

1.1 Receptores Purinérgicos

Em 1929, Drury e Szent-Gyorgyi observaram que a injeção intravenosa de extratos de músculo produzia diversos efeitos cardiovasculares em cachorros, como a diminuição da frequência cardíaca e fibrilação dependendo da dose. Após testar diversas substâncias isoladas desse extrato foi constatado que a adenosina produzia tais efeitos, uma vez que a mesma extraída de leveduras ocasionava um efeito idêntico (23). Essa foi a primeira descrição do papel extracelular das purinas. Em 1959, Holton observou que o ATP era liberado por neurônios na orelha de coelhos e causava vasodilatação (24). Entretanto, ainda era desconhecida a entidade molecular sob o qual o ATP ou a adenosina atuava. Em 1972, Burnstock baseado em suas observações em terminações nervosas de porquinhos-da-índia, cunhou o termo “nervos purinérgicos”, mostrando que diferentes terminações nervosas eram responsivas a aplicação de ATP, que cumpria todos os requisitos para ser classificado como um neurotransmissor, como liberação vesicular sináptica dependente de Ca^{++} e inativação por ectoenzimas (25). Desde então começaram a surgir evidências que os efeitos da adenosina e do ATP atuavam em classes distintas de receptores e finalmente, em 1985, foram formalmente classificados as duas principais classes de receptores purinérgicos, baseado em suas propriedades farmacológicas (26).

		Agonista fisiológico	
		Nucleosídeos (Adenosina)	Nucleotídeos (ATP)
Mecanismo de Transdução	Associado à Proteína G	Receptores P1 (A1, A2A, A2B, A3)	Receptores P2Y (P2Y1-11)
	Canal Iônico	–	Receptores P2X (P2X1-7)

Tabela 1.1 – Classificação dos receptores purinérgicos. A nomenclatura proposta para a classificação dos receptores purinérgicos foi inicialmente baseada em seus agonistas naturais: P1 para os receptores de adenosina e P2 para os receptores de ATP. Todos os subtipos de receptores P1 são associados a proteína G. Os receptores P2, por sua vez, são classificados de acordo com seu mecanismo de transdução de sinal, sendo os P2Y metabotrópicos e os P2X ionotrópicos.

1.1.1 Receptores P1

Os receptores de adenosina são chamados de receptores P1 e, até o momento, 4 subtipos foram clonados (A1, A2A, A2B e A3), todos eles são associados a proteínas G (7). Suas funções melhor esclarecidas são no sistema nervoso central (SNC), devido a descoberta de que os efeitos estimulatórios da cafeína (Figura 1.1) se dão pelo bloqueio de receptores de adenosina no cérebro (27) e grande parte dos antagonistas desenvolvidos para os receptores de adenosina são derivados sintéticos da cafeína (28). Além disso, a adenosina já é empregada na prática clínica devido a sua capacidade de diminuir a taquicardia supraventricular (29). Os receptores de adenosina são amplamente distribuídos no organismo e diversas outras funções já foram descritas, como o seu papel no metabolismo de lipídeos (30), fluxo sanguíneo renal (31), angiogênese (32) e sua ação predominantemente anti-inflamatória no sistema imune (com exceção do subtipo A2B, que exerce ação pró-inflamatória) (33).

Os receptores P1 possuem 7 domínios transmembrana com os domínios N- e C-terminais voltados para a face citoplasmática e uma alça extracelular que interage com o seus agonistas. Até o momento, já foram publicadas as estruturas cristalográficas do receptor A1 (34) e A2A (35). Além disso, alguns antagonistas já vem sendo desenhados racionalmente para o receptor A2A, empregando a abordagem de *docking* molecular baseado nas estruturas publicadas (36). Esses estudos tem sido importantes para a aplicação clínica do bloqueio ou estimulação dos receptores de adenosina, devido à grande promiscuidade dos agonistas e antagonistas disponíveis aliado a sua ampla distribuição dos 4 subtipos no organismo, que dificulta o desenvolvimentos de terapias farmacológicas que minimizem os efeitos colaterais (28).

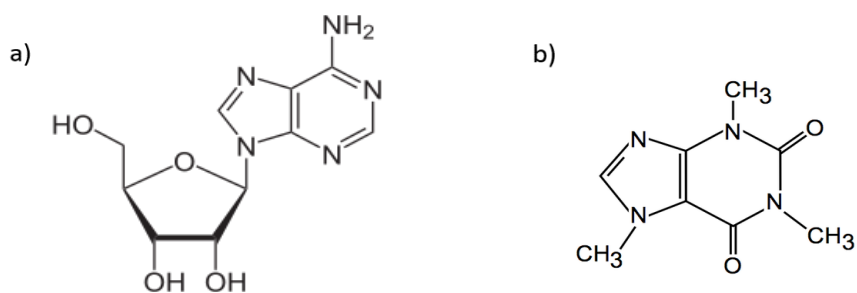


Figura 1.1 - Estrutura molecular da adenosina e da cafeína. (a) O nucleosídeo adenosina é formada pela purina adenina ligada a uma ribose, sem a presença de grupamentos fosfato. (b) A cafeína, amplamente

conhecida por seu uso tanto na clínica quanto como droga recreativa, é um dos antagonistas naturais dos receptores de adenosina.

1.1.2 Receptores P2

Os receptores P2 são os receptores para nucleotídeos e são classificados de acordo com seu mecanismo de transdução de sinal. Os receptores P2Y são acoplados a proteína G (8) enquanto os receptores P2X formam um canal iônico (9). O ATP é agonista de ambas as famílias, enquanto o ADP (difosfato de adenosina), UTP (trifosfato de uridina) e UDP (difosfato de uridina) são capazes de ativar apenas alguns tipos de receptores P2Y (8). Virtualmente todas as células de mamíferos possuem pelo menos um subtipo de receptores P2, os quais participam de uma grande variedade de papéis fisiológicos (3, 37, 38).

1.1.2.1 - Receptores P2Y

Até o momento, 8 subtipos de receptores P2Y foram clonados: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (8). A numeração dos receptores foi baseada na ordem em que eles foram clonados e os números que estão faltando (3, 5, 7, 8, 9 e 10) se referem a subtipos não pertencentes a mamíferos ou ortólogos que, embora tenham semelhança na sequência de aminoácidos, não respondem a nucleotídeos extracelulares (8). Os subtipos de receptores P2Y podem ser classificados pela homologia de suas sequências de aminoácidos (Figura 1.2) e pelo mecanismo de transdução de sinal (8). Os 5 subtipos semelhantes ao receptor P2Y₁ (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁) são acoplados a proteína G_q (39), levando a ativação da PKC (proteína cinase C) e conseqüentemente elevando os níveis de Ca⁺⁺ intracelular. Os demais 3 subtipos, semelhantes ao receptor P2Y₁₂ (P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) são acoplados a proteína G_s levando à ativação da enzima adenilato ciclase (40).

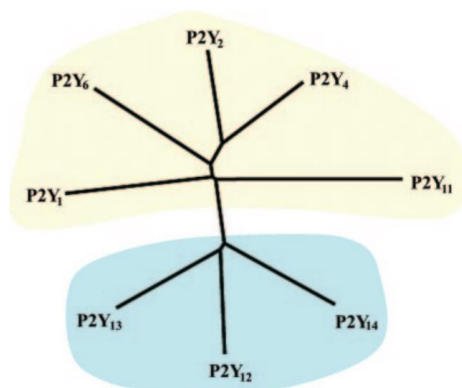


Figura 1.2 – Árvore filogenética dos receptores P2Y. Baseado na homologia da sequência de aminoácidos foi possível dividir os receptores P2Y entre os semelhantes ao P2Y₁ (com fundo amarelo) e os receptores semelhantes ao P2Y₁₂ (com o fundo em azul). As semelhanças entre cada grupo também é refletida no mecanismo de transdução de sinal, sendo os semelhantes ao receptor P2Y₁ acoplados a proteína G_q e os semelhantes ao P2Y₁₂ acoplados a proteína G_i. Adaptado de (8).

A sequência de aminoácidos que compõem os receptores P2Y os coloca na classe A de receptores acoplados à proteína G (ou semelhantes a rodopsina) no ramo δ juntamente com os receptores de trombina, leucotrienos, receptores olfativos e diversos outros receptores ainda sem função definida (41). Contudo, a sequência de aminoácidos entre os dois principais grupos de receptores P2Y (semelhantes ao P2Y₁ e semelhantes ao P2Y₁₂) possuem apenas cerca de 19% de identidade (8), embora sejam semelhantes nas características farmacológicas (discutidas abaixo). Recentemente foram publicadas as estruturas 3D, determinadas por experimentos de cristalografia de raio-x dos receptores P2Y₁ ligado aos antagonistas MRS2500 e BPTU (42) e as do receptor P2Y₁₂: ligado ao antagonista AZD1283 (43) e aos agonistas MeSADP (metiltio-adenosina difosfato, análogo do ADP) e meSATP (metiltio-adenosina trifosfato, análogo do ATP) (44) (Figuras 1.3 e 1.4). As estruturas confirmaram que estes receptores seguem o padrão bem conhecido dos demais receptores associados à proteína G: a forma monomérica com sete domínios transmembrana com 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares (41). Essas estruturas também confirmam, assim como esperado para todos os outros subtipos de receptores P2Y, duas pontes de dissulfeto: entre o N-terminal e alça intracelular 3 e entre as alças intracelulares 1 e 2. Entretanto, na estrutura ligada ao agonista AZD1283 (43) a ponte dissulfeto entre as alças 1 e 2 não estava presente, indicando que modificações estruturais induzidas pela ligação do antagonista possam desfazer-la, sugerindo seu caráter dinâmico. Além disso, duas alças intracelulares não puderam ser modeladas, provavelmente devido ao seu caráter flexível.

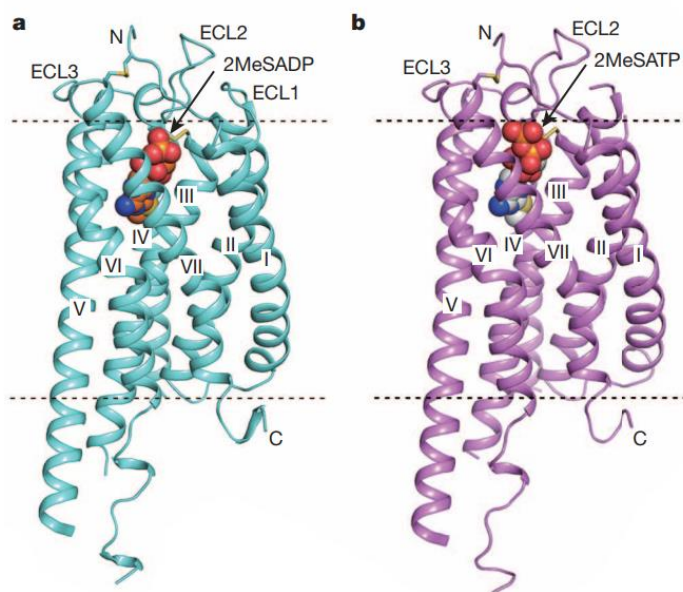


Figura 1.3- Modelo estrutural do receptor P2Y₁₂ ligado a análogos do ADP e ATP. Esse modelo estrutural foi baseado nos dados obtidos por cristalografia de raios-x. Em (a) podemos ver a estrutura ligada ao MeSADP (metiltio-adenosina difosfato, análogo do ADP) e em (b) ligada ao agonista MeSATP (metiltio-adenosina trifosfato, análogo do ATP). As regiões transmembrana aparecem como numerais romanos (I-VII). As alças extracelulares estão indicadas como ECL1-3 (*extracellular loop*). O receptor P2Y₁₂ está representado como *cartoon* e os agonistas como esferas. “N” e “C” indicam os domínios N- e C-terminais. EL: *extracellular loop*. Adaptado de (44).

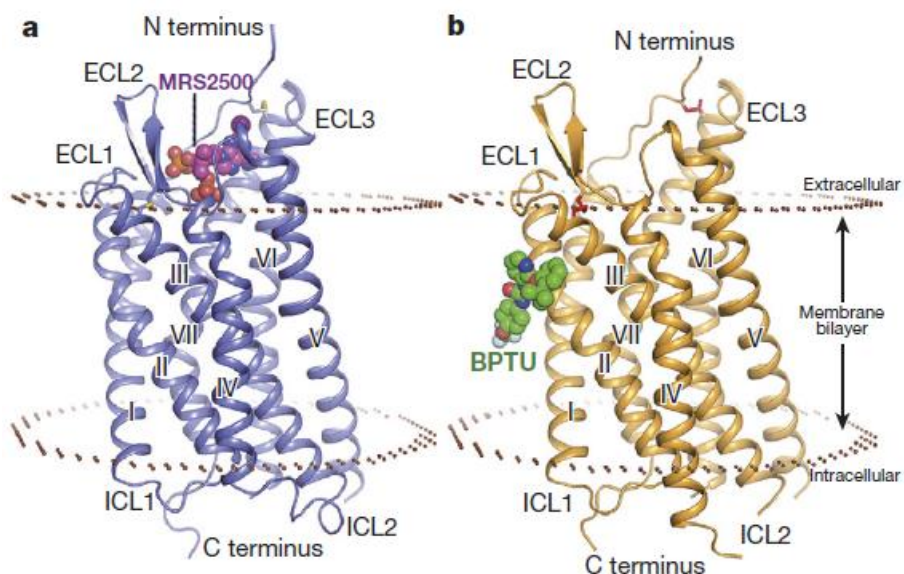


Figura 1.4- Modelo estrutural do receptor P2Y₁ ligado aos antagonistas MRS2500 e BPTU. Esses modelos estruturais foram baseados nos dados obtidos por cristalografia de raios-x. O modelo está representado como *cartoon* em verde e os antagonistas como esferas em magenta. Adaptado de (42).

Como citado anteriormente, podemos subdividir a família de receptores P2Y em dois grupos baseados na identidade da sequência primária de aminoácidos: os semelhantes ao P2Y₁ e os semelhantes ao P2Y₁₂ (8). Conseqüentemente, essa característica leva a uma diferença na estrutura terciária entre as duas famílias. Os modelos estruturais, baseado em dados de cristalográfica do receptor P2Y₁ ligado ao antagonista competitivo MRS2500 e o antagonista alostérico BPTU, mostraram diferenças marcantes no arranjo das hélices transmembrana em relação a estrutura do receptor P2Y₁₂ (42). O final extracelular da hélice transmembrana III está em uma orientação diferente no modelo estrutural do receptor P2Y₁ em comparação as estruturas do receptor P2Y₁₂. A hélice VI no receptor P2Y₁, que aparece em posições diferentes na estrutura do receptor P2Y₁₂ ligado ao agonista (MeADP) e ao antagonista (AZD1283), aparece em uma posição intermediária entre essas duas estruturas do receptor P2Y₁₂. Além disso, a hélice 5 do receptor P2Y₁ apresenta uma prolina altamente conservada na classe A dos receptores associados à proteína G o que proporciona uma dobra na hélice transmembrana (42). Esse resíduo não está presente na posição análoga no receptor P2Y₂ (44), fazendo com que as posições dessa hélice, tanto na face intracelular quanto extracelular da proteína sejam diferentes em relação ao receptor P2Y₁ e P2Y₁₂. Interessantemente, as maiores diferenças podem ser notadas na extremidade extracelular da proteína (Figura 1.5), embora a principal diferença entre as subfamílias (semelhantes ao P2Y₁ e semelhantes ao P2Y₁₂) seja o mecanismo de transdução de sinal que, naturalmente, ocorre via interações na face citoplasmática da proteína que, por sua vez, é muito similar entre as subfamílias.

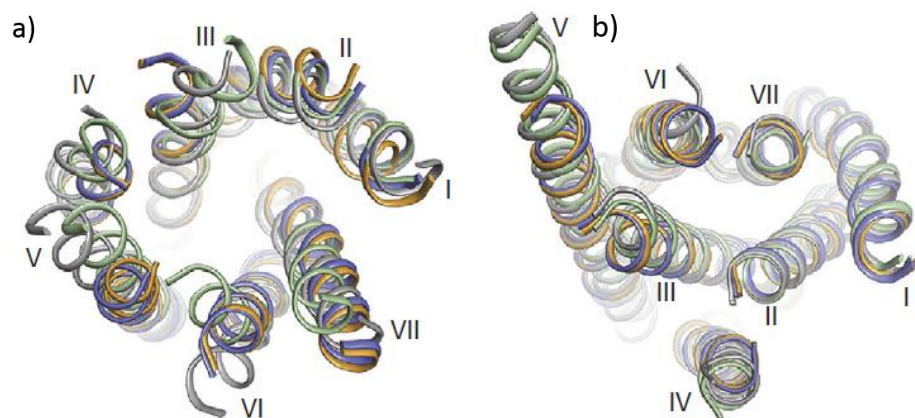


Figura 1.5 - Comparação entre os modelos estruturais dos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂. As cadeias principais dos modelos estruturais do receptor P2Y₁₂, ligado ao agonista MeADP (verde) e ao antagonista AZD1283

(cinza), e do receptor P2Y₁ ligado ao antagonista competitivo MRS2500 (azul) e ao antagonista alostérico BPTU (laranja) apresentam suas diferenças mais marcantes na face extracelular (a). Por outro lado, com exceção da hélice 5, a face intracelular (b) é bastante semelhante. (42)

Os receptores P2Y são fisiologicamente ativados por mononucleotídeos di- ou trifosfatados baseados em adenina e uracila podendo, ainda, serem ativados por dinucleotídeos polifosfatados (45). Os subtipos diferem bastante entre si em relação a farmacologia. Nucleotídeos baseados em adenina, ATP e ADP, podem ativar a maioria dos subtipos (46), com exceção do receptores P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₄, que são ativados exclusivamente por nucleotídeos baseados em uracila UTP, UDP, além do UTP conjugado a glicose (UTPG) (47, 48). O ATP é um agonista completo dos subtipos P2Y₂ (49) e P2Y₁₁ (50), entretanto ainda é capaz de ativar os subtipos P2Y₁ (39) e P2Y₁₃ (51) como agonista parcial. Por outro lado, o ATP atua como antagonista nos subtipo P2Y₄ (52) e P2Y₁₂ (53). Além disso, o análogo sintético do ATP MeSATP é capaz de ativar os receptor P2Y₁ (39), enquanto o ATPγS é capaz de ativar os receptores P2Y₂(54) e P2Y₁₁ (55). O Bz-ATP, um análogo do ATP normalmente usado para o estudo de receptores P2X é capaz de ativar o receptor P2Y₁₁ (56). O ADP, assim como seu análogo sintético MeSADP, atua como agonista completo nos subtipos P2Y₁ (57), P2Y₁₂ (40) e P2Y₁₃ (58). Entretanto, existem diferenças entre espécies, por exemplo o receptor canino P2Y₁₁ responde ao ADP da mesma maneira que responde ao ATP (55). O UTP ativa principalmente o receptor P2Y₄ (59), com a exceção do de rato, mas também é capaz de ser ativado pelo ATP (60). Além disso, o UTP é capaz de ativar o receptor P2Y₂ (54), fazendo desse o único capaz de se ligar a mononucleotídeos de adenina e uracila. O UDP, por sua vez, ativa os receptores P2Y₆ (59) e P2Y₁₄ (61). A UTPG foi identificada como outro ligante natural do receptor P2Y₁₄ e também pode atuar como agonista parcial do subtipo P2Y₂ (62). Além disso, as ações fisiológicas de dinucleosídeos polifosfatados parecem ocorrer, pelo menos em parte, pela sua interação com os receptores P2Y (46). Foi demonstrado que a uridina/adenosina tetrafosfato (U_{p4}A) é capaz de ativar os receptores P2Y₁ humano (63) e P2Y₂ de rato (64). Além disso, a diadenosina tetrafosfato (A_{p4}A)é também capaz de ativar o receptor P2Y₂ humano (65). Interessantemente, o NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida) extracelular é capaz de ativar o subtipo P2Y₁₁ (66). Devido a essa relativa promiscuidade de ligantes (Tabela 2), diversos ligantes sintéticos vem sendo usados para o estudo dos receptores P2Y (45). Nesse sentido, agonistas como MRS2365 (67), PSB1114 (68), MRS4062

(69), 5-OMe-UDP (70), NF546 (71) e MRS2690 (62) foram desenvolvidos e se ligam de maneira específica aos receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ e P2Y₁₄, respectivamente.

A suramina, um medicamento utilizado em infecções parasitárias, é um importante bloqueador dos receptores de receptores associados a proteína G (72), incluindo os receptores P2Y (46). Levando em consideração que o mecanismo de ação da suramina nas infecções parasitárias seja pela ligação a proteínas do próprio parasita, muitos dos seus efeitos adversos provavelmente derivam do bloqueio cruzado de receptores associados a proteína G. A suramina bloqueia principalmente os receptores P2Y₁ (55), P2Y₂ (73), P2Y₁₁ (74) e P2Y₁₂ (47). Contudo, em altas concentrações de suramina (>10µM) ainda podem bloquear o receptor P2Y₁₃ (51). O PPADS (ácido piridoxalfosfato azofenil disulfônico) também é um importante antagonista dos receptores P2Y (75), embora também bloqueie os receptores P2X (10).

Base Nitrogenada	Nucleotídeo	<i>P2Y1-like</i>					<i>P2Y12-like</i>		
		P2Y1	P2Y2	P2Y4	P2Y6	P2Y11	P2Y12	P2Y13	P2Y14
	ATP	Parcial	Completo	Antagonista	S.E.	Completo	Antagonista	Parcial	S.E.
	ADP	Completo	S.E.	S.E.	S.E.	N.D.	Completo	Completo	S.E.
	UTP	S.E.	Completo	Completo	Completo	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.
	UDP	S.E.	Completo	S.E.	Completo	N.D.	S.E.	S.E.	Completo
	UTPG	S.E.	Parcial	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	Completo

Tabela 1.2. Principais agonistas fisiológicos dos receptores P2Y humanos. **A:** adenina, **U:** uracila, **ATP:** trifosfato de adenosina, **ADP:** difosfato de adenosina, **UTP:** trifosfato de uracila, **UDP:** difosfato de uracila, **UTPG** (UTP-glicose), **S.E.:** sem efeito, **N.D.:** não determinado.

As tienopiridinas foram usadas de maneira empírica como agente antitrombótico por muitos anos (76). Contudo, em 2001 foi demonstrado que sua ação ocorria pelo bloqueio irreversível do receptor P2Y₁₂ (77). Tienopiridinas de uso clínico, como o Clopidogrel® (Figura 1.6), são pró-drogas e seu metabólito ativo (78) se liga covalentemente, por um grupamento tiolreativo a cisteínas, na alça extracelular II do receptor P2Y₁₂ (79). Os receptores P2Y₁₂, antes organizados como oligômeros na membrana, são dissociados em formas mono- e diméricas que não conseguem mais se ligar ao seu principal agonista endógeno, o ADP (80). Dessa maneira, o ATP e o ADP não são mais capazes de induzir a agregação plaquetária via receptor P2Y₁₂. O

análogos do ATP como o cangrelor, atuam como antagonista alostérico reversível no receptor P2Y₁₂ e também tem ação antitrombótica (81). Sua ação não depende de metabolização hepática e ocorre de maneira mais rápida do que as tienopiridinas (82). Devido à baixa biodisponibilidade, o cangrelor é administrado de maneira intra-venosa (76). Nesse sentido, foi desenvolvido o ticagrelor, que também é um análogo do ATP que exerce um bloqueio alostérico reversível no receptor P2Y₁₂, contudo, devido a sua boa disponibilidade, pode ser administrado pela via oral (76).

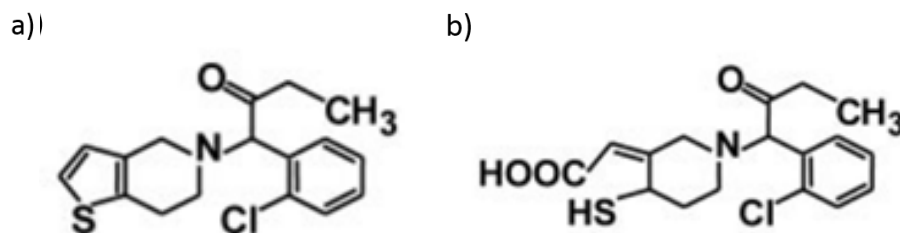


Figura 1.6. Clopidogrel® e seu metabólito ativo. (a) Estrutura química da droga antitrombótica clopidogrel que é inativa *in vitro*, entretanto, após a metabolização hepática, transforma-se no seu metabólito ativo (b) que é capaz de formar uma ligação dissulfeto com cisteínas na alça extracelular II do receptor P2Y₁₂ através de seu grupamento tiol reativo e promover seu bloqueio de maneira irreversível.

Os receptores P2Y possuem ampla distribuição em mamíferos, podendo ser encontrado no cérebro, próstata, placenta, pulmões, coração, fígado, rim, pâncreas medula óssea, células do sistema imune, musculatura lisa e esquelética, pituitária, timo, baço, adipócitos, megacariócitos e, naturalmente, em plaquetas (8). Dessa maneira, diversos processos fisiológicos são mediados por esses receptores fazendo que sua ativação ou bloqueio possam funcionar como estratégias terapêuticas em algumas patologias (76). O papel mais bem conhecido dos receptores P2Y é no processo de agregação plaquetária (83). A agregação plaquetária é um processo complexo e dinâmico que precisa ser iniciado, por diversos fatores já bem estabelecidos, e posteriormente amplificado e sustentado. Após a lesão de um vaso sanguíneo, há a exposição de camadas do vaso que antes eram protegidas pelo endotélio, logo diversos fatores que ativam receptores na superfície de plaquetas são expostos. Por exemplo, o fator de von Willebrand das plaquetas se liga ao colágeno na camada do vaso exposta (84). Após a aderência a camada subendotelial, as plaquetas interagem com diferentes moléculas, como o colágeno, através diversos receptores na membrana e se tornam ativadas fazendo com que adote uma forma oval e com múltiplos

prolongamentos de membrana (84). Nesse momento, diversos fatores são liberados pelas plaquetas como o tromboxano A₂, ADP e ATP. Logo, o tromboxano A₂ estimula receptores específico na superfície das plaquetas (85) e o ADP, por sua vez, vai ativar receptores P₂Y₁ e P₂Y₁₂ (86). Ambas as vias, as dos receptores purinérgicos e do tromboxano, vão convergir na conversão da integrina α IIb β 3 para a sua forma ativa, a qual é capaz de se ligar ao fibrinogênio, promovendo e sustentando a agregação plaquetária (83). O ATP ainda pode ser convertido a ADP por ectonucleotidases (87), contribuindo para a amplificação do sinal. A ativação do receptor P₂Y₁ leva ao aumento do cálcio intracelular levando a mudanças na morfologia das plaquetas (88) e a uma fraca resposta de agregação quando comparado à ativação do receptor P₂Y₁₂ (89). O papel do receptor P₂Y₁ é atribuído no processo de iniciação da agregação plaquetária (86), por outro lado, a ativação do receptor P₂Y₁₂ está envolvida na amplificação e manutenção. A sua ativação é capaz de amplificar o sinal de todas as moléculas conhecidas por induzir agregação plaquetária (90). Como citado anteriormente, bloqueadores reversíveis e irreversíveis do receptor P₂Y₁₂ são efetivos agentes antitrombóticos e são aprovados para o uso clínico (91).

A secreção de íons por células epiteliais também é modulada pelos receptores P₂Y (92) (Figura 1.7). No epitélio respiratório, o receptor P₂Y₂ tem um papel importante na regulação do transporte de Cl⁻ para o lúmen do pulmão (93). O aumento do Ca⁺⁺ intracelular subsequente a ativação do receptor P₂Y₂ resulta em (1) o bloqueio de canais epiteliais de Na⁺ (ENaCs) e (2) abertura de canais de Cl⁻ sensíveis ao Ca⁺⁺ intracelular (94). O primeiro efeito ajuda a criar um gradiente eletroquímico para a secreção do Cl⁻ e o segundo efeito leva a secreção propriamente dita do Cl⁻. Em pacientes com fibrose cística, o CFRT (regulador transmembrana da fibrose cística), um canal de Cl⁻ não ativado por Ca⁺⁺ intracelular, não se dobra corretamente e acaba não sendo endereçado para a membrana apical da célula epitelial pulmonar, onde deveria ocorrer a secreção de Cl⁻ (92). Dessa maneira, a deficiência na secreção de Cl⁻ afeta a consistência do muco pulmonar levando a um prejuízo na capacidade respiratória (95) e o aumento da frequência de infecções (96). Nesse sentido, vem sendo proposto que a ativação do receptor P₂Y₂ pode ser útil nesses casos. Neste contexto, o agonista específico do receptor P₂Y₂ Denufosol foi submetido a testes clínicos para o tratamento de fibrose cística (97). A ativação do receptor P₂Y₂ por essa droga levaria a um aumento da secreção de Cl⁻ para a mucosa pulmonar através dos canais de Cl⁻

sensíveis ao Ca^{++} intracelular, compensando a secreção deficiente de Cl^- nesses pacientes (95). Além disso, ele bloqueia os ENaC impedindo a absorção de Na^+ pela célula, o que ajudaria a criar um gradiente que ajuda na secreção de Cl^- (98). Embora estudos *in vitro* sustentassem a potencial eficácia do Denufosol (95, 97), os testes foram suspensos na fase III devido à ausência de melhora significativa dos pacientes (99). O ATP, assim como seu produto de degradação ADP, pode ainda ser liberado no trato gastro intestinal (100) e ativar receptores P2Y modulando a secreções no lúmen por um mecanismo similar ao discutido no epitélio pulmonar (101). A ativação dos receptores P2Y ainda são relacionadas com a embriogênese (102), proteção em processos de isquemia cardíaca (103), quimiotaxia (104), diferenciação de linfócitos em Th17 no intestino (105), dor neuropática (106) e atividade fagocítica da micróglia (107). Esse último parece ter um papel importante no desenvolvimento do mal de Alzheimer (76). Futuramente, novas abordagens terapêuticas visando os receptores P2Y devem ser incorporadas na prática clínica.

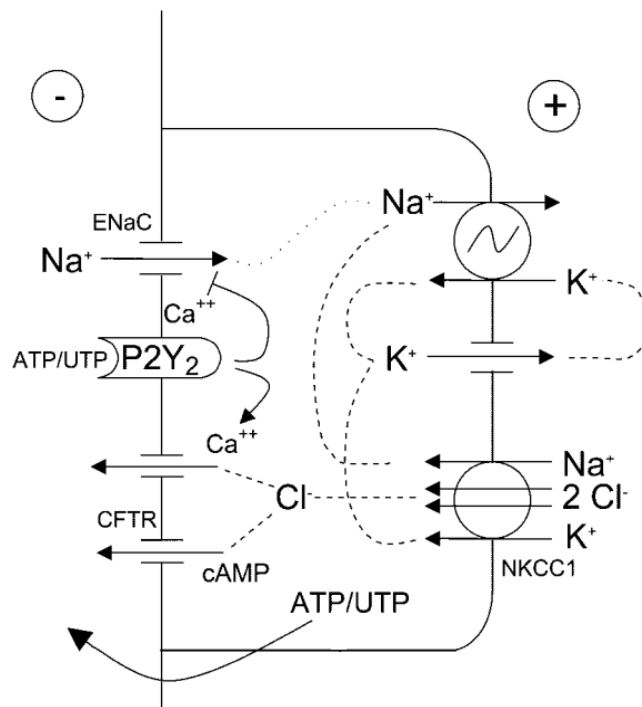


Figura 1.7. Papel do receptor P2Y₂ na secreção de Cl⁻ no pulmão. Desenho esquemático da ação do receptor P2Y₂ nas células epiteliais pulmonares. O Cl⁻ é cotransportado da corrente sanguínea na face basolateral junto a Na⁺ e K⁺ na célula epitelial por através do co-transportador NKCC1. Após a ativação dos receptores P2Y₂, a elevação do Ca⁺⁺ intracelular leva a abertura de canais de Cl⁻ dependentes de Ca⁺⁺, secretando o cloreto na mucosa pulmonar. Esse mecanismo tem o potencial de compensar o defeito no transporte de Cl⁻ pelo CFTR. Adaptado de (92).

1.1.2.2 - Receptores P2X

Diferentemente dos receptores P2Y metabotrópicos, os receptores P2X abrem um canal catiônico não seletivo quando ativado pelo agonista (108). Além disso, os receptores P2X são mais restritivos do que os receptores P2Y quanto aos agonistas fisiológicos, somente sendo ativado fisiologicamente pelo ATP extracelular (10). Até o momento, 7 subunidades já foram clonadas: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 e P2X6 e P2X7 (Figura 1.8a). Essas subunidades se organizam principalmente como homotrímeros podendo ainda se organizar como heterotrímeros. Até o momento, todos os heterotrímeros dos receptores P2X descritos possuem duas subunidades idênticas associadas a uma terceira diferente (109), nenhum heterotrímero com 3 subunidades diferentes foi documentado até o momento. A maioria dos estudos com heterotrímeros é feita em sistemas de expressão heteróloga (em ouócitos de *X. laevis* ou em células HEK293), dessa maneira, a sua presença natural nos tecidos biológicos ainda é motivo de controvérsia (109), por outro lado, a presença e a relevância biológica dos homotrímeros em mamíferos vem sendo amplamente documentada (3). Dessa maneira, vamos nos referir aos homotrímeros P2X pela subunidade em questão (ex. receptor P2X7 – homotrímero P2X7). A subunidade P2X6 é incapaz de formar homotrímeros (10). Além disso, a maior parte da população humana possui um polimorfismo de um nucleotídeo (SNP – *single-nucleotide polymorphism*) na sequência do exon 10 do receptor hP2X5 (110) que resulta em um receptor não funcional, destinado a degradação (111). Por outro lado, o P2X5 murino (mP2X5) resulta em receptores funcionais e parece exercer importantes funções em camundongos (112). Embora tenham pouca semelhança na sequência primária dos aminoácidos (~21-46% Figura 1.8b), as subunidades P2X possuem a mesma organização básica: dois domínios transmembrana (TM1 e TM2) conectados por uma grande alça extracelular, além disso, os domínios N- e C-terminais estão voltados para a face citoplasmática da membrana (Figura 1.8c) (10). A porção citoplasmática C-terminal, que parece interagir com componentes intracelulares (113, 114), varia de tamanho entre as subunidades, de 26 (P2X6) a 239(P2X7) aminoácidos (115), e parece estar relacionada com diferenças na atividade de cada subunidade, como será discutido posteriormente.

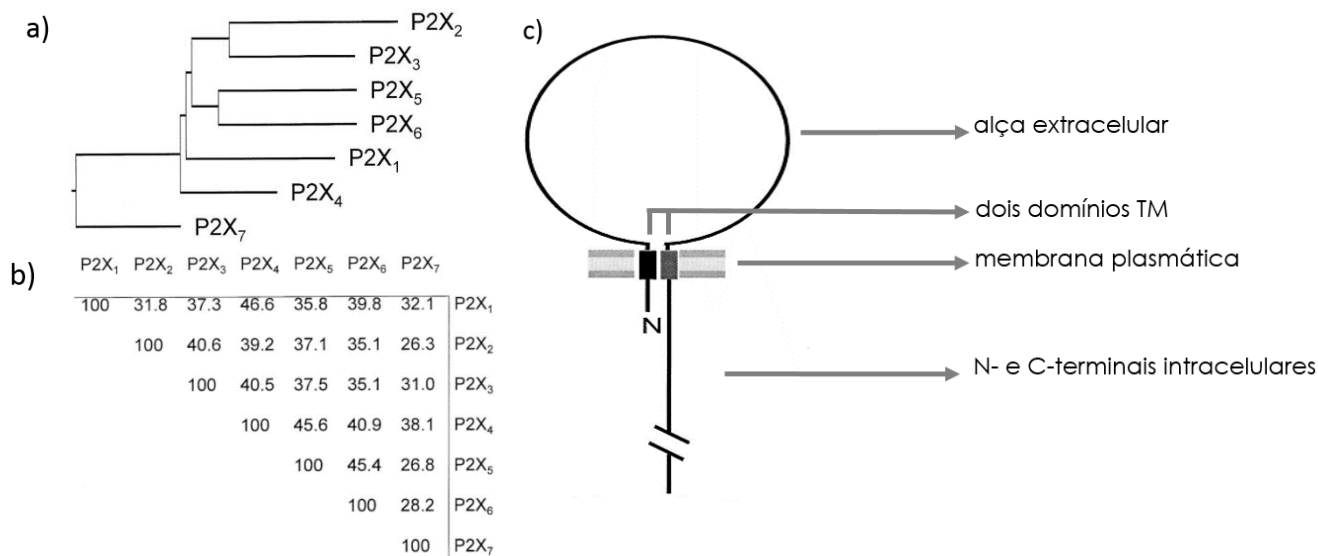


Figura 1.8 – Características básicas das subunidades P2X - (a) Árvore filogenética das diferentes subunidades P2X. Em (b) podemos ver a (%) de semelhança entre as diferentes subunidades P2X. Todas essas subunidades se organizam da mesma maneira (c), com dois domínios transmembrana (TM) conectados por uma grande alça extracelular com as regiões N- e C-terminais voltadas para o citoplasma. Adaptado de (9).

Assim que ativados, os receptores P2X rapidamente abrem um canal iônico cátion seletivo (Figura 1.9), permitindo a entrada de Na^+ e Ca^{++} e a saída de K^+ , onde a maior parte da corrente é atribuída ao Na^+ , uma vez que o gradiente eletroquímico da célula em repouso favorece a entrada de cátions, logo, a entrada de Na^+ leva a despolarização da membrana (10). Egan e Khakh mostraram, ao combinar ensaios de eletrofisiologia à fluorimetria de Ca^{++} , a pequena contribuição do Ca^{++} no total da corrente observada após a ativação de diferentes receptores P2X (116). Logo, foi possível observar que os receptores hP2X1 e hP2X4 possuíam a maior fração relativa de Ca^{++} da corrente (*Pf%* - *patch-clamp photometry* ~ 10 e 15 %, respectivamente) quando comparado aos receptores P2X3 e P2X7, que apresentaram a *Pf%* = ~3 e 5%, respectivamente (116). O subtipo P2X2 apresenta uma permeabilidade intermediária de *Pf%* = ~7% (116). A ativação dos receptor P2X envolve basicamente 3 fases: (1) ativação, onde ocorre o rápido desenvolvimento da corrente, (2) dessensibilização, onde há um decaimento da corrente mesmo em presença do agonista e (3) a desativação do canal, quando ele se fecha após a retirada do agonista (10). Assim que sensibilizado pelo agonista, os receptores P2X desenvolvem a corrente em poucos μs (117). A cinética de ativação e de dessensibilização variam de acordo com a

concentração do agonista, em contraste com a taxa de desativação, após a retirada do agonista, que é constante em todos os subtipos (10). Logo, a taxa de dessensibilização consiste na principal diferença observada na corrente gerada pelos subtipos P2X (10, 118). Eles podem ser classificados como os de dessensibilização rápida (P2X1: $\tau_{des} \sim 64$ ms e P2X3: $\tau_{des} \sim 78$ ms) e os de dessensibilização lenta P2X2 ($\tau_{des} \sim 5$ ms) e P2X4 ($\tau_{des} \sim 10$ ms) (10). O subtipo P2X7 pode ter dois comportamentos distintos em relação a cinética de dessensibilização: formando um canal de dessensibilização lenta em baixas concentrações do agonista e um canal não dessensibilizante em altas concentrações (119). A ativação dos subtipos de dessensibilização lenta P2X2 e P2X4, além do subtipo não dessensibilizante P2X7, acontece concomitantemente com a captação de moléculas de alto peso molecular (13, 120). Ainda não se sabe se tais moléculas entrariam diretamente pelo canal iônico (possivelmente em um estado dilatado) ou se sua ativação está associada a uma segunda proteína, capaz de formar um poro na membrana plasmática (11). Esse fenômeno será discutido em detalhes adiante.

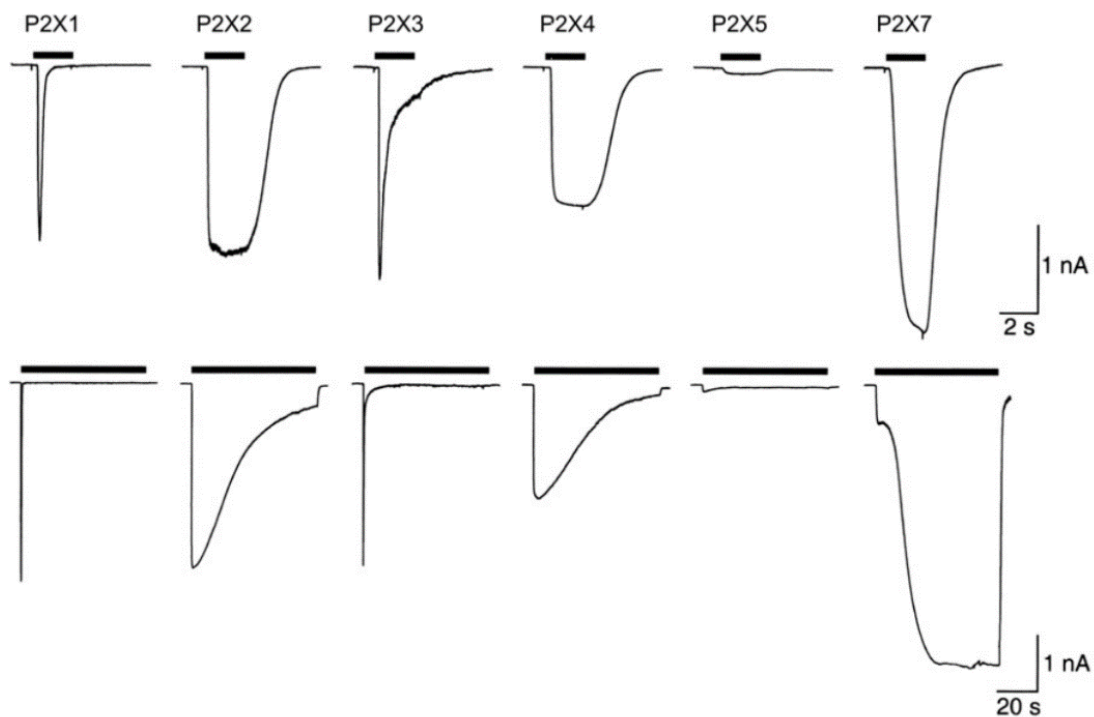


Figura 1.9 – Ativação, dessensibilização e desativação dos receptores P2X. Correntes produzidas por concentrações saturantes de ATP nos subtipos P2X utilizando a técnica de *patch-clamp* modalidade *whole-cell*. O tempo de aplicação do ATP é indicado pelas barras pretas. Note que cada subtipo é ativado de maneira semelhante, com exceção do receptor P2X7 em exposição prolongada ao ATP. Cada subtipo tem um padrão próprio de dessensibilização, enquanto a desativação, após a retirada do agonista, é similar. Adaptado de (118).

