

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATIELE CARLA DA SILVA FERREIRA

Padronização da triagem de alto desempenho de antagonistas para receptores purinérgicos ativados por UTP a partir da mensuração de cálcio intracelular

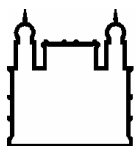
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Rômulo José Soares Bezerra

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATIELE CARLA DA SILVA FERREIRA

**PADRONIZAÇÃO DA TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO DE ANTAGONISTAS
PARA RECEPTORES PURINÉRGICOS ATIVADOS POR UTP A PARTIR DA
MENSURAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rômulo José Soares Bezerra

Aprovada em: 06/04/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Válber da Silva Frutuoso – **Presidente**
(IOC/ Fiocruz - RJ)

Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro - **Membro**
(UFRJ - RJ)

Prof. Dr. Oscar Kenji Nihei - **Membro**
(UNIOESTE - PR)

Prof. Dr^a. Carmen Penido Monteiro - **Revisora e Suplente**
(FarManguinhos/ Fiocruz - RJ)

Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho - **Suplente**
(IOC/ Fiocruz - RJ)

Rio de Janeiro, 06 de abril de 2015.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F383 Ferreira, Natiele Carla da Silva

Padronização da triagem de alto desempenho de antagonistas para receptores purinérgicos ativados por UTP a partir da mensuração de cálcio intracelular / Natiele Carla da Silva Ferreira. – Rio de Janeiro, 2015.

xv, 100 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 73-85

1. Receptores P2Y. 2. Triagem. 3. Antagonistas. 4. Produtos naturais. I. Título.

CDD 572.696

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, amigos e orientadores por acreditaram em mim e me ajudarem na concretização desta importante etapa da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois sem Ele nada seria possível. Agradeço por confortar meu coração nos momentos de desânimo e me fazer acreditar que “*Tudo concorre para o bem daqueles que amam a Deus*” (Rm 8, 28). Agradeço a todos os meus intercessores celestiais, a quem tanto recorri nos momentos difíceis.

Agradeço a toda a minha família: meus pais Robson e Carla, meu irmão Mateus, minhas avós Maria e Graça, meu avô Rozivel, minha tia-avó Fatima, meus tios André e Mariângela e a todo restante da família. Agradeço por cada oração, por cada palavra de conforto e por cada atitude de demonstração de afeto e carinho: sem vocês a vida não tem graça.

Agradeço também ao meu marido Cassiano que foi quem mais cuidou de mim nesses dois anos. Agradeço por todas as vezes que enxugou minhas lágrimas, que me disse que tudo ia ficar bem e que se alegrou com todas as minhas conquistas, sejam elas pequenas ou grandes. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

Agradeço aos meus orientadores, os doutores Luiz Anastacio Alves e Rômulo José Soares Bezerra.

Agradeço ao Dr. Luiz Anastacio pela oportunidade, pela confiança e por todo o incentivo. Obrigada por me ajudar a subir novos degraus em minha carreira profissional, os quais se tornam cada vez mais difíceis, uma vez que vamos nos deparando com novos obstáculos e responsabilidades. Muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Rômulo Bezerra por estar sempre ao meu lado, e literalmente. Obrigada por cada ensinamento na bancada, por cada vez que me chamou atenção por ter visto o que meus olhos ainda não eram capazes de enxergar. Obrigada por cada palavra de incentivo e por me fazer acreditar que eu posso ir muito além de onde eu imagino que possa ir. Obrigada por me arrancar muitos sorrisos nos momentos de tristeza e por me ensinar que o luxo advém das coisas mais simples nesta vida. Muito obrigada!

Agradeço também ao mais novo integrante do nosso grupo de triagem de produtos naturais do Laboratório de Comunicação Celular, o aluno de Iniciação Científica Clayton por toda ajuda na bancada, pela presteza e solicitude em todos os momentos que precisei. Obrigada “irmão caçula”!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Comunicação Celular, em especial às doutorandas Kátia Quaresma e Carla Santos pela ajuda nos experimentos de bancada e por todos bons momentos compartilhados.

Agradeço a toda equipe da Plataforma de Bioensaios e Triagem de Fármacos do

Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Dr. Floriano Paes, ao Dr. Mario Senger, ao Dr. Rafael Dantas e aos técnicos Mariana e Willian por me auxiliarem nos experimentos, pela presteza, solicitude e disponibilidade. MUITÍSSIMO obrigada!

Agradeço a todos os meus amigos por todo apoio e incentivo, por estarem sempre torcendo por mim, mesmo que não estejamos tão próximos fisicamente. Obrigada pelas orações e por se alegrarem a cada vitória. Vocês são demais!

Agradeço aos amigos da Pós-Graduação com quem compartilhei muitas experiências, especialmente as de desespero e tensão durante as disciplinas, mas no final tudo deu e continuará dando certo! Foi um prazer estudar com vocês!

Agradeço a Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade maravilhosa de poder estudar e crescer profissionalmente em um ambiente muito notável pela sua qualidade.

Por fim, agradeço também aos órgãos de fomento CNPq e Faperj pelo apoio financeiro.

A todos vocês que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste projeto:
MUITÍSSIMO OBRIGADA!

“Ser um empreendedor é executar os sonhos, mesmo que haja riscos. É enfrentar os problemas, mesmo não tendo forças. É caminhar por lugares desconhecidos, mesmo sem bússola. É tomar atitudes que ninguém tomou. É ter consciência de que quem vence sem obstáculos triunfa sem glória.”

Augusto Cury

*“Sim, todo amor é sagrado
E o fruto do trabalho
É mais que sagrado
Meu amor.”*

Beto Guedes, Amor de índio.

LISTA DE ABREVIATURAS

- [Ca²⁺]: Concentração de cálcio
- [Ca²⁺]_i: Concentração de cálcio intracelular
- αβmeATP: α,β-metilenoadenosina 5'-trifosfato
- Aβ: Amilóide beta
- A₁R: Receptor de Adenosina 1
- A_{2A}R: Receptor de Adenosina 2_A
- A_{2B}R: Receptor de Adenosina 2_B
- A₃R: Receptor de Adenosina 3
- AC: Adenilil ciclase
- ADP: Adenosina difosfato
- AKT: Proteína quinase específica para serina/treonina
- AM: Acetoximetil
- AMPC: Adenosina monofosfato cíclico
- Ap₄A: Tetrafosfato de P¹,P⁴ de diadenosina
- APP: Proteína precursora amilóide
- AR: Receptor de Adenosina
- AR-C118925: 5-[[5-(2,8-dimetil-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-il)-3,4-dihidro-2-oxo-4-tioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-N-2H-tetrazol-5-il-2-furanocarboxamida
- ATP: Adenosina trifosfato
- AVE: Acidente vascular encefálico
- BAPTA: 1,2-bis(o-aminofenóxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetra acético
- BBG: Azul Brillante G
- CACC: Canais de cloro ativados por cálcio
- CaCl₂: Cloreto de cálcio
- Ca_v: Canais de cálcio ativados por voltagem
- CD86: *Cluster of differentiation 86*
- cDNA: DNA complementar
- CFTR: Proteína transmembrana reguladora da condutância iônica
- CTP: Citidina trifosfato
- DAG: Diacilglicerol
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: Deóxinucleotídeos
DPBS: Dulbecco's *Phosphate Buffered Saline*
EC₅₀: Concentração eficaz em 50% da população (*effective concentration*)
EGTA: Etileno glicol-bis(2-aminoetilenóeter)-N',N'-ácido tetra acético
ENaC: Canal de sódio epitelial
E-NTPDase1/CD39: Enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1
ERK: Proteína quinase regulada por sinal extracelular
GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDP: Guanosina difosfato
GFAP: Proteína glial fibrilar acídica
G_i: Proteína G inibitória
GPCR: Receptores acoplados à proteína G
G_q: Proteína G quiescente
G_s: Proteína G estimulatória
GTP: Guanosina trifosfato
H⁺: Próton
HBSS: *Hanks' Balanced Salt Solution*
HDL: Lipoproteína de alta densidade
IC₅₀: Concentração que causa inibição em 50% da população (*inhibitory concentration*)
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IP₃: Inositol (1,4,5) trifosfato
IP₃R: Receptor de inositol (1,4,5) trifosfato
ITP: Inosina trifosfato
JNK: Janus quinase
LDH: Lactato desidrogenase
KCl: Cloreto de potássio
K_d: Constante de dissociação
KH₂PO₄: Fosfato monopotássico
Mg²⁺: Magnésio
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA: RNA mensageiro
MRS 2179: 2'-deóxi-N⁶-metiladenosina 3',5'-bifosfato sal tetrasódico
MRS 2698: [(2R,3S,4R,5R)-4-amino-3-hidróxi-5-(4-oxo-2-sulfanilidenopirimidina-1-

il)oxolano-2-il]metil (hidróxi-fosfanooxifosforil) fosfato de hidrogênio
MRS 2768: Uridina-5'-tetrafosfato δ-fenil éster sal tetrasódio
MRS 4062: N4-fenilpropoxicidino-5'-O-trisfosfato sal tetra(trietilamônio)
Na₂HPO₄: Fosfato dissódico
NaCl: Cloreto de sódio
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
oATP: Adenosina trifosfato oxidada
P1: Receptor purinérgico do tipo 1
P2: Receptor purinérgico do tipo 2
P2X: Receptores Purinérgicos da família X
P2XR: receptores P2X
P2X3R: Receptor P2X3
P2X7R: Receptor P2X7
P2Y: Receptores Purinérgicos da família Y
P2Y2R: Receptor P2Y2
P2Y4R: Receptor P2Y4
P2Y6R: Receptor P2Y6
P2Y11R: Receptor P2Y11
P2Y12R: Receptor P2Y12
P2Y13R: Receptor P2Y13
P2Y14R: Receptor P2Y14
pb: Pares de base
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: *Polymerase chain reaction*
pEC₅₀: Logaritmo negativo do EC₅₀
PI3K: Fosfoinositídeo-3 quinase
pIC₅₀: Logaritmo negativo do IC₅₀
PIP₂: Fosfatidilinositol, (4,5) bifosfato
PKC: Proteína quinase C
PLCβ: Fosfolipase C beta
PPADS: Piridoxal 5-fosfato 6-azofenil-2', 4'- ácido disulfônico
PSB-716: 1-amino-4-(2-metóxfenil)-2-sulfaantraquinona
RB2: Azul Reativo 2
RNA: Ácido ribonucléico
RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SERCA: ATPase do retículo sarco/endoplasmático
SPCA: ATPase do Complexo de Golgi
SOC: Canais de cálcio operados por estoque
TGF- β : Fator de crescimento de transformação beta
TM1: Domínio transmembrana 1
TM2: Domínio transmembrana 2
TNP-ATP: 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)adenosina-5'-trifosfato sal tetra(trietilamônio)
TRP: Receptores de potencial transiente
UDP: Uridina difosfato
UTP: Uridina trifosfato
UTP γ S: Uridina-5'-(γ -tio)-trifosfato
UV: Luz ultravioleta
VCAM-1: Molécula celular de adesão vascular 1

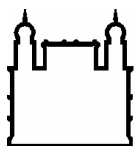
LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Classificação dos receptores purinérgicos segundo a proposta original de Burnstock (1978) e revisão conforme o trabalho de Abbracchio e Burnstock (1994).....	03
Figura 2: Esquema da via de sinalização dos receptores de adenosina (AR).....	05
Figura 3: Esquema do fluxo catiônico promovido pelos receptores P2X ativados.....	07
Figura 4: Topologia básica dos receptores P2X.....	08
Figura 5: Esquema da via de sinalização dos receptores P2Y1, 2, 4, 6 e 11 os quais são acoplados à proteína G _q	11
Figura 6: Fármacos com ação antagonista sobre o receptor P2Y12R utilizados na clínica na prevenção da aterotrombose e suas respectivas estruturas químicas.....	14
Figura 7: Atividade do receptor P2Y2 sobre canais iônicos transmembranares em células ciliadas das vias aéreas.....	20
Figura 8: Mecanismo de ação do Diquafosol [®] nas células do epitélio da conjuntiva e nas células caliciformes.....	21
Figura 9: Mecanismo de ação do P2Y4R na estimulação da pinocitose em micróglia....	23
Figura 10: Princípio básico de carregamento de um indicador de cálcio, o Fluo-4AM...	30
Figura 11: Sistema FlexStation.....	32
Figura 12: Carregamento celular com Fluo-4AM na ausência de probenecida.....	41
Figura 13: Carregamento celular com Fluo-4AM na presença de probenecida.....	42
Figura 14: Comparação entre o carregamento celular com Fluo-4 obtido com as soluções de carregamento: Meio de cultura DMEM e DPBS.....	43
Figura 15: Comparação entre os sinais de cálcio obtidos de células em Meio de cultura DMEM e DPBS.....	44
Figura 16: Comparação entre o carregamento celular obtido com o Fluo-3 e com Fluo-4.....	45
Figura 17: Comparação entre os sinais de cálcio obtidos em células carregadas com os indicadores de cálcio Fluo-3AM e Fluo-4AM no FlexStation III.....	45
Figura 18: Mensuração da $[Ca^{2+}]_i$ no FlexStation III após o tratamento com ATP [100 μ M] em células carregadas com diferentes concentrações do indicador de cálcio Fluo-4.....	46
Figura 19: Curva concentração-resposta do ATP.....	47
Figura 20: Curva concentração-resposta da Ionomicina.....	48

Figura 21: Registros originais do sinal de cálcio obtidos no FlexStation III.....	49
Figura 22: Registro individualizado de células carregadas com Fluo-4AM.....	50
Figura 23: Fragmentos de cDNA correspondentes aos subtipos de receptores P2 expressos na linhagem J774.G8.....	52
Figura 24: Resposta de aumento de cálcio intracelular induzida por agonistas de receptores P2.....	53
Figura 25: Registro original do sinal de cálcio promovido por agonistas de receptores P2.....	54
Figura 26: Efeito dos antagonistas de receptores P2 sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo ATP.....	55
Figura 27: Efeito dos antagonistas dos receptores P2Y2 e P2Y4 sobre a inibição do aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	57
Figura 28: Efeito dos extratos dos grupos A e B sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	59
Figura 29: Efeito dos extratos dos grupos C e D sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	60
Figura 30: Efeito dos extratos dos grupos E e F sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	61
Figura 31: Efeito dos extratos dos grupos H e J sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	62
Figura 32: Efeito dos extratos do grupo P sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP.....	63
Figura 33: Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	64