A ativação dos receptores P2X no contexto fisiológico é desencadeada principalmente pelo ATP (10, 118, 121). Entretanto, eles ainda podem ser ativados, assim como os receptores P2Y, por dinucleotídeos polifosfatados (122). O ATP é um agonista completo para todos os subtipos, atuando com potência similar em todos os subtipos (pEC_{50} : $\sim 5,8 - 6,5$), com exceção do subtipo mais sensível P2X1 (pEC_{50} : $\sim 7,2$) e do menos sensível P2X7 (pEC_{50} : $\sim 4-3$) (122). Dessa maneira, não é possível identificar os diferentes subtipos P2X em função apenas do seu agonista fisiológico. Entretanto, os subtipos P2X respondem de maneira diferente a análogos do ATP (Tabela 1.3). O $\alpha\beta$ -MeATP é um potente agonista dos subtipos P2X1 e P2X3 (pEC_{50} : ~ 6), entretanto, não tem efeito ou age como agonista parcial nos demais subtipos (10, 122, 123). O 2me-S-ATP também é um potente agonista do receptor P2X1 (pEC_{50} : 7,2) e ainda age como agonista completo em todos os subtipos (pEC_{50} : 5,7-6,6), com exceção do receptor P2X7 (122, 123). O Bz-ATP age como agonista completo nos receptores P2X1 (pEC_{50} : 8,3) e P2X7 (pEC_{50} : 5,3) enquanto atua como agonista parcial nos demais subtipos (10, 122, 123). O ATP γ S atua como agonista completo em todos os subtipos com potência similar pEC_{50} : 5,6 – 6,1) (122, 123). O trinitrofenil-ATP (TNP-ATP) age como antagonista entre todos os subtipos, sendo bastante potente nos subtipos P2X1 e P2X3 (IC_{50} : ~ 6 e 1 nM, respectivamente) (123, 124) enquanto nos demais subtipos o TNP-ATP age com IC_{50} na faixa de micromolar (123, 124). Outros antagonistas, não derivados do ATP também são empregados nos receptores P2X. O PPADS, que como citado anteriormente, também bloqueia os receptores P2Y, é bastante inespecífico nos receptores P2X podendo bloquear todos os subtipos com potência similar (IC_{50} : $\sim 0.1-5$ μ M), com exceção do subtipo P2X7, que é insensível ao PPADS (122, 123). A suramina por sua vez também atua de maneira bem inespecífica nos receptores P2X, podendo bloquear as correntes de todos os subtipos P2X, com exceção do subtipo P2X4 (122, 125). Devido à grande promiscuidade desses antagonistas, diversos esforços vem sendo empregados no desenvolvimento de ligantes específicos para cada subtipo. Nesse sentido, os derivados da suramina NF449 (126) e NF770 (127) são potentes bloqueadores que agem especificamente nos receptores P2X1 e P2X3, respectivamente, em concentrações nanomolares. O peptídeo *spinorfin*, é capaz de bloquear o receptor P2X3 em concentrações picomolares, sendo um dos antagonistas mais específicos para os receptores P2X (128). Não há antagonistas tão potentes para o receptor P2X4, e dentre eles se

destaca o PBS12054, que possui um IC_{50} : ~200 nM (129). Por outro lado, diversos antagonistas específicos para o receptor P2X7 foram desenvolvidos como o A438079 (130), A740003 (131) e o AZ11645373 (132) e possuem o IC_{50} da faixa de nanomolar. Esses e outros antagonistas tem sido testados como tratamento em diversas condições patológicas (45), devido à grande distribuição dos receptores P2X em diversos tecidos (3). Essas possíveis aplicações serão discutidas mais adiante.

	hP2X1	hP2X2	hP2X3	hP2X4	hP2X7
ATP	completo	completo	completo	completo	completo
$\alpha\beta$ -MeATP	completo	S.E.	completo	parcial	completo
2meS-ATP	completo	completo	completo	completo	S.E.
Bz-ATP	completo	parcial	parcial	parcial	completo

Tabela 1.3 – Resposta dos principais subtipos P2X encontrados em humanos a derivados sintéticos do ATP. Dados baseados em experimentos de *patch-clamp* modalidade *whole-cell* utilizando receptores recombinantes expressos heterologicamente em HEK293 (122). S.E.: sem efeito.

Até o momento, 3 subtipos tiveram a sua estrutura determinada por cristalografia de raios-X em diferentes condições: o P2X4 de peixe-zebra (zfP2X4) (133, 134), o P2X3 humano (hP2X3) (135) e as variantes do receptor P2X7 de panda (pP2X7) (136) e galinha (ckP2X7) (137). Os modelos estruturais confirmaram a topologia básica esperada dos receptores P2X (Figura 1.8c e 1.10): como dois domínios transmembrana, um grande domínio extracelular e as regiões N- e C-terminais voltadas para o lado citoplasmático da membrana. Os receptores zfP2X4 (134) e hP2X3 (135) puderam ser cristalizados na presença de ATP, e revelaram informações sobre essa molécula consegue se ligar a esses receptores e induzir o mecanismo de abertura do canal. As variantes do receptor P2X7 (137), por outro lado, não puderam ser cristalizados na presença de ATP, logo, até o momento, não temos modelos cristalográficos deste receptor ativado publicados. O subtipo de rápida dessensibilização hP2X3 (Figura 1.9) foi também cristalizado no estado dessensibilizado, ou seja, ligado ao ATP mas com o canal fechado. As estruturas dos receptores hP2X3 (135) e ckP2X7 (137) ainda foram determinadas na presença dos antagonistas competitivos TNT-ATP e A317491 (esse último apenas na estrutura da variante hP2X3) enquanto a variante pdP2X7 (136) pode ser cristalizada também na presença dos antagonistas alostéricos

A740003, A804598, AZ10606120, GW791343 e JNJ47965567. A obtenção desses modelos estruturais só foi possível utilizando os receptores com os domínios intracelulares N- e C-terminais truncados. Nesse sentido, os modelos estruturais dos receptores zfP2X4 (134), ckP2X7 (137) e pP2X7 (136) aparentam mostrar somente até o limite das regiões transmembrana, definido pelos domínios em hélice dessa região (Figura 1.10). Em relação ao receptor hpP2X3 (135), embora ele tenha sido truncado na mesma região aproximadamente, foi possível observar parte do domínio intracelular transientemente estruturado durante a abertura do canal, como será discutido a frente. De uma maneira geral, os modelos estruturais revelaram que os receptores P2X se organizam da seguinte maneira: os domínios transmembrana configurados em hélice, sendo que o TM2 forma a luz do canal enquanto o TM1 fica posicionado de maneira periférica, provavelmente ancorando o receptor na membrana plasmática. A porção extracelular logo adjacente aos domínios transmembrana está configurada como folhas- β rígidas enquanto a região mais distante da membrana possui domínios flexíveis compostos por múltiplas alças, onde vai ocorrer a ligação do agonista. Os modelos estruturais também confirmaram a presença de 5 pontes de dissulfeto intra-subunidades que mantêm a compactação da porção extracelular dos receptores P2X, o que já era esperado devido ao fato dos receptores P2X correrem como monômeros em um SDS-PAGE mesmo em condições não redutoras (138). Quando os modelos estruturais do receptor zfP2X4 foram publicados (134) foi observado que o arranjo estrutural das subunidade se assemelhava a um golfinho (Figura 1.10), onde os domínios intracelulares seriam a cauda e a porção extracelular seria a *cabeça* e o *corpo* do golfinho, incluído pequenos domínios denominados *nadadeiras direita e esquerda* além da *barbatana dorsal*. Desde então, esses diferentes domínios estruturais dos receptor P2X, vem sendo nomeadas na literatura segundo essa classificação e ela será usada aqui.

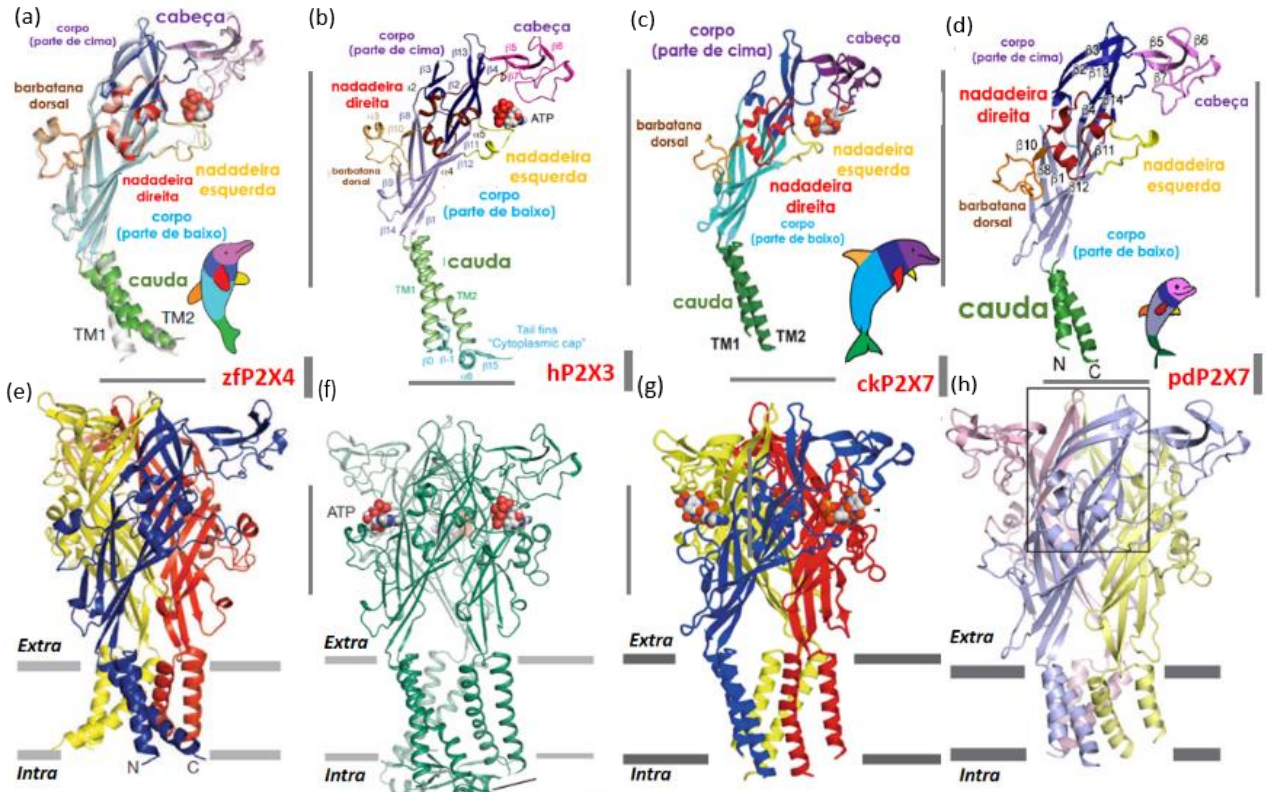


Figura 1.10 – Modelos estruturais dos receptores P2X – Visão lateral dos modelos estruturais dos monômeros (a-d) e dos trímeros (e-h) dos receptores P2X determinados por cristalografia de raios-x. (a) Estrutura do monômero zfP2X4 (em *cartoon*) ligado ao ATP (como esferas). (b) Estrutura do monômero hP2X3 (em *cartoon*) ligado ao ATP (como esferas). (c) Estrutura do monômero ckP2X7 (em *cartoon*) ligado ao antagonista TNT-ATP (como esferas). (d) Estrutura do monômero pdP2X7 (em *cartoon*) no estado fechado. Note a semelhança do monômero com um golfinho e as suas respectivas partes (e) Estrutura do trímero zfP2X4 (em *cartoon*) no estado fechado onde as 3 subunidades estão em cores diferentes (amarelo, azul e vermelho). (f) Estrutura do trímero hP2X3 (em *cartoon*) ligado ao ATP (como esferas). Neste caso as 3 subunidades estão da mesma cor (verde). Note o domínio citoplasmático estruturado durante a abertura do canal. (g) Estrutura do trímero ckP2X7 (em *cartoon*) bloqueado pelo antagonista competitivo TNT-ATP (como esferas) onde as 3 subunidades estão em cores diferentes (amarelo, azul e vermelho) (h) Estrutura do trímero pdP2X7 (em *cartoon*) no estado fechado. As 3 subunidade estão em cores diferentes (azul, rosa e amarelo). A área destacada se refere ao sítio de interação dos antagonistas alostéricos A740003, A804598, AZ10606120, GW791343 e JNJ47965567. *Extra* e *Intra* indicam os espaços extra e intracelulares. O espaço delimitada pelas linhas representa a área esperada da membrana plasmática. (a e e) adaptado de (134), (b e f) adaptado de (135), (c e g) adaptado de (137), (d e h) adaptado de (136).

A ativação dos receptores P2X começa com sua ligação ao agonista (139). Os primeiros estudos partiam da ideia que resíduos carregados positivamente poderiam participar da interação dos grupamentos fosfato, carregado negativamente, da molécula de ATP, assim como

ocorre em outras proteínas capazes de ligar ao ATP (140). Nesse sentido, Digby *et al* mostraram que havia um motivo (KxKG) altamente conservado nos receptores P2X e mutações, nos resíduos de lisina (carregado positivamente) por resíduos de alanina (sem carga), nesse motivo afetavam a sensibilidade dos receptores hP2X1, hP2X2 e hP2X3 ao ATP (141). Esses padrão ainda foi observado para o receptor P2X4 de rato (rP2X4) (142) e para o subtipo heteromérico rP2X2/3 (143). Finalmente, esses resultados foram confirmados na estrutura do receptor zfp2X4 ligado ao ATP, onde esses resíduos estão na posição K70 e K72 (134). Além disso, a estrutura cristalográfica do receptor zfp2X4, ligado ao ATP, mostrou que o sítio de interação com ATP era inter-subunidade, ou seja, quando a proteína está dobrada corretamente o sítio de interação com o ATP é formado na interface entre duas subunidades diferentes (134). Dessa maneira, outros resíduos carregados positivamente, como a K93 e K316 (numeração do zfp2X4), também participam da interação com os grupamentos fosfato carregados negativamente do ATP, mesmo estando longe na sequência primária de aminoácidos em relação as K70 e K72 (134). Posições análogas às lisinas K93 e K316 nos receptores hP2X1 (144), hP2X2 (145), rP2X3 (146), hP2X4 (145) e hP2X7 (147), também afetam a sensibilidade ao ATP quando mutadas por resíduos neutros, sugerindo também seu papel na interação com o ATP. Além das lisinas altamente conservadas, a arginina na posição R298 (numeração zfp2X4) interage com o ATP nos modelos estruturais do receptor zfp2X4 (134) e na sua posição correspondente no modelo estrutural do hP2X3 (135). A importância desse resíduo é demonstrado em estudos de mutagênese no hP2X1 (148) e rP2X2 (149). Interessantemente, a R290 no receptor rP2X2 (análoga à R298 no zfp2X4) faz uma ponte salina com o resíduo E167 estabilizando essa região no estado fechado, contudo, durante a ligação com ATP, a R298 deixa de interagir com o E167 e participa da coordenação dos grupamentos fosfato no ATP (150). Os modelo estruturais dos receptores P2X ligados ao ATP nos permitem ver a localização de cada resíduo na interface inter-subunidade de interação com ATP (134, 135) (Figura 1.11). Baseado na numeração do receptor zfp2X4, as K70 e K72 se localizam na cabeça e a K193 no corpo de uma mesma subunidade enquanto a K316 e R298 se encontraram no corpo da subunidade adjacente. Os resíduos K70, K72, K316 e R298 fazem interações eletrostáticas com os grupamentos fosfatos, que assume uma conformação em “U” quando interage com o seu sítio de interação, enquanto a K70 e T189 ainda formam pontes de hidrogênio

com a base de adenina (134) (Figura 1.11). Contudo, os estudos de mutagênese falharam em prever a participação dos resíduos hidrofóbicos de leucina e isoleucina nas posições L191 e I232 (numeração zfP2X4), respectivamente. Os resíduos L191 e I232 fazem interações hidrofóbicas a adenina (134, 135) (Figura 1.11). Outras mutações afetam a ação do ATP nos receptores P2X, entretanto, provavelmente agem perturbando a região vizinha a ligação do ATP, modificando a exposição dos resíduos chave para a ligação do ATP ou afetando as modificações estruturais resultantes (139). Um exemplo disso são os resíduos correspondentes a T186 e F185 (numeração zfP2X4) no receptor hP2X1, que quando mutados afetavam a resposta ao ATP (151) contudo não aparecem interagindo com a molécula no modelo estrutural do receptor zfP2X4 (134) ou do hP2X3 (135). Nesse sentido, os modelos estruturais dos receptores P2X vem desempenhando um papel fundamental no entendimento da interação do ATP com os receptores ajudando ao confirmar, ou não, as previsões baseadas em estudos de mutagênese.

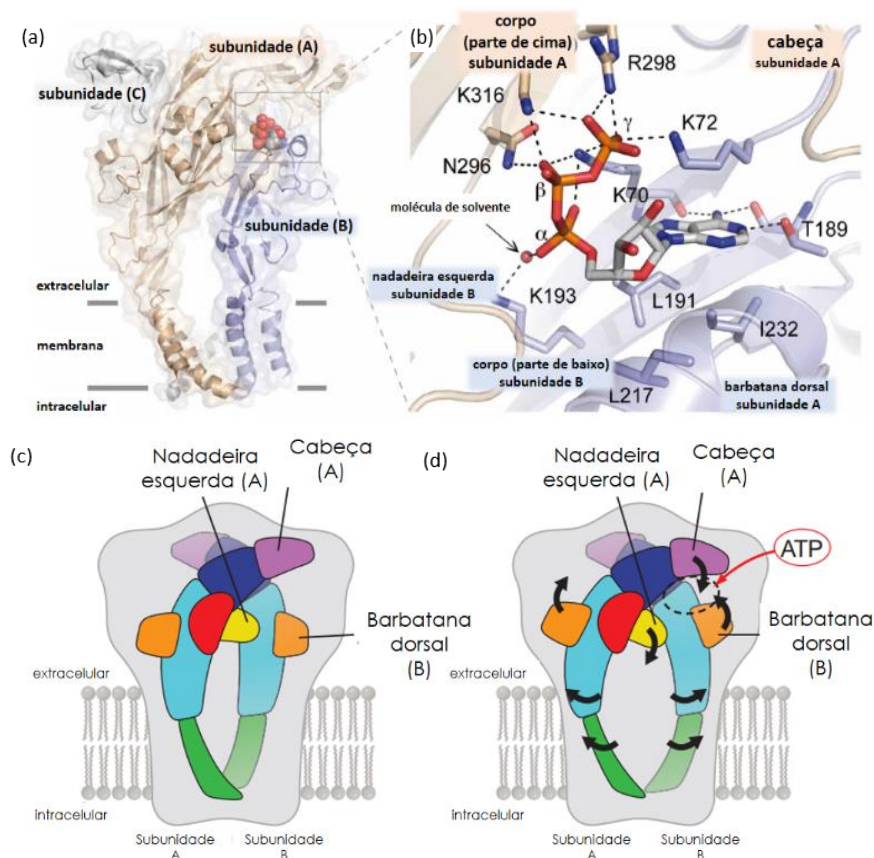


Figura 1.11 – Ligação do ATP aos receptores P2X. (a) Modelo estrutural do receptor zfP2X4 destacando os resíduos que interagem diretamente com o ATP. A estrutura da proteína está representada como *cartoon* e a molécula de ATP como bastões. O sítio de interação com o ATP se localiza na interface iner-subunidade, onde uma é mostrada em azul e outra em dourado. (b) Esquema simplificado da estrutura do zfP2X4 no qual se mostram as subunidades A e B, com a molécula de ATP ligada. (c) Diagrama simplificado da estrutura do zfP2X4 sem a molécula de ATP. (d) Diagrama simplificado da estrutura do zfP2X4 com a molécula de ATP ligada, mostrando a interação com a barbatana dorsal da subunidade B.

estado fechado e (d) movimentos subsequentes a ligação do ATP. A e B representam duas subunidades distintas no arranjo trimérico dos receptores P2X. Em todas as figuras apenas duas subunidades estão mostradas para facilitar a visualização. (a) Adaptado de (139), (b) e (c) adaptado de (134).

O sítio de interação do ATP nos receptores P2X se assemelham a uma mandíbula (Figura 1.11). Os resíduos que interagem com o ATP estão expostos quando o receptor está no inativo e, após a ligação do ATP, a “mandíbula” se fecha (134, 152) dando início às modificações estruturais que vão resultar na abertura do canal. A mandíbula é formada basicamente pela cabeça e a região superior de uma subunidade (“mandíbula superior”) e a barbatana dorsal e a região inferior do corpo da subunidade adjacente (“mandíbula inferior”) (Figura 1.11b e c). Após a ligação do ATP, a “mandíbula” se fecha (152) e as regiões adjacentes seguem na mesma direção: há um movimento em direção à membrana da cabeça de uma subunidade e um na direção contrária da membrana pela barbatana dorsal na subunidade adjacente, fazendo um movimento de pinça (Figura 1.11b e c). Como 3 moléculas de ATP são capazes de ativar os receptores P2X, esse movimento se sobrepõe entre as 3 subunidades do receptor e logo há um movimento relativo entre elas (153), torcendo a parte superior da fração extracelular no sentido anti-horário (154), levando a uma compactação dessa região. Além disso, o domínio flexível da nadadeira esquerda de uma subunidade se aproxima do corpo e barbatana dorsal da subunidade adjacente e promove diversos contatos que estabilizam a estrutura no estado ativado (155). Corroborando com esse modelo, foi proposto que na inibição do receptor P2X7 pelo seu antagonista competitivo TNT-ATP no receptor ckP2X7, o grupamento trinitrofenil fica posicionado entre os domínios da cabeça e da barbatana e impede o movimento relativo entre eles (137).

A porção extracelular flexível, onde se liga o ATP, nos receptores P2X está diretamente conectada com um extenso corpo rígido composto em maioria por folhas- β , que por sua vez se conecta aos domínios transmembrana, onde o canal efetivamente abre (Figura 1.12). Logo, o movimento da região flexível, em resposta a ligação do ATP, é transmitido através do corpo rígido de folhas- β para a região transmembrana (Figura 1.12b), assim como a haste rígida de uma bandeira permite que o movimento de nossas mãos possa ser transmitido para a bandeira em si. Nesse contexto, Kasawara *et al* mostraram que os 5 agonistas alostéricos que foram cristalizados com o receptor pdP2X7 (Figura 1.10h) interagem na interface entre a cabeça flexível e o corpo

rígido do receptor P2X7 (136). Foi possível observar que a interação dessas moléculas nesse região impedia que os movimentos da cabeça flexível fossem transferidos completamente para o domínio transmembrana. Nesse sentido, o receptor apresentava um certo grau de expansão do vestibulo interno mas sem a abertura na região transmembrana. Duas fitas- β do corpo rígido dos receptores são cruciais: a $\beta 1$ e $\beta 14$, que estão diretamente conectadas aos domínios transmembrana, onde ocorre efetivamente a abertura do canal (Figura 1.12a). Nesse sentido, Du *et al* sugeriu, baseado em simulações de dinâmica molecular da estrutura do receptor zfP2X4, que após a ligação do ATP no seu sítio, as fitas $\beta 1$ e $\beta 14$, de subunidades diferentes fariam rotações em sentidos opostos, logo, a parte superior dessas fitas- β se aproximariam enquanto a parte inferior se afastaria, essa última fica próxima aos domínios transmembrana (156) (Figura 1.12c e 1.12d). Essa hipótese é sustentada por estudos de mutagênese, onde resíduos nas folhas $\beta 1$ e $\beta 14$ foram trocados por cisteína levando a um prejuízo na abertura do canal. Essa abordagem é chamada de travamento dissulfeto (*disulphide locking*) e tem sido extremamente valiosa no entendimento dos movimentos que conectam o sítio de interação com o ATP e a região transmembrana, onde é aberto o canal. Nessa técnica, são desenhadas mutações duplas onde os resíduos em questão são substituídos por cisteína. Se estes resíduos estiverem próximos o suficiente vai haver uma ligação dissulfeto que irá *travar* o movimento entre eles. Assim, se o movimento relativo entre esses dois resíduos, normalmente em domínios diferentes da proteína, for importante para a abertura do canal, sua atividade será prejudicada. Nesse sentido, mutantes como: I62/D320C (hP2X1) (154), E59C/Q321 (rP2X2) (157) e S65/D315 (rP2X2) (158), o ATP não foi capaz de ativar o receptor, entretanto, esse efeito era revertido pelo tratamento com o agente redutor ditioneitol (DTT). Esses resultados sugerem que: esses resíduos estão próximos o suficiente para formar pontes dissulfeto e que o movimento relativo entre esses resíduos (logo as folhas $\beta 1$ e $\beta 14$) é fundamental para a abertura do canal. A fita $\beta 1$ está conectada diretamente ao domínio TM1 enquanto a fita $\beta 14$ se conecta ao TM2. O movimento relativo entre elas promove a aproximação do domínios TM de uma mesma subunidade e o afastamento dos domínios TM de subunidades diferentes (134, 158) (Figura 1.12e e f). Além disso, é possível observar ao comparar os modelos estruturais do receptor zfP2X4 no estado aberto e fechado que as hélices TM1 e TM2 giram em $\sim 10^\circ$ e $\sim 55^\circ$, respectivamente, no sentido anti-horário em relação

ao eixo central do canal e de maneira perpendicular a membrana (134). Paralelamente, o TM1 e o TM2 se inclinam em relação ao plano da membrana em $\sim 8^\circ$ e $\sim 2^\circ$, respectivamente (134). A combinação desses dois movimentos faz com que o canal se abra com um movimento semelhante a uma íris (134). Contudo, a magnitude do afastamento entre os domínios TM de subunidades diferentes parece ser um artefato da cristalização. Nesse sentido, Heymann *et al* realizaram simulações de dinâmica molecular do modelo estrutural do zfp2X4 e observaram que lipídeos da membrana se deslocavam pelos espaços entre os domínios TM de diferentes subunidades para dentro da luz do canal, o que é evidentemente incompatível com a abertura de um canal iônico (159). Nesse mesmo estudo, o autor propôs um modelo no qual o giro dos domínios TM2 seria mais suave e geraria um afastamento menor entre os domínios TM das diferentes subunidades. Esse modelo corrobora com os modelos estruturais recentemente publicados do receptor hP2X3 (135) no estado aberto. A hélice TM2 realizaria um giro mais suave que no zfp2X4 ($\sim 10^\circ$) e há uma mudança marcante no padrão conformacional da hélice, passando de uma α -hélice para uma hélice 3_{10} durante a abertura do canal (135). Além disso, a porção intracelular no receptor hP2X3, ausente nos modelos estruturais do receptor zfp2X4 (133, 134), passa de um estado desordenado, no modelo não ligado ao ATP, para um domínio altamente estruturado durante a ativação do receptor (135). A estrutura do domínio recém ordenado durante a ativação do receptor hP2X3 mostra folhas- β compostas de fitas inter-subunidades formando uma rede que fica próximo a face intracelular da membrana logo na interface de saída dos íons, onde diferentes contatos entre os segmentos N- e C-terminais são formados. Esse domínio, por estar diretamente conectado a região transmembrana, poderia influenciar no dobramento correto e conseqüentemente na estabilização dos domínios TM. Além disso, os domínios intracelulares podem ser capazes de interagir com proteínas intracelulares ou serem alvos de moduladores alostéricos, como será discutido mais adiante.

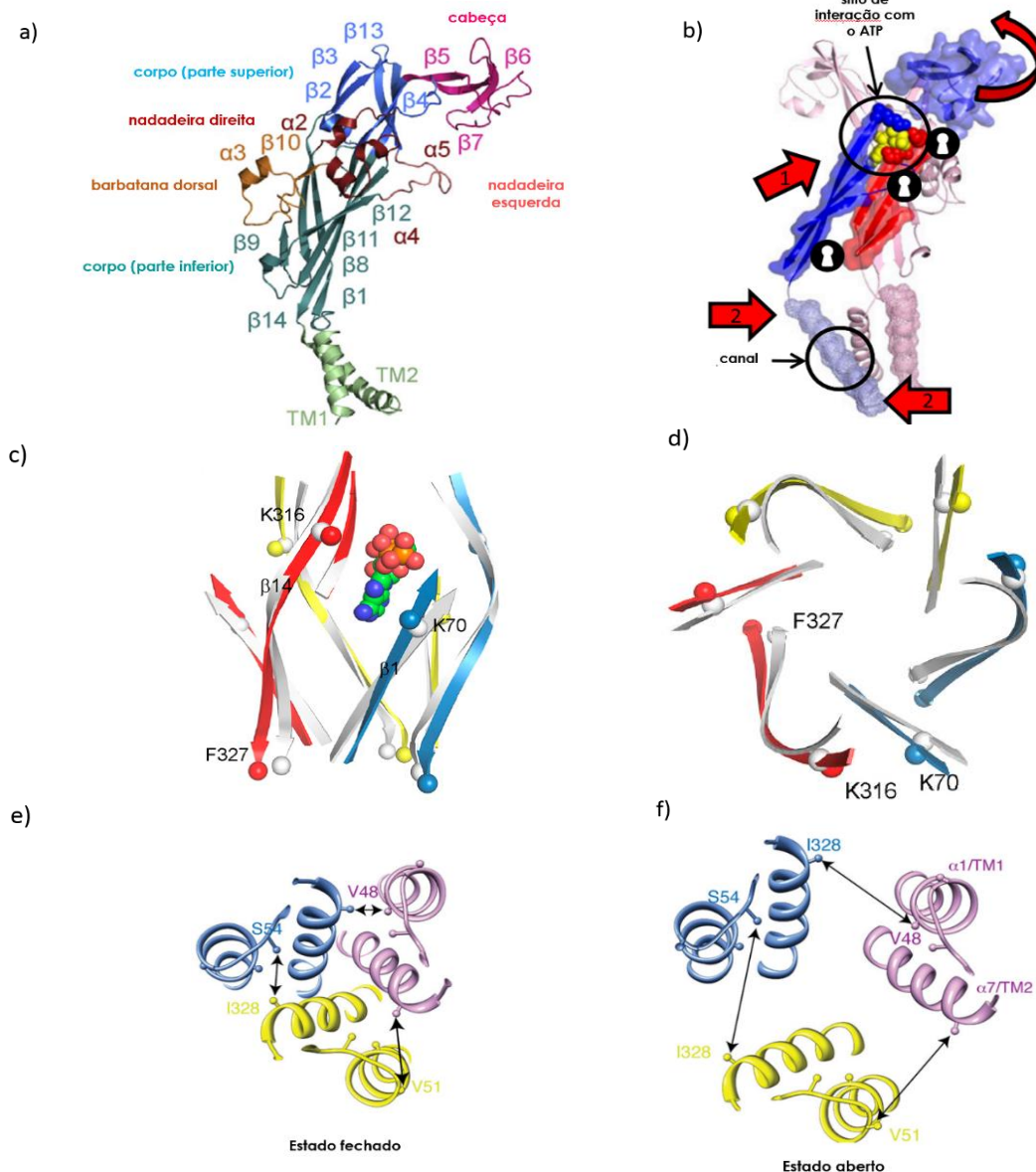


Figura 1.12 – Modificações estruturais induzidas pelo ATP nos receptores P2X. Em (a) são mostradas e numeradas todas as folhas presentes na subunidade P2X no estado fechado. Note que a fita $\beta 1$ se conecta diretamente a domínio transmembrana 1 (TM1) e a fita $\beta 14$ ao TM2. (b) Modelo proposto por Roberts et al dos movimentos subsequentes a ligação do ATP no modelo comparativo do hP2X1 baseado na estrutura do zP2X4. Os símbolos de fechadura representam as posições das mutações duplas por cisteína que impediam a abertura do canal, o que era revertido pela aplicação do agente redutor DTT. Nessa figura são mostradas apenas duas subunidades (em azul e rosa) para melhor visualização. (c) e (d) Movimento relativo entre as folhas $\beta 1$ e $\beta 14$ durante simulações de dinâmica molecular do zP2X4 visto lateralmente (em relação ao plano da membrana) e do lado extracelular, respectivamente. Cada subunidade do modelo estrutural após a simulação está representado em uma cor (vermelho, amarelo e azul) enquanto a estrutura antes do *docking* do ATP está em cinza. A proteína está representada como *cartoon* e a molécula de ATP como esferas. (e) e (f) Vista do lado extracelular dos domínios transmembrana do canal fechado e aberto, respectivamente, no modelo comparativo do receptor rP2X2 baseado no receptor zP2X4. Os

resíduos destacados foram mutados por cisteína e a ligação dissulfeto entre eles impediu a abertura do canal. (a) Adaptado de (160), (b) Adaptado de (154) (c) e (d) Adaptado de (161), (e) e (f) Adaptado de (158).

Quando os modelos estruturais do receptor zfP2X4 foram publicados (133, 134), foi possível observar duas prováveis entradas para os íons: pelo extremo superior da fração extracelular atravessando todo o eixo central do receptor (denominado caminho central) (Figura 1.13a) ou por 3 janelas laterais logo adjacentes a membrana (Figura 1.13b). Este padrão também está presente nos modelos estruturais do receptor hP2X3 (135). Além disso, os modelos estruturais dos receptores P2X mostram 3 cavidades internas, que se expandem quando o receptor está ligado ao ATP e, como esperado possuem um potencial eletrostática predominantemente negativo (134), o que facilitaria a difusão de cátions para o interior do receptor. Como podemos observar na Figura 1.13, o caminho central é mais longo e contém duas regiões de estreitamento. Por outro lado, as janelas laterais são menos estreitas e já dão acesso diretamente ao vestíbulo central e extracelular (134). Assim, simulações de dinâmica molecular de um modelo comparativo do receptor rP2X2, baseado na estrutura do zfP2X4, sugeriram que a passagem de íons pelo eixo central é termodinamicamente desfavorável em comparação às janelas laterais (157). Além disso, a primeira estrutura do receptor zfP2X4 foi cristalizada com sais contendo Gd^{+3} , esse íon estava presente coordenado em cadeias laterais no caminho central (133). A presença do íon Gd^{+3} no eixo central foi capaz de inibir as correntes geradas pela ativação do receptor com o ATP, entretanto, esse efeito foi suplantado pelo aumento da concentração de ATP, sugerido um mecanismo de inibição alostérica, provavelmente atrapalhando os movimentos dos domínios flexíveis da fração extracelular, em detrimento do bloqueio direto do caminho de passagem dos íons (133). Além disso, mutações duplas de cisteína no vestíbulo superior pela abordagem de *disulphide locking* (Figura 1.12), que presumivelmente promoveriam ligações dissulfeto que prejudicariam a sua expansão, não foram capazes de bloquear a passagem de íons. Logo é bastante improvável que os íons passem pelo caminho central, por outro lado, existe um grande corpo de evidências que sugerem a passagem de íons pelas amplas janelas laterais.

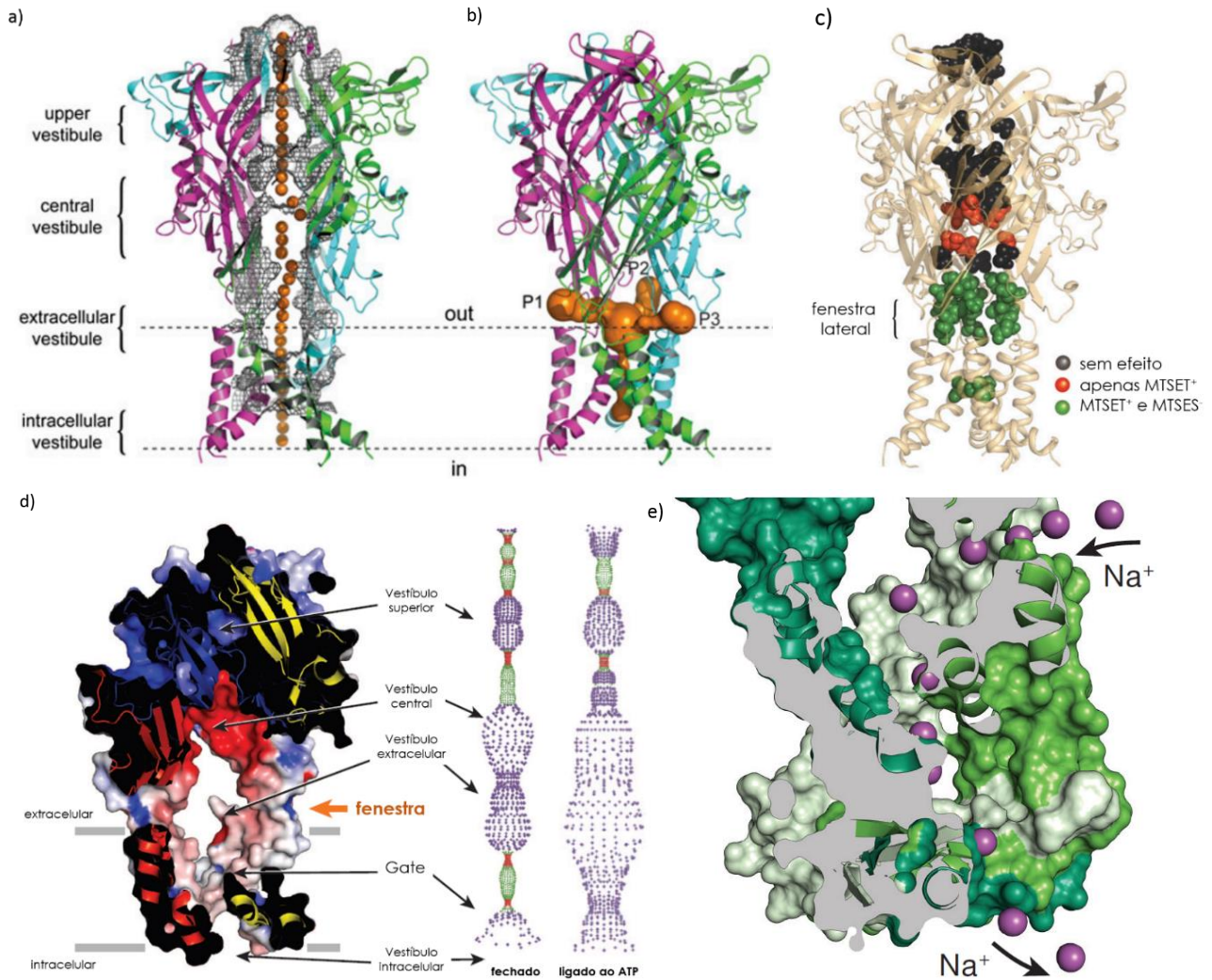


Figura 1.13 – Entrada dos íons pelos receptores P2X. (a) Corte sagital do modelo comparativo do receptor hP2X4 mostrando os dois caminhos possíveis para entrada dos íons: por uma via central (a) ou pelas fenestras laterais (b). As esferas laranja na via central (a) representam passos de 1 Å pelo provável caminho dos íons e os espaços preenchidos em laranja em (b) representa a cavidade adjacente às fenestras laterais. (c) Corte sagital do modelo estrutural do receptor zfP2X4 no estado aberto mostrando o potencial eletrostático: vermelho – carga negativa, azul – carga positiva e branco – neutro. Nessa figura apenas 2 subunidades estão sendo mostradas para maior clareza. Ao lado do modelo estrutural está a representação dos compartimentos internos com o receptor fechado e aberto, ligado ao ATP. Note os estreitamentos no caminho central e a união dos vestibulos central e extracelular no estado aberto. (d) Modelo comparativo do hP2X4 humano mostrando a provável posições de resíduos testados pelo método de acessibilidade a cisteína. Os resíduos coloridos representam aminoácidos que eram acessíveis a compostos tiol-reativos catiônicos e aniônicos e estes modificavam a corrente gerada pela ativação do receptor. (e) Corte sagital do domínio TM e de uma das fenestras laterais do receptor hP2X3 representando o caminho de passagem do Na durante simulações de dinâmica molecular. (a), (b) e (c) Adaptado de (162) (d) Adaptado de (134) e (e) adaptado de (135).

A exploração do caminho de passagem de íons nos receptores P2X vem sendo feita majoritariamente pela técnica de ensaio de acessibilidade à cisteína (SCAM – *substituted cysteine accessibility method*) (Figura 1.14) (163). Nessa técnica um modelo estrutural é usado para desenhar mutações de cisteína em resíduos que poderiam estar no caminho de passagem dos íons. Uma vez expresso o receptor na membrana de um sistema de expressão heteróloga, é testada a acessibilidade desses resíduos a substâncias com grupamentos tiol-reativos, ou seja, capazes de formar ligações covalentes com as cadeias laterais de cisteína. Dentre os principais grupos estão os metanotiosulfonados (MTSs) e as maleamidas, essas últimas não são capazes de se desligar mesmo em condições redutoras (163). Os diferentes derivados de MTSs e maleamidas possuem características químicas distintas como volume molecular e carga, além de serem relativamente impermeáveis à membrana (163). A ligação dessas substâncias às cisteínas presentes no caminho de passagem dos íons podem causar um bloqueio estérico da corrente ou mudar o potencial eletrostático da região, diminuindo ou aumentando a passagem de íons pelo canal, dependendo carga do íon e do composto utilizado. No demais, os compostos tiol-reativos ainda pode ser conjugado a biotina, permitindo que a proteína marcada possa ser separada com beads de avidina (13), ou conjugada a corantes fluorescentes como a rodamina (13) e o Texas Red (164), permitindo sua detecção pela fluorescência emitida. Além de compostos tiol-reativos, podemos testar a acessibilidade de resíduos de cisteína utilizando a Ag^+ , a qual pode ser coordenada por cisteínas suficientemente próximas e acessar regiões antes inacessíveis aos compostos tiol reativos. A coordenação da Ag^+ no caminho de passagem dos íons leva ao bloqueio da corrente através do canal (163). A ausência de efeito mediante a aplicação dos tiol-reativos e/ou a Ag^+ pode ser interpretada como inacessibilidade dos resíduos mutados por cistéinas (163). Além disso, é possível explorar a acessibilidade dos resíduos antes de depois da ativação do receptor, dando informações sobre as modificações estruturais que acontecem durante a abertura do canal. Nesse sentido, resíduos no caminho central previstos por modelos comparativos dos receptores rP2X4 (157) e hP2X4 (162) eram inacessíveis a compostos tiol-reativos. Inversamente, resíduos presumivelmente presentes no limite externo das janelas laterais foram capazes de se ligar covalentemente aos composto catiônico MTSET e ao composto aniônico MTSEA, diminuindo ou aumentando a corrente, respectivamente (162), nesse caso

provavelmente afetando o potencial eletrostático da região. Após a entrada pelas janelas laterais, os íons encontram o vestíbulo extracelular, que quando dilatado no estado aberto parece se fundir com o vestíbulo central (Figura 1.13d). Esse grande vestíbulo interno apresenta um potencial eletrostático predominantemente negativo em modelos comparativos dos receptores rP2X2 e no modelo estrutural, derivado de experimentos de cristalografia de raios-x, do receptor zfP2X4 (157). Interessantemente, o receptor hP2X5, que apresenta certa permeabilidade para ânions (P_{Cl^-}/P_{Na^+} : 0,5 (165)) tem o potencial eletrostático nos vestíbulos internos de seu modelo comparativo predominantemente positivo (157). Tal potencial eletrostático ainda parece impedir a acessibilidade de composto tiol-reativos com a mesma carga, uma vez que resíduos do vestíbulo central somente são acessíveis a uma curta aplicação (3s) do composto MTSET⁺ em contraste ao MTSEA⁻ (162), que pareceu acessar resíduos do vestíbulo central em longas aplicações (>120s) no receptor rP2X2 (166). A entrada pelas janelas laterais e os vestíbulos intracelular e central parecem estar acessíveis mesmo quando o receptor está no estado fechado, visto que o composto tiol-reativo biotinizado MTSEA-biotina é capaz de marcar resíduos de cisteína presentes nessas regiões no hP2X1 (154). Além disso, houve biotinylation na ausência de ATP, que no caso do vestíbulo central foi maior do que quando tratado com ATP (154), sugerindo que modificações estruturais nos vestíbulos possam forçar os íons em direção aos domínios transmembrana, onde há efetivamente o *gate* do canal.

O *gate* de um canal iônico se refere ao ponto exato na estrutura em que há a barreira para os íons no estado fechado e que após as mudanças conformacionais referentes a ativação do receptor abre a passagem para os mesmos (167). Após o *gate*, os íons devem passar pelos segmentos transmembrana até atingir o lado intracelular. Nos canais iônicos de mamíferos, as regiões transmembrana estão sempre configuradas como hélice, com exceção de alguns canais que possuem uma alça reentrante na membrana (168). Embora a análise da sequência primária dos receptores P2X sugerisse que houvesse uma alça reentrante (169, 170), os modelos estruturais 3D já publicados demonstraram que esse não é o caso (134). O caminho de passagem dos íons através da membrana parece ser formado em maior parte pelas hélices TM2. Levando em consideração o arranjo trimérico dos receptores P2X, apenas 3 segmentos de hélice iriam compor a passagem dos íons pela membrana, diferentemente dos receptores pentaméricos *Cys-Loop* ou

os receptores tetraméricos de NMDA (171), mas semelhante aos também triméricos canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC – *acid sensing ion channels*) no qual o TM2 também forma o caminho de passagem dos íons com uma pequena contribuição do TM1 próximo a interface intracelular (172). Nos receptores P2X, parece haver uma pequena contribuição do TM1, uma vez que compostos tiol-reativos tiveram acessibilidade a resíduos de cisteína inseridos sobretudo próximo às interfaces intra e extracelulares da membrana. Nesse sentido, foi observado que modificações por cisteína na posição dos resíduos H33, R34 e I50 no TM1 do receptor rP2X2 eram acessíveis à Ag⁺. Posições mais próximas ao centro da membrana no receptor rP2X2, como os resíduos G30C, G37C, Y43C e F44C só puderam ser acessíveis durante longas exposições (>60s) de compostos tiol-reativos (166), sugerindo que embora o TM1 não forme diretamente o caminho de passagem dos íons, também não é completamente impermeável durante a ativação do canal. Por outro lado, diversos resíduos do TM2 são acessíveis a compostos tiol reativos.

Estudos com mutantes do receptor rP2X2 mostraram que os resíduos L327, I328C, I332C, N333C, L334C, A335, T336C, A337C, L338C, T339, S340, I341, G342C, V343, G344C, S345C, F346C, L352C, L353C no TM2 podem ser acessíveis a Ag⁺ levando a modificação da corrente (173, 174). Esses resíduos cobrem grande parte da sequência primária presumida como domínio TM2. Entretanto o pequeno volume do íon de Ag⁺ faz com que ele possa alcançar cavidades no interior da região transmembrana que não possam fazer parte necessariamente do caminho de passagem dos íons mas podem perturbar a estrutura de maneira que prejudique a abertura do canal. Além disso, a estrutura de uma proteína é dinâmica, podendo assumir diferentes estados conformacionais, em detrimento da simples ideia de estado “aberto” e “fechado”, fazendo com que alguns resíduos possam ser expostos por breves momentos em estados conformacionais mais raros (108). Logo, o uso de compostos tiol-reativos de maior volume molecular nos dá uma visão mais clara da acessibilidade de resíduos no TM2 que efetivamente formam o caminho de passagem dos íons. Nesse sentido, mutações por cisteína em resíduos par primeira metade do domínio TM2 do receptor P2X2, como I328C, N333C e T336C, são acessíveis aos compostos MTSEA⁺, MTSET⁺ e MTSES⁻ (173). Nessa região parece haver uma seletividade a carga e tamanho, visto somente o composto catiônico MTSEA⁺ (que é menor que o MTSET⁺) ainda consegue acessar

os resíduos mais profundos L338C, S340C, G342C e D349C (175). O MTSEA⁺ também acessa os resíduos I331C V335C, G339C, S342C e Y343C no receptor hP2X7 (176). Interessantemente, com exceção do resíduo S342C, todos os mutantes modificados com MTSEA⁺ no receptor P2X7 tiveram a corrente aumentada na modalidade *whole-cell* (176), o que também ocorreu para os resíduos S340C e S342C no receptor P2X2 (175). Análises de canal unitário em frações de membrana excisadas dos mutantes do hP2X7 mostraram que embora as amplitudes dessas correntes dos canais unitários estivessem diminuídas, provavelmente pela oclusão do caminho de passagem dos íons, havia um aumento na probabilidade de abertura, que explicava a corrente aumentada observada na modalidade *whole-cell* (176). Dessa maneira, o MTSEA⁺ parece estabilizar a estrutura com o canal aberto, contudo o composto aniônico MTSES⁻ produziu o mesmo efeito, sugerindo que essa estabilização não está relacionada a interações eletrostáticas. O composto MTS-Rodamina também foi capaz de acessar o resíduo T336C no receptor rP2X2 enquanto resíduo localizado uma volta na hélice após (em direção ao C-terminal), T339C, foi acessível somente à Ag⁺, MTSEA⁺, MTSET⁺, MTS-TPAE mas não ao composto aniônico MTSES⁻ ou o de alto peso molecular MTSEA-Rodamina (Figura 1.14 e 1.16) (173, 175), o que sugere uma maior influência de forças eletrostáticas e um estreitamento da passagem, respectivamente. O possível estreitamento dessa região também foi observado no hP2X7, onde o MTST⁺, que é um pouco maior que o MTSEA⁺, acessava a cisteína na posição S342C mas não acessava os aminoácidos seguintes (na direção C-terminal) (176). Além disso, o acesso do MTSEA no resíduo de cisteína nessa posição ocorria muito mais rápido quando aplicado pelo lado intracelular (176), reforçando a ideia de uma constrição nessa posição mesmo com o canal aberto. Corroborando com essas observações, a região de maior estreitamento no canal observado no modelo estrutural do receptor hP2X3 é na T330 (135), resíduo análogo a S342 no hP2X7. Em contraste, as mutações G345C e T348 do rP2X7, análogas a G342 e S345 do receptor rP2X2, foram acessíveis aos MTSEA-biotina, embora o bloqueio tenha sido modesto (13). Além disso, o mutante G345C (numeração rP2X7) ainda foi acessível ao MTS-Rodamina (13). A acessibilidade desses resíduos no rP2X7 e do resíduo T336C do rP2X2 (164), localizados na metade mais externa e interna do domínio TM2, respectivamente, à substâncias tio-reativas de grande volume molecular pode ser associada com uma possível dilatação desses receptores, que será discutida agora.

Desde a década de 1970, vem sendo descrita a capacidade do ATP extracelular de induzir permeabilização celular, à moléculas de alto peso molecular (Figura 1.16), em alguns tipos celulares como fibroblastos transformados (177), macrófagos (178) e linfócitos (179). Após o estabelecimento da ideia de sinalização purinérgica (180), o receptor responsável pela permeabilização à moléculas de alto peso molecular foi chamado de receptor P2Z (170, 179). Contudo, após a clonagem desse receptor, foi possível incluí-lo na família de receptores P2X (181, 182), sendo então classificado como P2X7. Além disso, tal fenômeno ainda foi descrito para o receptor P2X2 e P2X4 (16, 120, 183). Esse fenômeno possui a natureza controversa e duas teorias surgem baseada nos dados publicados: (1) as moléculas entram diretamente em uma possível conformação dilatada do canal ou (2) a atividade de canal iônico do receptores P2X2, P2X4 ou P2X7 daria início a uma cascata intracelular que iria culminar na ativação de uma segunda proteína capaz de abrir um poro na membrana plasmática (11, 108). Devido a capacidade de permitir a passagem de moléculas com dimensões na faixa de nanômetros (Figura 1.16), essa entidade permeabilizante é chamada de macroporo.

Diversas moléculas são usadas na literatura para evidenciar a permeabilização celular induzida pela ativação dos receptores P2X (Figura 1.16). Os corantes de ligação ao DNA brometo de etídio (13, 184), iodeto de propídio (185, 186), YO-PRO1 (16, 120), DAPI (187) ou Hoechst (187) são usados, devido a sua capacidade de emitir uma quantidade maior de fluorescência quando difundido para o meio intracelular e conseqüentemente se ligar ao DNA. Outros corantes, incapazes de se ligar ao DNA, também são usados em menor escala, como o *Lucifer Yellow* (188) ou o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (13). Os íons de alto peso molecular como o NMDG⁺, TAE⁺, Tris⁺ e a espermidina (12, 16, 189) podem ainda ser usados em ensaios de eletrofisiologia como cátion condutor da corrente. Atualmente na literatura, o tamanho das moléculas que são

permeabilizadas, mediante a ativação dos receptores P2X, são descritas em função de seu diâmetro médio em vez do seu peso molecular.

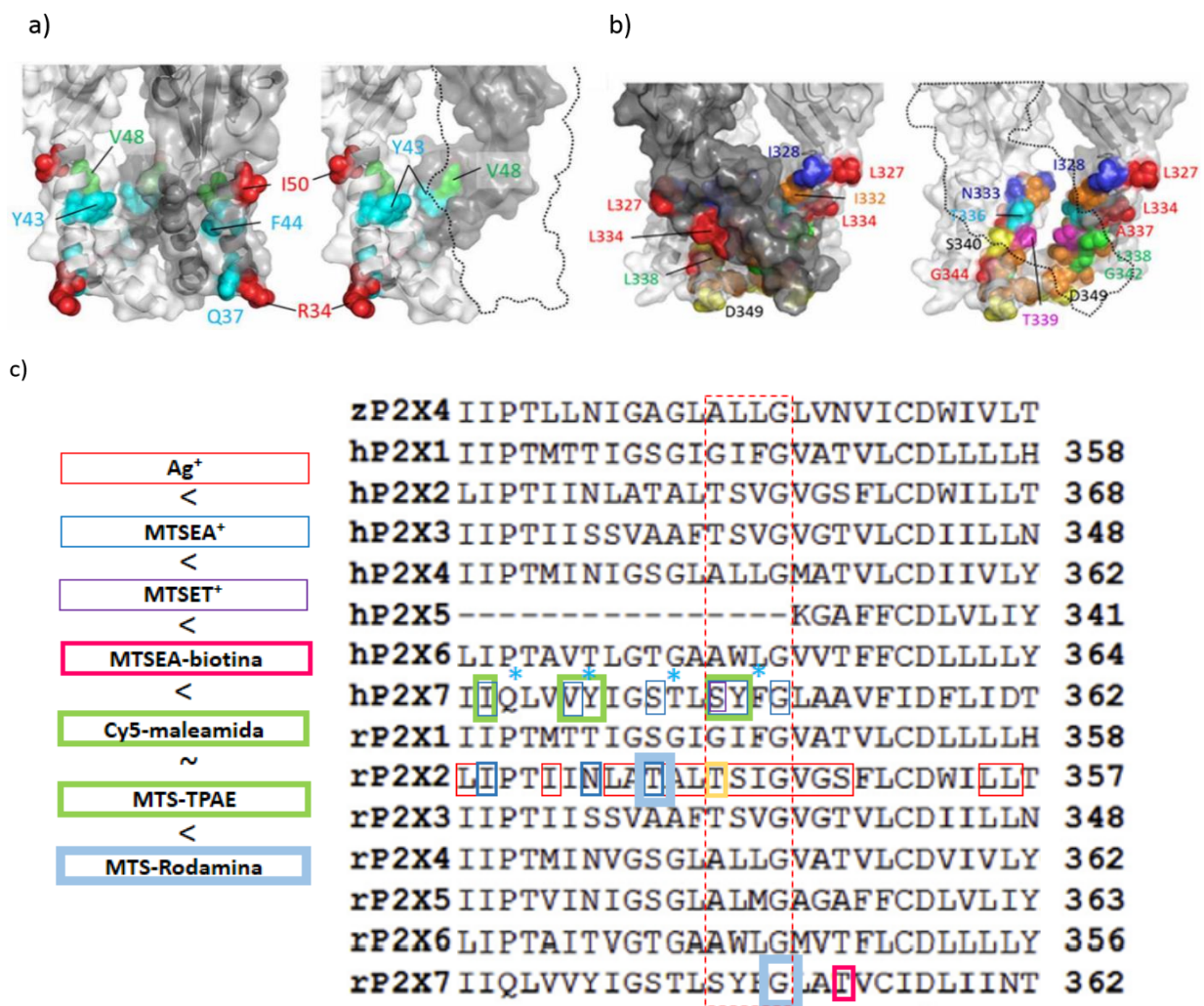


Figura 1.14 – Acessibilidade de resíduos presentes nos domínios transmembrana nos receptores P2X. (a) e (b) Modelo comparativo do receptor P2X2 mostrando apenas 2 subunidades para melhor visualização. Os resíduos dos domínios TM1 (a) e TM2 (b) foram mutados por cisteína e a coloração está de acordo com a substância tiol reativa de maior volume molecular ao qual o resíduo foi acessível (vermelho: Ag⁺ / amarelo: MTSEA / laranja: MTSET / magenta: MTS-TPAE). (c) alinhamento múltiplo da provável domínio TM2 dos receptores P2X humanos (hP2X) e de rato (rP2X), além do P2X4 de peixe-zebra (zP2X4). Os diferentes compostos tiol reativos estão em ordem relativa de diâmetro molecular e os resíduos acessíveis a eles estão marcados com a mesma cor. As linhas pontilhadas mostram a provável região de estreitamento do canal, onde provavelmente se encontra o filtro de seletividade. Os dados relativos ao rP2X7 se referem a uma presumível dilatação do canal, e por isso seria acessível a substâncias tiol-reativas de maior volume molecular. (a) e (b). Adaptado de (108). (c) Alinhamento múltiplo retirado de (190) e informações sobre acessibilidade dos resíduos baseados em (13, 164, 173-176).

Nenhuma das estruturas dos receptores P2X publicadas até o momento mostram o canal em estados distintos de dilatação (134, 135), como já foi observado para o ASIC, que muda sua condutância de acordo com o pH (172). Além disso, o receptor zfP2X4, com os domínios intracelulares truncados, não foi capaz de ser permeável ao NMDG⁺ e ao YO-PRO1 (134). Uma característica marcante que acompanha a entrada de moléculas de alto peso molecular nos receptores P2X4 (120) e P2X7 (13) é o padrão de corrente bifásica obtido em experimentos de *patch-clamp* modalidade *whole cell* utilizando condições simétricas de NMDG⁺: há uma primeira corrente que é ativada rapidamente (I₁) seguida de uma segunda que cresce gradativamente ao longo do tempo (I₂). Em condições biônicas, com o NMDG⁺ do lado extracelular e o Na⁺ do lado intracelular, o ATP rapidamente desencadeia uma corrente em direção ao lado extracelular (gerada presumivelmente pelo Na⁺) que vai sendo aos poucos suplantada por uma segunda corrente, no sentido inverso (presumivelmente pelo NMDG⁺) (Figura 1.15). Curiosamente, o receptor P2X7 quando ativado repetidamente com o ATP em intervalos alternados por processos de lavagem (retirada do agonista) parece imediatamente entrar no estágio I₂ (13, 184, 191), e essa facilitação parece ser regulada pelos domínios intracelulares, uma vez que a troca dos resíduos intracelulares na região N-terminal logo adjacentes ao TM1 do receptor P2X7 por resíduos análogos do P2X2 faz com que o receptor P2X7 entre imediatamente no estágio I₂ (191). Além disso, Rogers demonstrou que essa facilitação era dependente da ligação calmodulina ao receptor (192). Todavia, Li *et al* recentemente sugeriram, baseados em experimentos com o receptor rP2X2, que a corrente bifásica registrada em condições biônicas acontecia devido a um artefato da técnica relacionado com uma rápida modificação na concentração intracelular de íons e, conseqüentemente, o NMDG⁺ era prontamente difundido através da membrana (164). Corroborando com essa observação, Harkat *et al* mostraram, em frações de membrana excisados na modalidade *inside out* da técnica de *patch-clamp*, que o receptor rP2X2 era imediatamente permeável ao NMDG⁺ (16). Além disso, foi possível observar frações de membrana com condutância unitária constante de baixa condutância (< 20pS) no receptor rP2X2 (16), utilizando o NMDG⁺, e no receptor P2X7 utilizando o Na⁺ (176), NMDG⁺ (189) ou Tris⁺ (189) como principal cátion carregador da corrente. Experimentos de canais unitários em frações de membrana por *patch-clamp* mostraram que o ATP é capaz de induzir a formação de canais de alta condutância

unitária em células epiteliais tímica (193, 194), macrófagos (195-197) e cardiomiócitos (198), apresentando condutâncias unitárias de 300 a 400 pS. Curiosamente, os estudos que mostravam a corrente unitária constante e baixa durante a ativação do receptor P2X7 foram feitos em sistemas de expressão heteróloga baseados em oócitos de *Xenopus laevis* (176, 189). Além disso, há uma discordância entre a captação de YO-PRO1 em oócitos de *X. laevis*, observada por alguns grupos (120, 183), mas não por outros (176, 199). Interessantemente, o receptor P2X7 da espécie *X. laevis* (xP2X7) quando expresso heterologicamente em oócitos de *X. laevis* consegue captar Yo-Pro-1 (200). Foi recentemente demonstrado que, além dos subtipos P2X2, P2X4 e P2X7, os receptores P2X3 e P2X5 seriam permeáveis ao NMDG⁺(16), entretanto, não há evidência na literatura, para o nosso conhecimento, que esses subtipos possam também ser permeáveis a moléculas de maior volume molecular, como o Yo-Pro-1.

Ensaio de acessibilidade a resíduos na região transmembrana utilizando compostos metanotiosulfonados de grande volume molecular suportam a possibilidade da dilatação do canal associado ao receptor P2X7. Dessa maneira, Browne *et al* observaram acessibilidade a compostos tiol reativos de grande volume molecular, MTSEA-biotina e MTS-rodamina, aos resíduos de cisteína inseridos na posição G345C e T348C do receptor rP2X7 expresso em células HEK293 (13). Por outro lado, Pippel *et al* observaram que a marcação com MTSEA e maleamida-Cy5 ocorria até o resíduo S342C do receptor hP2X7 expresso em oócitos de *Xenopus laevis* (176). Recentemente, Karawasa *et al* demonstraram que o receptor P2X7 inseridos em vesículas sintéticas era capaz de captar YO-PRO-1 (201). A ausência de qualquer outra proteína nas vesículas mostra que sugere que esse corante é capaz de passar através do canal formado pelo receptor P2X7. Além disso, a composição lipídica da membrana influenciava a intensidade da captação de corante, o que explicaria diferentes efeitos em diferentes tipos celulares.

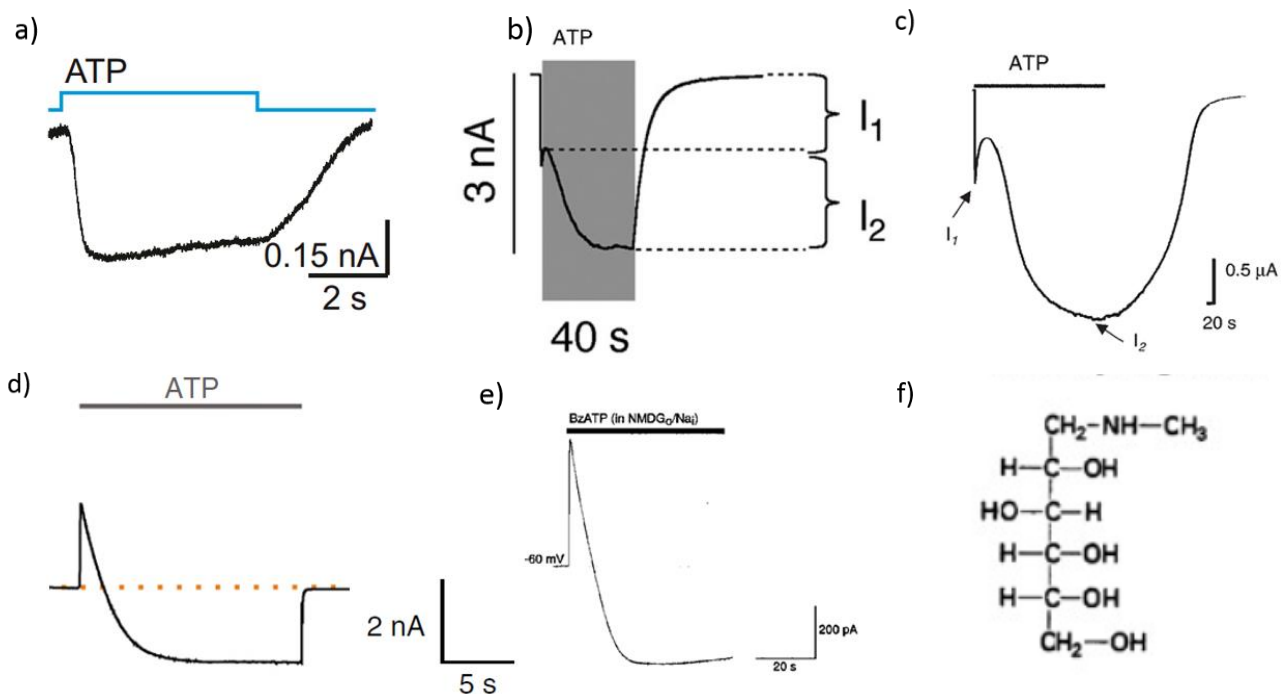


Figura 1.15 – Permeabilidade dos receptores P2X, expressos heterologicamente em células HEK293, ao NMDG⁺. Permeabilidade dos receptores P2X2 (a), P2X7 (b) e P2X4 (c) em condições simétricas de Na⁺ (Na⁺_{extracelular}/Na⁺_{intracelular}). (d) e (e) mostram o padrão de corrente gerado pelos receptores (d) P2X2 e (e) P2X7 em condições biônicas (NMDG⁺_{extracelular}/Na⁺_{intracelular}). (f) Estrutura molecular do NMDG⁺. I₁ e I₂ representam os estágios distintos da corrente observada. Em todas as figuras as células estão mantidas com potenciais negativos (a) Adaptado de (16), (b) Adaptado de (202) (c) Adaptado de (120), (d) Adaptado de (164), (e) adaptado de (203).

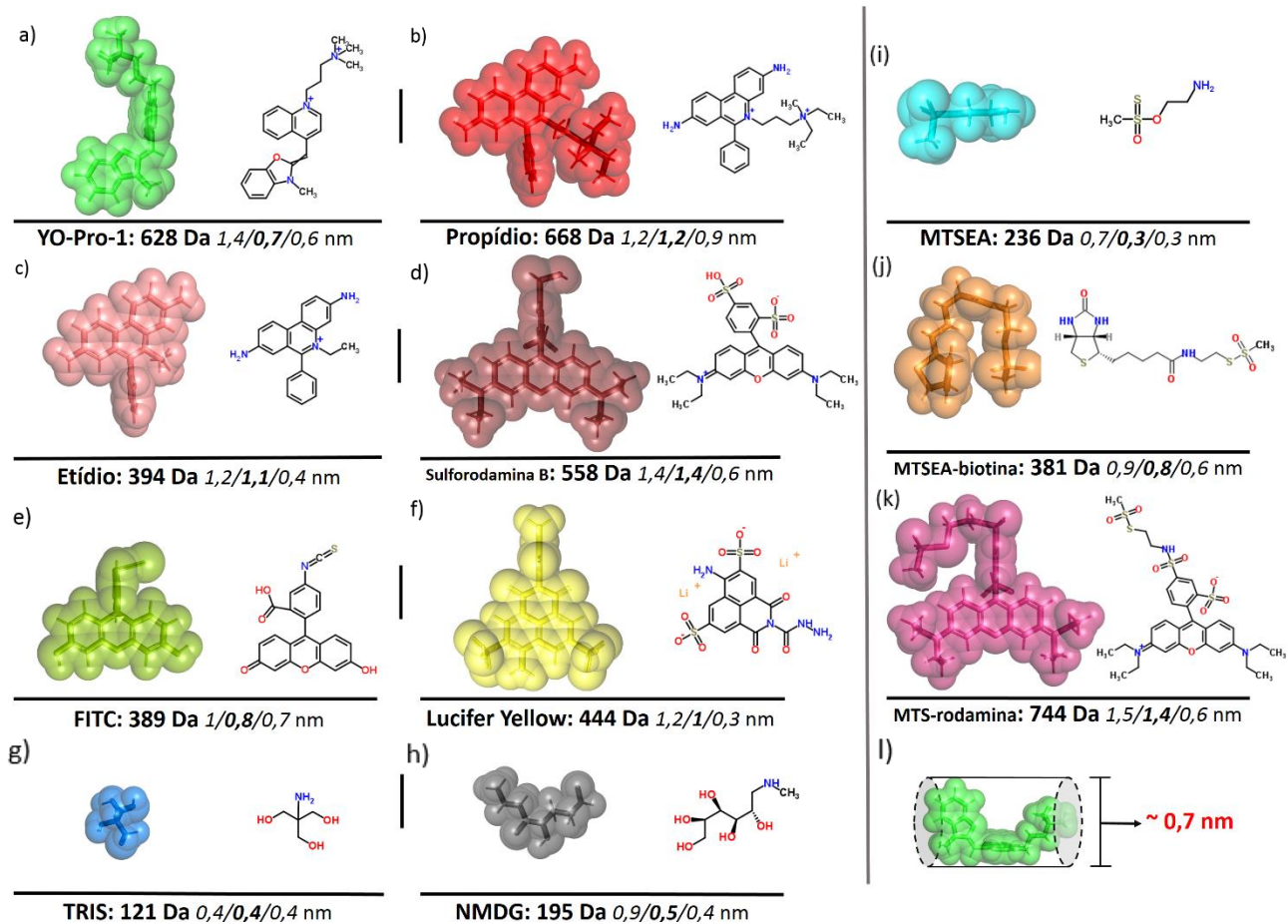


Figura 1.16. Moléculas usadas nos estudo de permeabilização dos receptores P2X e seu diâmetro efetivo. Estrutura 3D e planar de moléculas de moléculas usadas no estudo da permeabilização dos receptores P2X. (a-f) Corantes de alto peso molecular catiônicos (a-d) e aniônicos (e-f). (g-h) Íons de alto peso molecular, utilizados em estudos de eletrofisiologia. (i-k) Compostos metanotiosulfonados utilizados em abordagens de acessibilidade à cisteína. Embaixo das moléculas estão descritos os pesos e dimensões moleculares de cada uma. (l) Para se interpretar a permeabilização ou acessibilidade dessas moléculas no poro associado à ativação dos receptores P2X2, P2X4 e P2X7, devemos considerar a segunda menor medida da molécula no plano x/y/z (em negrito), que resultaria no diâmetro da base de um cilindro inscrito na molécula, que está exemplificado com o YO-Pro-1. Dessa maneira podemos estimar as dimensões do poro. Evidentemente, pode haver pequenas variações nesse diâmetro devido a flexibilidade da molécula. Tanto o desenho da estrutura 3D quanto a estimativa do tamanho das moléculas foram feitas no software *Pymol*.

Embora haja evidência que o NMDG⁺ e os corantes de alto peso molecular (Figura 1.16) possa passar diretamente pelo canal dos receptores P2X2, P2X3, P2X4 e P2X7, alguns dados na literatura sugerem que a ativação desses receptores possa ativar uma segunda proteína que iria

abrir um poro na membrana e permitir a passagem de moléculas de maior volume molecular (204). Por exemplo, o calmidazolium é capaz de inibir as correntes do receptor P2X7 em experimentos de *patch-clamp* mas não afeta a captação de Yo-Pro-1(205). Inversamente, a colchicina é capaz de bloquear a captação de Yo-Pro-1 induzida pela ativação do receptor P2X2 e P2X7 sem afetar a corrente (183). Nesse sentido, é esperado que esse fenômeno envolva a participação de mensageiros intracelulares. Suportando essa visão, é descrito que a captação de corantes induzida pela ativação do receptor P2X7 parece ser dependente da ativação de MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitose - *mitogen-activated protein kinases*), PI3K (fosfoinosítido 3-cinase), CALKII (calmodulina cinase II), (CALK) e PKC (proteína cinase C) (185, 193, 206). Além disso, o aumento de Ca⁺⁺ intracelular é capaz de promover a abertura de poros na membrana plasmática (193, 194, 207). Todavia, a dependência de uma via de segundo mensageiro não exclui necessariamente a possibilidade de as moléculas de grande volume molecular entrarem diretamente pelos receptores P2X em um estado dilatado, uma vez que modificações alostéricas nos domínios intracelulares poderiam induzir a um estado conformacional dilatado ou ativar direta ou indiretamente uma segunda proteína capaz de formar um poro na membrana. Nesse sentido, é demonstrado que mutações nos domínios intracelulares N- e C-terminais do receptor P2X7 prejudicam a capacidade de captar moléculas de alto peso molecular de alto peso molecular (184, 191). A região rica em cisteína no C-terminal do receptor P2X7 parece ser particularmente importante para a captação de moléculas de grande volume molecular (191). Além disso, a estruturas recentes do receptor hP2X3 mostraram que durante a abertura do canal os domínios intracelulares, antes em um estado desordenado, passam para uma estrutura altamente ordenada (135). Recentemente foi sugerido que o domínio C-terminal do receptor P2X7 podem interagir com a membranas plasmática através de sítios de palmitoilação, o que explica a importância da região rica em cisteína no domínio C-terminal (201). Além disso, é demonstrado que tanto a permeabilização da membrana plasmática quanto a atividade do canal iônico associados a ativação do receptor P2X7 podem ser modulados negativamente pelo colesterol presente na membrana (184, 201). Esse efeito parece ser dependente interação direta do colesterol com o receptor e não relacionado a fluidez da membrana (201).

O grande número de proteínas intracelulares que podem ser precipitadas juntamente com o receptor P2X7 (113, 208) sugere que ele faça parte de um grande complexo de sinalização contendo proteínas associadas à membrana plasmática como a caveolina (209) ou elementos do citoesqueleto (113, 208). Nesse sentido, Gu *et al* demonstraram que a ativação do receptor hP2X7 pelo ATP leva a dissociação da miosina não muscular de cadeia pesada II (NMMHC-II – *non muscle myosin heavy chain II*) do receptor (208). Além disso, A diminuição da expressão da NMMHC-II por siRNA levava a uma maior captação de corante pelas células sem afetar significativamente a corrente (208). Corroborando com essa ideia, a ativação prolongada do receptor P2X7 causa profundas mudanças na morfologia da célula, paralelamente a captação de moléculas de grande volume molecular, como a formação de *blebs* na membrana, que eventualmente pode levar a perda do selamento da interface pipeta/membrana em experimentos de *patch-clamp* (192) (Figura 1.15).

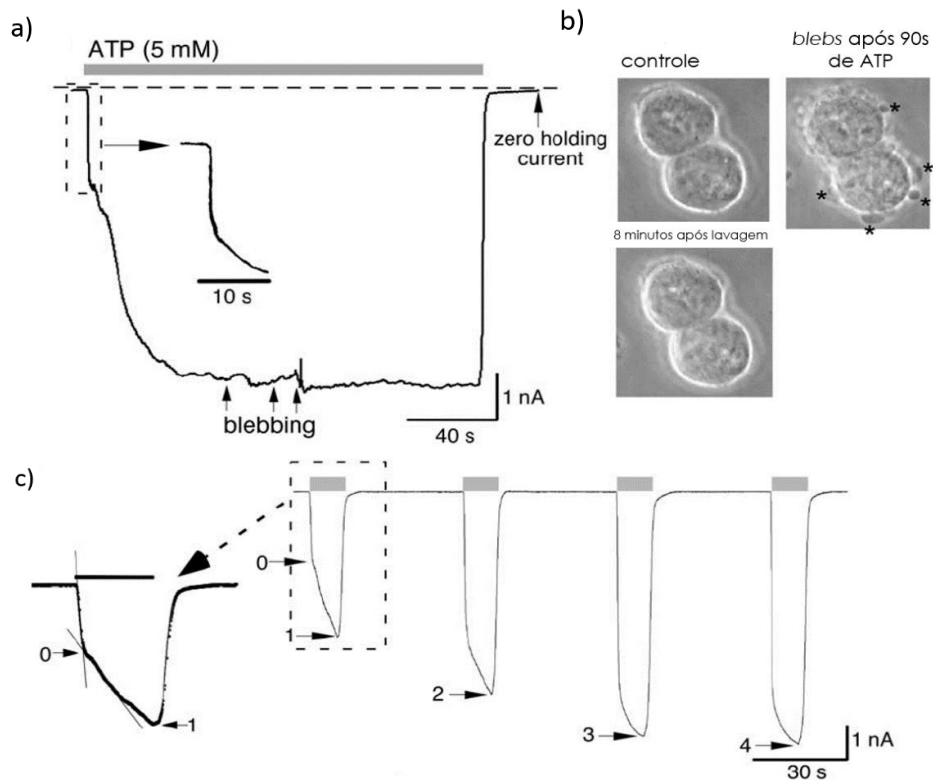


Figura 1.17. Modificações celulares induzidas pela ativação prologada do receptor rP2X7. Em (a) observamos a corrente não dessensibilizante associada a ativação do receptor rP2X7 expresso heterologicamente em células HEK293. Note o ruído no sinal que acontece ao mesmo tempo que a formação dos *blebs* de membrana (b). (c) Aplicações repetidas de ATP intercaladas por procedimentos de lavagem leva a uma facilitação da corrente. Adaptado de (192).

Uma das proteínas que podem ser ativadas pelo receptor P2X7 e permitir a passagem de moléculas de alto peso molecular é a panexina. As panexinas (isoformas 1, 2 e 3) são glicoproteínas integrais de membrana, extremamente abundantes em vertebrados, com semelhança aos hemicanais de conexina (210) de vertebrados e inexas (211) de invertebrados na estrutura primária. Contudo, os hemicanais de conexina diferem em relação a topologia e a funcionalidade (212). Os hemicanais de conexina são encontrados como hexâmetros na membrana, contudo seus canais conectam dois citoplasmas de células adjacentes onde cada célula contribui com um hexâmetro para formar a unidade funcional junção GAP (213). Em contraste, as panexinas formam canais na membrana como hexâmeros ou octâmeros na membrana que comunicam o citoplasma com o meio extracelular, sendo incapazes de formar canais que conectem o citoplasmas de duas células adjacentes (213). Além disso, são capazes de formar canais de alta condutância (198) permitir a passagem de moléculas de alto peso molecular (214). As panexinas podem ser ativadas por despolarização da membrana (198), clivagem do C-terminal por caspases (215), aumento do Ca^{++} intracelular (198, 207) ou com inchaço celular (216). Nesse sentido, Pelegrin e Surprenant mostraram que o bloqueio farmacológico, com cabenoxolona e o peptídeo inibidor da panexina (Pan₁₀), e genético da panexina foram capazes de bloquear parcialmente a captação de brometo de etídio induzida pela ativação do receptor P2X7 em células HEK293 e HeLa transfectadas com o P2X, macrófagos alveolares humanos e na linhagem murina J774 (204). Em contrapartida, a captação de YO-PRO-1 ou brometo de etídio não foi afetada pelo bloqueio genético ou farmacológico da panexina em macrófagos murinos derivados da medula óssea (217), macrófagos murinos peritoneais (197, 218), astrócitos murinos (219) ou células de Muller de galinhas (185). Os dados publicados na literatura também são conflitantes no que diz respeito a influência de antagonistas da panexina na corrente gerada pela ativação do receptor P2X7. Nesse sentido, foi observado que cabenoxolona ou a probenecida, bloqueadores de conexinas e panexinas (220, 221), não bloqueavam a corrente gerada pela ativação do receptor P2X7 em células HEK293 e 1321N1 transfectadas com o receptor P2X7 (204) ou em células de Muller de galinhas (185). Por outro lado, Iglesias observou em células J774 que a carbenoxolona inibiu o estágio I₂ da corrente e a captação de YO-PRO1 (222). Uma possível explicação para o desacordo entre os dados relativos a participação da panexina na

permeabilização da membrana plasmática associada ao receptor P2X7 foi sugerida por, Xu *et al.* Esses autores mostraram que a associação da via de permeabilização do receptor P2X7 com a panexina era dependente que a captação de brometo de etídio no splice-variante P2X7a era afetada pelo bloqueio farmacológico da panexina, enquanto a variante P2X7k, mais rara e encontrada em linfócitos, era insensível (223). Esses resultados podem representar que haja mecanismos diferentes de permeabilização, recrutando proteínas sinalizadoras e/ou formadoras de poro diferentes em cada tipo células (11, 224), com diferentes splice-variantes do receptor P2X7 e podendo ainda ocorrer sem a necessidade do receptor P2X7.

Recentemente, foi sugerido que TRPs (*transient receptors potential channels*) poderiam ser ativados na via de permeabilização mediada pelo receptor P2X7. Assim, foi demonstrado que inibidores dos receptores TRPV1 e TRPA1 bloqueavam parcialmente a captação do corante catiônico iodeto de propídio, mas não do aniônico calceína, em astrócitos murino (219). Em contraste, a captação de iodeto de propídeo foi insensível aos bloqueadores de hemicanais e panexinas carbenoxolona e probenecida (219). Bloqueadores de canais maxi-ânion bloqueavam discretamente a captação de iodeto de propídio enquanto bloqueava consistentemente a captação calceína (219). Contudo, um dos bloqueadores dos canais maxi-ânion, o Gd^{+3} , ainda é capaz de inibir o canal modulador da homeostase de Ca^{++} , que também possui propriedades biofísicas similares à observada durante ativação do receptor P2X7 (11, 225, 226). Esses dados sugerem que pode haver mais de uma via e mais e uma proteína envolvida na permeabilização de moléculas de alto peso molecular. Corroborando com essa observação, Cankurtaran-Sayar *et al* demonstraram que a linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 e células HEK293 transfectadas com o rP2X7 era capaz de captar o corante catiônico YO-PRO1 em um mecanismo independente de Ca^{++} , contudo o corante aniônico *Lucifer Yellow* é captado por um mecanismo sensível ao Ca^{++} intra e extracelular (14). Schachter *et al* mostraram que células HEK293 transfectadas com o P2X7 eram permeáveis ao corante catiônico YO-PRO mas não ao *Lucifer Yellow*. Os autores ainda demonstraram que macrófagos eram permeáveis a corante catiônicos e aniônicos e que o movimento de corantes aniônicos podia ser bidirecional, sugerindo um mecanismo de difusão facilitada, o transporte de corantes catiônicos por sua vez era unidirecional, sugerindo que seja mediado por um transportador de membrana (197).

1.1.2.2.1 Receptores P2X em condições patológicas

A expressão e atividade dos receptores P2X já foi documentada em diversos tecidos de diferentes vertebrados (3). Logo, diversos fenômenos fisio- e patológicos são associados aos receptores P2X, o que os torna possíveis alvos para estratégias terapêuticas (45). O receptor P2X1 é expresso principalmente em plaquetas, células de musculatura lisa de diversos órgãos e artérias além e células da glia (45). O seu bloqueio pode reduzir a agregação plaquetária (227). Além disso, sua ativação está relacionada com a contratibilidade da musculatura lisa no canal deferente, sendo um possível candidato a método contraceptivo (228). O receptor P2X2 é expresso principalmente no sistema nervoso central e periférico, sua ativação parece estar relacionada com as respostas mecanosensoriais na bexiga, devido aos efeitos antinociceptivos dos animais knockout $P2X2^{-/-}$ (229). Além disso, foi recentemente demonstrado que o receptor P2X2 pode liberar espermidina, um modulador de diversos canais presentes no sistema nervoso central (16). O receptor P2X3 é expresso principalmente em nervos sensoriais e animais knockout apresentam nocicepção diminuída, o tornando um possível alvo para a dor neuropática (45, 230, 231). O subtipo P2X4 também é expresso em neurônios centrais periféricos, além da micróglia e células endoteliais (3). Sua expressão é aumentada em modelos animais de danos ao nervo e o seu bloqueio se mostra efetivo na antinocicepção (45). Além disso, foi demonstrado que o acúmulo do peptídeo $A\beta_{1-42}$ na doença de Alzheimer pode induzir a clivagem dos domínios intracelulares do receptor P2X4 modificando suas propriedades de sensibilização (232). Nesse sentido, o bloqueio da expressão do receptor P2X4 nesse cenário foi capaz de diminuir a citotoxicidade induzida pelo acúmulo de $A\beta_{1-42}$.