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
SUMÁRIO.....	xiii
RESUMO.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
INTRODUÇÃO.....	01
1. Descoberta dos receptores purinérgicos.....	01
2. Classificação dos receptores purinérgicos.....	03
2.1 Receptores P1.....	03
2.2 Receptores P2X.....	06
2.3 Receptores P2Y.....	09
3. Receptores ativados fisiologicamente pelo UTP.....	15
4. Os Produtos Naturais na descoberta de novos ligantes de receptores purinérgicos...	23
5. A técnica de mensuração da $[Ca^{2+}]$ na triagem de ligantes para os receptores P2.....	26
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	86



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PADRONIZAÇÃO DA TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES PURINÉRGICOS ATIVADOS POR UTP A PARTIR DA MENSURAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

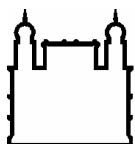
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natiele Carla da Silva Ferreira

Os receptores purinérgicos são proteínas expressas na membrana plasmática de diversos tipos celulares e são ativadas por purinas e pirimidinas extracelulares. Eles são classificados em receptores P1 e P2, de acordo com o tipo de ligante fisiológico, entretanto, os P2R são ainda subdivididos nas classes: P2XR, que abrange os subtipos ionotrópicos e P2YR, que agrupa os subtipos acoplados à proteína G. Dentre os P2YR, os subtipos P2Y2 e P2Y4 vem sendo amplamente estudados em virtude de suas funções sobre diversos sistemas biológicos. Uma vez ativados pelo UTP, estes receptores promovem a ativação e inibição de canais iônicos, controlam o fluxo de íons através da membrana, induzem um aumento de cálcio intracelular, além de estimular a proliferação celular. Em vista disso, muitos grupos de pesquisa já vem estudando o P2Y2 e o P2Y4 como alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, tais como fibrose cística, doença do olho seco, doença de Alzheimer, entre outras. Entretanto, a escassez de moléculas com propriedade antagonista seletiva sobre estes receptores dificulta o avanço da caracterização de novos papéis funcionais associados a eles, e neste contexto, os produtos naturais podem atuar como uma importante fonte para a descoberta de compostos que apresentem a característica almejada. Por isso, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia de mensuração de cálcio intracelular induzido pelo UTP em células da linhagem de macrófagos murinos J774.G8 e realizar a triagem de extratos oriundos de produtos naturais a fim de identificar compostos com atividade antagonista sobre o P2Y2R e o P2Y4R. Para isso, foi padronizado um protocolo de carregamento celular com o indicador de cálcio Fluo-4AM com posterior leitura dos sinais de cálcio no FlexStation III em células J774.G8. A partir desta padronização foi realizada a caracterização dos subtipos de receptores P2 expressos nestas células que possuem vias de sinalização que aumentam o cálcio intracelular, além da triagem de 78 extratos de origem natural para averiguar a sua atividade antagonista sobre receptores P2YR ativados por UTP. Nesta triagem, identificamos 7 extratos com atividade antagonista sobre o aumento de cálcio induzido pelo UTP e que não demonstraram citotoxicidade após o tratamento de 15 e 60 minutos. Com isso, acreditamos que essa metodologia seja capaz de identificar novos antagonistas para estes receptores, o que irá contribuir significativamente para o campo de Farmacologia de Receptores Purinérgicos.

Palavras-chave: Receptores P2Y; Triagem; Antagonistas; Produtos Naturais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PADRONIZAÇÃO DA TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES PURINÉRGICOS ATIVADOS POR UTP A PARTIR DA MENSURAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natiele Carla da Silva Ferreira

The purinergic receptors are proteins expressed in plasma membrane of many cell types that are activated by extracellular purines and pyrimidines. They are classified in P1 and P2 receptors, according to physiological ligand. However, the P2R are further subdivided in two classes: P2X for ionotropic subtypes and P2Y for G-protein coupled ones. Among P2YR, the P2Y2 and P2Y4 subtypes has been widely studied due to their functions in many biological systems. Once activated by UTP, these receptors promote the activation and inhibition of ion channels, control the flow of ions through the membrane, induce an increase of intracellular calcium and stimulate the cell proliferation. In view of this, many research groups have been studying the P2Y2 and P2Y4 as therapeutic targets for the treatment of several diseases like Cystic Fibrosis, Dry Eye Disease, Alzheimer, among others. However, the lack of molecules with selective antagonist property on these receptors difficults the advancement of characterization of new functional roles associated with them, and in this context, natural products may act as an important source for the discovery of compounds that present this desired feature. Therefore, the aim of this study was to standardize a methodology for measurement of intracellular calcium mobilization induced by UTP in a murine macrophage cell line J774.G8 and perform the screening of extracts derived from natural products in order to identify compounds with antagonist activity on the P2Y2R and P2Y4R. For this, it was standardized a protocol of cell labeling with calcium indicator Fluo-4AM in J774.G8 cells with subsequent detection of calcium signals in FlexStation III. With this standardization, it was characterized the P2 receptors subtypes expressed in this cell line that have signaling pathways of increase of intracellular calcium and the screening of 78 extracts from natural origin to verify its antagonist activity on P2YR receptors activated by UTP. In this screening, we identified 7 extracts with antagonistic activity on the increase of calcium induced by UTP and they did not demonstrate cytotoxicity after treatment 15 to 60 minutes. Thus, we believe that this method is able to identify new antagonists to these receptors, which will significantly contribute to the Purinergic Receptors Pharmacology field.

Keywords: P2Y receptors; Screening; Antagonists; Natural Products.

INTRODUÇÃO

1. Descoberta dos receptores purinérgicos

A descoberta de uma possível atividade biológica de compostos purinérgicos *in vivo* foi demonstrada pela primeira vez no trabalho de Drury e Szent-Györgyi em 1929, quando eles reportaram que uma substância constituída por adenina, pentose e ácido fosfórico, similar ao ácido adenílico ou adenosina monofosfato, apresentava efeitos sobre o coração de mamíferos. Eles observaram que esse composto diminuía a taxa de batimentos cardíacos e a pressão arterial, além de causar uma dilatação arterial em modelos animais de porquinho-da-índia, coelho, gato e cachorro. Além disso, eles relataram que a atividade desse composto dependia diretamente da sua facilidade de deaminação pelo corpo, função que atualmente é atribuída às ectonucleotidasas (Drury e Szent-Györgyi, 1929; Burnstock, 2006a).

Em 1934, Gillespie publicou um trabalho no qual descrevia a relação estrutural-atividade dos compostos derivados da adenosina, obtidos a partir da hidrólise do ATP, demonstrando que a remoção de grupos fosfatos influenciava tanto a sua potência quanto a sua resposta. Ele observou que a remoção do fosfato da molécula de ATP aumentava a capacidade desse composto em baixar a pressão sanguínea e dilatar os vasos sanguíneos em modelos animais de gato e coelho na seguinte ordem de potência: adenosina > adenosina monofosfato > ATP. Ele descreveu também que a atividade biológica somente desaparecia quando a pentose era removida dos compostos (Gillespie, 1934). Esses importantes experimentos demonstraram que havia uma diferença quanto à atividade de diferentes compostos de adenosina, bem como uma possível existência de receptores distintos para eles. Essa foi a primeira evidência acerca da existência de diferentes tipos de receptores purinérgicos (Ravelic & Burnstock, 1998).

Já em 1948, Emmelin e Feldberg demonstraram que a injeção intravenosa do ATP causava diversos efeitos incluindo a diminuição da pressão arterial sanguínea, o reflexo de bradicardia, vasodilatação, obstrução da circulação pulmonar, além de ter induzido a peristalse, micção, náuseas, defecação, bem como contrações musculares de origem espinhal e supra-espinhal em gatos. Posteriormente, Pamela Holton (1959) reportou a liberação do ATP após a estimulação antidrômica das fibras nervosas sensoriais da pele da orelha de coelhos. A princípio a sugestão era de que o ATP fosse proveniente de eritrócitos hemolisados presentes no perfusado nos experimentos iniciais, entretanto, nos ensaios posteriores, havia uma quantidade insuficiente de sangue hemolisado para produzir a quantidade de ATP detectada. Esse achado gerou a hipótese de que esse ATP poderia ser proveniente de fontes

intracelulares, como o próprio nervo, uma vez que o ATP foi detectado no espaço extracelular dos tecidos após a liberação da noradrenalina dos nervos simpáticos. Assim, Pamela Holton (1959) foi uma das pioneiras na descrição das purinas como neurotransmissores. Simultaneamente foi demonstrado também que o ATP era capaz de potenciar a contração das fibras musculares na junção neuromuscular estimulada pela acetilcolina em sapos (Buchthal e Folkow, 1948) e em seguida, foi caracterizada a modulação pré-sináptica induzida pela adenosina sobre a liberação da acetilcolina na junção neuromuscular entre o nervo frênico e o diafragma em ratos por Ginsborg e Hirst (1972), sendo então observado que a adenosina reduzia pela metade a liberação espontânea ou suscitada desse transmissor dos terminais nervosos motores.

Em 1970, Burnstock e colaboradores publicaram um trabalho demonstrando pela primeira vez que o ATP atuava como um neurotransmissor em nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) presentes no intestino, utilizando modelos animais de porquinho-da-índia, tênia, coelho, camundongo e rato e, com isso, propuseram a hipótese de neurotransmissão purinérgica (Burnstock et al., 1970). Essa hipótese não foi bem aceita na época uma vez que o ATP era caracterizado como uma molécula intracelular com importância na produção de energia, e que tal molécula ubíqua não atuaria como um mensageiro extracelular devido à presença de ectoenzimas potentes já descritas, que facilmente degradariam-na (Burnstock, 2006c).

Finalmente, no ano de 1976 (Burnstock, 1976; Burnstock, 2004), os receptores purinérgicos foram definidos pela primeira vez, sendo que em 1978, Burnstock propôs uma base para a divisão desses receptores em duas categorias de acordo com o ligante responsável pela sua ativação, o que foi evidenciado a partir de dados farmacológicos e estudos de clonagem posteriormente na década de 1990. Assim, foram nomeados de receptores P1, aqueles cujo ativador era a adenosina e receptores P2, aqueles que eram ativados pelo ATP ou ADP, os quais foram ainda agrupados nas classes P2X e P2Y na década de 1980 (Kennedy & Burnstock, 1985; Burnstock, 2013).

2. Classificação dos receptores purinérgicos

De acordo com a classificação proposta por Burnstock (1978), os receptores purinérgicos estão agrupados em duas famílias: os receptores P1 e receptores P2 como demonstrado na Figura 1.

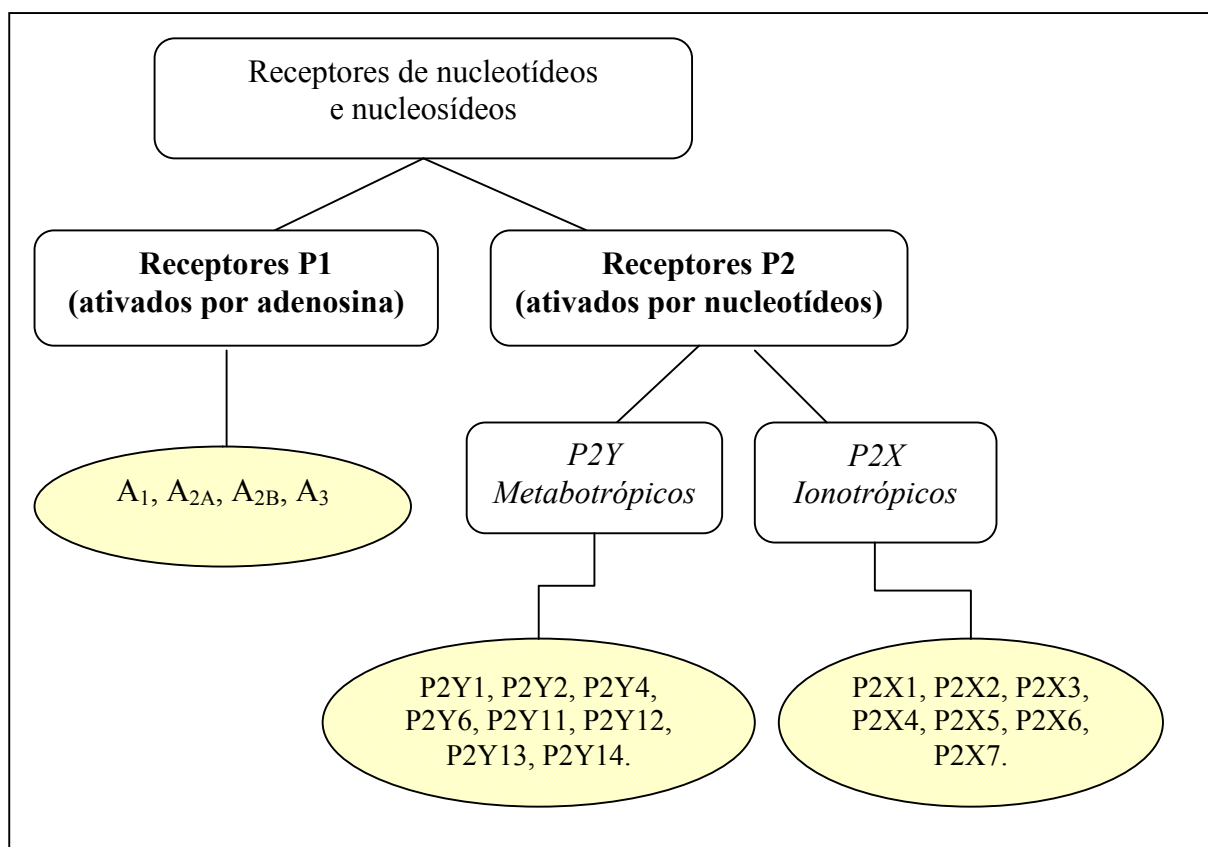


Figura 1: Classificação dos receptores purinérgicos segundo a proposta original de Burnstock (1978) e revisão conforme o trabalho de Abbraccio e Burnstock (1994). (Esquema feito pela autora).

2.1 Receptores P1

Os receptores P1 ou receptores de adenosina (AR) representam a família de receptores purinérgicos que são ativados pela adenosina. A adenosina é uma molécula produzida através do metabolismo do ATP e que desempenha várias funções importantes no organismo, tais como: a vasoconstrição e vasodilatação de veias e artérias, a regulação da proliferação de células T, a produção de citocinas, a inibição da lipólise e estimulação da broncoconstrição (Sheth et al., 2014).

A adenosina promove seus efeitos biológicos a partir da interação com os receptores

purinérgicos P1, os quais apresentam quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Sheth et al., 2014). Esses subtipos foram identificados a partir de estudos moleculares, bioquímicos e farmacológicos, incluindo dados de clonagem em diferentes espécies realizados na década de 1990 (Ravelic & Burnstock, 1998). Esses receptores são amplamente expressos em células do Sistema Nervoso, incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, micróglia, bem como em células de órgãos como: coração, pulmão, bexiga, testículos, baço, fígado e intestino (Burnstock, 2012; Sheth et al., 2014).

Os receptores P1 pertencem ao grupo dos receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (GPCR), os quais possuem uma estrutura de alfa hélice contendo sete domínios transmembranares, além de possuir um domínio extracelular (N-terminal) responsável pelo tráfego do receptor pela membrana plasmática, bem como um domínio intracelular (C-terminal) que atua como um sítio de fosforilação para proteínas quinases (Sheth et al., 2014). A proteína G que se associa com esse receptor é formada por um trîmero das subunidades $\alpha\beta\gamma$ e se acopla ao GPCR na região situada entre a terceira cauda intracelular do receptor e o domínio C-terminal (Sheth et al., 2014). Uma vez que o ligante ativa esse receptor, ocorre uma mudança conformacional em seu domínio citoplasmático, fazendo com que ele adquira uma alta afinidade pela proteína G e em seguida, o GDP que está acoplado à subunidade α é dissociado e substituído pelo GTP. Após essa substituição, as subunidades se dissociam em α -GTP e $\beta\gamma$, as quais representam as formas ativas da proteína G que interagem com a proteína efetora, que irá promover um determinado efeito biológico, o qual varia de acordo com o tipo de proteína G que é ativada (Rang et al., 2012).

No caso dos receptores P1, as proteínas G que são ativadas são: proteína G_s ou proteína G estimulatória nos subtipos A_{2A} e A_{2B}, e proteína G_i (inibitória) nos subtipos A₁ e A₃, sendo que os subtipos A_{2B} e A₃ também podem ativar a proteína G_q (quiescente), entretanto isto somente ocorre em alguns tipos celulares (Ravelic & Burnstock, 1998; Burnstock, 2012; Sheth et al., 2014). A proteína G_s (estimulatória) participa do sistema adenilil ciclase/AMPC. Quando ativada, ela induz a ativação de uma enzima associada à membrana plasmática denominada adenilil ciclase, a qual é responsável por sintetizar o nucleotídeo AMPC a partir do ATP conforme ilustrado na Figura 2. Uma vez formado, o AMPC promove a ativação de proteínas quinases, as quais regulam a função de diversas proteínas através do controle da fosforilação protéica. Dessa forma, o AMPC regula diversos mecanismos celulares, incluindo o metabolismo energético, a divisão e a diferenciação celular, o transporte iônico, a contração celular, dentre outros. Já a proteína G_i possui um papel antagônico a G_s, uma vez ativada promove a inibição da enzima adenilil ciclase como demonstrado na Figura 2 (Rang et al., 2012).

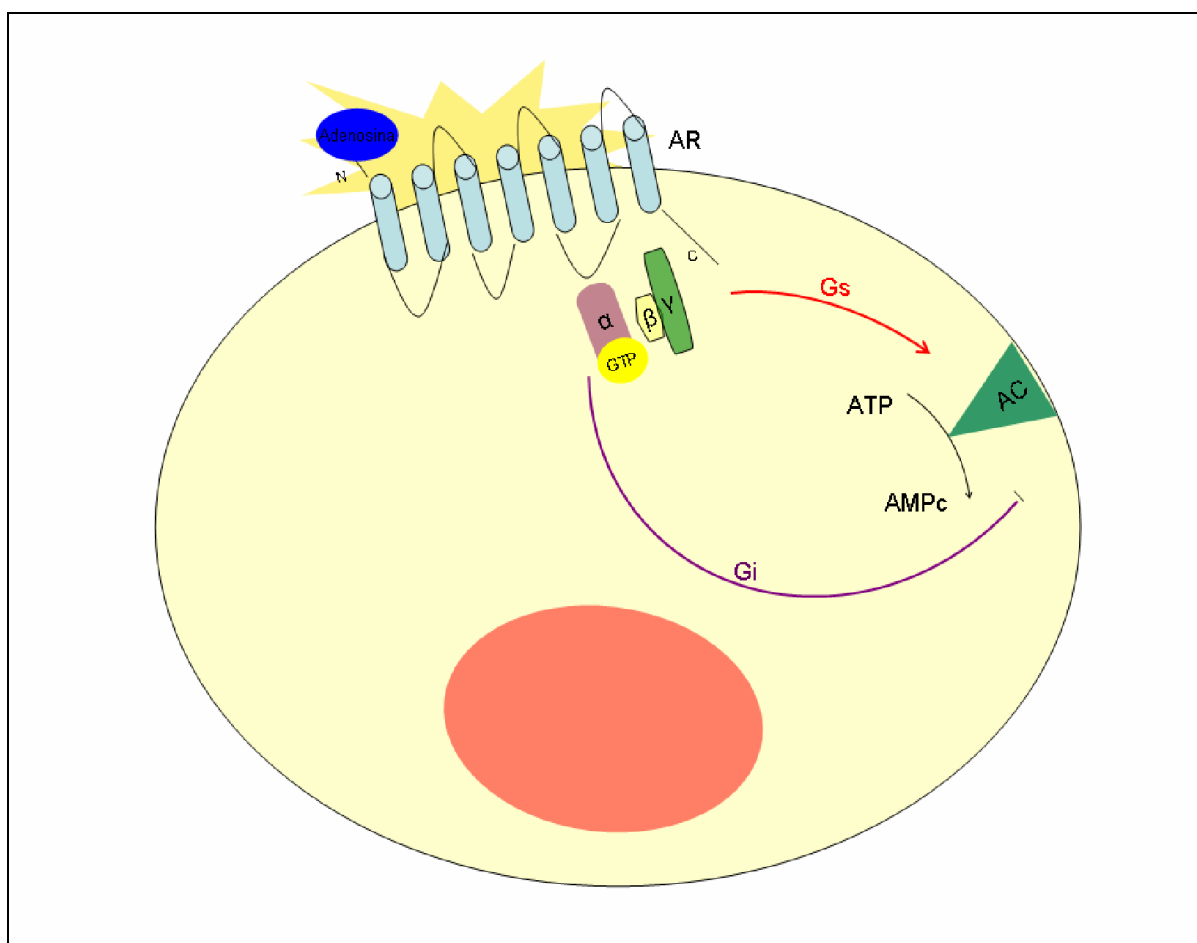


Figura 2: Esquema da via de sinalização dos receptores de adenosina (AR). Após a ligação da adenosina aos seus receptores (AR), ocorre uma mudança conformacional no domínio intracelular do receptor, o que permite o acoplamento da proteína G, a qual é composta pelo trímero das subunidades $\alpha\beta\gamma$, possuindo ainda uma molécula de GDP associada à subunidade α . Os subtipos A_{2A} e A_{2B} se acoplam à proteína G_s , enquanto os subtipos A_1 e A_3 se acoplam à proteína G_i e após esse acoplamento, ocorre a ativação da proteína G através da associação com o GTP. Uma vez ativada, a proteína G_s promove a ativação da enzima adenilil ciclase (AC), a qual é responsável pela formação do AMPc a partir do ATP, aumentando assim, os níveis intracelulares do AMPc. Entretanto, a ativação da proteína G_i promove a inibição da enzima adenilil ciclase, diminuindo então, os níveis intracelulares do AMPc (Esquema feito pela autora).

Atualmente já existem agonistas e antagonistas seletivos para cada um dos quatro subtipos de receptores P1, sendo que alguns já foram implementados na clínica para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo, o Adenocard, um agonista do A₁AR que é rapidamente metabolizado com a finalidade de tratar arritmias cardíacas (Jacobson et al., 2012). Além disso, existem novos agonistas dos receptores AR em etapas de ensaio clínico sendo estudados para o tratamento de várias doenças como: arritmias cardíacas, dor neuropática, isquemia cardíaca, doenças inflamatórias auto-imunes, câncer, além do uso como agentes marcadores a serem utilizados na cintilografia de perfusão miocárdica. Já os antagonistas dos AR, particularmente do A₂AR, estão sendo desenvolvidos por diversas empresas farmacêuticas como uma possibilidade para o tratamento da doença de Parkinson (Jacobson et al., 2012; Sheth et al., 2014).

2.2 Receptores P2X

Os receptores P2X são receptores purinérgicos cujo ligante fisiológico é o ATP. Eles são receptores ionotrópicos, isto é, formam um canal catiônico não seletivo quando ativados pelo agonista, o qual permite a passagem dos íons Na⁺, Ca²⁺ e K⁺ através da membrana plasmática, a favor do gradiente eletroquímico conforme ilustrado na Figura 3. Como efeito, a ativação destes receptores resulta em um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular, um importante mensageiro celular, bem como na despolarização das células em um intervalo situado na faixa de milissegundos (Ravelic & Burnstock, 1998; White & Burnstock, 2006).

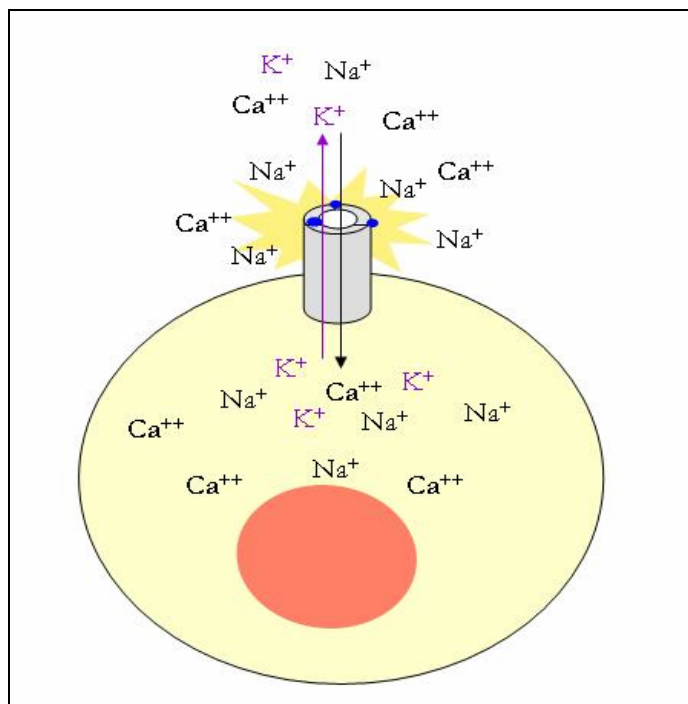


Figura 3: Esquema do fluxo catiônico promovido pelos receptores P2X ativados. Os receptores P2X necessitam aproximadamente, de três moléculas de ATP (representadas pelos três círculos azuis) para tornarem-se ativados (Khakh & North, 2006). Uma vez ativados, eles permitem a passagem de cátions não seletivos através da membrana de acordo com o gradiente eletroquímico. Dessa forma, ocorre o influxo dos íons Na^+ e Ca^{2+} e o efluxo de K^+ . (Esquema feito pela autora).

Esses receptores são formados por apenas três subunidades protéicas, sendo que cada uma delas consiste em dois domínios transmembrana (TM1 e TM2), os quais são separados por uma alça extracelular que contém dez resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto, e um resíduo intracelular amino (N) e outro carboxi (C) terminal conforme demonstrado na Figura 4 (White & Burnstock, 2006; Khakh & North, 2006).

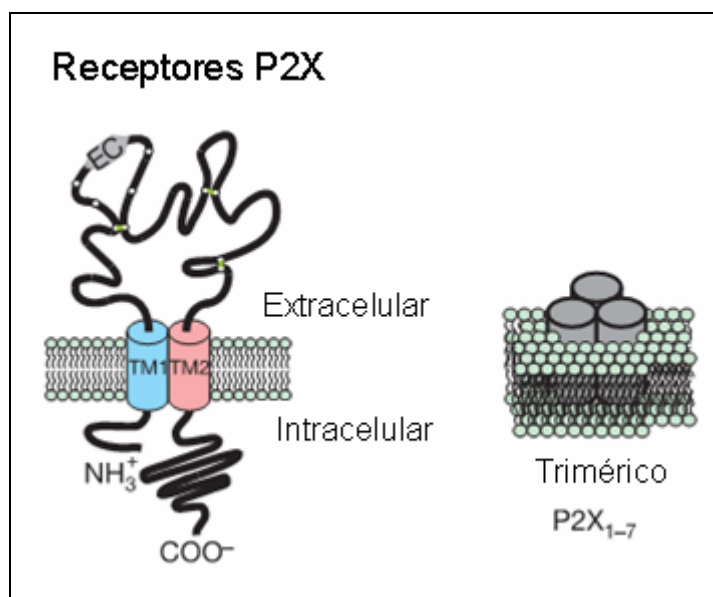


Figura 4: Topologia básica dos receptores P2X. Os receptores P2X contêm três subunidades protéicas, sendo cada uma delas composta por dois domínios transmembrana (TM1 e TM2), uma extensa alça extracelular contendo resíduos de cisteína, os quais formam pontes dissulfeto, bem como um domínio N e C-terminal na face intracelular (Adaptado de Khakh & North, 2006).