Como citado anteriormente, o receptor P2X7 possui a menor afinidade ao ATP entre os subtipos P2X, sendo ativado apenas em concentrações micromolares (122). Dessa maneira, é esperado que a atividade desse receptor permaneça silenciosa a maior parte do tempo, uma vez que tecidos saudáveis apresentam concentrações nanomolares de ATP extracelular(233). Contudo, em determinadas situações, como sítios inflamados (233) e no microambiente tumoral (234), a concentração de ATP extracelular pode aumentar cerca de mil vezes, assim, podendo ser capaz de ativar o receptor P2X7. O fato de que esse receptor somente possa ser ativado em situações patológicas, onde há alta concentração de ATP, faz com que ele seja um potencial alvo

terapêutico(22). Assim, há atualmente grande interesse na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de moléculas capazes de bloquear seletivamente o receptor P2X7 com propriedades farmacocinéticas adequadas (22). Atualmente, antagonistas do receptor P2X7 estão sendo testados no tratamento de doenças inflamatórias uma vez que a sua ativação em macrófagos é parte da via de síntese, maturação e liberação de interleucina 1 β (IL-1 β), uma potente citocina pró-inflamatória, através do inflamassoma (20) (Figura 1.18). O inflamassoma é um complexo de diferentes proteínas que é ativado durante a inflamação associada a microrganismos (235). Uma vez ativado, ele leva a célula a liberar citocinas pró-inflamatórias e eventualmente entrar em processo de piroptose (236), um tipo de morte celular programada induzida em processos inflamatórios que leva a perda de integridade da membrana plasmática. A expressão e montagem dos componentes do inflamassoma em macrófagos, para que resulte na liberação de IL-1 β , é desencadeada por dois sinais: o reconhecimento de PAMPs e o ATP extracelular (20). PAMPs como o LPS, presente de maneira abundante em bactérias gram-negativas (237), ativam receptores *Toll-Like* na membrana de macrófagos e leva a expressão do NLRP3 (receptor semelhante ao NOD com domínio PYD 3 – *NOD-like receptor PYD domain 3*) e a pró-IL1 β (235). Moléculas associadas ao dano celular (DAMPs – *damage associated molecular patterns*), como as catepsinas, ativam o receptor NLRP3 durante a ativação do inflamassoma (235). Paralelamente, o LPS leva a ativação da caspase 11, que cliva parte do domínio intracelular da panexina promovendo sua abertura e liberando ATP que, por sua vez, ativa os receptores P2X7 na membrana (20, 238). A ativação do receptor P2X7 leva, dentre outros efeitos, ao efluxo de K⁺ que leva à montagem do complexo oligômero do inflamassoma que então cliva a pró-caspase 1 (20, 239). Finalmente, a caspase 1 cliva a pró-IL1 β em sua forma ativa (235). Logo, a IL-1 β madura pode ser liberada para o citoplasma (20). O efluxo de K⁺ parece ser associado ao poro associado ao receptor P2X7, uma vez que toxinas formadoras de poro proveniente de bactérias, que também promovem o efluxo de K⁺, levam a montagem de ativação do inflamassoma (239). O ATP ainda pode ser liberado pelo poro associado ao receptor P2X7 criando uma retroalimentação positiva (20, 238) e, além disso, o LPS atua como um modulador alostérico do receptor P2X7 e o torna mais sensível ao ATP (238). Consistente com essas observações, o bloqueio tanto farmacológico quanto da expressão do receptor P2X7 amenizam diversos efeitos da inflamação

em diferentes modelos animais (22, 240-248). Assim, antagonistas do receptor P2X7 vem sendo desenvolvidos e usados em testes clínicos (22, 45, 190, 249). Embora essas drogas sejam bem toleradas pelos pacientes, elas falharam resultados satisfatórios em comparação com os tratamentos correntes (20, 22, 45).

Como citado anteriormente, no microambiente tumoral também é possível encontrar altas concentrações de ATP, quando comparado a tecidos saudáveis (234). Essas concentrações são suficientes para ativar o receptor P2X7. Nesse caso, o ATP pode ser secretado tanto por células do tumor quanto por células vizinhas, ou liberado por células necróticas (250-253). Além disso, diferentes tipos de tratamento para o câncer, como alguns agentes quimioterápicos ou terapia fotodinâmica, podem ainda aumentar a secreção de ATP pelas células do tumor em processo de morte (250-252, 254). A presença do receptor P2X7 já foi descrita em diversos tipos de células tumorais, tanto em biopsias de pacientes quanto em linhagens utilizadas em laboratório, tais como células da próstata (255, 256), pele (257-259), pulmão (260-262), mama (260), cérebro (263, 264) e tireoide (265). Logo, no contexto do microambiente tumoral, deve ser levado em consideração a ativação do receptor P2X7 tanto no tumor em si quanto no infiltrado inflamatório local, o que resulta em uma complexa rede de efeitos (18, 266, 267). A liberação de ATP pelas células tumorais favorece resposta imune contra tumor (250-253). Nesse contexto, tem sido sugerido que macrófagos ativados pelo ATP fagocitam células tumorais em processo de morte e promovem a liberação de IL1 β , em um mecanismo dependente da ativação do receptor P2X7 (268, 269), o que torna esse tipo de morte imunogênica, já que ela desencadeia uma reação inflamatória. Dessa maneira, esse ambiente leva ao deslocamento de células dendríticas e linfócitos T para a periferia do tumor (252, 253, 268, 270). O ATP também é capaz de ativar o receptor P2X7 nas células dendríticas levando a produção de mais IL-1 β (253). Nesse contexto, tanto a IL-1 β quanto o próprio ATP são fundamentais para *primar* células T CD8⁺ contra as células tumorais (253, 271). De acordo com essas observações, alguns grupos observaram que o bloqueio, farmacológico ou da expressão, do receptor P2X7 acelera o desenvolvimento de tumores em determinados modelos animais (272, 273), onde é observado um drástico decréscimo do infiltrado inflamatório. É importante afirmar que o ATP extracelular ainda pode ser degradado por ectonucleotidases presentes tanto nas células tumorais quanto em células do

infiltrado inflamatório (274). Assim, seus produtos de degradação, como o ADP e a adenosina, podem ativar outros subtipos de receptores purinérgicos e esses efeitos vão se somar aos do P2X7 (18, 266, 267, 270, 274). Por exemplo, a adenosina tem efeito predominantemente imunossupressor nos tumores, contrabalanceando dos efeitos do receptor P2X7 (267). Nesse sentido, a presença de ectonucleotidases e receptores purinérgicos específicos em cada microambiente vai determinar, em parte, a resposta imune contra o tumor.

Em relação ao receptor P2X7 expresso nas células tumorais, a sua ativação pode promover tanto proliferação quanto a morte das células tumorais, dependendo das condições, uma vez que o receptor P2X7 apresenta múltiplos papéis na sobrevivência da célula. Por exemplo, é demonstrado que o tratamento com altas concentrações de ATP (>mM) leva a perda a integridade da membrana plasmática, evidenciado pela liberação de lactato desidrogenase, quando mantido por mais de uma hora em linhagens de macrófagos (275) e glioma (264), além de culturas primárias de timócitos (276). Por outro lado, também é demonstrado que ativação do receptor P2X7 por longos períodos (>6 horas) em diferentes células tumorais promove um perfil apoptótico, com exposição de fosfatidil serina, alterações morfológicas características e/ou ativação de caspase 3 (257, 277-279). De acordo com esses dados, Mackenzie *et al* mostraram a incubação de células HEK293 expressando heterologicamente o receptor P2X7 com Bz-ATP por 40 minutos, seguido de lavagem, compromete a sua proliferação nas 12 horas seguintes (280). Todavia, esses autores também observaram que a curta incubação (2 minutos) das células com o Bz-ATP, seguido de lavagem, desencadeava alterações morfológicas tanto da mitocôndria quanto da células em si que eram prontamente reversíveis poucos minutos após a lavagem do agonista, o que os autores chamaram de *pseudoapoptose*. Curiosamente, esse quadro não comprometia a viabilidade das células e ainda aumentava a sua taxa de proliferação. Essas informações, aparentemente paradoxais, sugerem que a ativação do receptor P2X7 por curtos períodos pode promover a proliferação em detrimento da morte celular e a ativação por períodos prolongados leva a apoptose provavelmente seguida por necrose secundária, levando a lise da célula. A expressão heteróloga do receptor P2X7 leva ao aumento da atividade mitocondrial e do Ca⁺⁺ intracelular, mesmo na ausência de aplicação externa de ATP, e aumenta a taxa de crescimento dessas células, inclusive permitindo sua proliferação em meio sem soro fetal bovino por um tempo maior que as

células não transfectadas (281, 282). Nessas situações, o tratamento com apirase é capaz de reverter esses efeitos, sugerindo que a secreção basal de ATP pelas células ativaria, de maneira parácrina e autócrina, o receptor P2X7 e promoveria a sobrevivência da célula. Nesse contexto, ainda foi observado que o modelo de tumor gerado por células HEK293 transfectada com o receptor P2X7, em camundongos, apresentava o crescimento mais rápido quando comparado ao gerado pela mesma célula não transfectada (283). Além disso, a progressão desse tumor era diminuída por injeções intra-tumorais de antagonistas do receptor P2X7. Dentro do contexto do microambiente tumoral, é possível que o receptor P2X7 seja ativado em intervalos curtos, devido ao balanço entre a taxa de secreção de ATP pelas células vizinhas e a ação de ectonucleotidases, e conseqüentemente seu efeito global seja, sob certas condições, a favor do crescimento tumoral. Por outro lado, a ativação do receptor P2X7 no infiltrado inflamatório é importante para a resposta para a resposta contra o tumor. Assim, é atualmente debatido se o bloqueio ou ativação do receptor P2X7 pode ser empregado em estratégias anti-tumorais (18, 266, 267, 270), contudo, ainda é necessário uma melhor compreensão do balanço entre esses diferentes eventos.

Ainda não está claro a participação do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 nesses eventos. Contudo, a morte celular induzida por longos períodos de ativação do receptor P2X7 parece ser decorrente da atividade continuada do macroporo. Corroborando com essa ideia, o *splice* variante do receptor P2X7 expresso em linfócitos (P2X7B), que não é capaz de levar a abertura do macroporo, embora preserve atividade de canal iônico, é resistente a morte induzida por longas incubações com ATP (284). Além disso, enquanto a ativação basal do receptor P2X7 aumenta a atividade mitocondrial (282), a ativação continuada leva ao colapso da mesma (280). Esses efeitos paradoxais entre a ativação curta e prolongada do receptor P2X7 podem representar efeitos distintos regulados pelo macroporo, logo a identificação da sua natureza pode levar a um melhor entendimento da ativação do receptor P2X7 nas células tumorais e basear novas estratégias que podem ser aplicadas para o câncer. Com o intuito de investigar a proposta de que o canal do receptor P2X7 dilate durante a sua ativação e promova a abertura do macroporo na membrana plasmática, adaptamos um protocolo de acessibilidade à cisteína para verificar se um resíduo de cisteína inserido na região de estreitamento do canal é acessível ao

composto metanotiosulfonados MTS-biotina. Esse composto, devido as suas dimensões moleculares (Figura 1.16) só seria acessível a tal resíduo se o canal iônico do receptor P2X7 dilatasse. Para isso, utilizamos um modelo comparativo do receptor P2X7 no estado aberto, baseado na estrutura cristalográfica do receptor P2X4, para desenhar o mutante G345C. Além disso, desenvolvemos um ensaio para evidenciar a captação de corantes fluorescentes de alto peso molecular, baseado em um leitor de placas, com boa reprodutibilidade e passos de normalização para evitar artefatos e aumentar a janela de trabalho do ensaio. Para testar a acessibilidade do resíduo G345C, otimizamos um sistema de expressão heteróloga transiente do receptor P2X7 em células HEK293T utilizando a lipofecção. Durante a otimização desse sistema, ainda observamos que a células HEK293T, que não expressa o receptor P2X7, promove permeabilização da membrana plasmática ao iodeto de propídio e ao YO-Pro-1 em virtude do tratamento com concentrações milimolares de ATP, mostrando que há nessas células uma via de permeabilização do receptor P2X7.

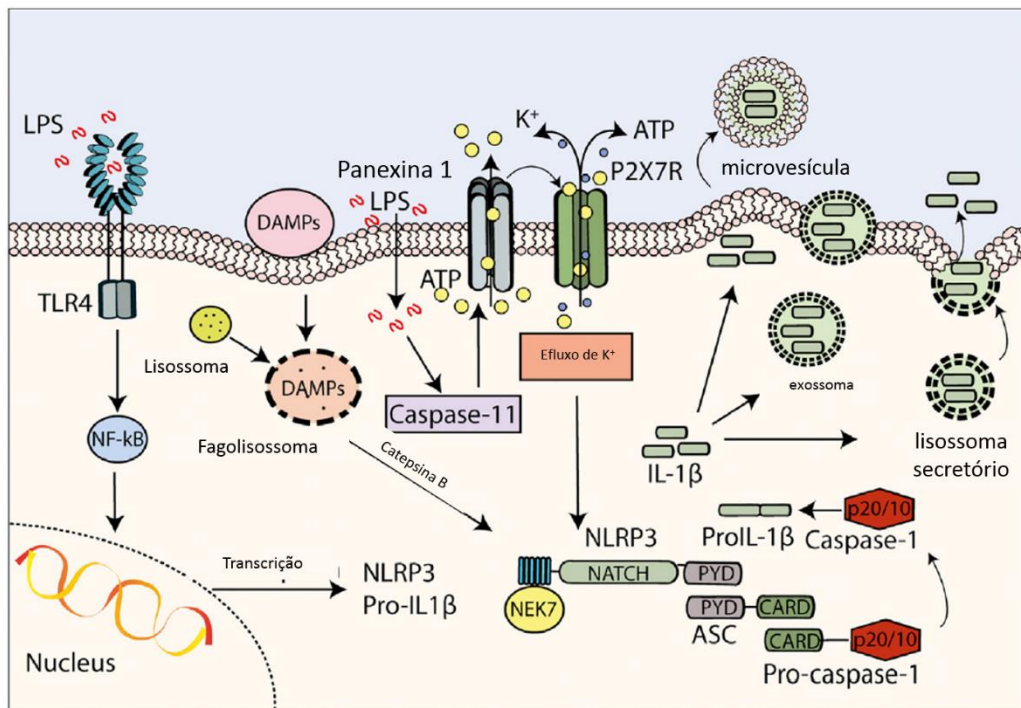


Figura 1.18 - Ativação do inflamassoma via NLRP3 – O LPS leva a síntese do receptor NLRP3, que é ativado por moléculas associadas ao dano celular (DAMPs - *damage associated molecular patterns*), como as catepsinas. O LPS ainda leva a ativação das panexinas via clivagem pela caspase 11, liberando ATP que ativa o receptor P2X7. O efluxo de K⁺ gerado, presumivelmente pelo poro associado a ativação do receptor P2X7, junto com a ativação do NLRP3 pelos DAMPs leva a montagem do inflamassoma, que cliva a pró-IL1B, que é liberada na forma ativa para o meio extracelular. Adaptado de (20)

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Caracterizar a natureza da vias de permeabilização ativadas pelo ATP extracelular, dependentes ou não do receptor P2X7, em células HEK293T.

2.2- Objetivos Específicos

- 1- Estabelecer um método para medir a permeabilização da membrana plasmática a corantes de alto peso molecular em um leitor de placas;
- 2- Otimizar a expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T;
- 3- Caracterizar o poro ativado por ATP, independente do receptor P2X7, em células HEK293T;
- 4- Testar a acessibilidade do resíduo G345C do receptor P2X7 ao composto metanotiosulfonados de alto peso molecular MTSEA-biotina.

3- Métodos

1- Cultura celular - As células HEK293T foram gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr^o Guilherme Oliveira, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, e foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (3,7 g/L - *Sigma* - EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (*Cultilab* - Brasil). As células J774.G8 utilizadas no trabalho foram clones do nosso laboratório (Laboratório de Comunicação Celular IOC – FIOCRUZ). Nenhum antibiótico foi utilizado na cultura de células. As células foram mantidas na temperatura de 37° C em uma estufa umidificada e com atmosfera de 5% de CO₂. Para a utilização nos experimento, o meio de cultura foi retirado e as células foram diluídas em uma solução estéril de tripsina, (na concentração de 2,5 mg/mL, pH: 7 e pré-aquecido a 37°C) e incubados na estufa a 37°C por 5 minutos. No caso das células J774.G8 o tratamento com tripsina foi precedido por 3 passos de lavagem com tampão fosfato estéril (Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH: 7,4) pré-aquecido a 37°C. Após a incubação, a solução de tripsina foi diluída por um fator de 5 em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e centrifugadas por 5 minutos a 200 G. O *pellet* resultante foi ressuscitado em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e contadas com azul de tripan. Para os experimentos as células foram cultivadas em placas ou lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina para evitar o destacamento das células. O tratamento consistiu na aplicação de uma solução estéril de poli-L-lisina na concentração de 0,001 % (*Sigma* - EUA) e incubadas a 37°C, na estufa, por pelo menos 15 minutos. Posteriormente, os poços ou lamínulas foram lavados com água deionizada estéril por 3 vezes e deixado secar por pelo menos 1 hora. Os números de células cultivadas estão indicados em cada experimento.

2- Transfecção - Para obter a transfecção transiente do receptor hP2X7 em células HEK293T utilizamos o método de lipofecção com o reagente Lipofectamina 3000™ (*Invitrogen* - EUA). Resumidamente: as células HEK293T foram semeadas em placas ou lamínulas por 24 horas. Para a transfecção foram feitas duas soluções: uma de Lipofectamina 3000™ diluída em OPT-MEM (*Gibco* - EUA) e outra contendo o plasmídeo e o reagente P3000

(composição não informada pelo fabricante, que deve ser misturadas na proporção de 2 µL/µg de plasmídeo) também diluídos em OPT-MEM. Após a incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, ambas as soluções são misturadas na proporção de 1:1, homogeneizadas, incubadas novamente por 15 minutos e aplicadas nas células em um volume correspondente a 10% do volume total do poço. Segundo recomendações do fabricante, o plasmídeo deve ser diluído para se obter a concentração de 1 µg/mL. Após 24 horas as células apresentavam cerca de 90% de confluência e foram utilizadas para os experimentos. A concentração final de Lipofectamina 3000™ foi ajustada para obter a melhor eficiência na transfecção. Os detalhes desse ajuste estão na seção de Resultados. Todavia a concentração final escolhida e utilizada nos experimentos foi de 0,15% (v/v). Em todos os dias as células foram inspecionadas ao microscópio para garantir que não havia sinais de contaminação

3- Biologia Molecular: O plasmídeo PQCXIN (*Clontech* - EUA) foi subclonado com a sequência do receptor hP2X7 (variante A) no laboratório da Prof^a Dr^a Christa Müller (*Pharma-Zentrum, Universität Bonn* - Alemanha) e gentilmente cedido para o desenvolvimento desse trabalho. Para a amplificação do material, transformamos bactérias DH5α (*New England Biolabs* - EUA) por choque térmico com o plasmídeo e as colônias foram selecionadas pela resistência, conferida pelo plasmídeo, a ampicilina (1µg/ml). Algumas colônias foram selecionadas e semeadas em meio Luria-Bertani (*Sigma* - EUA) contendo ampicilina (1µg/ml) e incubados sob rotação de 180 rpm a 37°C por 15 horas. Após esse período, algumas alíquotas foram coletadas e congeladas com glicerol (20%). Sempre que necessário, as bactérias congeladas foram repicadas em meio Luria-Bertani (*Sigma* - EUA) contendo ampicilina (1µg/ml) e incubadas nas mesmas condições. Após 15 horas a bactéria foi centrifugada a 3.000 G por 5 minutos e utilizado o kit de *max prep* (*Qiagen* – Países Baixos) para lise das bactérias e purificação do plasmídeo, seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, o plasmídeo foi diluído em água livre de nucleases (*Sigma* - EUA), aliquoteado e mantido a -20°C. A concentração do plasmídeo foi determinada através da absorbância em 260 nm. A pureza foi determinada pela razão da

absorbância em 260/280, mantendo sempre valores entre 1,8-1,9. As medidas de absorbância foram feitas no *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific* - EUA). As mutações no segundo domínio transmembrana foram feitas utilizando *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (*New England Biolabs* - EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta presente no site da própria empresa (<http://nebasechanger.neb.com/>) e sintetizados pela empresa Genemed Synthesis (EUA). Para a mutação do resíduo G345C no receptor P2X7 foram utilizados os primers: *forward* – CTCCTACTTCTGTCTGGCCGCTG e *reverse* – CATGTACCGAGTTGGGA. A reação de PCR foi feita seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da reação, foi corrido um gel de agarose (0,8%) para confirmar o resultado. Uma vez que o produto do PCR é gerado a partir dos *primers*, e esses já contém a sequência mutada, podemos esperar que o material amplificado contenha a mutação. Por fim, o produto do PCR foi tratado com um coquetel de enzimas contendo: uma cinase, para fosforilar as extremidades do produto de PCR; uma ligase, para unir as extremidades do produto do PCR; e a DNase *DNpI*, que cliva o DNA metilado, como o DNA molde da reação, que foi amplificado em bactérias e não possui a mutação. Logo, o produto dessa reação foi transformado em bactérias competentes para que o novo plasmídeo, contendo a mutação, seja amplificado.

- 4- **Desenho da mutação G345C:** A mutação no segundo domínio transmembrana do receptor hP2X7 foi desenhada a partir da análise do modelo comparativo do receptor hP2X7 baseado na estrutura do receptor P2X4 do peixe-zebra que foi cedida pelo nosso colaborador Rafael Soares Ferreira do Programa de Computação Científica (PROCC) da FIOCRUZ/RJ. As análises da estrutura bem como as figuras das mesmas, descritas na seção de Resultados, foram feitas no software *Pymol* (*Schrödinger* – EUA).
- 5- **Ensaio de permeabilização da membrana plasmática:** As células HEK293T foram cultivadas em placas de 96 poços pretas de fundo claro (*Greiner Bio-One* - Alemanha) na quantidade de 3×10^4 por poço e transfectadas após 18-24 horas. No caso das células HEK293T não transfectadas e J774.G8, as células foram somente mantidas por um período

de 48 horas. O ensaio de captação foi feito no leitor de placas *Spectramax Paradigm*[®] (*Molecular Devices* - EUA) utilizando como fluoróforos o iodeto de propídio (*Sigma* - EUA), EvaGreen (*Jena Bioscience* - Alemanha) ou Yo-Pro-1 (*Thermo Scientific* - EUA), que foram excitados e lidos nos comprimentos de Abs:540/Em:609, Abs:491/Em:509, Abs:500/Em:530, respectivamente. As soluções dos corante diluídos em tampão fosfato foram mantidas a 37°C até o momento de aplicação nos poços em um *Thermo Mixer* (*Eppendorf* - Alemanha). Além disso, o leitor de placas foi configurado para manter a placa a 37°C em todo o experimento. Todos os ensaios foram feitos no modo *Well Scan* com 12 pontos por poço e 1,5 de espaçamento. O fator Z' foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Zhang, J (285), onde DP: desvio padrão.

$$Z' = 1 - \frac{3 (DP \text{ controle positivo}) + 3 (DP \text{ controle negativo})}{\text{média do controle positivo} - \text{média do controle negativo}}$$

- 6- Substâncias:** O ATP, UTP e Bz-ATP (*Sigma* - EUA) foram diluídos em água deionizada em um estoque de 100 mM , 1 mM e 10 mM, respectivamente e mantidos a -20°C. O antagonista A740003 (*Sigma* - EUA) foi diluído a 10 mg/ml (24 mM) em DMSO (*Sigma* - EUA), segundo recomendações do fabricante. Logo, a solução estoque foi incubada em um banho sonificador por 15 minutos. Para a curva de inibição, foram feitas ainda duas diluições em um fator de 10, a primeira em DMSO e a segunda em tampão fosfato. Todas as diluições foram intercaladas por 15 minutos no banho sonificador. Por fim, as soluções estoque foram mantidas a 4°C. A probenecida foi diluída em tampão fosfato já na concentração de uso no dia do experimento. Para testar a acessibilidade do resíduo G345C no receptor P2X7 durante sua ativação foi utilizado o composto metanotiosulfonados de alto peso molecular MTSEA-biotina (*Biotium* - EUA). O MTSEA-biotina foi diluído em DMSO (*Sigma* - EUA) na concentração de 100 mM e estocado a -20°C em um dessecador.
- 7- Western Blotting:** As células HEK293T ou J774.G8 foram semeadas (8×10^5 /poço) em uma placa de 6 poços colocadas na estufa por 20-24h. No dia seguinte, elas foram transfectadas, ou não, e colocadas novamente na estufa por 20-24h. Após esse tempo, a

placa foi colocada por 30 minutos no gelo e o meio foi retirado. As células foram removidas mecanicamente através de rinsagens do fundo do poço com tampão fosfato gelado, utilizando uma micropipeta, passadas para um tubo e centrifugadas a 200 G por 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão fosfato gelado e lavadas dessa maneira por mais duas vezes. Após essa etapa, o pellet foi gentilmente ressuspensado no tampão de lise gelado. O tampão de lise é composto por NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Triton-X100 1%, deoxicolato de Na⁺ 0,5%, SDS 0,1%, pH:8 adicionado um coquetel de inibidores de proteases (*Sigma* - EUA). As células ressuspensas no tampão de lise foram incubadas no gelo sob leve agitação por 30 minutos e centrifugadas por 20.000 G por 1 hora a 4°C. Após essa etapa, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e passado para um novo tubo e estocado por até no máximo 24 horas a -20°C. As proteínas totais do sobrenadante foram dosadas utilizando o kit BCA (*Thermo Scientific* - EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de proteína (50 µg/poço) foram separadas em um SDS-PAGE (12%). Após a corrida, o gel foi lavado em água deionizada e a transferência foi feita para uma membrana de PVDF (*Millipore* - EUA) por um sistema semi-seco *Trans Blot* (*Biorad* - EUA) por 45 minutos. O tampão de transferência foi composto de Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%. Após a transferência, a membrana foi incubada em um tampão de bloqueio (*Li-Cor* - EUA) por 1 hora e foi adicionado o anticorpo anti-P2X7, produzido em coelho, APR-004 (*Alomole Labs* - Israel) na diluição de 1:5000 e mantido a 4°C, sob leve agitação, até o dia seguinte. Após essa etapa, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST (NaCl 150 mM Tris 50 mM Tween-20 0,01% pH:8). Cada lavagem foi intercalada por uma incubação de 10 minutos com TBST a 4°C sob leve agitação. Após a lavagem, a membrana foi incubada com um tampão de bloqueio (*Li-Cor* - EUA) contendo o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em camundongo, IR800 (*Li-Cor* - EUA) na diluição de 1:20000 e incubado, sob leve agitação, a 4°C por uma hora. As membranas foram novamente lavadas 3x com TBST e mantidas em tampão TBS (NaCl 150 mM Tris 50 mM pH:8). A emissão do conjugado IR900 do anticorpo secundário foi detectada pelo Odyssey (*Li-Cor* - EUA). Após a confirmação do resultado, o tampão TBS foi substituído pelo tampão de bloqueio contendo com o anticorpo anti-β-Actina, produzido em camundongo, (*Sigma*

- EUA) na diluição de 1:20000, e incubado por 2 horas a 4°C sob leve agitação. Os procedimentos de lavagem foram feitos da mesma maneira que para o anticorpo anti-P2X7. Todavia, para a β -Actina foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo IR700 na diluição de 1:20000 e lido a sua emissão. A densitometria das bandas foram feitas baseadas nas imagens registradas pelo Odyssey (*Li-Cor* - EUA) com o *software ImageJ* (EUA).

8- Imunofluorescência - As células HEK293T ou J774.G8 foram semeadas (4×10^4 /poço) em uma placa de 24 poços contendo lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina e colocadas na estufa por 20-24h. No dia seguinte, elas foram transfectadas, ou não, e colocadas novamente na estufa por 20-24h. As lamínulas com as células HEK293T ou J774.G8 foram fixadas em paraformaldeído a 4% (*Sigma* - EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão fosfato por 3 vezes. As amostras foram permeabilizadas em tampão fosfato contendo 0,1% de Triton X-100 (*Sigma* - EUA) por 1 hora. Após essa etapa, as células são novamente incubadas por 1 hora no mesmo tampão agora contendo o anticorpo anti-P2X7 produzido em coelho concentração final 1:200 (*Alomone Labs* – Israel). Após a lavagem com tampão fosfato, as lamínulas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário contra IgG de coelho produzido em cabra conjugado ao fluoróforo *AlexaFluor 488* (*Thermo Scientific* - EUA) na concentração final de 1:1000. A marcação do núcleo das células foi feita utilizando DAPI, (*Sigma* - EUA) na concentração final 1 μ g/mL. As lamínulas foram montadas com *Prolong Gold* (*Thermo Scientific* - EUA) e analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss com lâmpada de mercúrio no sistema HXP120 em objetivas de 20x. A aquisição das imagens foi realizada usando o software *AxioVision 4.8* (*Zeiss* - Alemanha). A contagem das células marcadas foi feita em uma objetiva de 20x, onde foram contados 5 campos por lamínula.

9- Atividade Metabólica (MTT): As células HEK293T foram cultivadas em placas de 96 poços transparentes (*Greiner Bio-One* - Alemanha) na quantidade de 3×10^4 por poço e transfectadas após 18-24 horas. No caso das células HEK293T não transfectadas e J774.G8,

as células foram somente mantidas por um período de 48 horas. No dia do experimento, foi adicionado nos poços uma solução de MTT em tampão fostato para atingir a concentração final de 1 mg/ml. Após um período de 3 horas de incubação a 37°C, a placa foi centrifugada a 50g por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Os cristais de formazan solubilizados em 100 µL de DMSO. A absorbância dos cristais de formazan, em 570 nm, foi lida em um leitor de placas EzRead 400 (*Biochrom* - Reino Unido).

10- Liberação de lactato desidrogenase: As células HEK293T foram cultivadas em placas de 96 poços transparentes (*Greiner Bio-One* - Alemanha) na quantidade de 3×10^4 por poço e transfectadas após 20-24 horas. O sobrenadante (DMEM sem vermelho de fenol) foi coletado e a lactato desidrogenase foi dosada com um kit (*Doles* – Brasil). Nos ensaios com ATP, o meio de cultura foi substituído por tampão fosfato e ATP na concentração de 5mM. Em seguida, as células foram incubadas na estufa a 37°C nos tempos indicados e o sobrenadante foi coletado. A catalisação da conversão do piruvato em lactato pela lactato desidrogenase requer a oxidação do NADH a NAD⁺. Assim, incubamos a amostra com a solução de trabalho, contendo piruvato e NADH, por 30 segundos a 37°C e fizemos a leitura inicial da absorbância do NADH (530nm) em um leitor de placas EzRead 400 (*Biochrom* - Reino Unido). Em seguida, a leitura é feita por mais 3 vezes intercaladas pela incubação por 1 minuto, a 37°C, e a taxa de oxidação do NADH por minuto é calculada através da média dessas 3 medidas. Logo, a quantificação da lactato desidrogenase é feita de maneira indireta, através de um cálculo, pela oxidação do NADH e foi expressa em U/L.

11- Patch-clamp- As células HEK293T foram semeadas (5×10^3 /poço) em uma placa de 24 poços contendo lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina e colocadas na estufa por 20-24h, resultando quase que exclusivamente de células isoladas. No dia do experimento, as lamínulas foram retiradas da placa, lavadas a com solução extracelular que será utilizada nas medidas de canal (NaCl 147 mM, KCl 2mM, glicose 13 mM, HEPES 10 mM, CaCl 0,1 mM e pH: 7,4 titulado com NaOH). Os experimentos foram feitos na modalidade *whole-*

cell, onde podemos registrar todos os canais da célula ao mesmo tempo. Foi utilizado um amplificador *Axopatch 200B* (*Molecular Devices* - EUA), no qual o sinal de saída foi filtrado a 1 kHz (filtro passa-baixa) e digitalizado à taxa de 5 kHz pelo sistema de aquisição de dados *DIGIDATA 1440A* no programa *pClamp 10.2* (*Molecular Devices* - EUA). Para o registro das correntes foram utilizadas micropipetas com resistência de ponta de 2 a 4 M Ω , confeccionadas em tubos de vidro de borossilicato, utilizando um estirador horizontal P-97 (*Sutter Instruments Co.* - EUA). A solução interna da pipeta continha KCl 147 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM e pH 7,4 (titulado com KOH). As células analisadas estavam isoladas. Durante o protocolo a voltagem foi mantida em - 60 mV. O ATP foi aplicado manualmente com o auxílio de uma micropipeta e nos experimentos com o antagonista A740003, essa droga foi diluída previamente na solução extracelular.

12- Análise dos dados – Os dados foram expressos sempre como média \pm erro padrão ou desvio padrão, indicado na legenda de cada figura. O número de replicatas e dias independentes de cada experimento estão descritos nas legendas das figuras. Em todos casos que houve inferência estatística os dados foram previamente submetidos ao teste de D'agostino & Pearson para verificar se seguiam uma distribuição gaussiana, o que aconteceu com todos os resultados, logo foram utilizados apenas testes paramétricos. A inferência estatística foi feita utilizando o teste t para comparação de duas condições, teste Holm-Sidak para comparações de múltiplos pares e Tukey para comparações múltiplas. O testes utilizados em cada experimento também estão descritos na legenda das figuras. Além disso, os *outliers* foram removidos através da interpretação do teste de Grubbs. A significância estatística foi aceita se $p < 0,05$. Todos os cálculos de fórmulas, razões ou normalizações foram feitos no *Excel* (*Microsoft* - EUA) e os gráficos bem como a análise estatística no *GraphPad Prism 7.0* (EUA).

4-Resultados

4.1 – Ensaio de permeabilização da membrana plasmática

Como citado na introdução, podemos mostrar a atividade do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 pelo uso de fluoróforos de alto peso molecular (maiores que cerca de 300 Da – Figura 1.16). Tais moléculas são relativamente impermeáveis a membranas, tanto pela sua carga quanto pelo seu volume molecular. Assim, mediante a ativação do receptor P2X7, elas podem passar pela macroporo, e a sua presença dentro da célula pode ser detectada. O uso de fluoróforos capazes de intercalar o DNA e emitir mais fluorescência, como o iodeto de propídio e o Yo-Pro-1, ainda apresentam a vantagem de que não haja a necessidade de lavar as moléculas que permaneceram no lado extracelular. Com o objetivo evidenciar a permeabilização da membrana plasmática a fluoróforos de alto peso molecular, utilizamos diferentes moléculas, todas capazes de se ligar ao DNA e emitir mais fluorescência, e evidenciamos sua ligação ao DNA (logo sua presença dentro da célula) em um leitor de placas. Para tal, as células foram cultivadas em placas de 96 poços pretas de fundo claro. A placa preta impede que a fluorescência de um poço possa interferir nos vizinhos e o fundo claro permite a inspeção da confluência da monocamada, morfologia das células e possíveis sinais de contaminação antes que fossem feitos os experimentos. Uma vez que a abordagem utilizando leitores de placas resulta em uma medida do global de fluorescência da monocamada no poço em detrimento da fluorescência de cada célula em particular, é possível que hajam artefatos que possam comprometer a qualidade da medida. Nesse contexto, estabelecemos um protocolo de leitura em 3 etapas com o intuito que tais artefatos sejam evitados e que tenhamos uma medida confiável da atividade do poro associado ao receptor P2X7. Para efetuar a primeira medida, o meio de cultura é retirado do poço e substituído pelo tampão com o fluoróforo de escolha. Logo, imediatamente fazemos a primeira leitura, que denominamos de *background*. Nesse ponto, registramos a medida de fluorescência do corante em solução e/ou que possa ter imediatamente difundido em células com a integridade da membrana plasmática comprometida. O segundo passo consiste em medir a entrada do corante mediante a abertura do macroporo associado a ativação do receptor P2X7. Assim, aplicamos o agonista em cada poço e incubamos no tempo desejado. Em seguida registramos a

fluorescência e atribuímos o valor a atividade do macroporo associado a ativação do receptor P2X7. Por fim, tratamos os poços com Triton-X100, que vai levar a abertura de poros na membrana plasmática de todas as células, e após a incubação por 5 minutos registramos a medida de fluorescência, que denominamos fluorescência máxima. Utilizando esses 3 valores, calculamos a permeabilização das células segundo a formula abaixo:

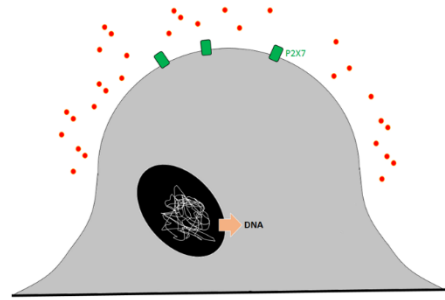
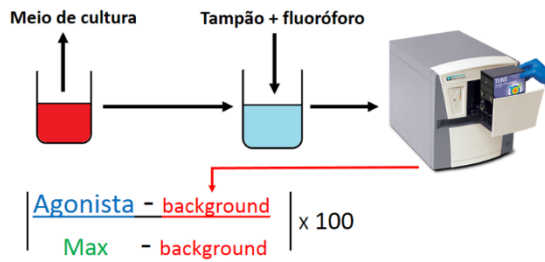
$$\text{permeabilização relativa} = \left(\frac{\text{agonista-background}}{\text{fluorescência máxima-background}} \right) \times 100$$

Cada valor que compõe a fórmula é registrado de maneira independente para cada poço, onde cada um terá seus controles internos. Ao subtrairmos a fluorescência de *background* da fluorescência medida *após aplicação do agonista* garante que o valor de permeabilização represente somente as moléculas que entraram na célula durante o período incubação. O *background* se torna importante também devido ao fato de que excluimos qualquer outro tipo de ruído que venha a contaminar a medida, como por exemplo quaisquer resquícios de vermelho de fenol, presente no meio de cultura, que possa permanecer no poço. A aquisição da fluorescência máxima nos dá a janela máxima de trabalho, que pode variar em função do rendimento quântico de cada corante (número de fótons absorvidos/número de fótons emitidos) ou por variações na quantidade de células em cada poço. O tampão fosfato (sem íons divalentes) foi o tampão de escolha nos experimentos de permeabilização. Dessa maneira, podemos maximizar a resposta de permeabilização da membrana plasmática associada com o receptor P2X7, uma vez que ele é inibido por cátions divalentes (205). É importante frisar que, o método utilizado não inclui passos de lavagem do poço. Logo, é provável que haja um resquício de Ca⁺⁺ na solução proveniente do meio de cultura e do soro fetal bovino. Esse tipo de ensaio, onde não há passos de lavagem e as substância são somente adicionadas durante o experimento, é classificado como um ensaio homogêneo.

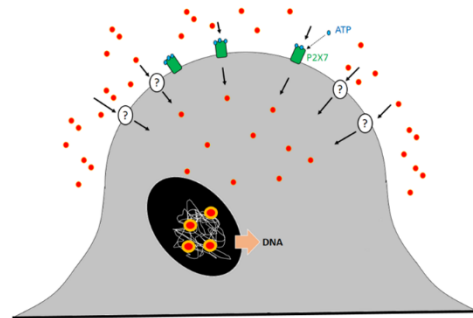
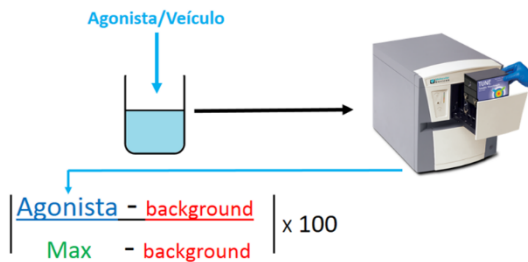
O leitor de placas utilizado nesse trabalho (*Spectramax Paradigm® - Molecular Devices*), que opera através do software Softmax® 6 (*Molecular Devices*). As opções disponíveis no *software* permitem diferentes tipos de leitura do poço em relação a sua área. Na configuração padrão (*endpoint*), o detector registra a fluorescência de apenas um ponto limitado ao centro do poço, admitindo que a fluorescência seja homogenia pela área do poço inteiro e represente bem

qualquer ponto no poço. Entretanto, ao analisarmos experimentos de permeabilização por microscopia (184, 218), vemos que há uma diferença marcante na intensidade de fluorescência entre as células, logo, temos uma superfície heterogênea em relação a intensidade de fluorescência dentro de um mesmo poço. Dessa maneira, utilizamos o modo de leitura *well scan*, no qual podemos determinar o número, o padrão de distribuição e a distância entre os pontos de leitura no poço (Figura 4.2). Quanto mais pontos houver no poço, maior será área coberta pela leitura, o que por outro lado leva a um tempo maior de aquisição. Como veremos adiante (Figura 4.5), a abertura do poro associado ao receptor P2X7 é um evento dinâmico que evolui em poucos minutos, portanto o tempo de leitura não deve ser muito grande. Assim, utilizamos 12 pontos por poço com um padrão que pode ser observado na figura 4.2 e expressamos o resultado da fluorescência de cada poço pelo somatório do valor dos 12 pontos, de maneira que esse valor represente a fluorescência de todo o poço. Nessa configuração a aquisição demora 80 segundos e o aparelho é capaz de medir uma fileira ou coluna inteira da placa de 96 poços ao mesmo tempo. Assim, todos os procedimentos que serão discutidos a seguir, foram feitos uma fileira (12 poços) por vez, independente do ensaio.