Desde 1994, já foram clonados sete subtipos de receptores P2X expressos em mamíferos, os quais foram denominados de P2X1-7 e até o momento sabe-se que estes receptores são amplamente expressos em diversas espécies de animais vertebrados (Kaczmarec-Hájek et al., 2012). As subunidades P2X1, 2, 3, 4 e 6 podem se reunir para formar canais homotriméricos ou heterotriméricos. O P2X5 é pouco ativo na forma homotrimérica, porém parece ser funcional nas formas heterotriméricas: P2X1/P2X5, P2X2/P2X5 ou P2X4/P2X5 (Di Virgilio, 2012).

Por outro lado, o P2X7 é o único que funciona como um homotrímero e apresenta algumas características excepcionais. A primeira delas é a necessidade de altas concentrações de ATP para ser ativado, isto é, o P2X7R apresenta um $EC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$, enquanto os demais subtipos (P2X1-6) têm EC_{50} na faixa entre $0,07 - 10 \mu\text{M}$ de ATP (Khakh & North, 2012). Uma outra característica é a capacidade de formar um poro membranar quando ativado por altas concentrações de ATP ($\geq 100 \mu\text{M}$) ou por exposição prolongada a esse agonista. Esse poro membranar permite o transporte bidirecional de cátions de acordo com o gradiente eletroquímico, assim como a passagem de moléculas com peso molecular de até 900 Da em macrófagos, tendo uma variação de limite de peso molecular em diferentes tipos celulares, como por exemplo, em linfócitos, cujo limite de peso molecular situa-se entre 200-300 Da.

Cabe ressaltar que esse poro parece ter relação com a citotoxicidade associada ao P2X7R e a sua formação depende do domínio intracelular C-terminal (Ravelic & Burnstock, 1998).

Os receptores P2X são expressos em diferentes tipos celulares, tais como: neurônios, células da glia, células epiteliais, células do pulmão, intestino, rins, células musculares, endotélio e células do sistema imune, incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos, dentre outros tipos celulares (White & Burnstock, 2006; Di Virgilio, 2012). Em virtude dessa ampla expressão nos mais variados sistemas biológicos e dos efeitos promovidos, os P2XR vêm sendo cada vez mais estudados como possíveis alvos terapêuticos de várias doenças, incluindo doenças inflamatórias crônicas e dor. Além disso, já está descrito na literatura que o uso de antagonistas seletivos para determinados subtipos destes receptores, como o P2X3R e o P2X7R, por exemplo, em modelos animais vem demonstrando efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios bastante promissores (Kaczmarec-Hájek et al., 2012).

2.3 Receptores P2Y

Os receptores P2Y são receptores acoplados à proteína G, assim como os P1R, e apresentam sete domínios transmembrana, além dos domínios N-terminal extracelular e C-terminal intracelular. Até o presente momento, já foram clonados oito subtipos de P2YR: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11-14, sendo que esse salto na sequência ocorreu devido à identificação incorreta de receptores como membros da família P2Y (Ralevic & Burnstock, 1998). Os subtipos de P2Y apresentam uma diversidade nos perfis de ligantes endógenos e na proteína G acoplada conforme apresentado no Quadro 1 (White & Burnstock, 2006).

Quadro 1 - Receptores P2Y: agonistas fisiológicos e proteína G acoplada (Jacobson, 2010).

Receptor	Agonistas fisiológicos (ordem de potência)	Proteína G acoplada
P2Y1	ADP>ATP	G _q
P2Y2	UTP≥ATP	G _q / G _i
P2Y4	UTP≥ATP	G _q / G _i
P2Y6	UDP>UTP>>ATP	G _q
P2Y11	ATP	G _q / G _s
P2Y12	ADP	G _i
P2Y13	ADP>ATP	G _i
P2Y14	UDP-glicose=UDP	G _i

Diferentemente das proteínas $G_{s/i}$, a proteína G_q , que está acoplada à maioria dos P2YR, participa de outra via de sinalização, a qual é conhecida como sistema da fosfolipase C/ fosfato de inositol. Nesta via, a proteína G_q promove a ativação da enzima fosfolipase C beta ($PLC\beta$), cujo substrato é um fosfolípido de membrana pertencente ao grupo dos fosfoinosítios, o fosfatidilinositol, (4,5) bifosfato (PIP_2). Uma vez clivado pela $PLC\beta$, o PIP_2 é convertido em diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5) trifosfato (IP_3). O IP_3 é um mediador hidrossolúvel que é liberado no citosol para atuar em um receptor exclusivo para ele, o qual é expresso na membrana do retículo endoplasmático. Esse receptor é um canal de cálcio controlado por ligante e uma vez ativado pelo IP_3 , promove a liberação de cálcio de uma das reservas intracelulares desse íon conforme demonstrado na Figura 5. Já o diacilglicerol, o qual é altamente lipossolúvel e por isso, mantém-se associado à membrana, liga-se à proteína quinase C (PKC), a qual migra do citosol para a membrana plasmática na presença de DAG. Essa proteína quinase catalisa a fosforilação de várias proteínas intracelulares, sendo que algumas das 10 isoformas da PKC necessitam adicionalmente de altos níveis intracelulares de cálcio para serem ativadas (Rang et al., 2012).

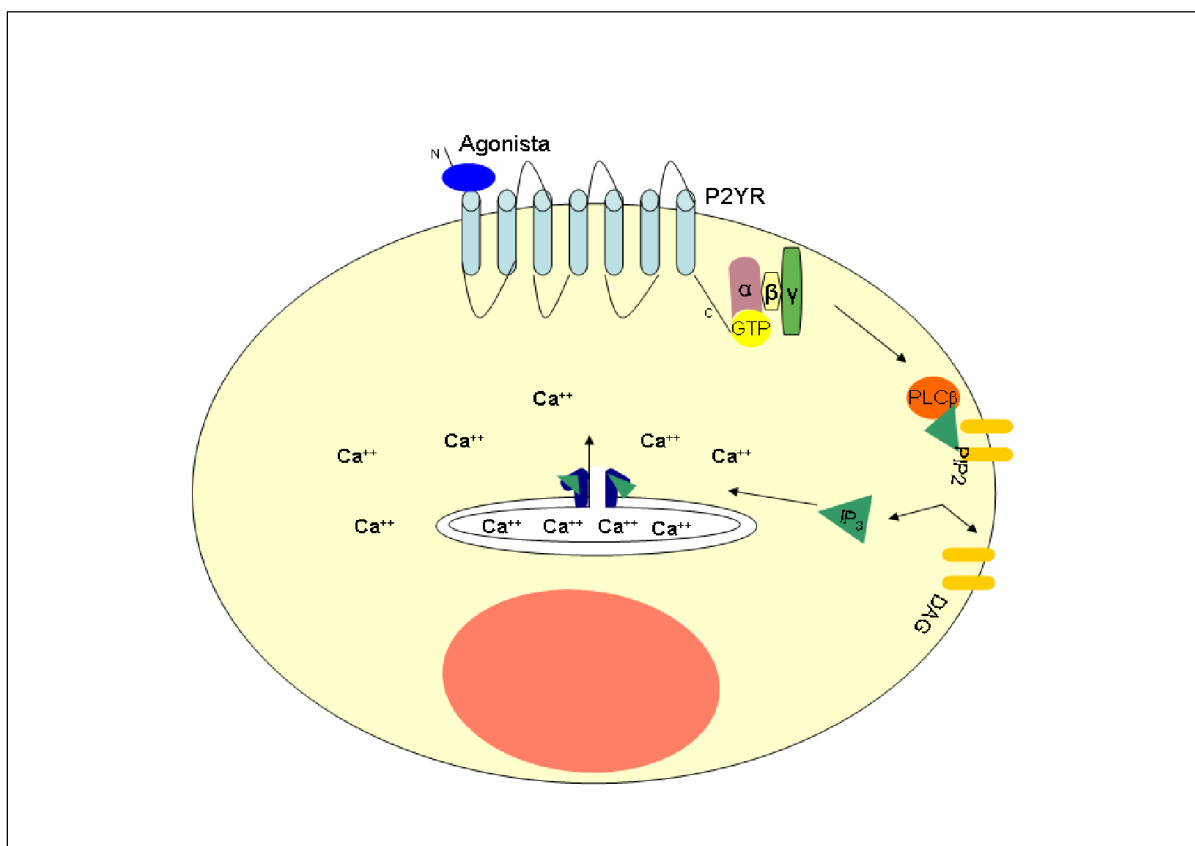


Figura 5: Esquema da via de sinalização dos receptores P2Y1, 2, 4, 6 e 11 os quais são acoplados à proteína G_q . Após a ligação do agonista a esses receptores, ocorre uma mudança conformacional ao domínio intracelular do receptor, o que permite o acoplamento da proteína G_q , seguida de sua ativação através da associação com o GTP. Uma vez ativada, esta proteína promove a ativação da enzima fosfolipase C β , que cliva o seu substrato o fosfatidilinositol, (4,5) bifosfato (PIP_2), o qual é convertido em diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5) trifosfato (IP_3), sendo que este último se liga ao seu receptor no retículo endoplasmático (IP_3R), estimulando a liberação do estoque de Ca^{2+} e aumentando os níveis deste íon no citosol. (Esquema feito pela autora).

Os receptores P2Y apresentam uma ampla distribuição em células de mamíferos, incluindo: plaquetas, leucócitos, células endoteliais, coração, músculos esquelético e liso vascular, pulmão, baço, rins, placenta, fígado, trato digestivo e nos tecidos neuronais (von Kügelgen, 2006; Burnstock, 2006b). Em virtude da ampla expressão desses receptores, muitos estudos têm evidenciado importantes funções biológicas executadas por eles, o que os torna promissores alvos terapêuticos.

Por exemplo, o receptor P2Y1 expresso nas plaquetas e ativado fisiologicamente pelo ADP, atua em conjunto com o subtipo P2Y12 para promover a agregação plaquetária, sendo que o primeiro está envolvido na mudança do formato da plaqueta e na promoção de uma agregação transiente, enquanto o último está associado ao desenvolvimento da agregação

sustentada, tornando a agregação plaquetária definitiva (Burnstock, 2006b; Jacobson & Boeynaems, 2010).

Os subtipos ativados fisiologicamente pelo UTP apresentam efeitos sobre a secreção de cloro e água em células epiteliais nas vias áreas e olhos via P2Y2 e nas células epiteliais do intestino via P2Y4. Essa função é importante porque promove a lubrificação da superfície e hidratação do muco, o que pode auxiliar no tratamento de doenças como fibrose cística, doença do olho seco e constipação crônica (Burnstock, 2006b; Jacobson & Boeynaems, 2010).

Já o P2Y6R, o qual é ativado pelo UDP, é altamente expresso em placas ateroscleróticas. Ele induz a expressão da molécula celular de adesão vascular 1 (VCAM-1) nas células endoteliais de artérias, o que é fundamental para a infiltração de monócitos circulantes, além de induzir a liberação de citocinas por macrófagos (Jacobson & Boeynaems, 2010; Stachon et al., 2014).

O P2Y11R apresenta um importante papel em linhagens celulares derivados de leucemia como a HL-60 e NB4 (células de leucemia promielocítica humana). Quando ativado pelo seu ligante fisiológico, o ATP, este receptor induz a diferenciação destas linhagens em células tipo neutrófilo (van der Weyden et al., 2000; White & Burnstock, 2006).

O P2Y13R desempenha um importante papel na endocitose de partículas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em hepatócitos, um processo conhecido como transporte reverso do colesterol, isto é, o transporte do colesterol dos tecidos para o fígado através destas lipoproteínas (Jacquet et al., 2005; Jacobson & Boeynaems, 2010).

O P2Y14R por sua vez, ao ser ativado pelo UDP-glicose participa do processo de ativação e maturação das células dendríticas através da indução de fluxos de Ca^{2+} e estimulação no aumento da expressão da molécula co-estimulatória CD86 (Jacob et al., 2013).

O P2Y12R é o único dentre todos os subtipos de receptores da família P2 que atua como um alvo farmacológico, apresentando medicamentos que são atualmente utilizados na terapia de pacientes com maior risco de apresentar eventos cardiovasculares adversos, tais como: infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (AVE). Os antagonistas do P2Y12R atuam inibindo a agregação plaquetária que é promovida pelo receptor ativado pelo seu ligante fisiológico, o ADP, prevenindo assim, a formação de trombos (Motovska & Kala, 2008; Jacobson & Boeynaems, 2010).

O clopidogrel (Plavix[®]), mostrado na Figura 6a, foi o primeiro fármaco desenvolvido e pertence ao grupo das tienopiridinas que atuam como pró-drogas, que após serem metabolizadas pelo fígado, tornam-se metabólitos ativos, os quais são inibidores irreversíveis do P2Y12R. A porção ativa deste fármaco é um grupamento tiol, que se liga covalentemente à

cisteína 97 da primeira cauda extracelular do P2Y₁₂R, o que resulta na ruptura dos oligômeros deste receptor em dímeros ou monômeros, o que explica a sua atividade irreversível (Jacobson & Boeynaems, 2010). O clopidogrel (Plavix[®]) está no mercado desde a década de 1990 e somente no ano de 2008 rendeu aproximadamente 8 bilhões de dólares em vendas mundiais (Jacobson & Boeynaems, 2010; Calo-Fernández & Martínez-Hurtado, 2012).

No ano 2000, foi lançado o fármaco prasugrel (Efient[®]), um antagonista irreversível do P2Y₁₂R, que é também é uma pró-droga, porém mais potente que o clopidogrel, mostrado na Figura 6b. Uma comparação entre esses dois fármacos demonstrou que o prasugrel reduziu em 19% o risco de morte por problemas cardiovasculares, como infarto do miocárdio ou AVE na população estudada, porém aumentou o risco de hemorragia. Entretanto, um novo estudo sugere o uso do prasugrel em pacientes diabéticos, nos quais o fármaco apresenta uma maior intensidade de inibição plaquetária e menor risco de hemorragia (Jacobson & Boeynaems, 2010; Cuisset et al., 2013).