Passo 1 – background



Passo 2 – permeabilização



Passo 3 – fluorescência máxima

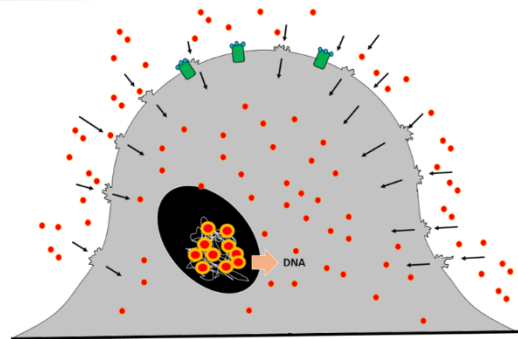
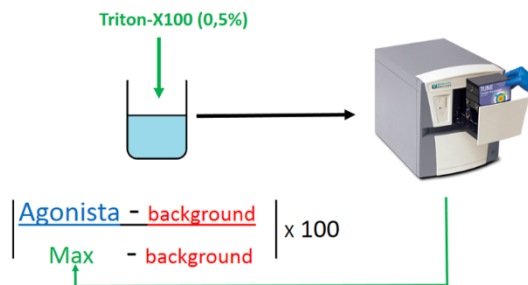


Figura 4.1 – Ensaio de permeabilização celular. O método utilizado nesse trabalho é baseado na aquisição da fluorescência do corante de escolha em 3 etapas: (1) o meio de cultura é retirado e substituído pelo tampão de escolha contendo o corante e feita a primeira leitura imediatamente. Nesse momento, é lida a fluorescência do corante em solução. (2) A placa é retirada do aparelho e o agonista/veículo é adicionado. Nesse momento, a placa é incubada no tempo desejado e a fluorescência é lida. Logo, podemos esperar ver a fluorescência do corante entrar na célula e se ligar ao DNA. Na última etapa, todos os poços são tratados com Triton-X100 na concentração final de 0,5%. Nesse momento, todas as células sofrem danos diretos à membrana plasmática e o corante pode difundir livremente para dentro da célula e se ligar ao DNA. Logo, temos o valor de fluorescência máxima de cada poço. Após a aquisição dos desses valores, eles são compostos na fórmula mostrada na página 53. Logo, denominamos o resultado a ser expresso de *permeabilização relativa*. Ao lado da descrição de cada etapa há um desenho esquemático mostrando o que presumivelmente aconteceria a uma célula aderida no poço da placa em cada comentário. O receptor P2X7 está representado como um retângulo verde, o ATP como esferas azuis e o corante como esferas vermelhas pequenas. As esferas maiores, ligadas ao DNA, representam o corante emitindo uma quantidade maior de fluorescência nesse caso.

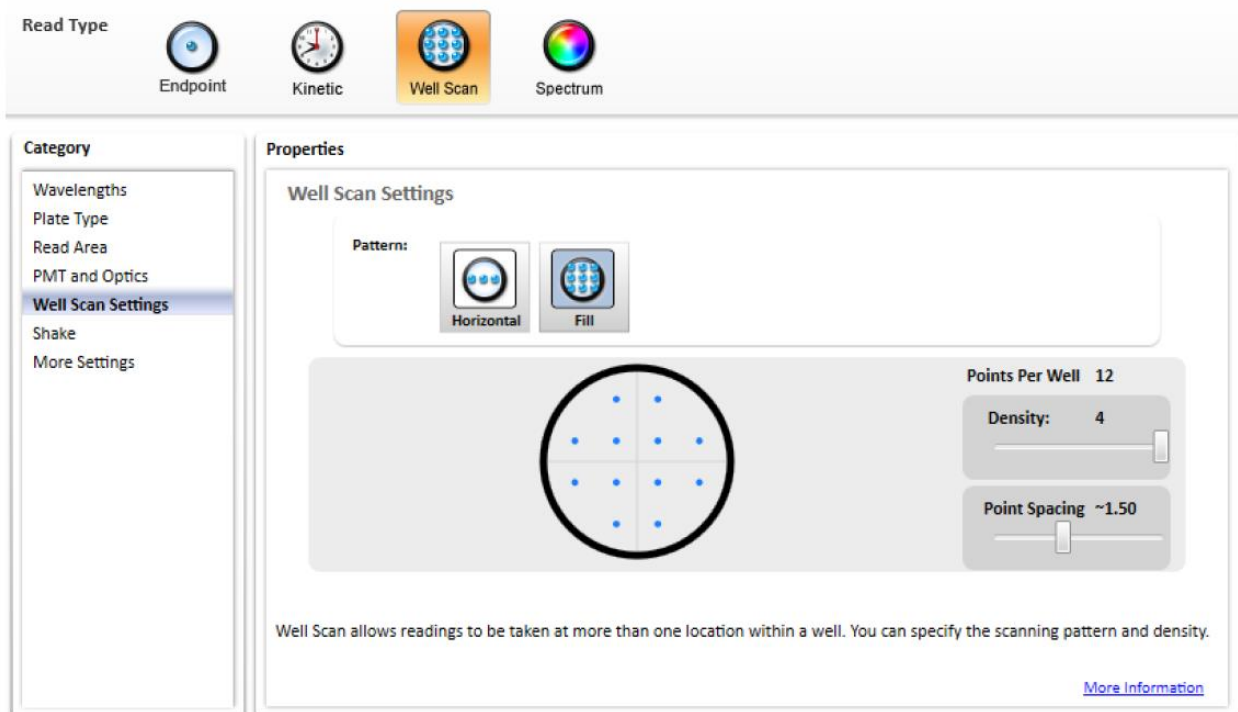


Figura 4.2- Modo de leitura *well scan* – Captura de tela do software Softmax Pro 6 mostrando a configuração de leitura usada nos experimentos no leitor de placas SpectraMax Paradigm (Molecular Devices). Nesse modo de leitura, são registrados 12 pontos por poço em uma placa de 96 poços, em contraste com o modo (*endpoint*) no qual apenas um ponto é registrado. Quanto maior a quantidade de pontos, maior é o tempo de leitura necessário para obter o registro. A relação escolhida neste trabalho foi de 12 pontos por poço levando 80 segundos de leitura por fileira no mesmo padrão indicado na figura.

Com o objetivo de determinar a melhor concentração de corantes para serem utilizados nos ensaios de permeabilização, foram avaliadas as janelas experimentais, delimitadas pela fluorescência mínima (*background*) e pela fluorescência máxima, em diferentes concentrações de iodeto de propídio, Yo-Pro-1 e Eva-Green (Figura 4.3). Para tal, utilizamos células HEK293T cultivadas 48 horas antes do experimento. O corante iodeto de propídio apresentou a maior razão fluorescência máxima/*background* entre 1 e 10 μM (Figura 4.4a), sendo que entre 1 nM e 1 μM a razão fluorescência máxima/*background* apresentou crescimento exponencial e logo atinge o platô. Em concentrações superiores a 10 μM essa razão começou a cair (Figura 4.4a). Esse fato pode ser explicado pelo pequeno aumento da fluorescência máxima frente as mesmas concentrações no *background* (Figura 4.4b e c). O intenso aumento da fluorescência de *background*, em função da concentração do corante, pode ser confirmado pela inspeção visual do poço (não mostrado aqui) que fica, nitidamente, vermelho. O Yo-Pro-1 também apresenta um

aumento exponencial da razão fluorescência máxima/*background* em função da concentração (Figura 4.4a). Contudo, até a concentrações testadas ($< 10 \mu\text{M}$), não foi observado a formação do platô. Ao contrário do observado com o iodeto de propídio, a fluorescência máxima do Yo-Pro-1 cresce em uma taxa maior, em função da concentração (Figura 4.4b e c), do que a fluorescência de *background*. O pequeno aumento da fluorescência deve ocorrer em virtude de seu baixo desvio de Stokes (Abs:491/Em:509). Em altas concentrações, a proximidade entre as moléculas é maior permitindo que uma suprima a fluorescência da outra, uma vez que o comprimento de absorção e emissão são muito próximos, dessa maneira a medida que a concentração aumenta, a supressão da fluorescência entre as moléculas também aumenta. O fabricante do Yo-Pro-1 recomenda a concentração de $1 \mu\text{M}$ para experimentos de viabilidade celular. Contudo podemos ver que entre 50 nM e 100 nM de Yo-Pro-1 temos uma janela de trabalho tão grande como a concentração mais eficiente do iodeto de propídio ($1 \mu\text{M}$). Corroborando com essa observação, podemos ver que os valores absolutos de fluorescência de YO-PRO-1 (Figura 4.4b e c) são sempre maiores que os do iodeto de propídio a partir da concentração de 10 nM . Os pontos de $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ do YO-PRO-1 não puderam ser comparados com o iodeto de propídio devido ao seu alto custo. Por esse mesmo motivo, não consideramos investigar a janela de trabalho dentro dessa faixa. O fabricante do corante EvaGreen (*Jena Bioscience*) não informa a concentração do produto, contudo afirma que o estoque está em uma concentração 100x superior a recomendada. Por isso, fizemos uma diluição seriada do EvaGreen para observar o comportamento desse corante em diferentes concentrações. A concentração recomendada pelo fabricante apresentou a maior razão fluorescência máxima/*background*. Além disso, na concentração 10x superior a recomendada acontece o mesmo efeito observado para o iodeto de propídio, e a razão foi diminuída.

É importante ressaltar que o leitor de placas *Spectramax Paradigm* não é capaz de ler comprimentos de absorção e emissão com uma diferença inferior a 40 nm. Por essa razão, os comprimentos de onda lidos pelo YO-PRO-1 (Abs:491/Em:509 nm) foram lidos em Abs:480/Em:520 nm e o comprimento de onda do EvaGreen (Abs:500/Em:530 nm) foram lidos em Abs:500/Em:540 nm. Contudo, esses comprimentos estão próximo dos picos de absorção e emissão (Figura 4.3d e f). Ao comparar as razões fluorescência máxima/*background* dos 3 corantes utilizados, podemos observar que o YO-PRO-1 e o EvaGreen apresentam a melhor janela de trabalho (Figura 4.4g). Todavia, escolhemos o iodeto de propídio para a maioria dos experimentos devido ao seu baixo custo e, como veremos a frente, por apresentar resultados satisfatórios de permeabilização (Figura 4.5 a-c). Nesse sentido, escolhemos a concentração de 2 μ M de iodeto de propídio, com o objetivo de trabalhar no platô da razão fluorescência máxima/*background*.

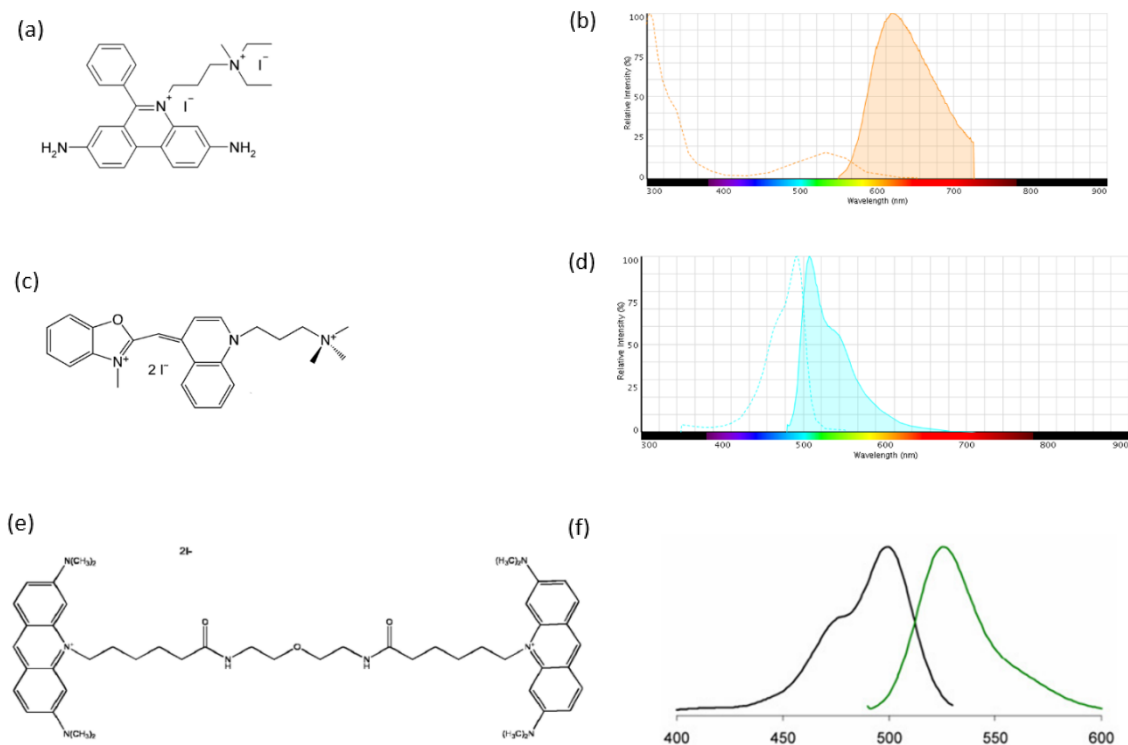


Figura 4.3 – Estrutura molecular do iodeto de propídio, Eva-Green e YO-PRO-1 – Representação da estrutura planar do (a) iodeto de propídio, (c) Yo-Pro-1 e (e) EvaGreen. (b, d e f) Ao lado de cada estrutura está representado o espectro de absorção e emissão de cada fluoróforo. Os espectros do iodeto de propídio e Yo-Pro-1 foram obtidos com a ferramenta *Spectra Viewer* (*Thermo Scientific*) enquanto a do EvaGreen foi cedida no manual do fabricante.

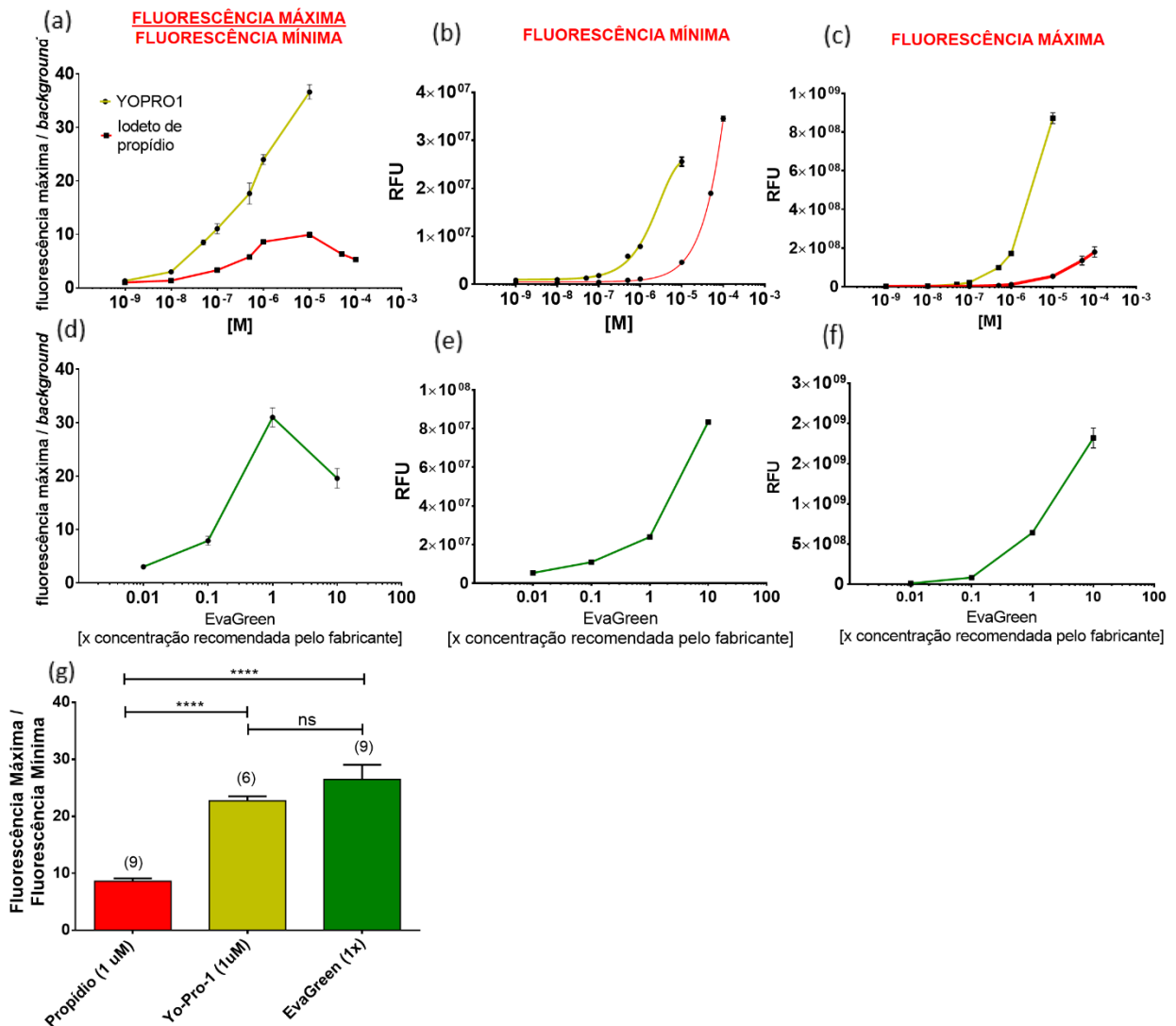


Figura 4.4 – Eficiência do iodeto de propídio, YO-PRO-1 e EvaGreen em evidenciar a permeabilização da membrana plasmática. Razão entre a fluorescência máxima/background do (a) iodeto de propídio e o YO-PRO-1 e (d) EvaGreen em diferentes concentrações. A fluorescência mínima (b e e) representa a fluorescência de background. A fluorescência máxima (c e f) foi obtida após a incubação dos mesmos poços com Triton-X100 0,5% por 5 minutos. O iodeto de propídio e o YO-PRO-1 estão expressos em função da concentração. Todavia, o fabricante do EvaGreen não informa a concentração, logo os dados foram expressos em função da diluição da concentração recomendada pelo fabricante. (g) Comparação da janela de trabalho nas concentrações de 1 M para o iodeto de propídio e Yo-Pro-1 e 1x para o EvaGreen Os comprimentos de absorção e emissão foram: iodeto de propídio (Abs:540 nm/Em:609 nm), Yo-Pro-1 (Abs:480 nm/Em:520 nm) e EvaGreen (Abs:500 nm/Em:540 nm). As figuras (b), (c), (e) e (f) estão expressas na unidade padrão do leitor de placas RFU (*relative fluorescence units*). Média ± erro padrão de n=9 (iodeto de propídio e Eva Green) em 3 dias independentes e n=6 para o YO-PRO-1 em dois dias independentes. Algumas barras de erros estão menores que os pontos marcados no gráfico e por isso não aparecem. A inferência estatística foi feita usando ANOVA + Tukey onde: **** $p \leq 0.0001$ e ns: não significativo.

Para testar a o método em função da permeabilização induzida pela ativação do receptor P2X7, utilizamos células de linhagem de macrófago de camundongo J774.G8, que expressam constitutivamente o receptor P2X7 (Figura 4.8), e células HEK293T expressando heterologicamente do receptor P2X7 (HEK293T-P2X7). Os detalhes do processo de transfecção das células HEK293T com o receptor P2X7 serão discutidos na próxima seção. A Figura 4.5a e b e c mostram a permeabilização celular induzidas pelo tratamento com 5 mM de ATP utilizando o iodeto de propídio, na concentração de 2 μ M, como marcador da permeabilização. Assim, podemos ver que a permeabilização cresce com o tempo satura por volta de 6 minutos (Figura 4.5a-c), o que condiz com outros trabalhos publicados na literatura (184, 191). Além disso, podemos ver que há uma permeabilização mesmo na ausência de ATP nas células J774.G8 e HEK293-P2X7, mas não na célula HEK293T (Figura 4.5a-c). A captação de iodeto de propídio das HEK293T-P2X7 na ausência de ATP será discutida na próxima seção. Todavia, o mesmo não foi investigado nas células J774.G8. Para nossa surpresa, a célula HEK293T, que não expressa o receptor P2X7 (Figura 4.8), apresentou permeabilização da membrana plasmática ao iodeto de propídio em resposta ao tratamento com 5 mM de ATP (Figura 4.5c). Esse fenômeno será investigado com maiores detalhes na seção 4.3. Podemos ver na Figura 4.5e e que os valores de permeabilização relativa variam para cada corante. O iodeto de propídio e o EvaGreen apresentam uma maior entrada na ausência de ATP em comparação ao YO-PRO-1. Isso faz com que os valores de permeabilização observados com o tratamento com ATP também sejam maiores. Contudo, ao normalizamos os dados em função da entrada de corante na ausência de ATP, podemos ver que eles são permeabilizados em taxas similares em um tempo de incubação de 6 minutos (Figura 4.5f). Esses dados mostram que os passos no método de permeabilização relativa permitem que corantes que emitem diferentes quantidades de fluorescência possam ser comparados, uma vez que tais corantes possuem dimensões moleculares similares e é esperado que sejam permeabilizados em taxas similares.

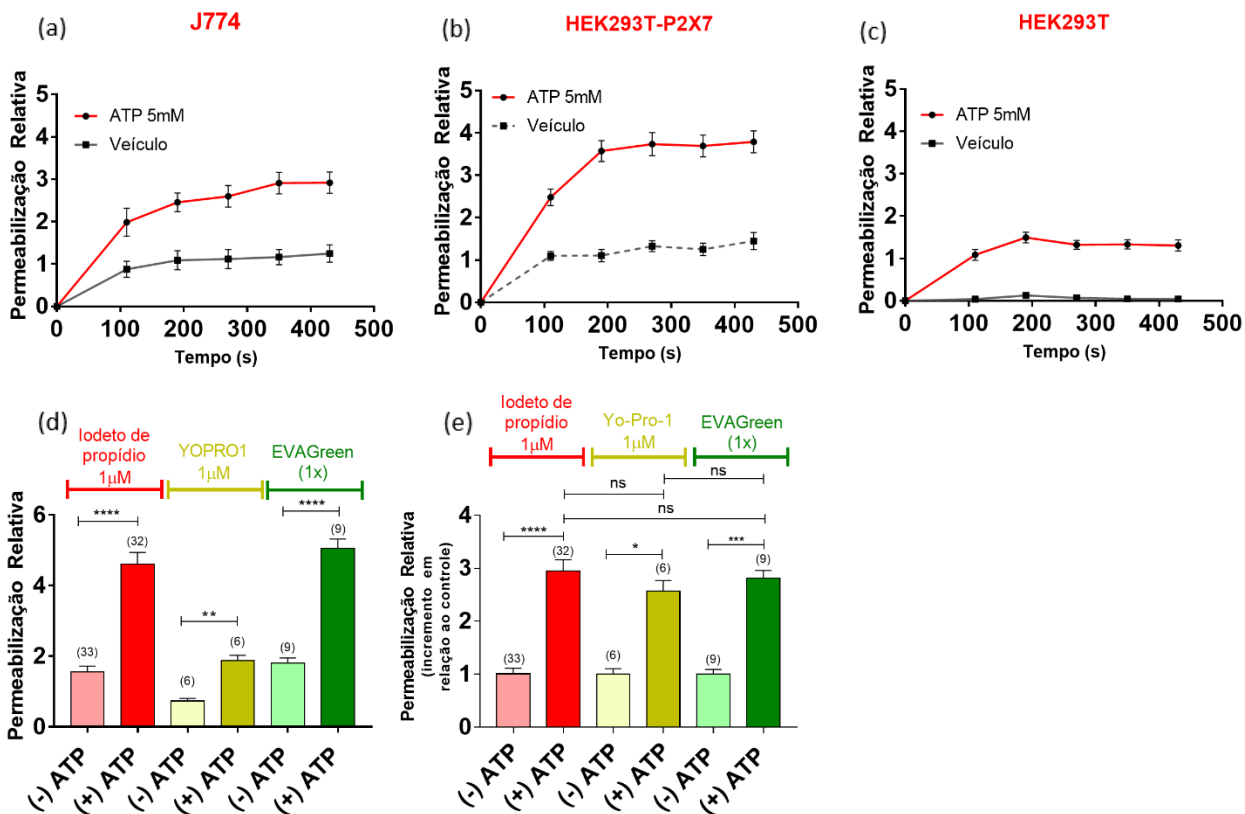


Figura 4.5 – Permeabilização celular induzida pelo ATP. (a), (b) e (c) Permeabilização das células J774.G8 e HEK293T (transfectadas com o receptor P2X7 ou não), respectivamente, ao iodeto de propídio em função do tratamento com ATP. Em (d) podemos ver a janela de trabalho que cada corante oferece pela razão fluorescência máxima/background. Em (e) está mostrada a permeabilização após a incubação de 6 minutos com 5 mM de ATP. (f) Normalização da permeabilização da resposta ao ATP em função da entrada na ausência de ATP. A normalização foi feita pela média da entrada na ausência de ATP de cada dia. Média \pm erro padrão de (a) $n=9$, (b) $n=18$ e (c) $n=12$ em 3, 6 e 4 dias independentes, respectivamente. Em (d), (e) e (f) $n=9$ em 3 dias independentes e o EVAGreen e $n=6$ em 2 dias independentes para o Yo-Pro-1. Para o iodeto de propídio, (d) $n=9$ em 3 dias independentes e (e) e (f) $n=32$ em 11 dias independentes. A inferência estatística foi feita usando ANOVA + Tukey onde: ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$ e ns: não significativo.

Com o objetivo de avaliar se os 3 passos idealizados no método de permeabilização relativa são vantajosos em relação a medição direta da permeabilização induzida pelo ATP extracelular expressamos os dados obtidos em um experimento significativo de ambas as maneiras. Assim, utilizamos o fator Z' como medida de comparação dos métodos. Essa ferramenta foi desenvolvida para avaliar ensaios de alta vazão (285). Nesse sentido, é computado os desvios padrão do controle negativo (veículo) e do controle positivo (ATP), e a diferença entre a média desses grupos. Assim, quanto menores forem os desvios e maior for a diferença entre as

médias maior o valor, onde o máximo é 1. Na figura 4.7 está mostrado um experimento representativo em triplicata onde comparamos os valores de Z' entre a leitura direta da permeabilização e a utilização da fórmula de permeabilização relativa (Figura 4.1). Assim, podemos ver a utilização da formula de permeabilização relativa aumentou a diferença entre as médias sem afetar os desvios (Figura 4.7), logo aumentou a janela de trabalho em comparação a medida direta. Assim, podemos observar que o no exemplo representativo o fator Z' ficou maior utilizando a permeabilização relativa do que a leitura direta do poço. É importante frisar que a permeabilização celular induzida pelo receptor P2X7 não afeta a integridade da membrana plasmática até os tempos de incubação analisados (6 minutos), uma vez que não há liberação significativa de lactato desidrogenase quando comparado ao controle (Figura 4.6). Uma vez que estabelecemos o método de captação de corante, o próximo passo foi otimizar um sistema de expressão heteróloga transiente do receptor P2X7 em células HEK293T.

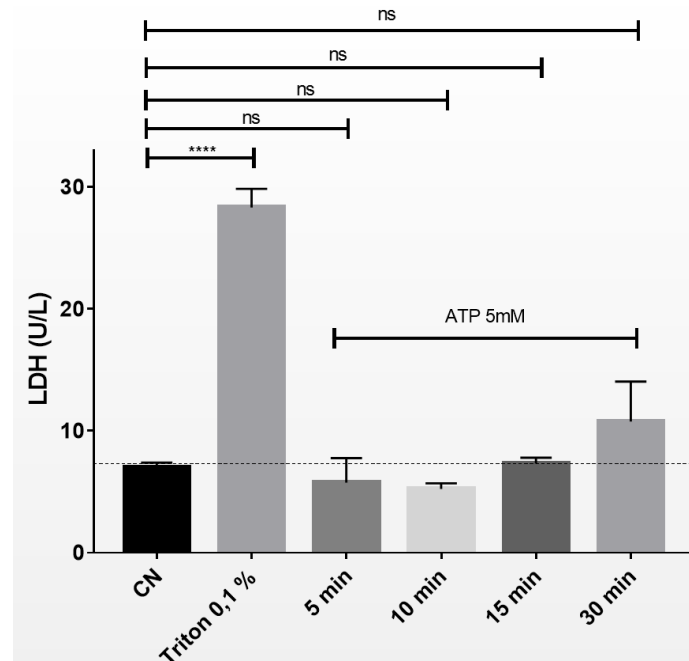
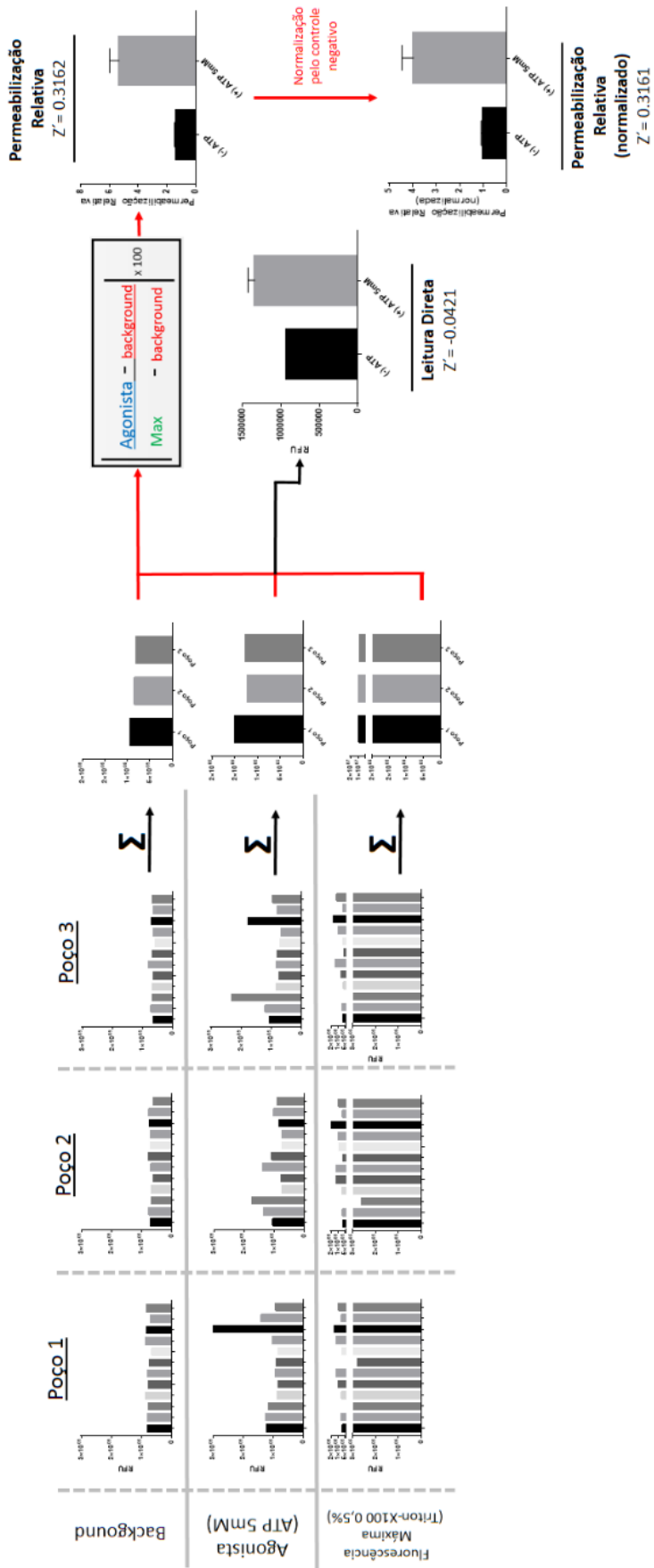


Figura 4.6 – Integridade da membrana plasmática após ao tratamento com ATP. Células HEK293T transientemente expressando o receptor P2X7 foram tratadas com 5 mM de ATP na presença de tampão fosfato em diferentes tempos. Não há liberação de lactato desidrogenase até o tempo usado nos experimentos de permeabilização dos corantes fluorescentes (<6 minutos). CN: controle negativo. Média \pm erro padrão de 1 dia de experimento em triplicata. A inferência estatística foi feita usando ANOVA + Tukey onde: **** $p \leq 0.0001$ e ns: não significativo.



4.2 -Otimização da expressão heteróloga do receptor hP2X7 em células HEK293T:

Com o objetivo de trabalhar com o receptor P2X7 contendo mutações nos segundo domínio transmembrana, foi necessário estabelecer um modelo de expressão heteróloga. Logo, utilizamos células HEK293T, uma vez que ela não expressa o receptor P2X7 (13, 197) (Figura 4.8a). Para tal, escolhemos a lipofecção como método de internalização do plasmídeo na célula. O plasmídeo utilizado foi o PQCXIN (*Clontech* - EUA) subclonado com o cDNA do receptor P2X7 humano. O fabricante da Lipofectamina 3000™ não informa a concentração ou a composição dos lipídeos na sua fórmula. Além disso, há um componente do kit denominado P3000, o qual tem a composição também não informada e deve ser previamente misturado ao plasmídeo, em uma proporção específica, logo antes desse ser misturado com a Lipofectamina 3000™. O fabricante também recomenda que se mantenha a concentração de 1 ng/μL de plasmídeo e varie a concentração de lipofectamina para encontrar o ponto ótimo de expressão. Nesse sentido utilizamos a imunodeteção do receptor P2X7, por *Western Blot* e imunofluorescência, e a resposta funcional do receptor frente ao tratamento com ATP em células HEK293T nas diferentes concentrações lipofectamina para avaliar os níveis de expressão. Em adição, a atividade metabólica da célula e a integridade da membrana plasmática foram avaliadas, por MTT e liberação de lactato desidrogenase, respectivamente, nas mesmas concentrações de Lipofectamina 3000™.

Expressamos a concentração de lipofectamina em função do volume do reagente em um total de OPT-MEM (v/v). Logo, seguindo a faixa recomendada pelo fabricante testamos as concentrações de 0,05%; 0,1%; 0,15% e 0,3% de Lipofectamina 3000™ incubadas por 24 horas com plasmídeo contendo a sequência do receptor P2X7. A figura 4.8j mostra a quantificação relativa da expressão (em função da expressão da β-actina) do receptor P2X7. Pode ser observado que a expressão aumenta até a concentração de 0,15% e depois estabiliza. Além disso, o nosso ensaio de imunofluorescência mostra um padrão similar, com a marcação do receptor P2X7 aumentando em função da concentração de Lipofectamina 3000™ (Figura 4.9c-f). Curiosamente, é possível observar uma maior marcação do receptor P2X7 na concentração de 0,3% de Lipofectamina 3000™ (Figura 4.8f) embora a expressão global não aumente (Figura 4.8i), já que os níveis de expressão globais parecem estabilizar entre a concentração de 0,15% e 0,3%, como

verificados através do *Western Blot* (Figura 4.8i e j). No entanto, a quantidade de células dispostas nos campos observados aparentemente decresce em função da concentração de Lipofectamina 3000™ (Figura 4.8a-f), sugerindo que a lipofecção diminui a taxa de proliferação ou aumenta a taxa de morte das células transfectadas. Nesse sentido, podemos inferir que há uma quantidade maior de receptores por células e os níveis globais de expressão se mantêm (Figura 4.8). A inspeção visual do poço ao microscópio 24 horas após a transfecção (não mostrado aqui) também sugere que há uma quantidade menor de células nas condições tratadas com 0,3% de lipofectamina durante a lipofecção.

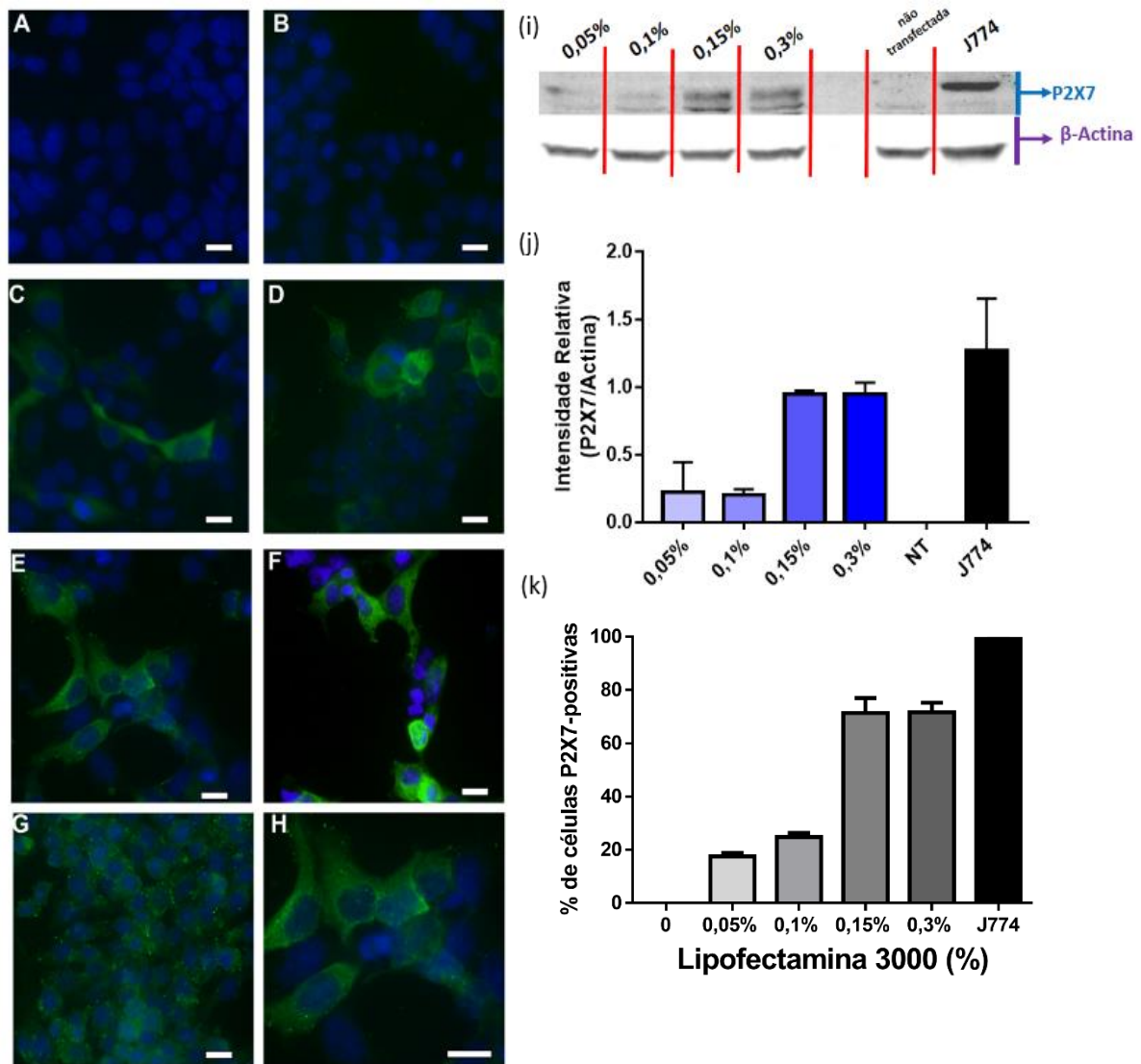


Figura 4.8 – Expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T com Lipofectamina 3000™. Células HEK293T foram transfectadas, seguindo as recomendações do fabricante (vide a seção de métodos) com diferentes concentrações de lipofectamina Lipofectamina 3000™. (a-h) Experimento de

imunofluorescência representativo de 3 dias independentes utilizando anticorpo policlonal para o receptor P2X7 e o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa488: (a) Células HEK293T não transfectada e (b) controle somente com o anticorpo secundário. (c-f) Células HEK293T transfectadas com Lipofectamina 3000™ nas concentrações de (c) 0,05%, (d) 0,1%, (e) 0,15% e (f) 0,3%. (g) Células J774.G8, que expressam constitutivamente o receptor P2X7. (h) Zoom da imagem (e) que utiliza a concentração de 0,15%. (i) Experimento representativo de *Western Blot* mostrando a expressão global do receptor P2X7 em diferentes concentrações de lipofectamina. (j) Média \pm erro padrão da expressão relativa do receptor P2X7 em função da expressão de β -actina de dois *Western Blots* independentes. NT: não transfectada. (k) Média \pm erro padrão da porcentagem de células marcadas para o receptor P2X7 nos experimentos de imunofluorescência, onde foram contadas 2 lamínulas por condição em 3 dias independentes (n=6).

Para avaliar a função do receptor P2X7, fizemos ensaios de permeabilização com o método discutido na seção anterior. Nesse sentido, utilizamos 5 mM de ATP para ativar o receptor P2X7 e o iodeto de propídio como marcador da permeabilização da membrana plasmática. Como podemos ver na figura 4.9a-c, não há entrada de iodeto de propídio na célula HEK293T não transfectada durante o tempo de incubação utilizado (cerca de 6 minutos). Além disso, como citado anteriormente, a célula HEK293T, mesmo não expressando o receptor P2X7, permeabiliza ao iodeto de propídio em resposta ao tratamento com ATP (Figura 4.8), o que será discutido na próxima seção. A resposta de permeabilização ao iodeto de propídio cresce de maneira dose dependente em função da concentração de Lipofectamina 3000™ quando as células são transfectadas com o receptor P2X7 (Figura 4.9a). Essa resposta cresce até saturar em 0,15%, assim como os níveis expressão observados nos ensaios de *Western Blot* (Figura 4.8i e j). Por outro lado, a entrada de iodeto de propídio na célula na ausência de ATP aumenta de maneira linear em função da concentração de Lipofectamina 3000™ (Figura 4.9d). A lipofectamina por si não levou ao aumento da toxicidade, dessa maneira ela está relacionada com a expressão do receptor P2X7. Esse fato nos sugere três hipóteses: (1) a super-expressão do receptor P2X7 faz com que a célula entre em processo de necrose (primária ou secundária), levando a perda da integridade da membrana plasmática; (2) há uma atividade constitutiva do receptor P2X7 (na ausência de ATP) que levaria a entrada de uma certa quantidade de iodeto de propídio através do poro associado à sua ativação, uma vez que tal atividade já foi observada em outros canais (286, 287) ou a (3) transfecção com o receptor P2X7 pode, de alguma maneira, aumentar a liberação de ATP pelas células, que ativaria o receptor P2X7, mesmo sem aplicação externa e justificaria a entrada de iodeto de propídio mesmo na ausência de aplicação externa de ATP

(Figura 4.9c). Para testar a primeira hipótese, verificamos integridade da membrana plasmática e a atividade metabólica da célula por liberação de lactato desidrogenase e por MTT, respectivamente, 24 horas após a transfecção (Figura 4.9e e f, respectivamente). Podemos ver na figura 4.9e que há um decréscimo da atividade metabólica da célula de cerca de 25% a partir das concentração de lipofectamina de 0,15%. Curiosamente, ela se mantém sem diferença significativa em relação à concentração de 0,3% (Figura 4.9d). Esse dado deve ser interpretado com , pois a ativação do receptor P2X7, dependendo da situação, pode aumentar (282) ou diminuir a atividade mitocondrial (280). Em contraste, a liberação de lactato desidrogenase parece aumentar em função da concentração de Lipofectamina 3000™ (Figura 4.9f), reforçando a ideia de que as células estão perdendo a integridade da membrana plasmática. Contudo, esse aumento não foi estaticamente significativo, provavelmente devido ao baixo número de repetições do experimento. Baseado nos dados obtidos podemos concluir que a concentração de 0,15% Lipofectamina 3000™ apresentou a melhor resposta de permeabilização aliado ao menor dano a célula (Figura 4.9c). Nesse sentido, utilizamos essa concentração de nos experimentos utilizando a expressão heteróloga do receptor P2X7.

Como mostrado anteriormente, a células HEK293T são permeabilizadas ao iodeto de propídio em resposta ao tratamento com ATP, mesmo não expressando o receptor P2X7 (Figura 4.8a e 4.8). Embora essa questão não estivesse prevista nesse trabalho, esse fenômeno pode ser uma peça importante na elucidação dos efeitos do ATP na permeabilidade da membrana plasmática. Dessa forma, investigamos a via de permeabilização induzida pelo ATP extracelular independente do receptor P2X7.

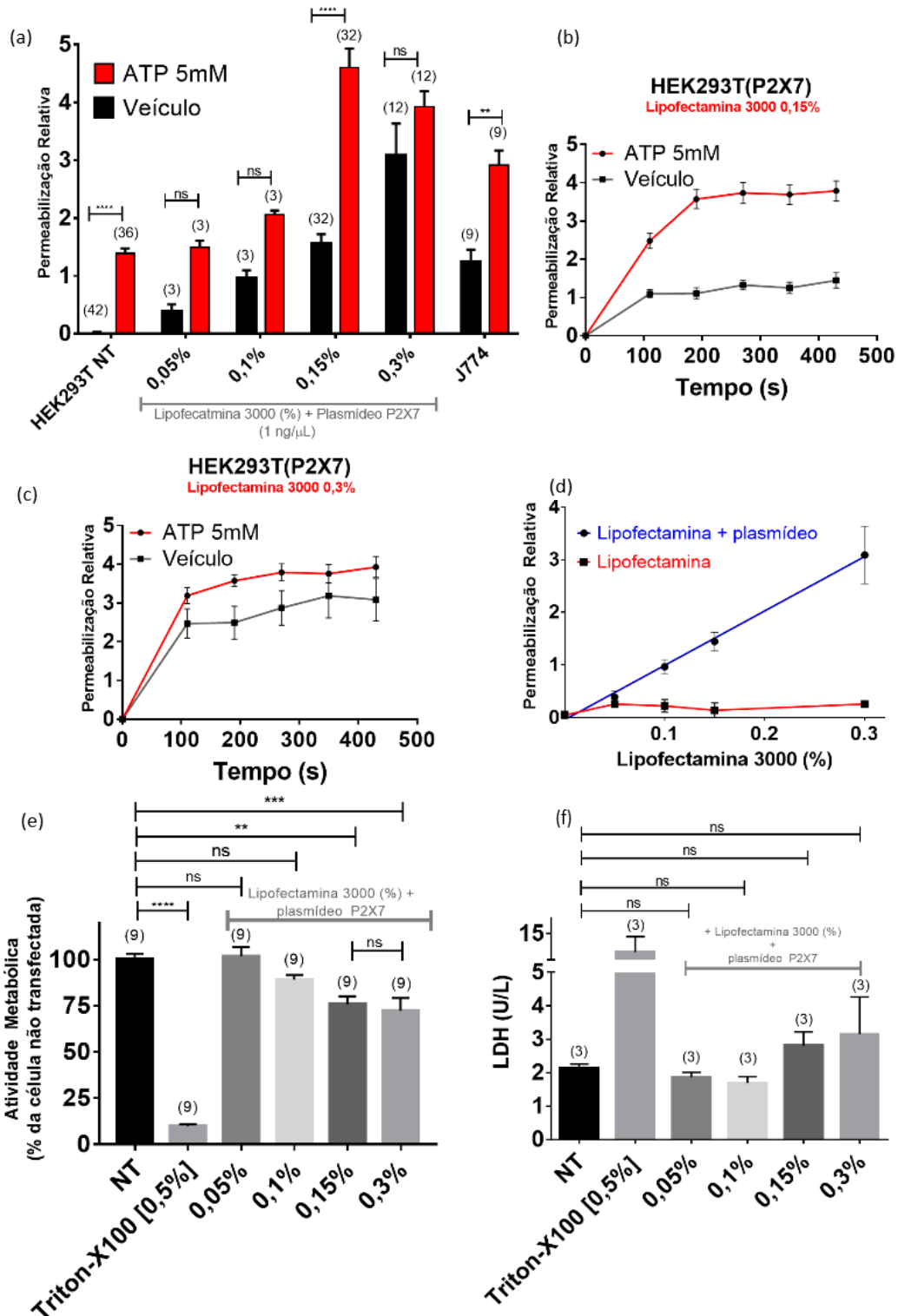


Figura 4.9. Expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T. (a) Permeabilização relativa de células HEK293T transfectadas com o receptor P2X7 com diferentes concentrações de Lipofectamina 3000™. As células foram incubadas com ATP ou veículo por 6 minutos e o ensaio foi feito da mesma maneira que mostrado na figura 4.1. As células J774.G8 foram utilizadas como controle de expressão

constitutiva do receptor P2X7. NT: não transfectada. (b) e (c) mostram a curva de permeabilização em função do tempo nas concentrações de 0,15 (b) e 0,3% (c) de Lipofectamina 3000™. (d) Comparação da entrada de entrada de iodeto de propídio em 6 minutos em células transfectadas ou somente tratadas com lipofectamina sem a adição de ATP. (e) Análise da atividade metabólica das células transfectadas com diferentes concentrações de Lipofectamina 3000™ através da técnica de MTT. O Triton-X100 foi utilizado como controle positivo por causar danos a membrana e comprometer a viabilidade das células. (f) Análise da integridade da membrana plasmática das células transfectadas com diferentes concentrações de Lipofectamina 3000™ através da atividade da lactato desidrogenase presente no sobrenadante. O Triton-X100 foi utilizado como controle positivo por comprometer a integridade da membrana plasmática e permitir a liberação de LDH para o meio extracelular. (a) Média \pm erro padrão de 12 (NT), 1 (0,05%), 1 (0,1%), 11 (1,5%), 4 (0,3%) ou 3 (J774.G8) dias independentes. (b) e (c) Média \pm erro padrão de 4 dias independentes. (e) Média \pm erro padrão de 1 dia para as condições sem o plasmídeo e 1 (0,05%), 1 (0,1%), 11 (1,5%) e 4 (0,3%) dias para as condições com o plasmídeo. (f) Média \pm erro padrão de 1 dia. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, onde os *outliers* foram excluídos (vide métodos) e o *n* está entre parênteses. A inferência estatística foi feita usando ANOVA + Tukey, onde: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ e ns: não significativo.

4.2 Permeabilização celular independente do receptor P2X7.

Com o objetivo de investigar a permeabilização independente do receptor P2X7 nas células HEK293T, realizamos o experimento de permeabilização relativa em diferentes concentrações de ATP. Para efeito de comparação, também foi feita uma curva dose-resposta ao ATP para as células HEK293T transfectadas com o receptor P2X7 na concentração de 0,15% de Lipofectamina 3000™ (HEK293T-P2X7) e para as células J774.G8 (Figura 4.10b e c, respectivamente). A permeabilização nas células HEK293T-P2X7 satura em 5 mM enquanto na célula HEK293T e nas células J774.G8 não foi possível encontrar o platô em concentrações até 10 mM. A necessidade de concentrações milimolares de ATP para que se comece a observar o fenômeno de permeabilização nas células HEK293T sugere que não há outro subtipo de receptor P2X envolvido, uma vez que os subtipos P2X2 e P2X4 levam a permeabilização em concentrações menores de ATP (16, 120, 183).

Para avaliar a contribuição do receptor P2X7 no total de permeabilização observado na célula HEK293T-P2X7, utilizamos o antagonista A740003. Esse antagonista consegue bloquear a resposta do receptor P2X7 em concentrações nanomolares, enquanto não apresenta atividade nos demais subtipos P2X em concentrações de até 100 μ M (131). O tratamento com o antagonista

A740003 foi capaz de bloquear somente cerca de metade da resposta de permeabilização induzida pelo ATP nas células HEK293T-P2X7 (Figura 4.10d). Por outro lado, a permeabilização observada nas células HEK293T foi insensível ao tratamento com o A740003 em concentrações de até a concentração de 10 μ M. Além disso, o agonista específico do receptor P2X7 Bz-ATP, foi capaz de induzir a permeabilização apenas na célula HEK293T-P2X7 (Figura 4.10g). Logo, podemos concluir que há pelo menos duas vias de permeabilização nas células HEK293T-P2X7: uma dependente e uma independente do receptor P2X7, cada uma contribuindo com cerca de metade da permeabilização ao iodeto de propídio observada. Nesse sentido, fomos investigar características da via independente do receptor P2X7 com o objetivo de conseguir informações que auxiliem na sua elucidação, uma vez que ela não foi descrita na literatura. Esse achado reforça a teoria que a outras proteínas poderiam formar o poro na membrana plasmática após o tratamento com ATP.

Com o objetivo de verificar se a panexina está envolvida na permeabilização das células HEK293T, realizamos o ensaio de permeabilização relativa na presença do seu antagonista probenecida. Como podemos ver na figura 4.10f, a probenecida bloqueou cerca de metade da permeabilização induzida pelo ATP nas células HEK293T, o que sustenta a ideia de que a panexina promove a permeabilização nessas células. Uma vez que a panexina não pode ser ativada diretamente pelo ATP (207), levantamos a hipótese que os receptores P2Y₁ e P2Y₂, que são expressos nas células HEK293T poderiam ativar a panexina, através do aumento do Ca⁺⁺ liberados pelos estoques intracelulares (207). Para testar a participação do receptor P2Y₂ utilizamos o UTP como agonista, contudo essa molécula não foi capaz de induzir a permeabilização em concentrações de até 50 μ M.

Para verificar se o tratamento com ATP nas células HEK293T promoveria a abertura de um canal, realizamos experimentos de *patch-clamp* na modalidade *whole-cell* em células HEK293T. As células foram mantidas em um potencial de -60 mV e o ATP foi aplicado manualmente, com o auxílio de uma micropipeta, na concentração de 5 mM. Logo, podemos ver na figura 4.11a que o ATP leva a abertura de canal cátion seletivo na membrana. O canal abre e atinge o platô milissegundos após a aplicação do ATP, apresentando uma corrente de $21,7 \pm 4,6$ pA/pF que

dessensibiliza por volta de 40 segundos. Além disso, as correntes observadas não puderam ser bloqueadas pelo antagonista do receptor P2X7 A740003 (1 μ M) (Figura 4.11b e c).

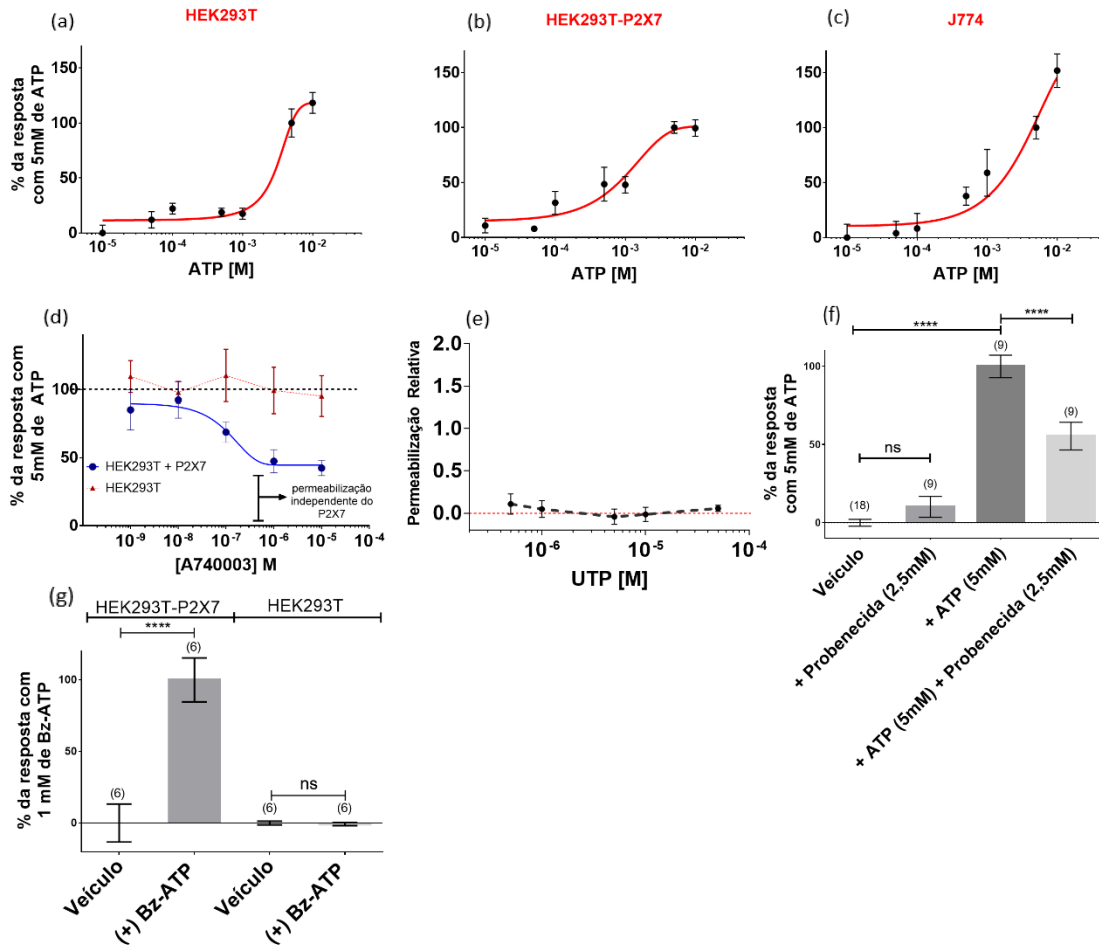


Figura 4.10 – Características da permeabilização independente do receptor P2X7. (a-c) Ensaio de permeabilização relativa em resposta a diferentes concentrações de ATP nas células (a) HEK293T, (b) HEK293T-P2X7, (c) J774.G8. (d) Curva de inibição do antagonista específico para o receptor P2X7 A740003 nas células HEK293T (vermelho) e HEK293T (Azul). O tracejado representa a média da resposta com 5 mM de ATP. A resposta em (d) foi normalizada em função dos controles de cada dia, onde 100% é a resposta obtida com 5 mM de ATP e 0% é a resposta do controle negativo. (e) Ensaio de permeabilização relativa em resposta a diferentes concentrações de UTP nas células HEK293T. O tracejado representa a média do tratamento com o veículo (controle negativo). (f) Ensaio de permeabilização relativa em resposta ao ATP na presença do antagonista da panexina probenecida (2,5 mM). (g) Ensaio de permeabilização relativa em resposta ao agonista específico do receptor P2X7 Bz-ATP. Todos os ensaios de permeabilização relativa foram feitos utilizando o iodeto de propídio como marcador da permeabilização em um tempo de incubação de 6 minutos. Média \pm erro padrão de (a) 2, (b) 5, (c) 2, (d) 5, (e) 3, (f) 3 ou (g) 2 dias independentes de experimento. Todos os experimentos foram feitos em triplicata onde os *outliers* foram excluídos (vide métodos) e o *n* está entre parênteses. A inferência estatística foi feita usando ANOVA + Tukey, onde: **** $p \leq 0,0001$ e ns: não significativo.

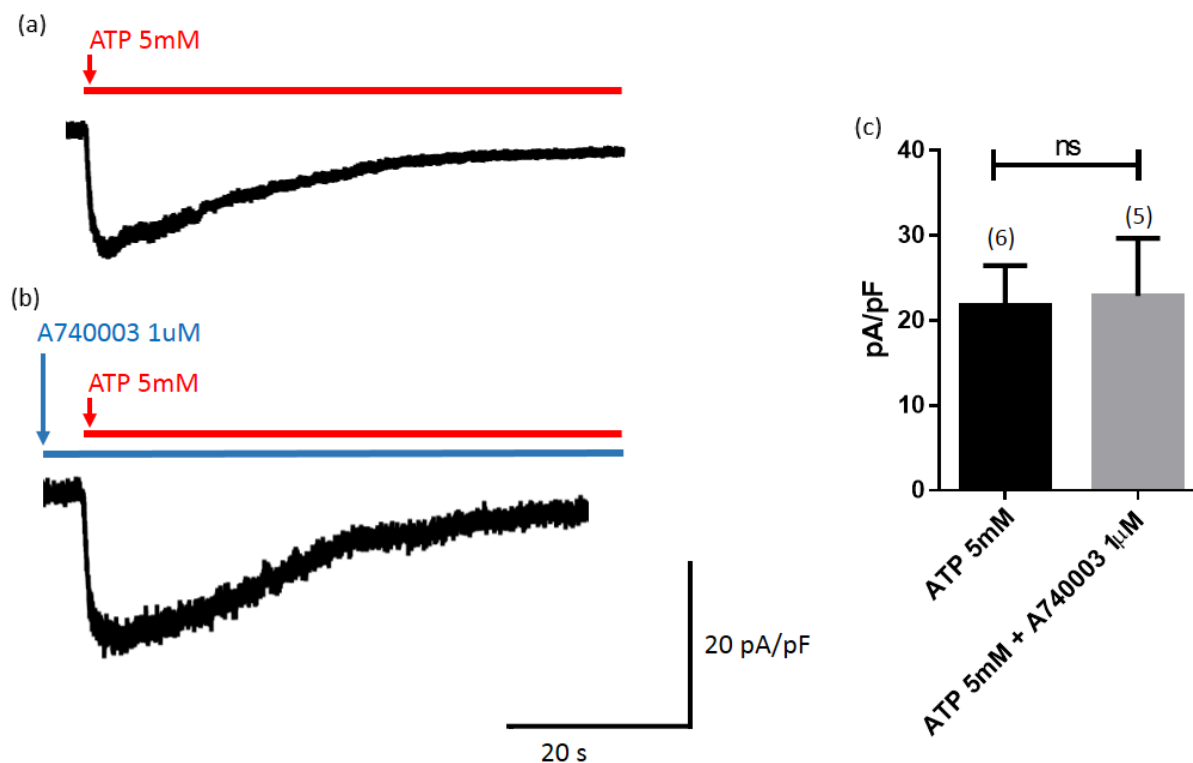


Figura 4.11 – Atividade de canal desencadeada pelo ATP em células HEK293T. (a) e (b) Traços representativos de experimentos de *patch-clamp* modalidade *whole-cell* em células HEK293T na presença de ATP (a) e/ou (b) o antagonista específico do receptor P2X7 A740003. (c) Média \pm erro padrão do pico da corrente de 3 dias independentes de experimentos. O número de células analisadas está entre parênteses. A inferência estatística foi feita utilizando o ANOVA + teste t onde: ns: não significativo.

4.4 - Possível dilatação do canal do receptor P2X7

Com o objetivo de verificar se a permeabilização dependente do receptor P2X7 constitui na dilatação do canal do próprio receptor, adaptamos o ensaio de acessibilidade à cisteína ao ensaio de permeabilização relativa (discutido na seção 4.1) para verificar a acessibilidade de resíduos do domínio no TM2 do receptor P2X7 ao composto MTSEA-biotina. Nesse tipo de ensaio, são feitas mutações nos domínios transmembrana de canais trocando os aminoácidos em questão por cisteína. Logo, são utilizados compostos capazes de se ligar covalentemente a esses resíduos de cisteína, contudo, a ligação somente ocorre se o resíduo em questão estiver exposto durante a abertura do canal e se o composto utilizado tem dimensões pequenas o suficiente para

chegar até esse resíduo. Logo, escolhemos o MTSEA-biotina, que possui a segunda menor medida (em um plano x/y/z) de 0,6nM e 381 Da. Para garantir que a possível acessibilidade a esse composto represente a dilatação do canal, decidimos buscar resíduos que estariam na região de maior estreitamento da região transmembrana do canal. Para esse objetivo utilizamos um modelo comparativo da estrutura do receptor hP2X7 baseado na estrutura do zfp2X4 no estado aberto (Figura 4.12). Essa estrutura quando inserida em uma membrana *in silico* promove a passagem dos cátions K⁺ e Na⁺ mas não de Cl⁻ em simulações de dinâmica molecular (288). A região do maior estreitamento do canal está entre os resíduos G339 e S342 (Figura 4.13), o que é sustentado por dados funcionais recentemente publicados (176). Nesse sentido, hipotetizamos que se o canal do receptor P2X7 dilate, o primeiro resíduo exposto na luz do canal após a região de estreitamento (G345 – Figura 4.13) seria acessível ao composto metanotiosulfonados MTSEA-biotina e a entrada de iodeto de propídio possa ser, pelo menos parcialmente, bloqueada. Logo, escolhemos o resíduo o G345 (Figura 4.13), que é o primeiro resíduo que aparece exposto a luz do canal após a região de estreitamento (em direção ao interior da célula). Para isso idealizamos produzir mutante onde o resíduo G345 será substituído por uma cisteína (G345C).

Para realizar a mutação, buscamos na sequência codificante do cDNA do receptor P2X7 os códons relacionados aos aminoácidos na região transmembrana, em especial os correspondentes ao resíduo G345. Logo, foi desenhado um primer que alinhe nessa região e já contenha as bases codificantes para a cisteína na região de interesse. Mesmo tendo essa discrepância, o primer consegue alinhar dentro das condições da reação do kit e então foi feito uma reação de PCR onde o produto amplificado formará o novo plasmídeo contendo a mutação (vide métodos). Contudo, após o sequenciamento do plasmídeo, foi verificado que não houve a mutação, o que até o momento inviabiliza o ensaio de acessibilidade à cisteína.

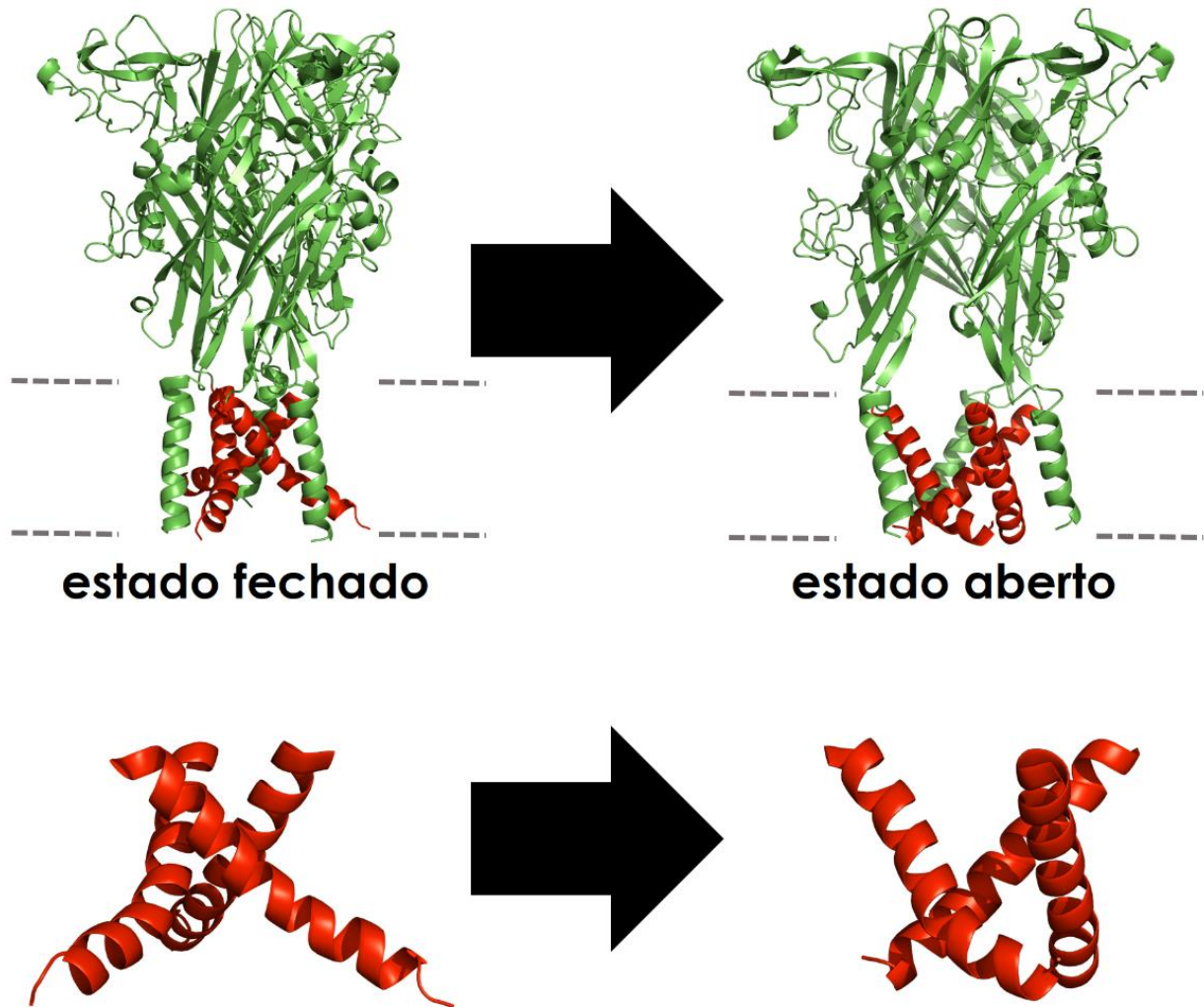


Figura 4.12 – Estrutura 3D do modelo comparativo do receptor hP2X7 humano. O modelo foi construído a partir da estrutura do receptor P2X4 do *peixe-zebra*. As imagens mostram o receptor modelado no estado (a) fechado e (b) aberto. Em (c-d) podemos ver separadamente os domínios TM2 no estado fechado e aberto, respectivamente. As estruturas estão mostradas na representação *cartoon*, portanto não podemos ver as cadeias laterais. Essa estrutura é formada por 3 subunidades idênticas, cada uma com dois domínios transmembrana, sendo que o segundo domínio transmembrana (TM2 – em vermelho) forma a passagem dos íons pela membrana (espaço entre as linhas pontilhadas) em um formato que remete a metade de uma ampulheta. É importante notar que a estrutura do receptor P2X4 de peixe zebra, que serviu como molde, não possuía os domínios intracelulares (vide introdução), portanto essa região, embora muito importante, não foi modelada. As linhas tracejadas indicam a posição da membrana plasmática. O modelo estrutural foi cedido pelo autor para a realização desse trabalho (288). Figura gerada pelo *software* Pymol.

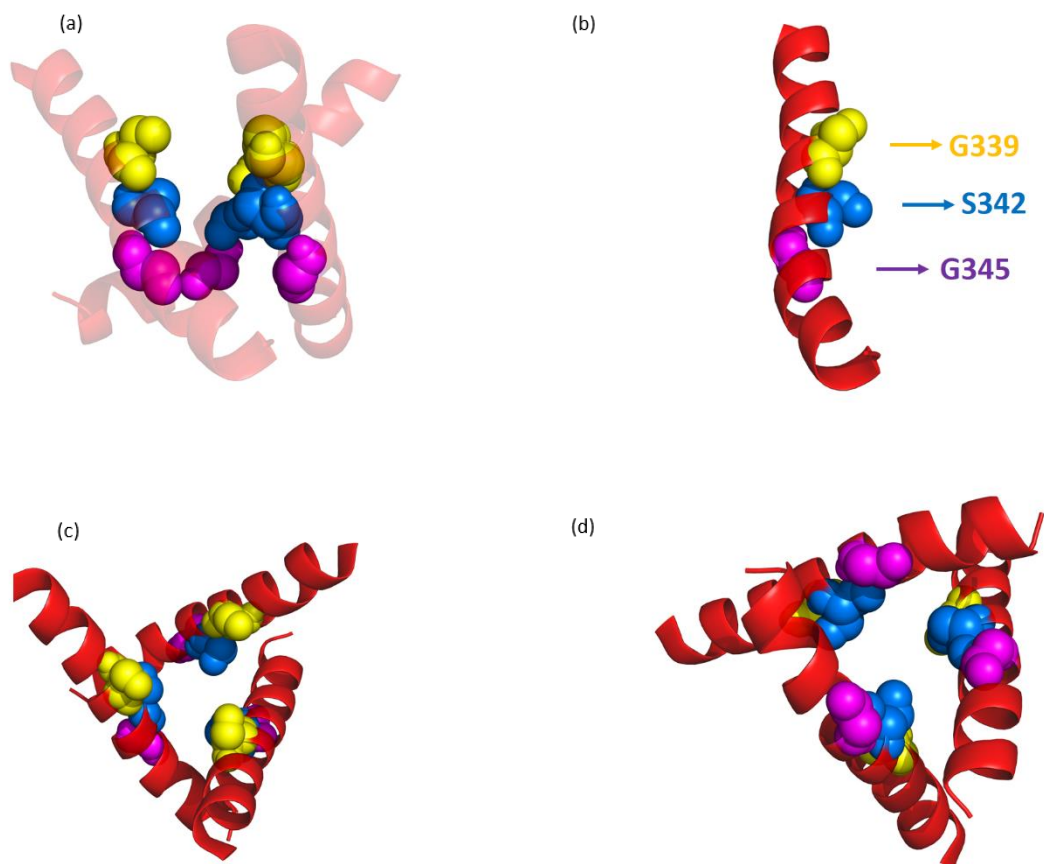


Figura 4.13 – Região de estreitamento do canal do receptor P2X7. (a-d) Representação gráfica, em *cartoon*, da estrutura dos segundos domínios transmembrana (TM2s) do modelo comparativo do receptor P2X7, baseado na estrutura do receptor P2X4 no estado aberto, destacando os resíduos que formam a região de estreitamento do canal, baseados nos dados de Pippel *et al* (176), como esferas. (a) Visão lateral do trímero, (b) visão lateral do monômero, (c) visão do lado extracelular e (d) visão do lado intracelular do trímero. Os átomos dos resíduos presentes na região do estreitamento do canal estão representados como esferas. Em (b) a imagem sofreu uma leve inclinação para melhorar a visualização. (e-f). Figuras geradas pelo software *Pymol*.



(b)

Required Primers					
Name (F/R)	Oligo (Uppercase = target-specific primer)	Len	% GC	Tm	Ta *
Q5SDM_11/5/2014_F	CTCCTACTTCgtCTGGCCGCTG	23	61	65°C	65°C
Q5SDM_11/5/2014_R	AGGGTTGAGCCGATGTAC	18	56	62°C	

(c)

purinergic receptor P2X7 variant A [Homo sapiens]
 Sequence ID: [ACS72266.1](#) Length: 595 Number of Matches: 1

Range 1: 295 to 595 [GenPept](#) [Graphics](#)

Query	11	FAQVLQGNVVEKRTL	IKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVWYIGSTLSYFGLAAVFIDFL	190
		+A+ +	NNVEKRTL	
Sbjct	295	YAKYYKENNVEKRTL	IKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVWYIGSTLSYFGLAAVFIDFL	354

(d)

purinergic receptor P2X7 variant A [Homo sapiens]
 Sequence ID: [ACS72266.1](#) Length: 595 Number of Matches: 1

Range 1: 302 to 350 [GenPept](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
98.2 bits(243)	3e-22	Composition-based stats.	47/49(96%)	48/49(97%)	0/49(0%)	+1
Query	31	NNVEKRTL	IKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVWYIGSTLSYFCLAAVF	177		
		+NVEKRTL	IKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVWYIGSTLSYF LAAVF			
Sbjct	302	NNVEKRTL	IKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVWYIGSTLSYFGLAAVF	350		

Figura 4.14 – Análise da mutagênese sítio dirigida. (a) Sequência de aminoácidos (em verde) e de códons relativos ao TM2 do receptor P2X7 (em preto). O aminoácido a ser mutado, a glicina 345 (G345) está em azul. Os primers estão mostrados em vermelho. (b) Características dos primers gerados pelo algoritmo da New England Biolabs para realizar a mutação. (c) Alinhamento pela plataforma BLAST do resultado do sequenciamento de parte do plasmídeo presumivelmente com a mutação G345C (Query) na sequência do receptor P2X7 variante A humano (Sbjct) . A seta vermelha indica a região esperada da mutação, que não ocorreu. (d) Análise de uma outra alíquota do plasmídeo presumivelmente com a mutação G345C, não utilizada nos experimentos dessa tese, mostrando a cisteína inserida na posição esperada.

5- Discussão

Há mais de 40 anos, vem sendo demonstrado a capacidade do ATP extracelular de causar profundas modificações celulares como inchaço celular, influxo de Na^+ e Ca^{++} e efluxo de K^+ (290, 291). Embora essas características pudessem ser explicadas por um canal catiônico não seletivo, era também observado a permeabilidade da membrana plasmática a moléculas de maior peso molecular, como o para-nitrofenilfosfato (219 Da) (177). Além disso, esse efeito poderia ser revertido pela adição de concentrações $>\text{mM}$ de Ca^{++} ao meio extracelular, fazendo com que alguns autores sugerissem que o ATP poderia interagir diretamente na membrana plasmática, mudando sua fluidez e abrindo espaços por onde os íons, e moléculas maiores como o para-nitrofenilfosfato, poderiam passar através do seu gradiente eletroquímico (177). Contudo, após o estabelecimento do conceito de sinalização purinérgica (26) através de receptores específicos e a posterior clonagem e classificação desses receptores, os efeitos acima citados nas células foram atribuídos à ativação receptor P2X7 pelo ATP extracelular (170, 181, 182, 292). Posteriormente, ainda foi descrito que os receptores P2X2 e P2X4 possuíam também a propriedade de promover a permeabilização da membrana plasmática a corantes de alto peso molecular (16, 120, 183), entretanto nenhum desses subtipos foram amplamente descritos como o receptor P2X7.

Assim como apresentado na introdução, a natureza desse poro na membrana plasmática é debatida (11, 293) e sua identificação pode levar ao desenho de estratégias terapêuticas baseadas no receptor P2X7 (22). Tais estratégias tem o potencial de ser aplicado no tratamento de tumores (270) e no desenvolvimento de novos anti-inflamatórios (294). Nesse sentido, esse trabalho se propôs a investigar a possível dilatação do canal do receptor P2X7, que levaria a abertura de um poro na membrana capaz de permitir a entrada de moléculas de alto peso molecular. Para tal, desenvolvemos um métodos de evidenciar a permeabilização da membrana plasmática a fluoróforos de ligação ao DNA de alto peso molecular. Além disso, estabelecemos um modelo de expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T utilizando lipofecção para, por fim, realizar o ensaio de acessibilidade à cisteína com o objetivo de verificar a acessibilidade de um resíduo de cisteína inserido no segundo domínio transmembrana do

receptor P2X7 a o composto metanotiosulfonado MTSEA-biotina. Todavia, foi possível observar que há uma via de permeabilização da membrana plasmática independente do receptor P2X7, o que pode ser um peça chave no entendimento dos efeitos do ATP nas células.

A combinação de ensaios de eletrofisiologia e captação de corantes fluorescentes tem sido as principais ferramentas na investigação da natureza da permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular através da ativação do receptor P2X7 (13, 193). Embora essas abordagens tenham revelado inúmeras propriedades desse fenômeno, elas falharam em responder, de maneira clara, se o próprio canal catiônico não seletivo do receptor P2X7 entra em um estado dilatado ou se ele iniciaria uma cascata de sinalização que levaria uma outra proteína a formar um grande poro na membrana plasmática. Esse fato se deve algumas inconsistências na observações frente a cada uma das teorias propostas. Por exemplo, poucos grupos puderam relatar a abertura de um canal de alta condutância em ensaios de canal unitário na membrana plasmática (193, 195, 198). Por outro lado, já foi demonstrado que resíduos no segundo domínio transmembrana do receptor P2X7 e do receptor P2X2 são acessíveis a compostos metanotiosulfonados de alto peso molecular, como o MTSEA-biotina e o MTS-rodamina, o que sugere que o canal possa assumir um estado conformacional dilatado. A teoria que o macroporo é formado por uma outra proteína, que não o receptor P2X7, é sustentada pela observação que o bloqueio gênico ou farmacológico da panexina podem bloquear a captação de moléculas de alto peso molecular induzida pela ativação do receptor P2X7(204). Todavia, a necessidade da panexina para a formação do macroporo foi observada apenas em alguns tipos celulares ou em determinadas condições experimentais (204, 218). Recentemente ainda foi sugerido que os receptores TRPA e TRPV pode formar um macroporo na membrana em decorrência da ativação do receptor P2X7. Contradições como essa já foram observadas em outros canais, como para o CFTR. Como citado anteriormente, uma mutação nesse canal afeta sua atividade e contribui para a patologia da fibrose cística (295). Durante muitos anos várias teorias foram propostas para explicar a influência desse canal para a secreção adequada de muco pelo epitélio pulmonar nos acinos pancreáticos (99). Essas teorias eram baseadas em dados muitas vezes não replicáveis, muito devido a problemas na metodologia de concepções assumidas na época. Por exemplo, o nome do canal (regulador transmembrana da fribrose cística)

era devido a concepção de que ele era uma proteína que regulava a secreção de Cl⁻ (99). Contudo, o estabelecimento e padronização de novas técnicas para o estudo do muco pulmonar, aumentaram nosso conhecimento sobre essas proteínas, revelando inclusive que ela era um canal de Cl⁻(98). Esse conhecimento vem melhorando a nossa capacidade de compreender como é formado o muco do epitélio pulmonar e permitir o desenho de estratégias terapêuticas que podem ser aplicadas na prática clínica (295). Uma vez que a atividade receptor P2X7 parece ser importante tanto em locais inflamados (22) como no microambiente tumoral (18), é necessário a compreensão do seu mecanismo de formação do macroporo para que possamos explorar como a modulação desse fenômeno possa ser aproveitada na prática clínica.

O uso de corantes fluorescentes se destaca como a abordagem mais utilizada na literatura para evidenciar a permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular, devido à simplicidade dos ensaios e relativo baixo custo. Além disso, a propriedade de alguns corantes de serem relativamente impermeáveis a membrana plasmática e emitir mais fluorescência quando ligado ao DNA é bastante útil uma vez que torna mais fácil detectar a sua presença dentro da célula, uma vez que o sinal do corante dentro da célula é maior do que quando no meio extracelular. Nesse sentido, qualquer aparelho capaz de excitar tais corantes em seu comprimento de absorção e detectar a faixa de fluorescência emitida dentro dos comprimentos adequados é potencialmente capaz de evidenciar a permeabilização da membrana plasmática a esses corantes. Logo, técnicas como aquisição em leitores de placas (131, 191), microscopia de fluorescência (13, 184, 218) e citometria de fluxo (179, 186, 279) vem sendo usadas no estudo do poro associado ao receptor P2X7. A aquisição no leitor de placas é simples e rápida, logo tem sido a alternativa mais usada em ensaios de alta vazão, como os usados na descoberta e caracterização de novos bloqueadores (130, 131, 296), entretanto, essa abordagem não nos permite observar o fenômeno célula a célula, uma vez que adquirimos o valor global de fluorescência de cada poço. Na citometria de fluxo e na microscopia de fluorescência podemos observar o fenômeno célula a célula, entretanto, na primeira abordagem há o inconveniente da necessidade do uso da tripsina em células aderentes e a relativa demora, em relação ao leitor de placas, já que é necessário fazer a leitura de uma condição experimental por vez. Na microscopia de fluorescência também podemos observar a permeabilização célula por célula e, atualmente, com o desenvolvimento e

aplicação de câmeras CCD e softwares de aquisição, podemos registrar com bastante precisão o fenômeno de permeabilização, contudo, dentre todas as abordagens essa se mostra a mais demorada, por também ser executada uma condição experimental por vez, e complexa devido a necessidade de câmaras especiais para o microscópio e uso de sistemas de perfusão para os tratamentos.

O método escolhido para o desenvolvimento desse trabalho foi a leitura dos corantes permeabilizados em um leitor de placas. Nesse sentido, desenhamos um método que utiliza a leitura de fluorescência em diferentes etapas para evitar o aparecimento de artefatos na medida (Figura 4.1). Além disso, como mostrado anteriormente, o nosso método produz uma janela de trabalho maior do que a leitura direta dos corantes permeabilizados (Figura 4.6). Todavia, esse método é adequado somente a corantes capazes de se ligar ao DNA e emitir mais fluorescência de quando livre em solução. A ausência de passos de lavagem classifica o método como homogêneo. Esse tipo de método é empregado pela indústria farmacêutica em ensaios de alta vazão, como na busca por novos agonistas ou antagonistas. Nesse contexto, ensaios homogêneos são preferido, em detrimento de ensaios heterogêneos, devido a simplicidade, rapidez e o potencial de automação do método, o que é útil quando são testados muitos compostos. Contudo, não exploramos nesse trabalho a possibilidade de empregar o nosso ensaio de permeabilização a ensaios de alta vazão. A ausência de passos de lavagem também é importante ao se trabalhar com células de baixa aderência a placa, como por exemplo as células HEK293T. Essas células se destacam com facilidade, mesmo com o tratamento com poli-L-lisina. Logo, procedimentos de lavagem podem afetar a quantidade de células no poço. Além disso, como é possível ver na Figura 4.16, a lavagem também parece a afetar a permeabilidade da membrana plasmática.