Já em 2005 foi lançado pela empresa AstraZeneca o fármaco ticagrelor, mostrado na Figura 6c. Ele atua como uma droga com atividade biológica e apresenta grande eficácia na redução da morte cardiovascular. Em um estudo comparativo realizado durante 12 meses em uma população de 18.624 pacientes americanos e europeus com síndrome coronária aguda foi observado que 9,8% dos pacientes que fizeram uso do ticagrelor contra 11,7% que fizeram uso do clopidogrel vieram a óbito em virtude de causas vasculares, tais como infarto ou AVE. Apesar disso, 0,9% dos pacientes que utilizaram o ticagrelor descontinuaram o tratamento em virtude do aparecimento de dispnéia como efeito colateral, contra os 0,1% que utilizaram o clopidogrel (Wallentin et al., 2009; Jacobson & Boeynaems, 2010).

Além destes, outros fármacos com ação antagonista sobre o P2Y₁₂R vêm sendo desenvolvidos e encontram-se em fase de ensaio clínico, como o cangrelor e o elinogrel (Jacobson & Boeynaems, 2010; Michelson, 2011; Bonadei et al., 2014).

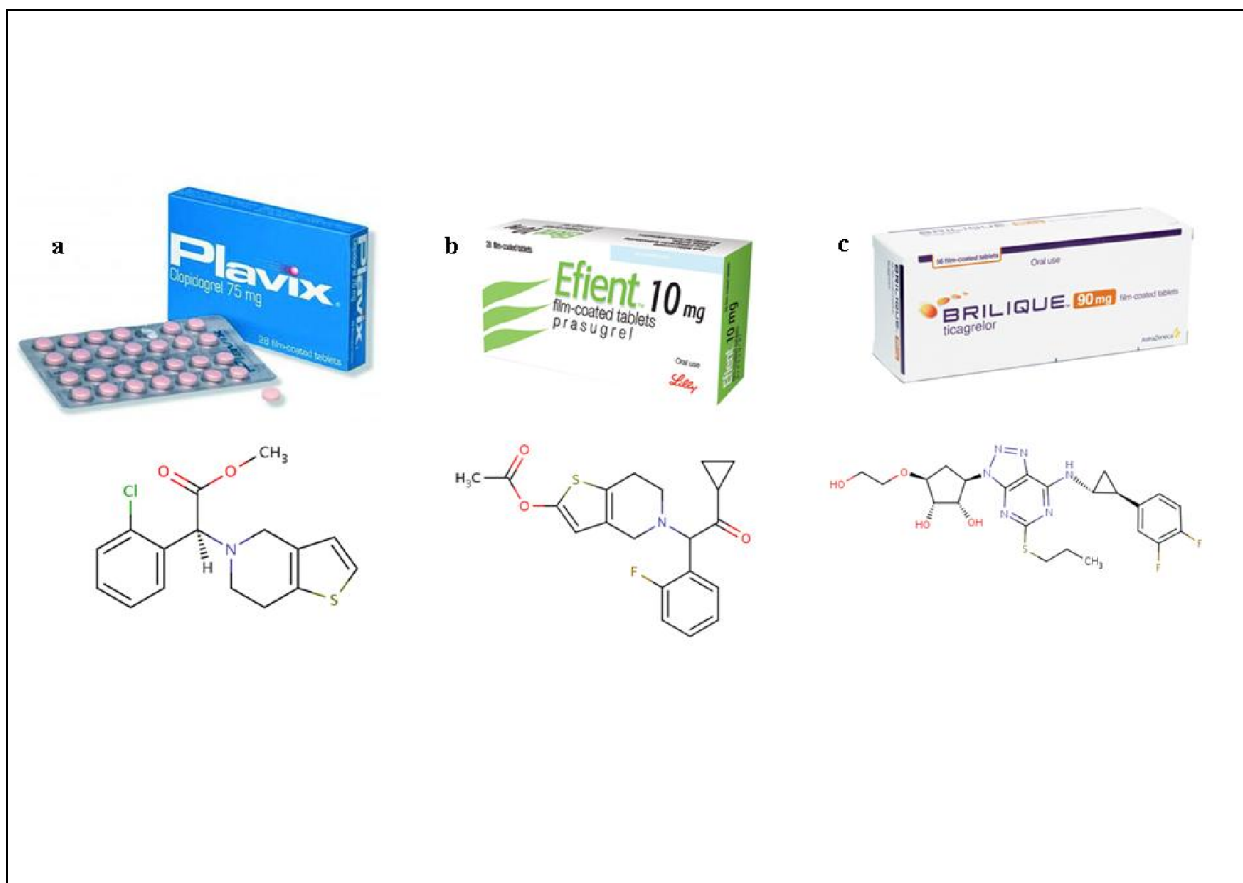


Figura 6: Fármacos com ação antagonista sobre o receptor P2Y₁₂R utilizados na clínica na prevenção da aterotrombose e suas respectivas estruturas químicas. Os fármacos clopidogrel (Plavix[®], Sanofi Aventis) (a) e prasugrel (Efient[®], Lilly) (b) são pró-drogas, que ao serem metabolizadas pelo fígado, tornam-se metabólitos ativos que inibem irreversivelmente o P2Y₁₂R, enquanto o ticagrelor (Brilique[®], AstraZeneca) (c), um antagonista reversível do P2Y₁₂R, funciona como uma droga com atividade biológica. Acima estão demonstradas as apresentações farmacêuticas e abaixo, suas respectivas estruturas químicas.

3. Receptores ativados fisiologicamente pelo UTP

A uridina extracelular é um nucleotídeo que promove importantes efeitos biológicos em diversos tipos celulares e tecidos a partir da ligação aos receptores específicos para essa molécula (Heilbronn et al., 1997). Esse nucleotídeo, assim como o ATP, encontra-se armazenado no meio intracelular, podendo ser liberado por neurônios excitatórios, células lesionadas ou que estejam sob estresse mecânico ou oxidativo, plaquetas em processo de agregação, macrófagos que estejam se degranulando, bem como por astrócitos através de mecanismos de exocitose de vesículas contendo UTP/ATP, bem como via transportadores da família ABC, entre outros (Weisman et al., 2005). Uma vez no meio extracelular, esse nucleotídeo é capaz de ativar os receptores P2Y2 e P2Y4 em uma concentração de aproximadamente 10 μ M (Heilbronn et al., 1997).

O receptor P2Y2 é um GPCR que apresenta afinidade tanto pelo UTP como pelo ATP extracelular. Ele é expresso em uma variedade de células e tecidos, tais como: células epiteliais e musculares, monócitos, macrófagos, neutrófilos, cardiomiócitos, além de órgãos como cérebro, coração, rins, fígado, baço, placenta e músculo esquelético (Peterson et al., 2010). Uma vez ativado, este receptor medeia respostas pró-inflamatórias, incluindo o aumento da proliferação e motilidade celular, bem como expressão de moléculas de adesão celular e citocinas. Além disso, ele também participa da síntese de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas e óxido nítrico (Weisman et al., 2005; Peterson et al., 2010).

No Sistema Nervoso, o P2Y2R é expresso em vários tipos celulares como células de Schwann, neurônios, oligodendrócitos e astrócitos (Weisman et al., 2005). Em astrócitos, a sua ativação estimula a expressão da citocina TGF- β , a qual regula a proliferação e diferenciação celular de forma dependente da ativação do p-38 e JNK. Além disso, já está descrito que o P2Y2 ativado tanto pelo ATP quanto pelo UTP induz a transição do ciclo celular da fase G1 para as fases S e M, além de aumentar a expressão da proteína glial fibrilar acídica (GFAP) e a síntese de DNA (Weisman et al., 2005). A interação entre o P2Y2R e integrinas $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ é essencial para a migração de astrócitos, o que facilita o crescimento axonal durante o desenvolvimento e a plasticidade e reparo de células danificadas em adultos, o que evidencia um possível papel neuroprotetor (Weisman et al., 2005). Além disso, o P2Y2R pode promover a otimização do rearranjo do citoesqueleto, além de regular funções específicas de acordo com o tipo celular, tais como: crescimento de neuritos, fagocitose, formação de sinapses e quimiocinese (Weisman et al., 2005).

Este papel neuroprotetor se torna evidente uma vez que em condições inflamatórias ou

de lesão, em que há grande aumento na liberação da citocina IL-1 β , ocorre um aumento na expressão do P2Y2R em neurônios, que até então, apresentavam uma baixa expressão deste receptor, bem como uma baixa responsividade ao UTP (Peterson et al., 2010). Entre os exemplos de situações patológicas em que ocorre um aumento da expressão do P2Y2R estão: lesão mecânica aguda ou crônica da medula espinhal, isquemia cerebral, lesão mecânica do núcleo accumbens e trauma cerebral, sendo que esta supra-regulação pode representar uma resposta celular ao dano tecidual e inflamação (Weisman et al., 2005).

Alguns autores sugerem que o receptor P2X7 pode participar da regulação da expressão do P2Y2R funcional em neurônios, uma vez que ele medeia a liberação da IL-1 β e também do ATP, promovendo dessa forma a liberação de um agonista para ativar os receptores P2, incluindo o P2Y2R (Weisman et al., 2012). Interessantemente, já foi detectado que os níveis da citocina IL-1 β são elevados em pacientes com a doença de Alzheimer, assim como a expressão do P2Y2R é supra-regulada por esta citocina. Vários estudos têm demonstrado o papel deste receptor nesta patologia *in vitro* e em modelos animais (Weisman et al., 2012). Além disso, já é descrito que essa supra-regulação do P2Y2R em neurônios aumenta o processamento da proteína precursora amilóide (APP) via ativação de metaloproteases de matriz extracelular, como a α -secretase, o que gera uma resposta neuroprotetora, em virtude da produção de peptídeos solúveis de APP não-amiloidogênicos. A ativação do P2Y2R também aumenta a migração celular e atividade fagocítica de micróglia, aumentando assim, a captação de oligômeros de amilóide β_{1-42} (A β) neurotóxicos, os quais possuem um papel importante na progressão da doença de Alzheimer, resposta essa que não foi detectada em camundongos P2Y2R^{-/-}. Com a internalização e a degradação da A β pela micróglia e astrócitos, a toxicidade da A β em neurônios torna-se reduzida e a progressão da doença pode tornar-se estacionada, o que torna o P2Y2R um importante alvo terapêutico para a prevenção do dano neuronal associado a esta doença e outras de caráter neuroinflamatório (Weisman et al., 2012; Peterson et al., 2010).

No contexto das respostas imunológicas, o P2Y2R também desempenha importantes papéis em vários tipos celulares. Em neutrófilos, o P2Y2R induz uma mobilização de cálcio através da via PLC β /IP $_3$, e medeia a polimerização da actina, a qual está envolvida na motilidade celular (Jacob et al., 2013). Em macrófagos, ele também produz uma mobilização de cálcio e promove junto com outros receptores P2 as atividades de quimiotaxia e fagocitose (Jacob et al., 2013; Alves et al., 2013). Nas células dendríticas, o P2Y2R apresenta um papel importante na promoção da migração celular induzida pelo ATP fisiológico (Jacob et al., 2013). Nos linfócitos B e T, o P2Y2R é um dos receptores P2Y que apresentam os maiores níveis de expressão, entretanto, a sua função neste tipo celular ainda não está definida (Jacob

et al., 2013). O P2Y2R já é caracterizado como possível alvo terapêutico para o tratamento da asma em virtude do seu papel na quimiotaxia de células dendríticas e de eosinófilos na inflamação alérgica do pulmão (Jacob et al., 2013). Além disso, o trabalho de Muller e colaboradores (2010) forneceu evidências que pacientes asmáticos apresentam uma elevada expressão do P2Y2R comparado aos controles saudáveis.

O receptor P2Y2 também é expresso em diversos tipos celulares de células tumorais, nos quais desempenha um papel sobre a proliferação celular. Em linhagens celulares de melanoma (A375), de carcinoma cutâneo escamoso (A431), de câncer de pulmão (A549) e de câncer de mama (MCF-7), entre outras, a ativação do receptor P2Y2 induz o aumento dos níveis intracelulares de cálcio através da via da PLC β /IP $_3$, além de promover a proliferação celular (White & Burnstock, 2006). Inclusive já foi demonstrada uma co-localização entre o P2Y2R e marcadores de proliferação celular em células de carcinoma cutâneo escamoso e a linhagem celular A431 (White & Burnstock, 2006). Já em culturas de células de pacientes com câncer colorretal, em células da linhagem de câncer colorretal HT29, em células de carcinoma escamoso do esôfago e na linhagem celular de câncer de esôfago Kyse-140, foi observada a presença do receptor P2Y2 funcional, entretanto, não foi constatada a proliferação celular como era esperado e isto sugere que ele pode estar implicado na inibição da proliferação celular em alguns tipos celulares (White & Burnstock, 2006). White & Burnstock (2006) comentam que esta ambigüidade no tipo de resposta pode estar associada com a ativação simultânea de diferentes sistemas de segundo mensageiro, que apresentam efeitos distintos sobre a proliferação celular ou ainda com a concentração de ATP extracelular necessário para causar uma resposta.

Um trabalho recente investigou o papel do receptor P2Y2 sobre a regeneração do fígado após hepatectomia parcial (Tackett et al., 2014). Thevananther e colaboradores (2004) demonstraram previamente que o ATP extracelular estimulava a progressão do ciclo celular de hepatócitos *in vitro* através da sinalização de JNK e que isso causava um aumento do número de células após a hepatectomia parcial (Thevananther et al., 2004). Isto sugere que o ATP extracelular poderia atuar como um importante ativador e iniciador da progressão do ciclo celular de hepatócitos, promovendo assim, a sua rápida proliferação. Alguns anos depois, este mesmo grupo de pesquisa identificou que o P2Y2R ativado pelo ATP extracelular iniciava a via de sinalização da p42/44 ERK MAPK que estimulava a progressão do ciclo celular e a proliferação dos hepatócitos em resposta à hepatectomia parcial (Tackett et al., 2014). Esses achados podem contribuir para o conhecimento do importante papel do P2Y2R na reparação de tecidos como o fígado e abrir novos caminhos para a terapia.

Alguns trabalhos também vêm demonstrando os efeitos do P2Y2R sobre a dor. O trabalho de Okada e colaboradores (2002) mostrou que o UTP e o seu derivado, o UDP, apresentaram efeitos antinociceptivos em modelos animais de nocicepção mecânica e térmica (teste de pressão na pata, teste de ponta da cauda e testes com filamentos de von-Frey). O UTP e o UDP apresentaram efeitos antialodínicos em modelo de dor neuropática atuando via receptores P2Y2, P2Y4 e P2Y6 expressos na espinha, enquanto o ATP e o α,β -metileno-ATP produziram hiperalgesia e alodínia táctica através da ativação dos receptores P2X. No trabalho de Andó e colaboradores (2010) foi realizada uma comparação sobre os efeitos de diversos ligantes de receptores P2X e P2Y, entre eles o UTP, em modelos animais de dor aguda, neuropática e inflamatória. Eles observaram que o UTP apresentou um efeito analgésico e reduziu a alodínia em modelos animais de neuropatia experimental com ligação parcial do nervo ciático e nocicepção térmica aguda utilizando o teste da placa quente. Apesar do significativo efeito antinociceptivo do UTP, os dois trabalhos relatam que o curto tempo de duração desta ação de aproximadamente de 45 minutos, deve-se a degradação sistêmica deste nucleotídeo pelas enzimas ectonucleotidases, o que interfere na potência da resposta (Okada et al., 2002; Andó et al., 2010). Já o trabalho de Li e colaboradores (2014) demonstrou que o P2Y2R expresso em neurônios do gânglio trigêmeo promove uma diminuição das correntes transitórias de rápida inativação geradas por canais de potássio, as quais têm a habilidade de regular a atividade neuronal de neurônios nociceptivos, e assim, potencia a excitabilidade neuronal que contribui para a dor neuropática trigeminal, sendo que essa sensação de alodínia foi atenuada na presença do antagonista do P2Y2R. Esses achados sugerem que ligantes do P2Y2R podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova classe de analgésicos.

Em virtude da ação das ectonucleotidases que rapidamente degradam o UTP, foi desenvolvido um agonista seletivo para o receptor P2Y2, o MRS2768, o qual apresenta uma aumentada estabilidade contra a ação destas enzimas por conta de um bloqueio do terminal δ -fosfato, atuando como um fosfoéster, que não é substrato de clivagem da enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (E-NTPDase1)/CD39. No trabalho de Hochhauser e colaboradores (2013) foi demonstrado que a ativação do P2Y2R através do agonista seletivo MRS2768 reduziu o dano isquêmico em cardiomiócitos de camundongos, protegendo o coração da isquemia, minimizando o tamanho do infarto e melhorando a função cardíaca após o infarto do miocárdio. Cabe ressaltar que essas funções foram reduzidas quando o MRS2768 foi co-administrado com o antagonista seletivo do receptor, o AR-C118925. Embora o mecanismo pelo qual o receptor P2Y2 diminua a lesão isquêmica do miocárdio ainda não seja conhecido, este achado é bastante promissor e justifica novos estudos.

Por todas as funções que o P2Y2R apresenta, algumas indústrias farmacêuticas se dedicam a buscar ligantes para este receptor que possam trazer avanços terapêuticos para diversas doenças. O primeiro fármaco que se encontra em fase de ensaio clínico para tratar uma doença associada ao P2Y2R é o Denufosal[®] (Inspire Pharmaceuticals). O Denufosal[®] é um fármaco[®] que apresenta atividade agonista ao P2Y2R. Ele vem sendo estudado para o tratamento da fibrose cística, que é uma doença de origem genética, em que o portador apresenta uma mutação no gene regulador da condutância transmembrana (CFTR), o qual codifica uma glicoproteína de membrana que regula o fluxo iônico de cloro, sódio e bicarbonato na superfície da via respiratória (Accurso et al., 2011). Assim, o portador dessa doença apresenta um transporte iônico anormal e líquido superficial nas vias aéreas reduzido, o que diminui a depuração mucociliar, aumentando a suscetibilidade a infecções e inflamação com progressivo dano nas vias aéreas (Accurso et al., 2011). O Denufosal[®] atuando sobre o P2Y2R consegue reverter o defeito básico desta patofisiologia, promovendo um aumento na secreção do cloro através de um canal de cálcio ativado por cloro, inibindo a reabsorção de sódio através de um canal de sódio epitelial, bem como estimulando a frequência do batimento ciliar como mostrado na Figura 7 (Accurso et al., 2011). Além disso, esse fármaco é bem tolerado pelos pacientes e causa poucos efeitos colaterais em virtude da baixa exposição sistêmica após a sua inalação (Accurso et al., 2011).

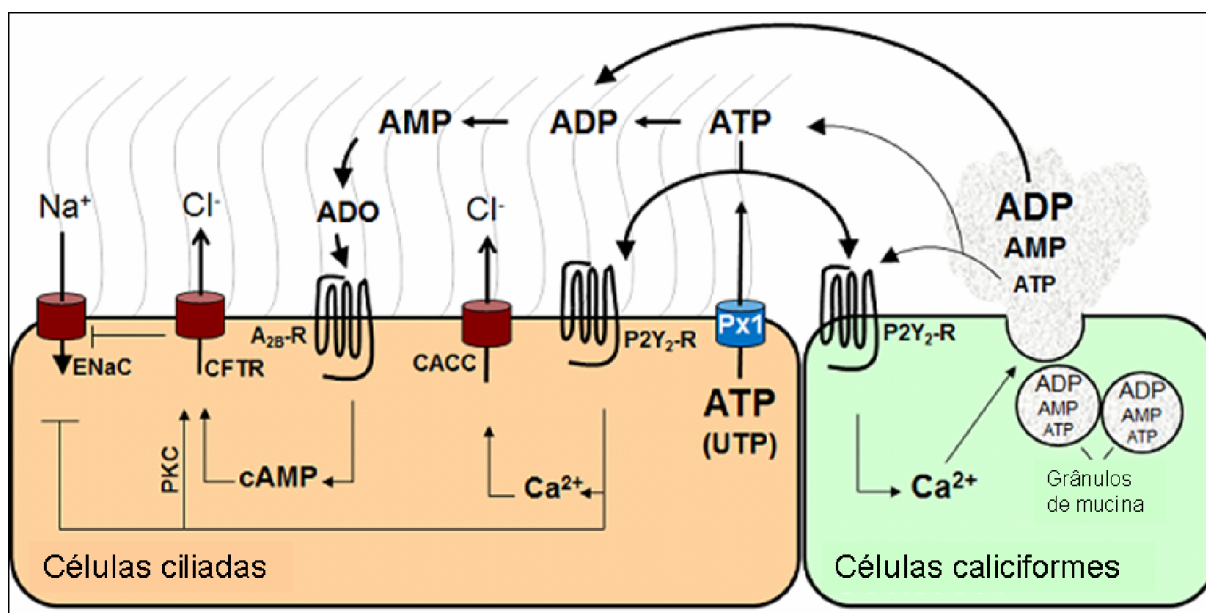


Figura 7: Atividade do receptor P2Y2 sobre canais iônicos transmembranares em células ciliadas das vias aéreas. O ATP e o UTP intracelular são liberados para o meio extracelular via panexina (Px1) expressa nas células ciliadas, e uma vez liberados, podem ativar receptores P2, incluindo o P2Y2R. O P2Y2R ativado pelo ATP ou UTP extracelular promove um aumento dos níveis intracelulares de cálcio e a ativação da proteína quinase C (PKC), promovendo a abertura de canais de cloro ativados por cálcio (CACC) e a ativação da proteína transmembrana reguladora da condutância iônica (CFTR) respectivamente, induzindo assim, a secreção de cloro. Além disso, o P2Y2R inibe um canal de sódio epitelial (ENaC), impedindo a reabsorção do sódio e nas células caliciformes, induz a liberação dos grânulos de mucina (Adaptado de Lazarowski, 2011).

O segundo fármaco é o Diquafosol[®] (Inspire Pharmaceuticals), uma solução oftálmica que atua sobre o P2Y2R expresso em células do tecido ocular para tratar a doença do Olho Seco e que já está aprovado para uso apenas no Japão e na Coreia com o nome de Solução Oftálmica 3% Diquas[™] (Nakamura et al., 2012; Lau et al., 2014). A doença do olho seco é uma doença multifatorial que é caracterizada por sintomas que incluem desconforto e perturbação visual, associado com a instabilidade e aumento da osmolaridade do filme lacrimal e inflamação da superfície ocular, que causam impactos na vida cotidiana dos portadores desta doença (Nakamura et al., 2012; Lau et al., 2014). O P2Y2R é expresso em células do tecido ocular tais como as células caliciformes e serosas, células do epitélio córneo, glândula de Meibomius e células ductais da superfície ocular, onde pode ser ativado por seus agonistas fisiológicos que são liberados na superfície ocular em resposta ao trauma (Nakamura et al., 2012; Lau et al., 2014). O Diquafosol[®] é um análogo do UTP, apresentando, portanto, atividade agonista sobre o P2Y2R. Uma vez que o P2Y2R é ativado nas células do

tecido ocular, ele promove um aumento da concentração de cálcio intracelular, o que induz a abertura dos canais de cloro ativados por cálcio, levando ao fluxo de cloro e transporte da água. Nas células caliciformes, esse aumento de cálcio induz a liberação de mucina dos grânulos secretórios como mostrado na Figura 8 (Nakamura et al., 2012; Lau et al., 2014).

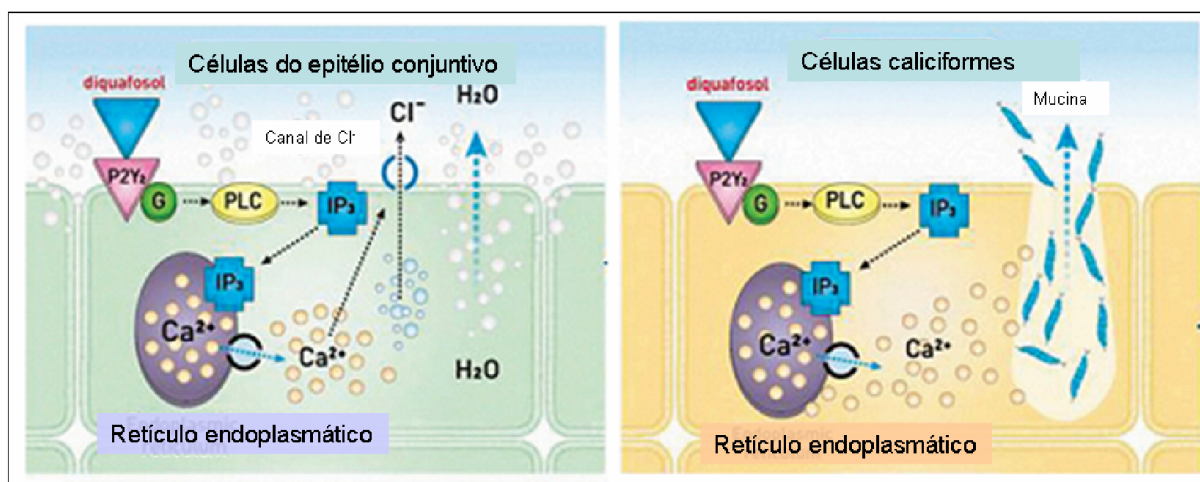


Figura 8: Mecanismo de ação do Diquafosol[®] nas células do epitélio da conjuntiva e nas células caliciformes. O Diquafosol ativa o P2Y2R nas células do epitélio conjuntivo promovendo um aumento dos níveis de cálcio intracelular, o que leva a abertura de canais de cloro ativados por cálcio e aumento do transporte da água. Nas células caliciformes, o aumento de cálcio intracelular induz a liberação de mucina (Adaptado de Nakamura et al., 2012).

O receptor P2Y4 é o outro receptor ativado fisiologicamente pelo UTP extracelular. Muitas de suas funções ainda não são bem compreendidas, uma vez que ele e o receptor P2Y2 são expressos nos mesmos tecidos biológicos e por vezes, até nos mesmos tipos celulares, sendo ativados pelo mesmo agonista, o que dificulta a discriminação dos seus efeitos biológicos (Maruoka et al., 2011). Cabe ressaltar que o P2Y4R murino pode ser ativado tanto pelo UTP quanto pelo ATP extracelular, embora em humanos este último não demonstra atividade, podendo atuar inclusive como um antagonista (Filippov et al., 2003; Jacobson & Boeynaems, 2010). Entretanto, este problema está sendo solucionado com o aparecimento de agonistas seletivos para cada um dos receptores conforme mostrado no Quadro 2, embora ainda não seja descrito nenhum tipo de antagonista seletivo para o P2Y4R.

Quadro 2 – Agonistas e antagonistas dos receptores P2Y2 e P2Y4

Receptor	Agonistas fisiológicos (pEC ₅₀)	Agonistas (pEC ₅₀)	Antagonistas (pIC ₅₀)
P2Y2	UTP (8,10) ATP (7,07)	MRS2698 (8,10) MRS2768 (5,72) INS 365/ Diquafosol (7,0) INS 37217/Denufosol (6,7) UTP γ S (6,6)	PSB-716 (5,01) AR-C126313 (6) Suramina (4,3) RB2 (4,0)
P2Y4	UTP (5,60) ATP (5,7) - rato	2'-azido-dUTP (7,1) UTP γ S (5,8) Ap ₄ A (5,5) CTP (5,2) ITP (5,1) MRS4062 (7,64)	ATP (4,4) - humano RB2 (> 4,0) Suramina (> 4,0)

O P2Y4R apresenta algumas funções biológicas importantes, como por exemplo, a regulação do fluxo de íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em alguns tipos celulares (Marcus & Scofield, 2001; Ghanem et al., 2005; Kim et al., 2010); a regulação positiva na neuritogênese em células SH-SY5Y em processo de diferenciação, aumentando a atividade de membros da família de transcrição AP-1 como c-fos, fos-B e jun-D, mas causando a morte celular em situações de ativação prolongada (Cavaliere et al., 2005). Também já está relatado que o P2Y4R demonstrou efeitos protetores em miócitos murinos HL-1 durante a isquemia cardíaca (Maruoka et al., 2011). No recente trabalho de Li e colaboradores (2013) foi observado que o ATP extracelular liberado pela micróglia estimulada com o peptídeo A β *in vitro*, induziu a pinocitose desses peptídeos via P2Y4R, a partir da ativação da via de sinalização do PI3K/AKT como mostrado na Figura 9. Apesar desta promissora atividade *in vitro*, a sua relevância em modelos *in vivo* precisa ser elucidada.