Nesse trabalho utilizamos 3 fluoróforos capazes de se ligar ao DNA: o iodeto de propídio, o YO-PRO1 e o EVAGreen. O iodeto de propídio e o YO-PRO1 são amplamente usadas em ensaios de morte celular e suas estruturas moleculares são bem conhecidas (Figura 4.3a, b e d). Por outro lado, o EVAGreen é protegido por patente e seu fabricante não revela a fórmula molecular exata. Entretanto, a busca pela sua estrutura molecular nos levou a uma patente de um kit de PCR em tempo real na qual o autor da patente mostra uma estrutura a qual ele atribui ao EVA-Green

(Figura 4.3c). O fabricante afirma que o EVA-Green possui um mecanismo de supressão da fluorescência quando em solução que acontece pelo fato de que a estrutura molecular consiste em dois monômeros de corante ligados por uma cadeia flexível (Figura 4.3c), que permite que os monômeros se aproximem e façam interações fracas. Devido ao baixo desvio de Stokes (Abs: 500 nM/Em: 520 nM), ocorre uma autosupressão entre a fluorescência emitida pelos monômeros por proximidade. Quando próximo o suficiente ao DNA, a interação entre os monômeros é desfeita e ao intercalar as bases do DNA eles ficam distantes o suficiente para emitir fluorescência.

Como mostrado na introdução (Figura 1.16), muitas moléculas já foram utilizadas na literatura no estudo do poro formado após a ativação do receptor P2X7 (297). Logo, a partir dessas informações, podemos estimar o tamanho do poro associado ao receptor P2X7. Classicamente, é afirmado que o receptor P2X7 é permeável a moléculas de até 900 Da. Contudo, alguns autores discutem os dados em função do diâmetro efetivo da molécula, que seria a segunda menor medida das coordenadas $x/y/z$, o que é mais adequado, uma vez esta seria a medida necessária para se interpretar a ocupação mínima de um corpo no espaço atravessando uma passagem estreita (Figura 1.16i). Já foi demonstrado que os corantes catiônicos: brometo de etídio (13, 183, 184, 191, 193, 204), YO-PRO-1 (203, 298), DAPI (187) e Hoechst 33258 (187) podem passar pelo poro associado à ativação do receptor P2X7. Todavia, a entrada de iodeto de propídio é observada por alguns grupos (186, 219) mas não por outros (179, 187). A diferença entre as observações pode ter duas explicações: (1) diferenças no método ou condições experimentais utilizadas, uma vez que esses parâmetros variam de trabalho para trabalho; ou, (2) que a via de permeabilização associada ao receptor P2X7 pode estar ligada a diferentes proteínas formadoras de poro em diferentes tipos celulares, onde alguns poros podem ter dimensões suficientes para passar o iodeto de propídio e outros não. A segunda explicação será discutida com detalhes adiante. Corantes aniônicos também pode ser permeabilizados através da ativação do receptor P2X7 como o *Lucifer Yellow* (188, 197, 219) e o FITC (13). Há divergências sobre o diâmetro das moléculas relatadas em diferentes publicações, contudo, nenhuma cita como foi feita a medida, logo não há como discutir as possíveis causas dessa diferença. Por exemplo, Browne *et al* reportam que o brometo de etídio teria segunda menor dimensão, nas coordenadas $x/y/z$, de 1,1 nm (13) enquanto Bukhari *et al* relatam 0,8 nm (187). Nossas medidas do brometo

de etídio, feitas através da medição dos limites dos raios de van der Waals da reconstrução da molécula feita no software *PyMol*, corroboram com as medidas de Browne *et al* (Figura 1.16). Nesse trabalho, mostramos a permeabilização ao iodeto de propídio, que calculamos que teria como diâmetro efetivo de 1,2 nm, (Figura 1.16), e dessa maneira estimamos que o diâmetro do poro associado a ativação do receptor P2X7 seja superior a esse valor. Assumindo a estrutura do EVAGreen mostrada na figura 4.3, podemos estimar que as suas dimensões efetivas são similares ao do iodeto de propídio. Outras moléculas, com dimensões tão grandes quanto o iodeto de propídio (1,2/1,2/0,9 nm) como os corantes aniônicos Lucifer Yellow (1,2/1/0,3 nm) e FITC (1/0,8/0,7 nm) (Figura 1.16), também podem passar pelo poro associado ao receptor P2X7 e reforçam a ideia de que o diâmetro do poro é maior que pouco mais que 1 nanometro. Uma vez que estabelecemos as condições ótimas do experimento de permeabilização, buscamos otimizar a expressão heteróloga do receptor P2X7 nas células HEK293T.

Nesse trabalho, a lipofecção (299) foi o método de escolha para a transfecção e a consequente expressão heteróloga do receptor P2X7. Esse método é utilizado em diversos trabalhos envolvendo a expressão heteróloga dos receptores P2X em células HEK293T (13, 184, 191). Contudo, há apenas uma descrição vaga do processo de transfecção, com poucos ou nenhum detalhe sobre as quantidades de células e/ou reagentes utilizados. Dessa maneira, determinamos as condições para ter uma eficiência máxima de expressão, uma vez que baixos níveis de expressão podem resultar em uma permeabilização insatisfatória altos níveis de expressão podem ser prejudiciais a célula, uma vez que a super-expressão de proteínas de membrana ou o excesso de compostos de lipofecção podem ser tóxicos à célula (299, 300). A lipofecção é baseada na mistura entre o DNA plasmidial de interesse e uma combinação de lipídeos catiônicos e lipídeos neutros (299). O princípio se baseia em que as moléculas de DNA plasmidial possam interagir com a cabeça polar dos lipídeos catiônicos através das interação eletrostática com as cargas negativas dos grupamentos fosfato das bases do DNA (299, 301). Além disso, os lipídeos neutros iriam interagir com esses lipídeos catiônicos formando complexos moleculares estáveis denominados lipoplexos (301). Essas estruturas interagem com a membrana plasmática e são endocitados, chegando ao núcleo (302) onde, após a dissociação dos lipoplexos (303), as regiões de interesse do plasmídeo possam ser transcritas em RNA-mensageiro ou,

dependendo do plasmídeo, ainda integradas ao DNA genômico. As primeiras formulações de lipofecção foram feitas por Felgner *et al*, e apresentaram uma eficiência de até 100 vezes em relação ao método utilizando fosfato de Ca^{++} , dependendo do tipo celular e do plasmídeo utilizado (299). Uma vez internalizado, os lipoplexos podem ter dois destinos: difusão até núcleo, através do movimento browniano ou associação ao citoesqueleto seguido pelo transporte ativo, através de microtúbulos, até o lisossomo, para posterior degradação (304). Nesse sentido, a razão entre os dois destinos possíveis dos lipoplexos determina, em parte, a eficiência de transfecção (304). A Lipofectamina™ é uma formulação comercial de lipídeos neutros e catiônicos a qual o fabricante não fornece a composição. Desde seu lançamento em 1993, 3 diferentes gerações de formulações já foram desenvolvidas: Lipofectamina™, Lipofectamina 2000™ e Lipofectamina 3000™. A Lipofectamina™ apresenta maior eficiência quando comparada a outras formulações de lipídeos catiônicos/neutros (304, 305). Nesse sentido, Cardarelli *et al* exploraram os mecanismos celulares por trás dessa eficiência. Os lipoplexos formados pela Lipofectamina™ majoritariamente se difundem pelo citoplasma até atingir o núcleo. Em contraste, as demais formulações utilizadas predominantemente se associam à microtúbulos logo após sua entrada na célula e são endereçadas para a degradação no lisossomo (304). Contudo, o desconhecimento da composição da Lipofectamina impede que saibamos mais sobre os mecanismos físico-químicos por trás desse fenômeno. Além da lipofecção e do método de cloreto de Ca^{++} , outras formas de transfecção pode ser feitas, como a micro injeção e a utilização de “pinças-ópticas”, para internalizar o DNA. Essas abordagens são adequadas apenas a um pequeno número de células, como experimentos de eletrofisiologia em oócitos de *X. laevis* (306), uma vez que o procedimento tem de feito individualmente para cada célula. Logo, devido à alta eficiência da lipofecção (136, 304) e sua praticidade, esse foi o método de escolha nesse trabalho. Nesse sentido, utilizando a última formulação lançada, a Lipofectamina 3000™. A lipofecção levou a expressão do receptor P2X nas células HEK293T com uma expressão e resposta de permeabilização similar a observada nos macrófagos de camundongo J774.G8. A variante de camundongo do receptor P2X7 produz uma permeabilização mais intensa que a variante humana quando é analisado célula a célula por microscopia de fluorescência(184). Contudo, nossos ensaios de imunofluorescência sugerem que há uma densidade e distribuição diferente de receptores como mostrado na figura 4.8, sugerindo

uma maior densidade de receptores por célula nas células HEK293T transfectada, principalmente nas concentrações de Lipofectamina 3000 de 0,15% e 0,3% (Figura 4.8c-f). Por outro lado, todos os macrófagos J774.G8 expressam o receptor P2X7 mas em uma densidade menor por células (Figura 4.8g).

Foi possível observar uma correlação entre a entrada de iodeto de propídio na ausência de ATP e a expressão do receptor P2X7, o que não parece estar relacionado com a alguma toxicidade da Lipofectamina 3000 (Figura 4.9d) mas sim com a expressão do receptor P2X7 através do plasmídeo. Esse fato pode representar a atividade basal do receptor P2X7 ativado pelo ATP liberado pelas próprias células. Consistente com essa explicação, Adinolfi *et al* mostraram que a ativação basal do receptor P2X7 expresso heterologicamente em células HEK293 aumenta a concentração intracelular de Ca^{++} (282). Além disso, Faria *et al* mostraram que a ionomicina, um ionóforo de Ca^{++} é capaz de promover a permeabilização de células HEK293T ao brometo de etídio (194). A atividade metabólica, evidenciada pela técnica de MTT, não apresentou diferença entre as condições de transfecção de 0,15% e 0,3% de Lipofectamina 3000 (Figura 4.9d), embora tenha havido uma grande diferença na entrada de iodeto de propídio na ausência de ATP (Figura 4.9a e d). Contudo, a análise da atividade metabólica nesse caso deve ser feito com cautela. A atividade basal do ATP, liberado pelas próprias células e pelas células vizinhas, no receptor P2X7 expresso heterologicamente em células HEK293T aumenta a atividade mitocondrial(282). Logo, embora a super-expressão do receptor P2X7 possa ter um efeito nocivo em determinados níveis, o aumento da atividade mitocondrial pode superestimar o resultado do MTT. Por outro lado, a liberação de lactato desidrogenase aumenta entre as concentrações de 0,15% e 0,3% de Lipofectamina 3000, indicando que mesmo que atividade mitocondrial possa estar aumentada, as células estão perdendo a integridade da membrana plasmática, sugerindo que eles estão entrando em necrose. Além disso, a liberação de lactato desidrogenase na concentração de 0,3% de Lipofectamina 3000 pode estar subestimada, uma vez que nessa condição a taxa de proliferação parece ser menor (Figura 4.8f e 4.9f). Assim, super-expressão do receptor P2X7 na membrana pode prejudicar as propriedades da mesma em se manter íntegra. Consistente com essa explicação, a super-expressão de proteínas de membrana é muitas vezes tóxicas tanto em sistemas procariotos

quanto eucariotos, o que é uma das principais barreiras na produção dessas proteínas em larga escala, como para estudos estruturais.

Para nossa surpresa, observamos que a célula HEK293T permeabilizou ao iodeto de propídio quando tratada com 5 mM de ATP. Dados não publicados do nosso grupo mostram, por RT-PCR, que a célula HEK293T utilizadas no presente trabalho não transcrevem o RNA-mensageiro do receptor P2X7 (307). Além disso, como pode ser observado na figura 4.8a e c, essa célula não apresenta imunomarcção para o P2X7 tanto por *Western Blot* quanto por imunofluorescência (Figura 4.8). As células HEK293 e HEK293T são amplamente usadas no estudo de receptores P2X, tanto para a caracterização dos receptores expressos heterologicamente quanto para os estudos envolvendo mutantes. A diferença entre dois subtipos se refere à capacidade da variante 293T de expressar o *SV40 large T antigen*, uma proteína capaz de ligar no promotor do vírus símio 40 (*SV40 – simian virus 40*), que está presente no plasmídeo utilizado nesse trabalho, aumentando a expressão de genes próximos (308). No demais, esses dois subtipos de células HEK293 apresentam pouca variação na sua expressão gênica (309). É desejável que em um sistema de expressão heteróloga, a célula não expresse constitutivamente a proteína de interesse. Entretanto, inúmeros trabalhos que utilizam a expressão heteróloga de receptores P2X em células HEK293 não mostram se a célula utilizada expressa ou não o receptor P2X em questão, com exceção dos trabalhos publicados por Browne *et al* (13) e Schachter *et al* (197), que mostraram que as células HEK293T e HEK293, respectivamente, não expressavam o receptor P2X7. Todavia, Worthington *et al* observaram que as células HEK293 apresentavam todos os subtipos P2X, com exceção do subtipo P2X2 (o subtipo P2X7 não foi analisado nesse trabalho) (310). Contudo, a expressão era somente observada em células com alta confluência. Contudo, outros trabalhos são necessários para dar suporte aos achados de Worthington *et al*. Como citado anteriormente, a ativação dos receptores P2X2 e P2X4 também podem levar à permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular (16, 120, 183, 311). Se esses subtipos estiverem promovendo a permeabilização das células HEK293T, seria esperado que concentrações menores que 5 mM de ATP seriam necessárias para promover a permeabilização. Na literatura, os trabalhos que observaram a permeabilização via receptores P2X2 e P2X4 conseguiram tal com concentrações de 30-300 μ M e (16, 183, 311) 100-300 μ M (120, 311),

respectivamente. Contudo, foi possível observar que a permeabilização ocorreu apenas em concentrações acima de 1 mM, logo, nossos dados sugerem que a permeabilização da células HEK293T não depende de outros subtipos P2X. Nesse sentido, decidimos investigar algumas características dessa via de permeabilização com o objetivo de elucidar as proteínas envolvidas nesse processo.

Como citado anteriormente, há evidências publicadas na literatura de que a panexina está envolvida na permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular desencadeada pelo ATP (204, 223, 224, 312). Em contraste, parece não haver necessidade da panexina na permeabilização induzida pela ativação do receptor P2X7 em alguns tipos celulares (217, 218) ou com alguns *splice* variantes do receptor, como o P2X7k (223). Essas observações sugerem que o poro associado ao receptor P2X7 possa ser célula ou variante específico (11). Acredita-se que na células em que a panexina é importante para a permeabilização, a ativação do receptor P2X7 desencadearia sinais intracelulares que culminariam na sua ativação (224). O poro da panexina pode ser aberto por despolarização da membrana (198), aumento do Ca⁺⁺ intracelular (207) ou pela clivagem do seu domínio C-terminal (215). O receptor P2X7 é capaz de levar a despolarização da membrana (12) e aumentar o Ca⁺⁺ intracelular (116), logo é possível que ele seja capaz de ativar a panexina por algumas das vias conhecidas. (221). Assim, podemos observar na Figura 4.10f que o tratamento com probenecida, um antagonista da panexina, bloqueou cerca de metade da permeabilização nas células HEK293T, o que sugere a participação da panexina nessa via. Contudo, na ausência do receptor P2X7 (Figura4.8), outra proteína deve estar sendo ativada pelo ATP que por sua vez iria ativar a panexina, já que ela não pode ser ativada diretamente pelo ATP (207). Nesse sentido, Locovei *et al*, mostraram que oócitos de *X. laevis* injetados com RNA-m dos receptores P2Y₁ ou P2Y₂ juntamente com o RNA-m da panexina produziam correntes característica de panexina (207). Nesse mesmo estudo, ainda foi observado que o aumento de Ca⁺⁺ intracelular, tanto derivado dos estoques intracelulares em resposta a ativação dos receptores P2Y quanto pelo tratamento com ionóforos, eram essenciais para a abertura do poro da panexina. Consistente com essas observações, foi recentemente demonstrado que a ativação do receptor P2Y₂ com UTP em macrófagos leva a abertura do poro da panexina, em um mecanismo dependente de Ca⁺⁺ intracelular e citoesqueleto, desencadeando

a liberação de ATP para o meio extracelular, que pode ainda levar a ativação do receptor P2X7 (313). É descrito na literatura que as células HEK293 apresentam expressão endógena dos receptores P2Y₁ e P2Y₂ (314). Além disso, Faria *et al* mostraram que o tratamento com ionóforos de Ca⁺⁺ também levavam a permeabilização tanto de células que expressam o receptor P2X7, como culturas primárias macrófagos, quanto em células que não expressam o receptor P2X7, como as células HEK293 (193, 194). O ATP é capaz de ativar os receptores P2Y₁ (39) e P2Y₂ (49) como agonista parcial e completo, respectivamente. Além disso, esses subtipos estão associados a ativação da PKC, levando ao aumento do Ca⁺⁺ intracelular (39, 49). Levando em consideração essas informações, é possível que a via de permeabilização independente do receptor P2X7 na célula HEK293T poderia ser desencadeada pela ativação de receptores P2Y, que levariam ao aumento do Ca⁺⁺ intracelular e ativariam a panexina. Embora a concentração de ATP necessária para produzir a permeabilização da célula HEK293T (Figura 4.10a – [$> \text{mM}$]) seja alta quando comparado a necessária para ativar os subtipos P2Y₁ (39) e P2Y₂ (49), Locovei *et al* observaram que a amplitude da corrente produzida pelo tratamento com ATP em oócitos de *X. laevis*, injetados com o RNA-m da panexina e dos receptores P2Y₁ ou P2Y₂, não saturava em até 1 mM (207). Para verificar a possibilidade do envolvimento do receptor P2Y₂, fizemos o ensaio de permeabilização relativa em células HEK293T utilizando o UTP como agonista. Podemos ver na figura 4.10e que o UTP não foi capaz de desencadear a permeabilização das células HEK293T em concentrações até 50 μM , o que sugere que esse efeito não depende do receptor P2Y₂. Será necessário fazer o mesmo ensaio utilizando o ADP para testar o envolvimento do receptor P2Y₁. Além disso, serão realizados ensaios com ionóforos de Ca⁺⁺ para confirmar o seu envolvimento na permeabilização.

Como pôde ser observado na figura 4.11, o tratamento com ATP nas células HEK293T desencadeou uma corrente macroscópica. Corroborando com essa visão Schachter *et al* e Noremborg *et al* também observaram correntes macroscópicas, mediante ao tratamento com concentrações milimolares de ATP, em células HEK293 (197) e células HEK293T (298), respectivamente por *patch-clamp* modalidade *whole-cell*. Todavia, Noremborg *et al* mostraram que essas correntes eram geradas em virtude de um efeito indireto do ATP no receptor TRPM7 (*transient receptor potential melastatin 7*). O receptor TRPM7 faz parte da grande família de

canais TRP (*transient receptor potential*) (315). O canal do subtipo TRPM7 ainda é associado a um domínio cinase intracelular (316), fazendo com que esse subtipo seja conhecido como “canal-cinase”. Essa proteína desempenha papel fundamental na regulação da homeostase do Mg^{++} (317), promovendo o seu transporte para o citoplasma (318). Contudo a acumulação intracelular de Mg^{++} promove a inibição do próprio TRPM7 através da interação com o seu domínio citoplasmático (319). Além disso, o canal do TRPM7 é inibido, de maneira voltagem dependente, pelo Ca^{++} extracelular, logo a depleção desse íon ou a mudança no potencial da célula promove a abertura do canal (318). Durante a ativação do TRPM7, o domínio cinase intracelular promove fosforilação tanto em si próprio (320) quanto de outros alvos (321-323), desencadeando sinais que regulam diferentes eventos celulares. O ATP tem a capacidade de agir como um quelante de íons divalentes (324) e, levando em consideração as altas concentrações de ATP utilizadas nos experimentos, ele teria a capacidade depletar o Ca^{++} extracelular e desinibir o canal TRPM7. Nesse sentido, Noremborg *et al* mostraram em células HEK293T e células de glioma de rato C6, que a depleção do Ca^{++} , pela perfusão de uma solução extracelular livre de Ca^{++} , produzia correntes idênticas às observadas com o tratamento com ATP (298). Além disso, as duas correntes podiam ser inibidas pelo Mg^{++} intracelular. Para mais, antagonistas específicos e o bloqueio da expressão do receptor TRPM7 por siRNA também foram capazes de abolir essas correntes. Em contraste com as nossas observações, Noremborg *et al* não observaram a captação de YO-PRO-1 em decorrência ao tratamento com ATP nas células HEK293T e C6. Por outro lado, embora Schachter *et al* tenham afirmado que a célula HEK293 não permite a entrada de brometo de etídio mediante ao tratamento com ATP, o dado apresentado nesse trabalho não mostra claramente isso. A inspeção visual das fotos de microscopia de fluorescência mostradas nesse trabalho dão a impressão que há uma entrada de brometo de etídio na células que, assim como nas nossas observações, é menor do que a observada na célula HEK293T-P2X7 (197). Para o nosso conhecimento, não há trabalhos mostrando a capacidade do TRPM7 de promover a permeabilização de corantes como iodeto de propídio, contudo o subtipo TRPM8 é capaz de levar a permeabilização do corante POPRO3 e da droga N-etil-lidocaína quando ativado pelo seu agonista mentol (325). Logo, é possível que a desinibição do canal TRPM7, causada pelo efeito quelante do ATP nos Ca^{++} extracelular, esteja correlacionada com a via de permeabilização

independente do receptor P2X7. De acordo com essa ideia, o vermelho de rutênio, um inibidor geral dos receptores TRPs, capaz de também inibir o TRPM7 (326), bloqueou parte da permeabilização ao iodeto de propídio, induzida pelo ATP, em astrócitos murinos (219). Logo, a possível permeabilização mediada pelo receptor TRPM7 também pode ser explicada de duas maneiras: (1) pela passagem direta das moléculas de alto peso molecular pelo canal TRPM7 ou (2) pela ativação de uma segunda proteína que iria formar o poro na membrana.

Já foi demonstrado que o tratamento com ATP leva ao rearranjo do citoesqueleto e conseqüentemente mudanças na morfologia da célula (192, 327). Além disso, drogas que perturbam a dinâmica do citoesqueleto diminuem a permeabilização a moléculas de alto peso molecular desencadeada pelo ATP sem afetar a atividade do canal do receptor P2X7 (183, 194) ou mesmo em células que não expressam o receptor P2X7, como as células HEK293 (194). Além disso, Nesse sentido, Gu *et al* mostraram que a miosina de cadeia pesada IIA, uma proteína motora capaz de se associar ao citoesqueleto, co-immunoprecipita com o receptor P2X7(208). Além disso, esses autores também mostraram a ativação do receptor P2X7 pelo ATP levou a dissociação da miosina de cadeia pesada IIA do receptor e o seu bloqueio farmacológico diminuiu a permeabilização ao brometo de etídio induzida pelo ATP. Esses dados sugerem que a ativação do receptor P2X7 afeta a associação da miosina de cadeia pesada IIA com o citoesqueleto e esse fenômeno precede a permeabilização induzida pelo ATP. Coincidentemente, a atividade de cinase do TRPM7 é capaz de fosforilar a miosina de cadeia pesada IIA e afetar sua associação com o citoesqueleto(323). Nesse sentido, células expressando mutantes da miosina IIA, que as tornam incapazes de serem fosforiladas pelo domínio cinase do TRPM7, não se associam ao citoesqueleto e apresentam a distribuição intracelular diferente da variante WT. Logo, é possível que tanto a ativação do receptor P2X7 quanto a desinibição do receptor TRPM7 por altas concentrações (>mM) de ATP extracelular, afetem a associação da miosina IIA com filamentos de citoesqueleto que por sua vez desencadeariam a ativação de uma proteína formadora de poro na membrana plasmática. Nossos dados também mostraram que a probenecida bloqueou parte da permeabilização independente do receptor P2X7 desencadeada pelo ATP, sugerindo a participação da panexina. Nesse sentido, já foi observado que a panexina também é capaz de se associar ao citoesqueleto (328). Além disso, ela também pode ser ativada como um

mecanoceptor (329), através de deformações na membrana plasmática, assim como ocorre quando há a formação de *blebs* induzidos tratamento com ATP (em função também de modificações no citoesqueleto) (192, 327). Logo, também é possível que a panexina possa ser ativada tanto pelo receptor P2X7 quanto pelo receptor TRPM7 via modificações no citoesqueleto que iriam: (1) a ativar a panexina via associação direta com o citoesqueleto ou (2) em decorrência da distensão da membrana plasmática durante a formação de *blebs*. Nosso dados mostraram que de que a probenecida bloqueou apenas parte da permeabilização (cerca de 50%) de iodeto de propídio nas células HEK293T (Figura 4.10f) mesmo na concentração 2,5 mM, que é capaz de bloquear cerca de 90% das correntes da panexina expressas heterologicamente em oócitos de *X. laevis* (221). Dessa forma, há a possibilidade da participação de outras proteínas formadoras de poro na permeabilização. Nesse sentido, Faria *et al* observaram que antagonistas dos receptores TRPV1 e TRPA1 bloqueavam parcialmente a captação de iodeto de propídio em culturas primárias de astrócitos de camundongo (219) e células de Müller de galinhas (185) tratados com ATP. Além disso, esses autores mostraram que a combinação de antagonistas dessas duas proteínas formadoras de poro apresentavam efeito sinérgico em bloquear a captação de iodeto de propídio, sugerindo a sua participação conjunta no fenômeno (219). Tanto o receptor TRPV1 (187, 330) quanto TRPA (331) são conhecidas por também promoverem a permeabilização da membrana plasmática a corantes de alto peso molecular. Contudo, para o nosso conhecimento, não há dados na literatura correlacionando a atividade dos receptores TRPV ou TRPA com a dinâmica do citoesqueleto.

Há dados na literatura sustentando que exista diferença entre as proteínas formadoras de poro responsáveis pela captação de corantes catiônicos e aniônicos. Nesse sentido, pelo menos dois grupos diferentes mostraram que as células HEK293 expressando o receptor P2X7 eram capazes de permeabilizar o corante catiônico brometo de etídio mas não o aniônico *Lucifer Yellow* (14, 197). Corroborando com essas observações, foi recentemente demonstrado que antagonistas de canais maxi-ânions, proteínas capazes de formar um poro ânion seletivo de alta condutância na membrana plasmática, eram capazes de bloquear a maior parte da permeabilização a corantes aniônicos via ativação do receptor P2X7, embora causassem somente um bloqueio modesto na captação de corantes catiônicos (219). Curiosamente, o trabalho de

Schachter *et al* sugere que a permeabilização a corantes catiônicos, mas não aniônicos, depende de um transportador e não de um canal (197). Nesse sentido, foi mostrado que macrófagos podem promover o influxo, mas não efluxo, de sulforodamina B quando tratados com ATP. Por outro lado, o corante aniônico *Lucifer Yellow* podia ser tanto captado quanto liberado pela célula, suportando a hipótese de que essas moléculas seriam difundidas pelo canal aniônico de alta condutância maxi-ânion de acordo com seu gradiente de concentração (219). A explicação de que os corantes catiônicos são internalizados por um transportador alinha com o fato de que a probenecida é capaz de bloquear a captação de corante em certos tipos celulares, assim como pode ser observado na figura 4.10f, uma vez que essa droga é capaz de antagonizar a atividade de transportadores de solutos aniônicos (332) ou catiônicos (333). Contudo, esse bloqueio se deve a competição da probenecida com os solutos transportados em detrimento do antagonismo direto do transportador. Contudo, mais estudos replicando os dados de Shachter *et al* devem ser feitos para confirmar a reprodutibilidade das informações.

Baseados nos dados mostrados, podemos observar que a célula HEK293T forma um poro na membrana plasmática ativado por concentrações milimolares de ATP independente da ativação do receptor P2X7. Essa via de permeabilização não envolve a participação do receptor P2Y₂. Serão feitos ensaios de permeabilização com ADP pra verificar a participação de receptor P2Y₁ nessa via. Além disso, serão usados tanto ionóforos quanto quelantes intracelulares de Ca⁺⁺ para provar a participação desse íon na permeabilização das células HEK293T. Vamos também prosseguir com a identificação do canal desencadeado pelo tratamento com ATP nas células HEK293T, com o objetivo de confirmar desinibição do receptor TRPM7 pela depleção do Ca⁺⁺ extracelular e o uso de inibidores. Por fim, serão testados outros antagonistas da panexina bem como seu bloqueio genético por siRNA para confirmar sua participação na permeabilização. Nossos dados suportam a ideia que é possível que outras proteínas, como a panexina, possam formar o poro na membrana plasmática desencadeado pelo ATP. Além disso, nossos dados sugerem que outra proteína, que não o receptor P2X7, possa iniciar a cascata de eventos intracelulares que ativariam a panexina. Contudo, esses fatos não excluem a possibilidade de que o próprio receptor P2X7 poderia também dilatar a permitir a passagem direta de pelo menos

parte dos corantes. Nesse sentido, decidimos investigar a dilatação do receptor P2X7 por ensaio de acessibilidade à cisteína.

Em contraste com as observações de Schachter *et al*, o grupo liderado pelo professor Alan North demonstrou que o corante aniônico FITC era capaz de ser permeabilizado por células HEK293T transfectadas com o receptor P2X (13)7. Além disso, esses autores realizaram mutações pontuais no segundo domínio transmembrana do receptor P2X7 inserindo resíduos carregados tanto positivamente quanto negativamente. A análise de ensaios de permeabilização mostrou que a inserção de resíduos carregados negativamente aumentavam a permeabilização ao corante catiônico brometo de etídio e resíduos carregados positivamente aumentavam a captação do corante aniônico FITC. Esses dados sustentam que houve uma dilatação do canal do receptor P2X7 que permitia a passagem tanto de corantes aniônicos quanto de corantes catiônicos, uma vez que o potencial eletrostático do canal influencia a entrada de tais corantes. Além disso, Karasawa *et al* mostraram, em um sistema mais reducionista, que é possível o receptor P2X7 por si só permita a passagem de YO-PRO-1 pelo canal. Esses autores expressaram o receptor P2X7 em células de inseto SF9, extraíram e o solubilizaram o receptor com o auxílio de detergentes. Após a purificação do receptor P2X7, ele foi inserido em vesículas de diferentes composições lipídicas, contendo DNA em seu interior, e verificaram que havia a entrada de YO-PRO-1. Além disso, a acumulação de corante no interior da vesículas contendo o receptor P2X7 desencadeada pelo ATP ocorria de maneira dose-dependente (201). A dilatação do canal do canal do receptor P2X7 expresso também é sustentada pela acessibilidade de resíduos de cisteína inseridos no TM2 (que formam a parede do canal iônico) aos compostos metanotiosulfonados de alto peso molecular. Nesse sentido, Browne *et al*, mostraram que os resíduos G345C e T348 eram acessíveis aos compostos MTSEA-biotina e MTS-rodamina (13). A acessibilidade foi demonstrada tanto pelo bloqueio parcial da captação de brometo de etídio e das correntes observadas por patch-clamp modalidade whole-cell em células HEK293T, quanto pela precipitação dos receptores biotiniladas (devido a ligação do MTSEA-biotina ao resíduo de cisteína) com *beads* contendo avidina. A possível dilatação do receptor P2X2 também pode ser demonstrada por Li *et al*, onde a ligação do composto metanotiosulfonados MTSEA-rodamina ao resíduo T336 (presente também no TM2 do receptor P2X2) bloqueou a corrente gerada pelo NMDG⁺ (164). Corroborando com essa

observações, Harkat *et al* mostraram que frações excisadas de membrana de células HEK293T expressando o receptor P2X2 eram prontamente permeáveis ao NMDG⁺ (16). Além disso, esse grupo desenvolveu uma estratégia para a permitir a passagem do YO-PRO-1 pelo receptor P2X2 sem o tratamento com o agonista. Essa abordagem consistiu na inserção de cisteínas no segundo domínio transmembrana do receptor, no entanto, as células foram tratadas com compostos metanotiosulfonados que modificavam a estrutura molecular, estendendo ou contraindo, sob a irradiação de luz em determinados comprimentos de onda. Esses compostos se ligavam as cisteínas e presumivelmente induziam o afastamento nas hélices transmembrana que permitiam a passagem de Yo-Pro-1 pelo canal e também produziam corretes. Em contraste com essas observações, Pippel *et al* também verificaram a acessibilidade de resíduos presentes no segundo domínio transmembrana do receptor P2X7 a compostos metanotiosulfonados e maleamidas (também capazes de se ligar covalentemente à cisteína) em um sistema de expressão heteróloga baseado em oócitos de *X. laevis* (176). Contudo, esses autores observaram que o resíduos G345C não eram acessível ao composto maleamida-Cy6 e não permitiam a entrada de corantes de alto peso molecular.

Nesse trabalho, estamos desenvolvendo uma adaptação do ensaio de acessibilidade à cisteína para aplicar a permeabilização induzida pelo receptor P2X7 a corantes de alto peso molecular. Embora nossos dados preliminares também sugiram que o resíduo G345C seja acessível ao composto MTS-biotina, novos ajustes no protocolo são necessários para confirmar essa observação. Para mais, mostramos que pelo menos duas vias podem operar ao mesmo tempo produzindo a permeabilização nas células HEK293T-P2X7. Essa observação, pode basear uma teoria que englobe dados aparentemente conflitantes na literatura, onde diferentes tipos celulares poderiam iniciar diferentes vias de permeabilização dependentes ou não do receptor P2X7(11, 218). Baseados no nosso dados e nos da literatura, sugerimos 6 possíveis vias pelo o qual o ATP poderia estar levando a permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular (Figura 5.1). Logo, diferentes pontos dessa via podem ser explorados para possíveis abordagens terapêuticas. Por exemplo, a elucidação de uma dessas vias, em especial as independentes do receptor P2X7, podem revelar maneira de modular a abertura do macroporo, aumentando sua atividade levando a morte de células tumorais (264, 277-280) sem interferir com

a resposta imune contra o tumor (253, 273). Nesse sentido, foi mostrado que o aumento da atividade do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 por hipertermia clinicamente tolerável (40 °C) aumentou seu efeito citotóxico em células de linhagem de tumor intestinal (334). Em relação a dilatação do receptor, novos moduladores podem ser desenhados de maneira que desestabilizem o estado conformacional dilatado, preservando a atividade de canal e bloqueando a formação do macroporo. Tais ferramentas poderiam auxiliar na compreensão da influência do macroporo nos efeitos mediados pelo receptor P2X7 levando ao desenho de estratégias anti-inflamatórias mais eficazes do que as proporcionadas pelos atuais antagonistas (22). Contudo, para esse fim são necessários mais dados estruturais a respeito do receptor P2X7 ligado ao ATP e até o momento, não foi possível cristalizar adequadamente o receptor na presença de ATP (136, 137). O macroporo ainda pode servir de mecanismo de entrada de moléculas de difícil penetração na células. Nesse sentido, a ativação dos receptores TRPV1 e TRPM8 leva a abertura de um macroporo que permite a entrada de derivados hidrofílicos da lidocaína (325). Logo, esses bloqueadores podem se ligar ao seu alvo no domínio intracelular de canais de Na⁺ ativados por voltagem de neurônios sensoriais. Essa estratégia tem sido proposta para aumentar a especificidade dessas moléculas nas células alvo. Dentro desse contexto, tem sido proposto que a ativação do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 também pode ser usado como mecanismo de entrada para o azul de metileno na terapia fotodinâmica (335, 336). Assim, a permeabilização do azul de metileno pelo macroporo aumentou a sua toxicidade em um modelo de terapia fotodinâmica utilizando a linhagem de macrófagos J774.G8 (336). Essa observação deixa aberta a possibilidade de que, a elucidação das proteínas envolvidas na formação do macroporo em diferentes tipos celulares possa levar também ao desenvolvimento de estratégias de permeabilização de compostos citotóxicos de maneira personalizada para cada tipo de tumor, baseado na expressão de tais proteínas formadoras de poro de cada tipo de célula tumoral.

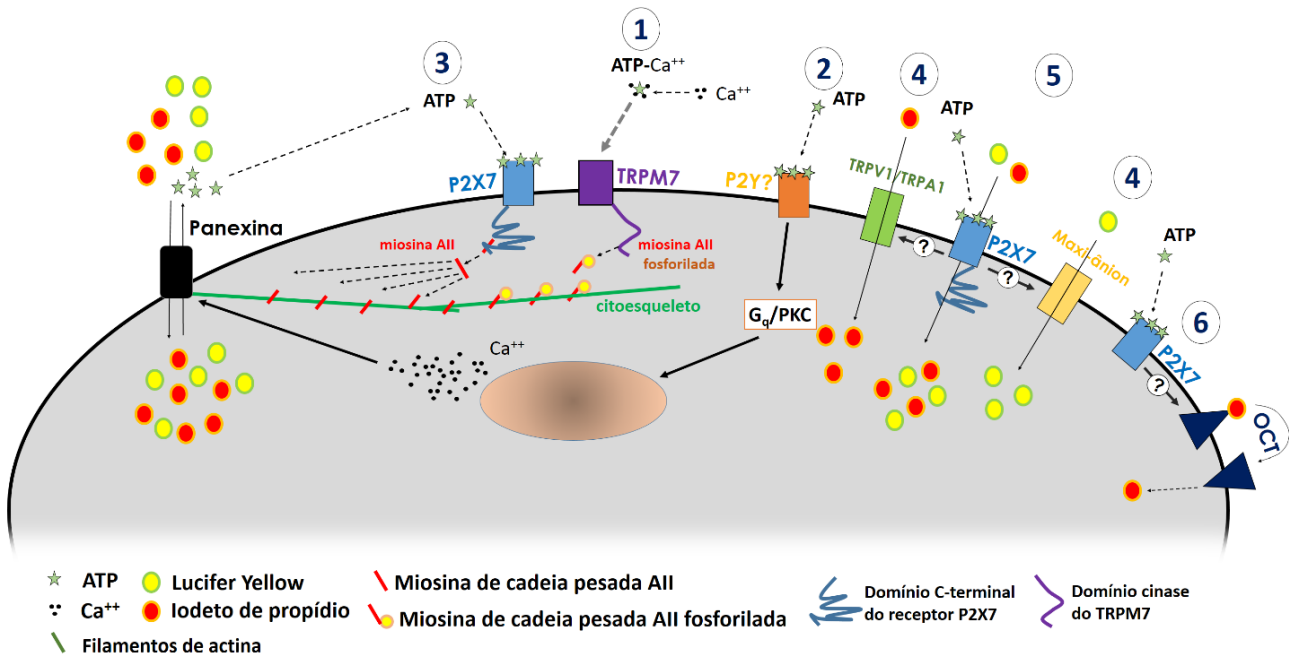


Figura 5.1 – Possíveis vias de permeabilização da membrana plasmática ativadas por ATP. As vias 1 e 2 são independentes e as 3-6 dependentes do receptor P2X7. (1) A depleção do Ca^{++} extracelular leva a desinibição do TRPM7 que por sua vez fosforila a miosina de cadeia pesada AII. Essa fosforilação permite que ela se associe corretamente a filamentos de actina promovendo mudanças no citoesqueleto e levando a abertura do poro da panexina por interação direta do citoesqueleto ou deformação da membrana plasmática. (2) o ATP ativa receptores P2Y associados a proteína G_q /PKC, levando ao aumento do Ca^{++} intracelular promovendo assim a abertura do poro da panexina. (3) A ativação do receptor P2X7 leva ao desligamento da miosina de cadeia pesada AII permitindo sua associação com o citoesqueleto e a possível interação com a panexina, assim como na via (1). (4) A ativação do receptor P2X7 leva, de maneira não conhecida, a ativação do TRPV1 ou TRPA1, permitindo a entrada de corantes catiônicos; e a ativação, via receptor P2X7, de canais maxi-ânion permitiria a entrada de corante aniônicos. (5) O canal do receptor P2X7 entra em um estado dilatado e permite a passagem tanto de corantes aniônicos quanto catiônicos. (6) O receptor P2X7 leva a ativação de um transportador de cátions orgânicos que move ativamente corantes catiônicos para o citoplasma. PKC: proteína cinase C, OCT: *organic cation transporter*.

6- Conclusões e perspectivas

Esse trabalho tem como perspectiva a produção de 3 artigos: os dois primeiros serão metodológicos, sobre o método de permeabilização e sobre os aspectos e otimização da expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T. O terceiro artigo será sobre as diferentes vias de permeabilização que o ATP pode desencadear nas células HEK293 que parecem envolver tanto a passagem das moléculas diretamente pelo canal do receptor P2X7 quanto por proteínas acessórias. Contudo, até os prazos estabelecidos pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da FIOCRUZ, não foi possível terminar os experimentos necessários, que serão realizados nos próximos meses.

No primeiro artigo, iremos abordar o ensaio de permeabilização relativa. Nesse contexto, pudemos achar as concentrações ótimas dos fluoróforos utilizados para o método e mostramos que ele possui passos de normalização intra-poço que são capazes de evitar artefatos e passos de lavagem, além de permitir a comparação de resultados entre corantes com intensidades de fluorescência diferentes. Nossos dados também mostraram que, dentro das condições experimentais utilizadas nesse trabalho, os passos de normalização aumentaram o valor do fator Z' em comparação a medida direta da fluorescência, o que mostra um ganho na janela de permeabilização induzida pelo ATP, em comparação ao controle, afetando minimamente a dispersão dos dados. Para finalizar os dados para a publicação, iremos comparar com diferentes métodos já publicados em leitores de placas quanto a eficiência e testar a permeabilização em outros tipos celulares.