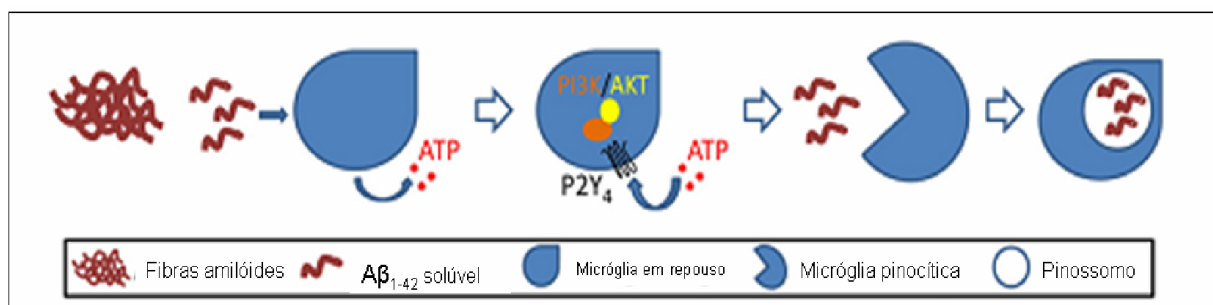


Figura 9: Mecanismo de ação do P2Y4R na estimulação da pinocitose em micróglia. Os peptídeos de $A\beta_{1-42}$ estimulam a micróglia em repouso a liberar ATP para o meio extracelular, o qual ativa o receptor P2Y4. Uma vez ativado, este receptor ativa vias de sinalização subjacentes, incluindo a via da PI3K/AKT e assim, promove a pinocitose e conseqüente depuração dos peptídeos $A\beta$ (Adaptado de Li et al., 2013).

4. Os Produtos Naturais na descoberta de novos ligantes de receptores purinérgicos

Um produto natural é uma substância ou um conjunto de substâncias químicas produzidas por organismos vivos, tais como: plantas, animais, fungos e microorganismos. Este termo, produto natural, ainda pode ser utilizado para definir um organismo (ex: planta, animal, microorganismo etc.), uma parte dele (ex: uma folha de uma planta ou um órgão isolado de um animal) e extratos e substâncias puras isoladas (Orhan, 2014).

Os produtos naturais vêm sendo utilizados há milhares de anos para o tratamento de doenças humanas tais como doenças inflamatórias, parasitárias, neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, oncológicas e dor, formando a base das medicinas tradicionais em todo mundo, como por exemplo, as Medicinas Tradicionais Chinesa, Japonesa e Coreana (Koehn & Carter, 2005; Balunas & Kinghorn, 2005; Itokawa et al., 2008; Soares-Bezerra et al., 2013).

Este legado centenário do uso principalmente de plantas nas Medicinas Tradicionais forneceu informações preciosas para a descoberta de novas drogas, como a maioria dos fármacos pioneiros, como a aspirina (analgésico), a digitoxina (antiarrítmico e cardiotônico), a morfina (analgésico opióide), a quinina (antimalárico) e a pilocarpina (agente miótico) (Butler, 2004; Itokawa et al., 2008). Além disso, os produtos naturais ainda são uma fonte importante para a descoberta de novos fármacos para o tratamento do câncer e hipertensão (Butler, 2004). Dentre os produtos naturais vegetais que apresentam atividade anticâncer estão: os alcalóides da *Vinca* sp. (ex: vinblastina) cujo alvo molecular é a proteína tubulina e

os dipertenos das espécies de *Taxus* sp. (ex: taxol) que também interagem com a tubulina (Itokawa et al., 2008).

Entre 1981 e 2002, foram introduzidas 877 moléculas como Novas Entidades Químicas, das quais aproximadamente 49% eram produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em farmacóforos de produtos naturais (Koehn & Carter, 2005). E de um total de 13 fármacos oriundos de produtos naturais ou seus derivados aprovados para o mercado em todo o mundo entre 2005 e 2007, 5 eram classificados como produtos naturais, 6 eram produtos naturais semi-sintéticos e 2 eram fármacos derivados de produtos naturais (Galvez-Llompart et al., 2011). Além disso, aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento utilizam plantas para curar suas enfermidades e aproximadamente 25% dos fármacos prescritos nos Estados Unidos contém ao menos um composto ativo de origem vegetal (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Orhan, 2014).

Apesar disso, a pesquisa em produtos naturais vem apresentando um declínio em virtude da substituição do uso de extratos brutos por moléculas sintéticas e puras, uma vez que os extratos apresentam uma grande complexidade de compostos, sendo que o princípio ativo pode ser encontrado em baixas concentrações, além de ocasionar problemas em virtude da coloração, difícil solubilidade, falta de reprodutibilidade entre outros (Bhakuni & Rawat, 2005). Apesar disso, a possibilidade de se encontrar aleatoriamente uma molécula dentro de uma biblioteca de compostos sintéticos com a atividade biológica é extremamente difícil e dispendioso.

Entretanto, a observação de moléculas protótipos em plantas medicinais oriundas da medicina popular pode render informações valiosas sobre a atividade biológica desejada e a diversidade de metabólitos secundários. Os produtos naturais também oferecem a vantagem de apresentar uma diversidade estrutural inigualável, que foi atingida durante os milhões de anos de evolução biológica (Cechinel Filho & Yunes, 2001; Yunes & Cechinel Filho, 2001). Além disso, o problema sobre o trabalho com extratos brutos foi solucionado com o avanço e modernização de técnicas de purificação de extratos, que visa eliminar os resultados falso-positivos e as interferências que levam a resultados de difícil definição, bem como diminuir cada vez mais o tempo de isolamento e determinação estrutural dos compostos naturais ativos (Yunes & Cechinel Filho, 2001).

Plantas, animais terrestres e marinhos, fungos e microorganismos são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e de acordo com riqueza de espécies existentes mundialmente, esses produtos naturais podem revelar-se como uma biblioteca natural que merece ser estudada e melhor conhecida, visto que apenas entre 5% das espécies

de plantas mundiais, por exemplo, tem sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Barreiro & Bolzani, 2009). Além disso, o Brasil apresenta entre 15 a 20% de toda biodiversidade mundial, sendo considerado ainda o maior do planeta em número de espécies como mostrado no Quadro 3 (Lewinsohn & Prado, 2005; Barreiro & Bolzani, 2009; Mora et al., 2011). Isto sugere que há uma grande possibilidade de serem descobertos espécies com potencial farmacológico promissor no Brasil, justificando assim, estudos que visem conhecer e identificar a atividade biológica das mais variadas espécies biológicas.

Quadro 3 – Número de espécies biológicas catalogadas no Brasil e no mundo e estimadas no mundo (Lewinsohn & Prado, 2005; Mora et al., 2011).

Grupo	Brasil	Mundo	Estimado no mundo
Animais	136.990	1.359.400	7.770.000
Fungos	14.510	72.000	611.000
Plantas	49.520	279.400	298.000
Protozoários	10.320	81.300	63.900
Bactérias e Archeobactérias	900	4.300	10.135
Total	212.240	1.796.400	8.753.035

Essa riqueza de espécies biológicas pode contribuir significativamente para a descoberta de novos agonistas e antagonistas para os receptores purinérgicos e assim, colaborar para a implementação da terapia purinérgica, visto que uma das principais razões para a dificuldade desta é a escassez de ligantes específicos para os subtipos de receptores que apresentem estabilidade e eficácia *in vivo* (Burnstock, 2006b). Além disso, já está descrito na literatura que várias espécies biológicas apresentam compostos com atividade agonista ou antagonista sobre diversos subtipos de receptores purinérgicos, como por exemplo, a atividade antagonista de flavonóides sobre o receptor P2Y₂; a atividade antagonista da emodina extraída da *Rheum officinale* Baill e da amentoflavona extraída da *Rheedia longifolia* Planch & Triana sobre o P2X₇R; a atividade agonista dos compostos iso-ianteranos A e B da esponja do mar *Ianthella quadrangulata* sobre o P2Y₁₁R; e a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP em plaquetas de coelhos pelo extrato da folha de *Trigonella foenum* possivelmente via inibição do P2Y₁₂R (Faria et al., 2012). Esses exemplos reforçam a importância dos produtos naturais na descoberta de novos ligantes para os receptores purinérgicos e a sua contribuição potencial para a terapia purinérgica.

5. A técnica de mensuração da $[Ca^{2+}]$ na triagem de ligantes para os receptores P2

O cálcio é um íon responsável por sinalizar e controlar numerosos processos intracelulares que vão desde a fertilização, diferenciação e proliferação celular até a apoptose (Berridge et al., 2000). Células em repouso apresentam uma concentração intracelular de cálcio de aproximadamente 100 nM, porém elas são ativadas quando esta concentração aumenta, podendo atingir a faixa de 1 μ M (Berridge et al., 2000). Essa baixa concentração de cálcio citosólico é mantida através do efluxo ativo de cálcio via Ca^{2+} -ATPases e transportadores de Na^+/Ca^{2+} na membrana plasmática e via Ca^{2+} -ATPases do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) e do Complexo de Golgi (SPCA), bem como através dos transportadores de Ca^{2+} e Na^+/Ca^{2+} na mitocôndria (Azimi et al., 2014). Por outro lado, os níveis de cálcio podem aumentar a partir da ativação de receptores acoplados à proteína G_q que ativa a via da $PLC\beta/ IP_3$ como a maioria dos subtipos do P2YR, resultando na liberação do cálcio em estoque mediado pelos canais de cálcio ativados pelo IP_3 e pelos receptores rianodínicos, os quais medeiam a liberação de cálcio do estoque induzida pelo aumento de cálcio. Além disso, canais iônicos expressos na membrana plasmática também podem contribuir para o influxo de cálcio, tais como os canais de cálcio ativados por voltagem (Ca_v), os canais de cálcio ativados por ligantes, como os P2X, canais de cálcio operados por estoque (SOC) e canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) (Azimi et al., 2014).

Em virtude das vias de sinalização dos receptores P2X e P2Y (com exceção dos P2Y12R, P2Y13R e P2Y14R) promoverem um aumento na concentração de cálcio intracelular através de fluxo direto deste íon pela membrana e liberação do estoque de cálcio via ativação do IP_3R respectivamente, técnicas de mensuração dos níveis deste íon podem ser bastante úteis na detecção de agonistas ou antagonistas para estes receptores em primeira instância (Arkin et al., 2012; YaQin et al., 2013). Existem dois tipos de técnicas para a mensuração da concentração de cálcio intracelular: as técnicas não-ópticas e as técnicas ópticas (Takahashi et al., 1999).

As técnicas não-ópticas são aquelas que mensuram as correntes de cálcio com o objetivo de observar se um ligante promove o aumento da $[Ca^{2+}]_i$, característica típica de agonistas, ou a sua inibição, característica típica de antagonistas. Entre as técnicas não-ópticas estão: a eletrofisiologia e os microeletrodos seletivos ao cálcio (Takahashi et al., 1999).

A eletrofisiologia é uma técnica utilizada para monitorar as correntes de cálcio geradas por canais iônicos localizados na membrana plasmática, como por exemplo, os receptores P2X, e que tem por principal vantagem a utilização de um canal iônico como um detector bioquímico natural (Takahashi et al., 1999). Esta técnica é considerada como o padrão-ouro

para o estudo de canais iônicos a partir de registros de correntes unitárias ou macroscópicas (soma de diversos canais unitários) utilizando o método de *patch-clamp* em diversas configurações, em virtude da sensibilidade e acurácia dos resultados. Apesar disso, a aplicação desta técnica é mais apropriada para ensaios de baixo desempenho, visto que é uma técnica bastante laboriosa e que exige profissional treinado (Takahashi et al., 1999; Mathes et al., 2009; YaQin et al., 2013).

Na técnica que utiliza microeletrodos sensíveis ao cálcio, as concentrações deste íon podem ser mensuradas potenciométricamente usando estes eletrodos, os quais somente são acessíveis às células grandes e possuem uma taxa de mensuração da resposta de cálcio muito baixa, na faixa de segundos (Takahashi et al., 1999; Bruton et al., 2012).

Já as técnicas ópticas incluem o uso de moléculas fluorescentes tais como as fotoproteínas ativadas por cálcio, as sondas metalocrômicas e os indicadores de cálcio derivados dos quelantes de cálcio EGTA e BAPTA, os quais mensuram a resposta intracelular deste íon que pode ser observada com o auxílio de diversos equipamentos como microscópios, citômetros de fluxo, fluorímetros e leitores de placas (Takahashi et al., 1999).

No passado, a aequorina foi a mais popular entre as fotoproteínas, sendo utilizada para mensurar os níveis de cálcio. Ela emite uma luz azul, cuja taxa de emissão aumenta dramaticamente em resposta ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e suas principais vantagens são o baixo *background* e a falta de necessidade de uma luz estimuladora (Bruton et al., 2012). Apesar disto, a produção de luz é muito baixa, visto que uma média de 20 íons Ca^{2+} tem que ligar-se a seis moléculas de aequorina para causar a emissão de um único fóton, sendo que esta fotoproteína é irreversivelmente destruída por uma alta concentração de cálcio (Tsien, 1999). Além disso, a principal dificuldade de trabalhar com estas fotoproteínas reside na necessidade de ter de microenjetá-las nas células, o que somente é possível em células grandes, ou realizar procedimentos de transfecção (Bruton et al., 2012).