Na segunda publicação, iremos abordar os aspectos da expressão heteróloga do receptor P2X7 em células HEK293T. Esse modelo de expressão é amplamente usado na literatura em estudos do receptor P2X7. Com os nossos resultados pudemos estabelecer condições ótimas de lipofecção. Além disso, nossos dados mostraram que a lipofecção do receptor P2X7 utilizando Lipofectamina 3000 alteram diferentes características nas células, como a atividade metabólica e a integridade da membrana plasmática. A compreensão dessas alterações é fundamental para a interpretação dos dados obtidos em tais modelos de expressão. Contudo, para melhorar nosso entendimento da influência dos componentes do processo de lipofecção nessas alterações,

realizaremos experimentos utilizando o plasmídeo vazio (PQCXIN sem a sequência do receptor P2X7 clonada) para testar a possível influência de outras características do plasmídeo nessas alterações. Além serão aumentados os *n* dos experimentos de imunofluorescência e liberação de lactato desidrogenase para se ter um perfil mais consistente destes dados. Os nossos dados de *Western Blot* e imunofluorescência mostraram os níveis de expressão globais e em cada célula, respectivamente. Contudo, no segundo caso, a avaliação foi predominantemente qualitativa. Para se ter a avaliação quantitativa, tanto dos níveis de expressão por célula e do número de células efetivamente transfectadas, iremos realizar experimentos de citometria de fluxo marcando as células com anticorpo anti-P2X7.

O terceiro artigo será sobre os mecanismos de permeabilização ativados pelo ATP. Nesse trabalho, estamos desenvolvendo uma adaptação do ensaio de acessibilidade à cisteína para aplicar a permeabilização induzida pelo receptor P2X7 a corantes de alto peso molecular. Contudo, houveram problemas com o mutante proposto G345C, o que até o momento inviabilizou a realização dessa técnica. Todavia, os nossos dados apontam que haja pelo menos duas vias, desencadeadas por ATP extracelular, que levam a permeabilização da membrana plasmática: uma dependente e uma independente do receptor P2X7. Baseados no nosso dados e nos da literatura, sugerimos 6 possíveis vias pelo qual o ATP poderia estar levando a permeabilização da membrana plasmática a moléculas de alto peso molecular (Figura 5.1). Logo, diferentes pontos dessa via podem ser explorados para possíveis abordagens terapêuticas. Por exemplo, a elucidação de uma dessas vias, em especial as independentes do receptor P2X7, podem revelar maneira de modular a abertura do macroporo, aumentando sua atividade levando a morte de células tumorais (264, 277-280) sem interferir com a resposta imune contra o tumor (253, 273). Nesse sentido, foi mostrado que o aumento da atividade do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 por hipertermia clinicamente tolerável (40 °C) aumentou seu efeito citotóxico em células de linhagem de tumor intestinal (334). Em relação a dilatação do receptor, novos moduladores podem ser desenhados de maneira que desestabilizem o estado conformacional dilatado, preservando a atividade de canal e bloqueando a formação do macroporo. Tais ferramentas poderiam auxiliar na compreensão da influência do macroporo nos efeitos mediados pelo receptor P2X7 levando ao desenho de estratégias anti-inflamatórias mais

eficazes do que a proporcionadas pelos atuais antagonistas (22). Contudo, para esse fim são necessários mais dados estruturais a respeito do receptor P2X7 ligado ao ATP e até o momento, não foi possível cristalizar adequadamente o receptor na presença de ATP (136, 137). O macroporo ainda pode servir de mecanismo de entrada de moléculas de difícil penetração na células. Nesse sentido, a ativação dos receptores TRPV1 e TRPM8 leva a abertura de um macroporo que permite a entrada de derivados hidrofílicos da lidocaína (325). Logo, esses bloqueadores podem se ligar ao seu alvo no domínio intracelular de canais de Na⁺ ativados por voltagem de neurônios sensoriais. Essa estratégia tem sido proposta para aumentar a especificidade dessas moléculas nas células alvo. Dentro desse contexto, tem sido proposto que a ativação do macroporo associado a ativação do receptor P2X7 também pode ser usado como mecanismo de entrada para o azul de metileno na terapia fotodinâmica (335, 336). Assim, a permeabilização do azul de metileno pelo macroporo aumentou a sua toxicidade em um modelo de terapia fotodinâmica utilizando a linhagem de macrófagos J774.G8 (336). Essa observação deixa aberta a possibilidade de que, a elucidação das proteínas envolvidas na formação do macroporo em diferentes tipos celulares possa levar ao também ao desenvolvimento de estratégias de permeabilização de compostos citotóxicos de maneira personalizada para cada tipo de tumor, baseado na expressão de tais proteínas formadoras de poro de cada tipo de célula tumoral.

8- Referências

1. Burnstock G, Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta physiologica*. 2009;195(4):415-47.
2. Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, Zhao C, Nichols CG, Ashcroft FM. A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(39):30046-9.
3. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental physiology*. 2014;99(1):16-34.

4. Fountain SJ. Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:247.
5. Cao Y, Tanaka K, Nguyen CT, Stacey G. Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. *Current opinion in plant biology*. 2014;20:82-7.
6. Zhong XZ, Cao Q, Sun X, Dong XP. Activation of lysosomal P2X4 by ATP transported into lysosomes via VNUT/SLC17A9 using V-ATPase generated voltage gradient as the driving force. *The Journal of physiology*. 2016;594(15):4253-66.
7. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews*. 2011;63(1):1-34.
8. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 2006;58(3):281-341.
9. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, et al. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*. 2001;53(1):107-18.
10. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*. 2011;63(3):641-83.
11. Alves LA, de Melo Reis RA, de Souza CA, de Freitas MS, Teixeira PC, Neto Moreira Ferreira D, et al. The P2X7 receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon? *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(10):2578-87.

12. Yan Z, Li S, Liang Z, Tomic M, Stojilkovic SS. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *The Journal of general physiology*. 2008;132(5):563-73.
13. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA. P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(8):3557-66.
14. Cankurtaran-Sayar S, Sayar K, Ugur M. P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Molecular pharmacology*. 2009;76(6):1323-32.
15. Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(5):1378-85.
16. Harkat M, Peverini L, Cerdan AH, Dunning K, Beudez J, Martz A, et al. On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(19):E3786-E95.
17. Skaper SD, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(2):337-45.
18. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 2017;36(3):293-303.
19. Morandini AC, Savio LE, Coutinho-Silva R. The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomedical journal*. 2014;37(4):169-77.

20. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*. 2017;47(1):15-31.
21. Savio LEB, de Andrade Mello P, da Silva CG, Coutinho-Silva R. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:52.
22. De Marchi E, Orioli E, Dal Ben D, Adinolfi E. P2X7 Receptor as a Therapeutic Target. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2016;104:39-79.
23. Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology*. 1929;68(3):213-37.
24. Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of physiology*. 1959;145(3):494-504.
25. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological reviews*. 1972;24(3):509-81.
26. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General pharmacology*. 1985;16(5):433-40.
27. Costenla AR, Cunha RA, de Mendonca A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20 Suppl 1:S25-34.
28. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(4):265-86.
29. Delacretaz E. Clinical practice. Supraventricular tachycardia. *The New England journal of medicine*. 2006;354(10):1039-51.

30. Johansson SM, Yang JN, Lindgren E, Fredholm BB. Eliminating the antilipolytic adenosine A1 receptor does not lead to compensatory changes in the antilipolytic actions of PGE2 and nicotinic acid. *Acta physiologica*. 2007;190(1):87-96.
31. Grenz A, Bauerle JD, Dalton JH, Ridyard D, Badulak A, Tak E, et al. Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) regulates postischemic blood flow during acute kidney injury in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(6):2438.
32. Liu XL, Zhou R, Pan QQ, Jia XL, Gao WN, Wu J, et al. Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates pathologic but not developmental angiogenesis in the mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(12):6625-32.
33. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(9):759-70.
34. Glukhova A, Thal DM, Nguyen AT, Vecchio EA, Jorg M, Scammells PJ, et al. Structure of the Adenosine A1 Receptor Reveals the Basis for Subtype Selectivity. *Cell*. 2017;168(5):867-77 e13.
35. Dore AS, Robertson N, Errey JC, Ng I, Hollenstein K, Tehan B, et al. Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure*. 2011;19(9):1283-93.
36. Tian S, Wang X, Li L, Zhang X, Li Y, Zhu F, et al. Discovery of Novel and Selective Adenosine A2A Receptor Antagonists for Treating Parkinson's Disease through Comparative Structure-Based Virtual Screening. *Journal of chemical information and modeling*. 2017;57(6):1474-87.
37. Verkhatsky A, Burnstock G. Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2014;36(7):697-705.

38. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology*. 2004;240:31-304.
39. Waldo GL, Harden TK. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Molecular pharmacology*. 2004;65(2):426-36.
40. Bodor ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK. Purification and functional reconstitution of the human P2Y12 receptor. *Molecular pharmacology*. 2003;64(5):1210-6.
41. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*. 2003;63(6):1256-72.
42. Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, Crane S, Wang J, et al. Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature*. 2015;520(7547):317-21.
43. Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, et al. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*. 2014;509(7498):115-8.
44. Zhang J, Zhang K, Gao ZG, Paoletta S, Zhang D, Han GW, et al. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature*. 2014;509(7498):119-22.
45. Jacobson KA, Muller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology*. 2016;104:31-49.
46. von Kugelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*. 2016;104:50-61.
47. Lazarowski ER, Rochelle LG, O'Neal WK, Ribeiro CM, Grubb BR, Zhang V, et al. Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target

for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(1):43-9.

48. Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, et al. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(15):10767-71.

49. Chen ZP, Krull N, Xu S, Levy A, Lightman SL. Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology.* 1996;137(5):1833-40.

50. Morrow GB, Nicholas RA, Kennedy C. UTP is not a biased agonist at human P2Y₁₁ receptors. *Purinergic Signal.* 2014;10(4):581-5.

51. Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, et al. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Molecular pharmacology.* 2003;64(1):104-12.

52. Kennedy C, Qi AD, Herold CL, Harden TK, Nicholas RA. ATP, an agonist at the rat P2Y₄ receptor, is an antagonist at the human P2Y₄ receptor. *Molecular pharmacology.* 2000;57(5):926-31.

53. Kauffenstein G, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor. *J Thromb Haemost.* 2004;2(11):1980-8.

54. Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(11):5113-7.

55. Qi AD, Zambon AC, Insel PA, Nicholas RA. An arginine/glutamine difference at the juxtaposition of transmembrane domain 6 and the third extracellular loop contributes to the markedly different nucleotide selectivities of human and canine P2Y₁₁ receptors. *Molecular pharmacology.* 2001;60(6):1375-82.

56. White PJ, Webb TE, Boarder MR. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Molecular pharmacology*. 2003;63(6):1356-63.
57. Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y₁ receptor. *Molecular pharmacology*. 1998;54(6):1118-23.
58. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, et al. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):41479-85.
59. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Molecular pharmacology*. 1996;50(2):224-9.
60. Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y₄ nucleotide receptor. *British journal of pharmacology*. 1998;124(3):428-30.
61. Carter RL, Fricks IP, Barrett MO, Burianek LE, Zhou Y, Ko H, et al. Quantification of G_i-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity reveals that UDP is a potent agonist of the human P2Y₁₄ receptor. *Molecular pharmacology*. 2009;76(6):1341-8.
62. Ko H, Das A, Carter RL, Fricks IP, Zhou Y, Ivanov AA, et al. Molecular recognition in the P2Y₍₁₄₎ receptor: Probing the structurally permissive terminal sugar moiety of uridine-5'-diphosphoglucose. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(14):5298-311.
63. Durnin L, Hwang SJ, Kurahashi M, Drumm BT, Ward SM, Sasse KC, et al. Uridine adenosine tetraphosphate is a novel neurogenic P2Y₁ receptor activator in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(44):15821-6.

64. Wiedon A, Tolle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, et al. Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(3):1035-40.
65. Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *British journal of pharmacology.* 1995;116(1):1619-27.
66. Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas RA, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, et al. Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor in human granulocytes. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(42):31419-29.
67. Chhatriwala M, Ravi RG, Patel RI, Boyer JL, Jacobson KA, Harden TK. Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(3):1038-43.
68. El-Tayeb A, Qi A, Muller CE. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors. *Journal of medicinal chemistry.* 2006;49(24):7076-87.
69. Maruoka H, Jayasekara MP, Barrett MO, Franklin DA, de Castro S, Kim N, et al. Pyrimidine nucleotides with 4-alkyloxyimino and terminal tetraphosphate delta-ester modifications as selective agonists of the P2Y(4) receptor. *Journal of medicinal chemistry.* 2011;54(12):4018-33.
70. Ginsburg-Shmuel T, Haas M, Schumann M, Reiser G, Kalid O, Stern N, et al. 5-OMe-UDP is a potent and selective P2Y(6)-receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry.* 2010;53(4):1673-85.

71. Meis S, Hamacher A, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Eckstein N, et al. NF546 [4,4'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-alpha,alpha'-diphosphonic acid) tetrasodium salt] is a non-nucleotide P2Y11 agonist and stimulates release of interleukin-8 from human monocyte-derived dendritic cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(1):238-47.
72. Beindl W, Mitterauer T, Hohenegger M, Ijzerman AP, Nanoff C, Freissmuth M. Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Molecular pharmacology.* 1996;50(2):415-23.
73. Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *British journal of pharmacology.* 1996;118(3):704-10.
74. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *British journal of pharmacology.* 1999;128(6):1199-206.
75. Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, et al. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *European journal of pharmacology.* 1992;217(2-3):217-9.
76. Jacobson KA, Boeynaems JM. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today.* 2010;15(13-14):570-8.
77. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001;409(6817):202-7.
78. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(11):1288-95.

79. Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, von Kugelgen I. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost.* 2008;6(11):1908-14.
80. Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(29):11069-74.
81. Huang J, Driscoll EM, Gonzales ML, Park AM, Lucchesi BR. Prevention of arterial thrombosis by intravenously administered platelet P2T receptor antagonist AR-C69931MX in a canine model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(2):492-9.
82. Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S. Comparison of the pharmacodynamic effects of the platelet ADP receptor antagonists clopidogrel and AR-C69931MX in patients with ischaemic heart disease. *Platelets.* 2002;13(7):407-13.
83. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:277-300.
84. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-34.
85. Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *Journal of Clinical Investigation.* 2001;108(1):25-30.
86. Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5(1):45-55.
87. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(2):234-46.

88. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(4):2030-4.
89. Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol*. 1998;103(3):858-66.
90. Conley PB, Delaney SM. Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y12 receptor in thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2003;10(5):333-8.
91. Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation*. 2010;121(1):171-9.
92. Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(3):F419-32.
93. Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR. Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(37):26461-8.
94. Ribeiro CM, Paradiso AM, Carew MA, Shears SB, Boucher RC. Cystic fibrosis airway epithelial Ca²⁺ i signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated Ca²⁺ i signals in human cystic fibrosis airway epithelia. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10202-9.
95. Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C. Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(11):1463-74.
96. Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*. 1996;335(3):179-88.

97. Donaldson SH, Galietta L. New pulmonary therapies directed at targets other than CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(6).
98. Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, et al. Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(5):627-34.
99. Moss RB. Pitfalls of drug development: lessons learned from trials of denufosol in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics.* 2013;162(4):676-80.
100. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Luminal ATP stimulates fluid and HCO₃⁻ secretion in guinea-pig pancreatic duct. *The Journal of physiology.* 1999;519 Pt 2:551-8.
101. Matos JE, Sorensen MV, Geyti CS, Robaye B, Boeynaems JM, Leipziger J. Distal colonic Na(+) absorption inhibited by luminal P2Y(2) receptors. *Pflugers Arch.* 2007;454(6):977-87.
102. Oliveira A, Illes P, Ulrich H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology.* 2016;104:272-81.
103. Yitzhaki S, Shainberg A, Cheporko Y, Vidne BA, Sagie A, Jacobson KA, et al. Uridine-5'-triphosphate (UTP) reduces infarct size and improves rat heart function after myocardial infarct. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(8):949-55.
104. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 2006;314(5806):1792-5.
105. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2008;455(7214):808-12.

106. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K. P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(19):4949-56.
107. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*. 2007;446(7139):1091-5.
108. Samways DS, Li Z, Egan TM. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:6.
109. Saul A, Hausmann R, Kless A, Nicke A. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:250.
110. Kotnis S, Bingham B, Vasilyev DV, Miller SW, Bai Y, Yeola S, et al. Genetic and functional analysis of human P2X5 reveals a distinct pattern of exon 10 polymorphism with predominant expression of the nonfunctional receptor isoform. *Molecular pharmacology*. 2010;77(6):953-60.
111. Lê K-T, Paquet M, Nouel D, Babinski K, Séguéla P. Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Letters*. 1997;418(1-2):195-9.
112. Kim H, Walsh MC, Takegahara N, Middleton SA, Shin HI, Kim J, et al. The purinergic receptor P2X5 regulates inflammasome activity and hyper-multinucleation of murine osteoclasts. *Sci Rep*. 2017;7(1):196.
113. Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J*. 2001;20(22):6347-58.
114. Costa-Junior HM, Sarmiento Vieira F, Coutinho-Silva R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal*. 2011;7(1):7-19.

115. Kaczmarek-Hajek K, Lorinczi E, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):375-417.
116. Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(13):3413-20.
117. Markwardt F. Activation kinetics of single P2X receptors. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):249-53.
118. Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. 2012;76(1):51-69.
119. Khadra A, Tomic M, Yan Z, Zemkova H, Sherman A, Stojilkovic SS. Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. *Biophys J*. 2013;104(12):2612-21.
120. Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci*. 1999;2(4):322-30.
121. Syed N-i-H, Kennedy C. Pharmacology of P2X receptors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*. 2012;1(1):16-30.
122. Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, et al. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European journal of pharmacology*. 1999;376(1-2):127-38.
123. Lambrecht G. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2000;362(4-5):340-50.

124. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Molecular pharmacology*. 1998;53(6):969-73.
125. Soto F, Lambrecht G, Nickel P, Stuhmer W, Busch AE. Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology*. 1999;38(1):141-9.
126. El-Ajouz S, Ray D, Allsopp RC, Evans RJ. Molecular basis of selective antagonism of the P2X1 receptor for ATP by NF449 and suramin: contribution of basic amino acids in the cysteine-rich loop. *British journal of pharmacology*. 2012;165(2):390-400.
127. Wolf C, Rosefort C, Fallah G, Kassack MU, Hamacher A, Bodnar M, et al. Molecular determinants of potent P2X2 antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking. *Molecular pharmacology*. 2011;79(4):649-61.
128. Jung KY, Moon HD, Lee GE, Lim HH, Park CS, Kim YC. Structure-activity relationship studies of spinorphin as a potent and selective human P2X(3) receptor antagonist. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(18):4543-7.
129. Hernandez-Olmos V, Abdelrahman A, El-Tayeb A, Freudendahl D, Weinhausen S, Muller CE. N-substituted phenoxazine and acridone derivatives: structure-activity relationships of potent P2X4 receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(22):9576-88.
130. Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, et al. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(12):3659-66.
131. Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, et al. A-740003 [N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-

dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1376-85.

132. Stokes L, Jiang LH, Alcaraz L, Bent J, Bowers K, Fagura M, et al. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. *British journal of pharmacology.* 2006;149(7):880-7.

133. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* 2009;460(7255):592-8.

134. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 2012;485(7397):207-12.

135. Mansoor SE, Lu W, Oosterheert W, Shekhar M, Tajkhorshid E, Gouaux E. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature.* 2016;538(7623):66-71.

136. Karasawa A, Kawate T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife.* 2016;5.

137. Kasuya G, Yamaura T, Ma XB, Nakamura R, Takemoto M, Nagumo H, et al. Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat Commun.* 2017;8(1):876.

138. Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, et al. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 1998;17(11):3016-28.

139. Chataigneau T, Lemoine D, Grutter T. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2013;7:273.

140. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-51.
141. Digby HR, Roberts JA, Sutcliffe MJ, Evans RJ. Contribution of conserved glycine residues to ATP action at human P2X1 receptors: mutagenesis indicates that the glycine at position 250 is important for channel function. *Journal of neurochemistry.* 2005;95(6):1746-54.
142. Zemkova H, Yan Z, Liang Z, Jelinkova I, Tomic M, Stojilkovic SS. Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *Journal of neurochemistry.* 2007;102(4):1139-50.
143. Wilkinson WJ, Jiang LH, Surprenant A, North RA. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. *Molecular pharmacology.* 2006;70(4):1159-63.
144. Roberts JA, Evans RJ. Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *Journal of neurochemistry.* 2006;96(3):843-52.
145. Roberts JA, Digby HR, Kara M, El Ajouz S, Sutcliffe MJ, Evans RJ. Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(29):20126-36.
146. Bodnar M, Wang H, Riedel T, Hintze S, Kato E, Fallah G, et al. Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(4):2739-49.
147. Worthington RA, Smart ML, Gu BJ, Williams DA, Petrou S, Wiley JS, et al. Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS Lett.* 2002;512(1-3):43-6.

148. Ennion S, Hagan S, Evans RJ. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(38):29361-7.
149. Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(44):34190-6.
150. Hausmann R, Gunther J, Kless A, Kuhlmann D, Kassack MU, Bahrenberg G, et al. Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X2 receptor. *Molecular pharmacology*. 2013;83(1):73-84.
151. Roberts JA, Evans RJ. ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(10):9043-55.
152. Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T. Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J*. 2012;31(9):2134-43.
153. Zhao WS, Wang J, Ma XJ, Yang Y, Liu Y, Huang LD, et al. Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. *Nat Commun*. 2014;5:4189.
154. Roberts JA, Allsopp RC, El Ajouz S, Vial C, Schmid R, Young MT, et al. Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(12):4663-7.
155. Wang J, Sun LF, Cui WW, Zhao WS, Ma XF, Li B, et al. Intersubunit physical couplings fostered by the left flipper domain facilitate channel opening of P2X4 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(18):7619-35.

156. Du J, Dong H, Zhou HX. Size matters in activation/inhibition of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(9):482-93.
157. Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD, Swartz KJ. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *The Journal of general physiology.* 2011;137(6):579-90.
158. Stelmashenko O, Compan V, Browne LE, North RA. Ectodomain movements of an ATP-gated ion channel (P2X2 receptor) probed by disulfide locking. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(14):9909-17.
159. Heymann G, Dai J, Li M, Silberberg SD, Zhou HX, Swartz KJ. Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(42):E4045-54.
160. Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016;104:18-30.
161. Du J, Dong H, Zhou HX. Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(11):4140-5.
162. Samways DS, Khakh BS, Dutertre S, Egan TM. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(33):13800-5.
163. Akabas MH. Cysteine Modification: Probing Channel Structure, Function and Conformational Change. *Adv Exp Med Biol.* 2015;869:25-54.

164. Li M, Toombes GE, Silberberg SD, Swartz KJ. Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nat Neurosci.* 2015;18(11):1577-83.
165. Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, et al. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Molecular pharmacology.* 2003;63(6):1407-16.
166. Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(18):14902-8.
167. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes* 2001. 607 p.
168. Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev.* 2004;84(3):803-33.
169. de Souza CA, Teixeira PC, Faria RX, Krylova O, Pohl P, Alves LA. A consensus segment in the M2 domain of the hP2X(7) receptor shows ion channel activity in planar lipid bilayers and in biological membranes. *Biochimica et biophysica acta.* 2012;1818(1):64-71.
170. 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.* 1994;371(6497):516-9.
171. Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;86(2):161-204.
172. Sherwood TW, Frey EN, Askwith CC. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303(7):C699-710.
173. Li M, Kawate T, Silberberg SD, Swartz KJ. Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat Commun.* 2010;1:44.

174. Egan TM, Haines WR, Voigt MM. A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(7):2350-9.
175. Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J*. 1997;16(12):3446-54.
176. Pippel A, Stolz M, Woltersdorf R, Kless A, Schmalzing G, Markwardt F. Localization of the gate and selectivity filter of the full-length P2X7 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(11):E2156-E65.
177. Rozengurt E, Heppel LA, Friedberg I. Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 1977;252(13):4584-90.
178. Steinberg TH, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. ATP₄⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(18):8884-8.
179. Wiley JS, Chen R, Jamieson GP. The ATP₄⁻ receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys*. 1993;305(1):54-60.
180. Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2012;34(3):218-25.
181. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(9):5482-6.

182. 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.
183. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Castro NG, Coutinho-Silva R, Guimaraes MZ. Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *British journal of pharmacology*. 2011;163(5):912-26.
184. Robinson LE, Shridar M, Smith P, Murrell-Lagnado RD. Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(46):31983-94.
185. Faria RX, Freitas HR, Reis RAM. P2X7 receptor large pore signaling in avian Muller glial cells. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(3):215-29.
186. Nihei OK, Savino W, Alves LA. Procedures to characterize and study P2Z/P2X7 purinoceptor: flow cytometry as a promising practical, reliable tool. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):415-28.
187. Bukhari M, Burm H, Samways DS. Ion channel-mediated uptake of cationic vital dyes into live cells: a potential source of error when assessing cell viability. *Cell Biol Toxicol*. 2016;32(5):363-71.
188. Coutinho-Silva R, Alves LA, de Carvalho AC, Savino W, Persechini PM. Characterization of P2Z purinergic receptors on phagocytic cells of the thymic reticulum in culture. *Biochimica et biophysica acta*. 1996;1280(2):217-22.
189. Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F. Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophys J*. 2007;92(7):2377-91.

190. Dal Ben D, Buccioni M, Lambertucci C, Marucci G, Thomas A, Volpini R. Purinergic P2X receptors: structural models and analysis of ligand-target interaction. *Eur J Med Chem.* 2015;89:561-80.
191. Allsopp RC, Evans RJ. Contribution of the Juxtatransmembrane Intracellular Regions to the Time Course and Permeation of ATP-gated P2X7 Receptor Ion Channels. *The Journal of biological chemistry.* 2015;290(23):14556-66.
192. Roger S, Pelegrin P, Surprenant A. Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008;28(25):6393-401.
193. Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(2):C260-71.
194. Faria RX, Reis RA, Casabulho CM, Alberto AV, de Farias FP, Henriques-Pons A, et al. Pharmacological properties of a pore induced by raising intracellular Ca²⁺. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(1):C28-42.
195. Coutinho-Silva R, Persechini PM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *The American journal of physiology.* 1997;273(6 Pt 1):C1793-800.
196. Persechini PM, Bisaggio RC, Alves-Neto JL, Coutinho-Silva R. Extracellular ATP in the lymphohematopoietic system: P2Z purinoceptors off membrane permeabilization. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas.* 1998;31(1):25-34.
197. Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano A, da Silva-Souza HA, Guimaraes MZ, Persechini PM. ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 19):3261-70.

198. Kienitz MC, Bender K, Dermietzel R, Pott L, Zoidl G. Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(1):290-8.
199. Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, Walsh JV, Jr. P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett*. 1997;411(2-3):339-45.
200. Paukert M, Hidayat S, Grunder S. The P2X(7) receptor from *Xenopus laevis*: formation of a large pore in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett*. 2002;513(2-3):253-8.
201. Karasawa A, Michalski K, Mikhelzon P, Kawate T. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *Elife*. 2017;6.
202. Yan Z, Khadra A, Li S, Tomic M, Sherman A, Stojilkovic SS. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(42):14213-24.
203. Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *The Journal of physiology*. 1999;519 Pt 2:335-46.
204. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006;25(21):5071-82.
205. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1285-94.

206. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):1053-61.
207. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 2006;580(1):239-44.
208. Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB, Wiley JS. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(2):C430-9.
209. Pflieger C, Ebeling G, Blasche R, Patton M, Patel HH, Kasper M, et al. Detection of caveolin-3/caveolin-1/P2X7R complexes in mice atrial cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(2):231-41.
210. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol.* 2000;10(13):R473-4.
211. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 2004;83(4):706-16.
212. Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels.* 2014;5(3):193-7.
213. Vinken M. Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(15):2775-8.
214. Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(20):7655-9.

215. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010;467(7317):863-7.
216. Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(5):525-34.
217. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE, et al. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol*. 2011;186(11):6553-61.
218. 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*. 2013;386(9):775-87.
219. Faria RX, Reis RA, Ferreira LG, Cezar-de-Mello PF, Moraes MO. P2X7R large pore is partially blocked by pore forming proteins antagonists in astrocytes. *J Bioenerg Biomembr*. 2016;48(3):309-24.
220. Michalski K, Kawate T. Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop. *The Journal of general physiology*. 2016;147(2):165-74.
221. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(3):C761-7.
222. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, et al. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(3):C752-60.
223. Xu XJ, Boumechache M, Robinson LE, Marschall V, Gorecki DC, Masin M, et al. Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 16):3776-89.

224. Pelegrin P. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *British journal of pharmacology*. 2011;163(5):908-11.
225. Ma Z, Tanis JE, Taruno A, Foskett JK. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch*. 2016;468(3):395-403.
226. Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, Li A, et al. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*. 2013;495(7440):223-6.
227. Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal*. 2011;7(3):293-303.
228. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, et al. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature*. 2000;403(6765):86-9.
229. Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, et al. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *The Journal of physiology*. 2005;567(Pt 2):621-39.
230. Jarvis MF. Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2003;7(4):513-22.
231. Ford AP. In pursuit of P2X3 antagonists: novel therapeutics for chronic pain and afferent sensitization. *Purinergic Signal*. 2012;8(Suppl 1):3-26.
232. Varma R, Chai Y, Troncoso J, Gu J, Xing H, Stojilkovic SS, et al. Amyloid-beta induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity. *Neuromolecular Med*. 2009;11(2):63-75.

233. Morciano G, Sarti AC, Marchi S, Missiroli S, Falzoni S, Raffaghello L, et al. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nature protocols*. 2017;12(8):1542-62.
234. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*. 2008;3(7):e2599.
235. Yi YS. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology*. 2017.
236. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-16.
237. Song DH, Lee JO. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2012;250(1):216-29.
238. Yang D, He Y, Munoz-Planillo R, Liu Q, Nunez G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*. 2015;43(5):923-32.
239. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-53.
240. Mishra A, Guo Y, Zhang L, More S, Weng T, Chintagari NR, et al. A Critical Role for P2X7 Receptor-Induced VCAM-1 Shedding and Neutrophil Infiltration during Acute Lung Injury. *J Immunol*. 2016;197(7):2828-37.
241. Huang C, Chi XS, Li R, Hu X, Xu HX, Li JM, et al. Inhibition of P2X7 Receptor Ameliorates Nuclear Factor-Kappa B Mediated Neuroinflammation Induced by Status Epilepticus in Rat Hippocampus. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2017;63(2):173-84.

242. Zheng B, Lai R, Li J, Zuo Z. Critical role of P2X7 receptors in the neuroinflammation and cognitive dysfunction after surgery. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;61:365-74.
243. Khalafalla MG, Woods LT, Camden JM, Khan AA, Limesand KH, Petris MJ, et al. P2X7 receptor antagonism prevents IL-1beta release from salivary epithelial cells and reduces inflammation in a mouse model of autoimmune exocrinopathy. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(40):16626-37.
244. Tsimis ME, Lei J, Rosenzweig JM, Arif H, Shabi Y, Alshehri W, et al. P2X7 receptor blockade prevents preterm birth and perinatal brain injury in a mouse model of intrauterine inflammation. *Biology of reproduction*. 2017;97(2):230-9.
245. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*. 2002;168(12):6436-45.
246. Santana PT, Benjamim CF, Martinez CG, Kurtenbach E, Takiya CM, Coutinho-Silva R. The P2X7 Receptor Contributes to the Development of the Exacerbated Inflammatory Response Associated with Sepsis. *Journal of innate immunity*. 2015;7(4):417-27.
247. Martins JP, Silva RB, Coutinho-Silva R, Takiya CM, Battastini AM, Morrone FB, et al. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *British journal of pharmacology*. 2012;165(1):183-96.
248. Teixeira JM, Dias EV, Parada CA, Tambeli CH. Intra-Articular Blockade of P2X7 Receptor Reduces the Articular Hyperalgesia and Inflammation in the Knee Joint Synovitis Especially in Female Rats. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2017;18(2):132-43.

249. Rech JC, Bhattacharya A, Letavic MA, Savall BM. The evolution of P2X7 antagonists with a focus on CNS indications. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(16):3838-45.
250. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell cycle*. 2009;8(22):3723-8.
251. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J*. 2012;31(5):1062-79.
252. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*. 2011;334(6062):1573-7.
253. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. 2009;15(10):1170-8.
254. Ohshima Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Harada H, Suzuki A, Sato M, et al. gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1800(1):40-6.
255. Slater M, Danieletto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*. 2004;44(3):206-15.
256. Ravenna L, Sale P, Di Vito M, Russo A, Salvatori L, Tafani M, et al. Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. *The Prostate*. 2009;69(11):1245-55.
257. White N, Butler PE, Burnstock G. Human melanomas express functional P2 X(7) receptors. *Cell and tissue research*. 2005;321(3):411-8.

258. Greig AV, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MH, et al. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(2):315-27.
259. Slater M, Danieletto S, Barden JA. Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium. *Journal of molecular histology*. 2005;36(3):159-65.
260. Jelassi B, Anchelin M, Chamouton J, Cayuela ML, Clarysse L, Li J, et al. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1487-96.
261. Takai E, Tsukimoto M, Harada H, Sawada K, Moriyama Y, Kojima S. Autocrine regulation of TGF-beta1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 21):5051-60.
262. Takai E, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. *Purinergic Signal*. 2014;10(3):487-97.
263. 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 research*. 2006;66(2):907-14.
264. Tamajusuku AS, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battasstini AM, Wink MR, et al. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109(5):983-91.
265. Solini A, Cuccato S, Ferrari D, Santini E, Gulinelli S, Callegari MG, et al. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology*. 2008;149(1):389-96.

266. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature reviews Cancer*. 2018.
267. de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R, Savio LEB. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1526.
268. Petrovski G, Ayna G, Majai G, Hodrea J, Benko S, Madi A, et al. Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1beta release in human macrophages. *Autophagy*. 2011;7(3):321-30.
269. Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, Petrovski G, Vandenabeele P, Fesus L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS One*. 2012;7(6):e40069.
270. Roger S, Jelassi B, Couillin I, Pelegrin P, Besson P, Jiang LH. Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt B):2584-602.
271. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(6):1685-93.
272. Hofman P, Cherfils-Vicini J, Bazin M, Ilie M, Juhel T, Hebuterne X, et al. Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer research*. 2015;75(5):835-45.
273. Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, Falzoni S, Giuliani AL, Rotondo A, et al. Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7. *Cancer research*. 2015;75(4):635-44.

274. Bergamin LS, Braganhol E, Zanin RF, Edelweiss MI, Battastini AM. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: an overview. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:959848.
275. Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, Di Virgilio F. Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. *The Biochemical journal*. 1992;288 (Pt 3):897-901.
276. Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(30):28142-51.
277. Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung KK, de Campos NE, de Oliveira Souza C, Ojcius DM, et al. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(5):G1024-35.
278. Fu W, McCormick T, Qi X, Luo L, Zhou L, Li X, et al. Activation of P2X(7)-mediated apoptosis Inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC cancer*. 2009;9:114.
279. Gehring MP, Pereira TC, Zanin RF, Borges MC, Braga Filho A, Battastini AM, et al. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signal*. 2012;8(4):729-39.
280. Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(40):33968-76.
281. Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, et al. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(47):33206-8.

282. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, et al. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(7):3260-72.
283. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer research*. 2012;72(12):2957-69.
284. Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(9):3393-404.
285. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening*. 1999;4(2):67-73.
286. Voigt N, Abu-Taha I, Heijman J, Dobrev D. Constitutive activity of the acetylcholine-activated potassium current IK,ACh in cardiomyocytes. *Advances in pharmacology*. 2014;70:393-409.
287. Lev S, Zeevi DA, Frumkin A, Offen-Glasner V, Bach G, Minke B. Constitutive activity of the human TRPML2 channel induces cell degeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(4):2771-82.
288. Ferreira RS. Estudos In Silico do Comportamento Dinâmico Do Receptor P2x7 Humano [Dissertação (Mestrado)]: FIOCRUZ; 2015.
289. Wang X, Lin R, Xu Z, Huang H, Li L, Liu F, et al. N-acetylcysteine induced quenching of red fluorescent oligonucleotide-stabilized silver nanoclusters and the application in pharmaceutical detection. *Analytica chimica acta*. 2013;793:79-85.

290. Rorive G, Kleinzeller A. The effect of ATP and Ca²⁺ on the cell volume in isolated kidney tubules. *Biochimica et biophysica acta*. 1972;274(1):226-39.
291. Trams EG. Evidence for ATP action on the cell surface. *Nature*. 1974;252(5483):480-2.
292. <wiley 1993.pdf>.
293. Di Virgilio F, Schmalzing G, Markwardt F. The Elusive P2X7 Macropore. *Trends in cell biology*. 2018;28(5):392-404.
294. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2018;151:234-44.
295. Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med*. 2017;15(1):84.
296. Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British journal of pharmacology*. 2007;151(5):571-9.
297. Ferreira L, Pereira L, Faria R. Fluorescent dyes as a reliable tool in P2X7 receptor-associated pore studies. *J Bioenerg Biomembr*. 2015;47(4):283-307.
298. Norenberg W, Plotz T, Sobottka H, Chubanov V, Mittermeier L, Kalwa H, et al. TRPM7 is a molecular substrate of ATP-evoked P2X7-like currents in tumor cells. *The Journal of general physiology*. 2016;147(6):467-83.
299. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(21):7413-7.

300. Bernaudat F, Frelet-Barrand A, Pochon N, Dementin S, Hivin P, Boutigny S, et al. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS One*. 2011;6(12):e29191.
301. Caracciolo G, Pozzi D, Amenitsch H, Caminiti R. Multicomponent cationic lipid-DNA complex formation: role of lipid mixing. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2005;21(25):11582-7.
302. Coppola S, Estrada LC, Digman MA, Pozzi D, Cardarelli F, Gratton E, et al. Intracellular trafficking of cationic liposome-DNA complexes in living cells. *Soft matter*. 2012;8(30):7919-27.
303. Lucas B, Remaut K, Sanders NN, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J. Towards a better understanding of the dissociation behavior of liposome-oligonucleotide complexes in the cytosol of cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2005;103(2):435-50.
304. Cardarelli F, Digiacomio L, Marchini C, Amici A, Salomone F, Fiume G, et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci Rep*. 2016;6:25879.
305. Akita H, Ito R, Khalil IA, Futaki S, Harashima H. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004;9(3):443-51.
306. Kaestner L, Scholz A, Lipp P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(6):1171-6.
307. Oliveira CSd. Estudo de proteínas candidatas ao poro associado ao receptor P2X7 em diferentes tipos celulares [PhD]: FIOCRUZ; 2016.

308. Rio DC, Clark SG, Tjian R. A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science*. 1985;227(4682):23-8.
309. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014;5:4767.
310. Worthington RA, Dutton JL, Poronnik P, Bennett MR, Barden JA. Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. *Electrophoresis*. 1999;20(10):2065-70.
311. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*. 1999;2(4):315-21.
312. Pelegrin P, Surprenant A. The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic Signal*. 2009;5(2):129-37.
313. Thorstenberg ML, Rangel Ferreira MV, Amorim N, Canetti C, Morrone FB, Alves Filho JC, et al. Purinergic Cooperation Between P2Y2 and P2X7 Receptors Promote Cutaneous Leishmaniasis Control: Involvement of Pannexin-1 and Leukotrienes. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1531.
314. Schachter JB, Sromek SM, Nicholas RA, Harden TK. HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1181-7.
315. Li H. TRP Channel Classification. *Adv Exp Med Biol*. 2017;976:1-8.
316. Fleig A, Chubanov V. Trpm7. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;222:521-46.

317. Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, et al. TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. *Nat Commun.* 2010;1:109.
318. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, et al. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature.* 2001;411(6837):590-5.
319. Jansen C, Sahni J, Suzuki S, Horgen FD, Penner R, Fleig A. The coiled-coil domain of zebrafish TRPM7 regulates Mg.nucleotide sensitivity. *Sci Rep.* 2016;6:33459.
320. Clark K, Middelbeek J, Morrice NA, Figdor CG, Lasonder E, van Leeuwen FN. Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PLoS One.* 2008;3(3):e1876.
321. Dorovkov MV, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(49):50643-6.
322. Su LT, Agapito MA, Li M, Simonson WT, Huttenlocher A, Habas R, et al. TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(16):11260-70.
323. Clark K, Middelbeek J, Lasonder E, Dulyaninova NG, Morrice NA, Ryazanov AG, et al. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *Journal of molecular biology.* 2008;378(4):790-803.
324. Wilson JE, Chin A. Chelation of divalent cations by ATP, studied by titration calorimetry. *Analytical biochemistry.* 1991;193(1):16-9.
325. McCoy DD, Palkar R, Yang Y, Ongun S, McKemy DD. Cellular permeation of large molecules mediated by TRPM8 channels. *Neuroscience letters.* 2017;639:59-67.

326. Numata T, Shimizu T, Okada Y. TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C460-7.
327. Pfeiffer ZA, Aga M, Prabhu U, Watters JJ, Hall DJ, Bertics PJ. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(6):1173-82.
328. Bhalla-Gehi R, Penuela S, Churko JM, Shao Q, Laird DW. Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(12):9147-60.
329. Furlow PW, Zhang S, Soong TD, Halberg N, Goodarzi H, Mangrum C, et al. Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival. *Nature cell biology*. 2015;17(7):943-52.
330. Wang EE, Li H, Wang S, Chuang AY, Chuang HH. Induction of TRPV1 desensitization by a biased receptor agonist. *Channels (Austin)*. 2011;5(6):464-7.
331. Banke TG. The dilated TRPA1 channel pore state is blocked by amiloride and analogues. *Brain research*. 2011;1381:21-30.
332. Lipman BJ, Silverstein SC, Steinberg TH. Organic anion transport in macrophage membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(4):2142-7.
333. Hsyu PH, Gisclon LG, Hui AC, Giacomini KM. Interactions of organic anions with the organic cation transporter in renal BBMV. *The American journal of physiology*. 1988;254(1 Pt 2):F56-61.
334. de Andrade Mello P, Bian S, Savio LEB, Zhang H, Zhang J, Junger W, et al. Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. *Oncotarget*. 2017;8(40):67254-68.

335. Alves LA, Ferreira LB, Pacheco PF, Mendivelso EAC, Teixeira PCN, Faria RX. Pore forming channels as a drug delivery system for photodynamic therapy in cancer associated with nanoscintillators. *Oncotarget*. 2018;9(38):25342-54.

336. Pacheco PA, Ferreira LB, Mendonca L, Ferreira DN, Salles JP, Faria RX, et al. P2X7 receptor as a novel drug delivery system to increase the entrance of hydrophilic drugs into cells during photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr*. 2016;48(4):397-411.