As sondas não-fluorescentes metalocrômicas de Bis-azo que funcionam como indicadores de Ca^{2+} são: arsenazo III e antipylazo III. A absorvância de luz destes compostos depende da $[Ca^{2+}]_i$ e assim, eles conseguem detectar variações transientes da $[Ca^{2+}]_i$ e em virtude da sua baixa afinidade pelo cálcio (K_d na faixa de 10 μM para a arsenazo III), eles podem detectar altos níveis da $[Ca^{2+}]_i$ (Tsien, 1999; Bruton et al., 2012). Apesar de suas vantagens, estes compostos apresentam grande sensibilidade ao pH, alta tendência de se ligarem a proteínas intracelulares como NAD(P)H e sulfidrilos e gerar radicais livres e superóxido. Além disso, essas sondas metalocrômicas também necessitam serem colocados dentro das células, uma vez que são impermeáveis à membrana plasmática (Tsien, 1999; Bruton et al., 2012).

Dessa forma, estes métodos de mensuração de cálcio intracelular descritos utilizam indicadores impermeáveis às membranas plasmáticas e por isso, eles precisam ser colocados dentro das células através de várias técnicas, que incluem: microinjeção, perfusão interna com uma micropipeta e eletroporação (Tsien, 1999). Estas técnicas são muito invasivas e podem causar danos à membrana celular, o que pode causar perturbações nos sinais da $[Ca^{2+}]_i$ em virtude do grande gradiente eletroquímico que favorece a entrada de cálcio. As técnicas de perfusão interna e eletroporação ainda podem causar uma substituição dos constituintes por aqueles que são injetados. Além disso, as técnicas que utilizam micropipeta necessitam de equipamento especializado e habilidade do operador, o qual precisa injetar a sonda em uma única célula de cada vez, o que torna o trabalho laborioso (Tsien, 1999).

Dessa forma o desenvolvimento de novos indicadores da $[Ca^{2+}]_i$ na década de 1980 por Tsien e colaboradores proporcionou um grande progresso em muitos campos da biologia e pesquisa biomédica (Gee et al., 2000; Bootman et al., 2013). Esses compostos são os indicadores de cálcio mais utilizados atualmente. Eles são baseados nos quelantes de cálcio, EGTA e BAPTA e apresentam alta afinidade pelo Ca^{2+} e baixa afinidade pelo Mg^{2+} e H^+ (Bruton et al., 2012). A molécula indicadora consiste em duas partes: uma parte de ligação ao Ca^{2+} e a parte fluorescente, sendo que a ligação do Ca^{2+} altera a conformação da parte da molécula que se liga a este íon, o que resulta na alteração da conformação da parte fluorescente e consequente emissão de fluorescência (Bruton et al., 2012).

Esses indicadores de cálcio são divididos em dois grupos: indicadores ratiométricos com duplo comprimento de onda e não-ratiométricos com comprimento de onda único (Bruton et al., 2012). Os indicadores ratiométricos apresentam duplo comprimento de onda, um para a forma do indicador ligado ao Ca^{2+} e outro para a forma livre, os quais apresentam dois picos distintos que podem ser combinados para formar uma razão e assim, são úteis para mensurações de caráter quantitativo. Um exemplo de indicador ratiométrico muito popular é o Fura-2. Já os indicadores não-ratiométricos, que possuem comprimento de onda único, são muito utilizados para mensurações qualitativas e apresentam pequena fluorescência em baixas $[Ca^{2+}]$, porém esta fluorescência aumenta em até 100 vezes quando a $[Ca^{2+}]$ se eleva, o que pode tornar o indicador saturado com Ca^{2+} . Apesar disso, esses indicadores não-ratiométricos apresentam uma faixa dinâmica (diferença entre a intensidade do indicador ligado ao Ca^{2+} e o indicador livre) geralmente maior que a faixa dos ratiométricos, tornando mais fácil a detecção de modestas variações dos níveis de cálcio. Entre os exemplos mais populares de indicadores não-ratiométricos estão o Fluo-3 e o seu derivado, Fluo-4 (Bruton et al., 2012; Bootman et al., 2013).

Os indicadores racionométricos e não-racionométricos são excitados no espectro de luz ultravioleta (UV) e no espectro de luz visível respectivamente. Os primeiros indicadores de Ca^{2+} fluorescentes eram excitados por luz UV e continuam sendo utilizados até hoje para mensuração quantitativa de Ca^{2+} . Um dos problemas com a irradiação UV é que esta é mais citotóxica do que os outros comprimentos de onda e ainda pode induzir a emissão de constituintes celulares que são excitados por este comprimento de onda, o que pode causar algum tipo de interferência na avaliação precisa da $[\text{Ca}^{2+}]$ (Takahashi et al., 1999). Enquanto isso, os indicadores de cálcio excitados por luz visíveis apresentam as vantagens de possuírem um comprimento de onda de emissão em que a autofluorescência celular e o *background* são menores, além de citotoxicidade inferior à promovida pela excitação ultravioleta (Takahashi et al., 1999).

Esses indicadores baseados na estrutura dos quelantes EGTA e BAPTA são moléculas carregadas e, portanto, impermeáveis às membranas plasmáticas. Devido à adição de grupos lipofílicos, como o grupo acetoximetil (AM), à parte carregada da molécula, esses indicadores tornaram-se permeáveis às membranas plasmáticas, o que permite a sua passagem para o interior das células. Uma vez no citosol, as enzimas esterases citoplasmáticas removem os grupos lipofílicos da molécula, tornando-a carregada e impermeável e que assim fica presa no citosol, onde consegue detectar as variações de cálcio rapidamente (Bruton et al., 2012). Em alguns tipos celulares, o indicador carregado pode ser removido do citosol para a solução extracelular através de transportadores orgânicos aniônicos expressos na membrana plasmática, o que geralmente é minimizado com a adição da probenecida, um inibidor padrão de transporte aniônico não específico, na solução de carregamento para prevenir essa perda conforme mostrado na Figura 10 (Li et al., 2008). Contudo, a presença da probenecida na solução de carregamento pode inibir a resposta de alguns receptores como o P2X7 e o TRPA1 (McClenaghan et al., 2012; Bhaskaracharya et al., 2014).

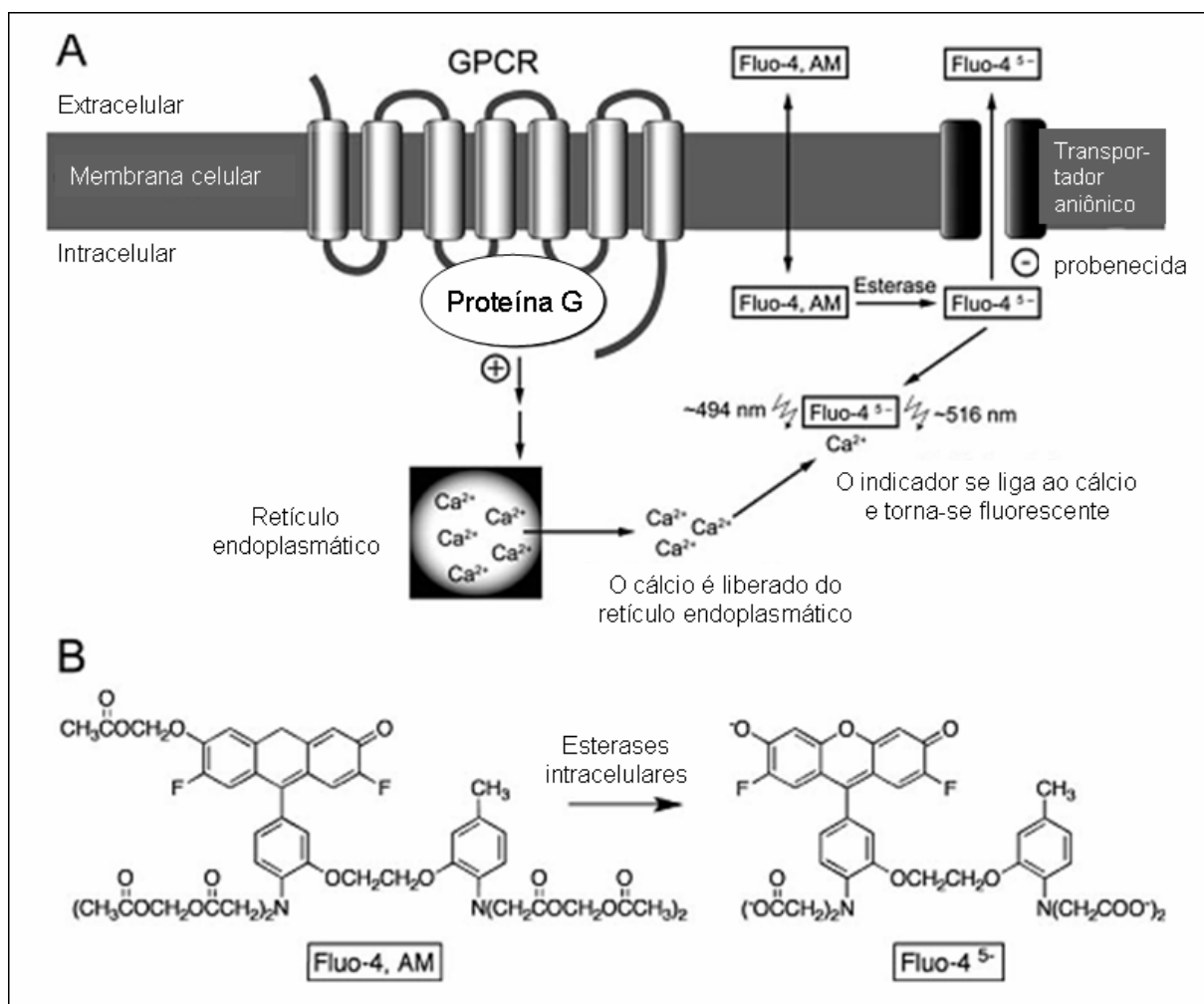


Figura 10: Princípio básico de carregamento de um indicador de cálcio, o Fluo-4AM.

Com a adição do grupo lipofílico, acetoximetil (AM), o Fluo-4AM se torna permeável à membrana plasmática das células, podendo transportar-se para o interior das células. Uma vez no citosol, as esterases citoplasmáticas removem esse grupamento lipofílico, tornando a molécula carregada e presa neste espaço celular. Apesar disso, essas moléculas carregadas podem ser removidas do interior da célula através de transportadores aniônicos, ação que pode ser facilmente inibida a partir da adição da probenecida na solução de carregamento. Assim, o indicador permanece no citosol, disponível para detectar variações nos níveis de cálcio intracelular como mostrado em (A). Em (B) é mostrada a comparação entre o Fluo-4AM, com o grupo acetoximetil e, portanto, lipofílico e o Fluo-4 com carga negativa, após a ação das esterases intracelulares (Adaptado de Hansen & Bräuner-Osborne, 2009).

O monitoramento do sinal de fluorescência dos indicadores de cálcio utilizando fluorímetro ou microscópio fluorescente confocal pode ser utilizado para a avaliação da atividade de compostos com ação sobre receptores metabotrópicos. Apesar disso, ensaios de cálcio que utilizem estes equipamentos não sejam aplicáveis para a execução de triagem de um grande número de amostras em virtude do intenso labor, já que uma única amostra pode ser processada por vez (Sullivan et al., 1999). Com a finalidade de solucionar este problema, foram desenvolvidos instrumentos especializados que permitem o processamento de muitas amostras de forma rápida e eficiente. Eles funcionam como uma excelente ferramenta para o *screening* de um grande número de amostras, como por exemplo, uma biblioteca de produtos naturais, e que precisam ser testadas a partir de ensaios baseados na fluorescência celular, incluindo a mobilização de cálcio promovida por receptores metabotrópicos (Sullivan et al., 1999). Um exemplo de equipamento utilizado para a triagem de alto desempenho de compostos com atividade sobre alvos moleculares que atuam na mobilização de cálcio é o Sistema FlexStation (Lydford et al., 2011).

O FlexStation é um leitor de placas produzido pela empresa Molecular Devices. Ele funciona como uma plataforma que integra as funções de adição de reagentes na placa de ensaio celular através de um sistema de pipetagem automática e a detecção do sinal de fluorescência acontece em tempo real como mostrado na Figura 11. Assim, o equipamento adiciona os reagentes desejados em uma coluna de cada vez, monitorando a fluorescência na modalidade *bottom read*, antes, durante e após a adição dos mesmos (Huggins & Olsen, 2009; Molecular Devices, 2006). Essa propriedade é importante para ensaios de cálcio, visto que a resposta de mobilização deste íon é sensível ao tempo, podendo ser observada entre 10 a 30 segundos para receptores metabotrópicos ativados (Hansen & Bräuner-Osborne, 2009). Além destas vantagens, o usuário pode definir diversos parâmetros para aperfeiçoar o seu ensaio, tais como: utilização de placas de 96 ou 384 poços, o tempo de leitura, o momento e a velocidade em que os reagentes serão adicionados, o número de adições de reagentes, a seleção das ponteiros e poços que serão lidos, entre outros. O FlexStation ainda pode ser integrado a uma variedade de sistemas robóticos visando ao aumento da vazão dos ensaios (Huggins & Olsen, 2009; Molecular Devices, 2006).

Além disso, já foi demonstrado que o FlexStation é capaz de realizar a triagem de compostos com atividade biológica de forma segura e reprodutível (Lydford et al., 2011). Dessa forma, a triagem de compostos com ação sobre os receptores P2 podem ser realizados nesta plataforma através ensaios de mobilização de cálcio intracelular utilizando indicadores de cálcio como o Fluo-4, o qual tem sido amplamente utilizado no campo de triagem de alto-desempenho para a descoberta de moléculas com atividade sobre receptores metabotrópicos e

outros alvos moleculares que resultam na mobilização de cálcio (Li et al., 2008).

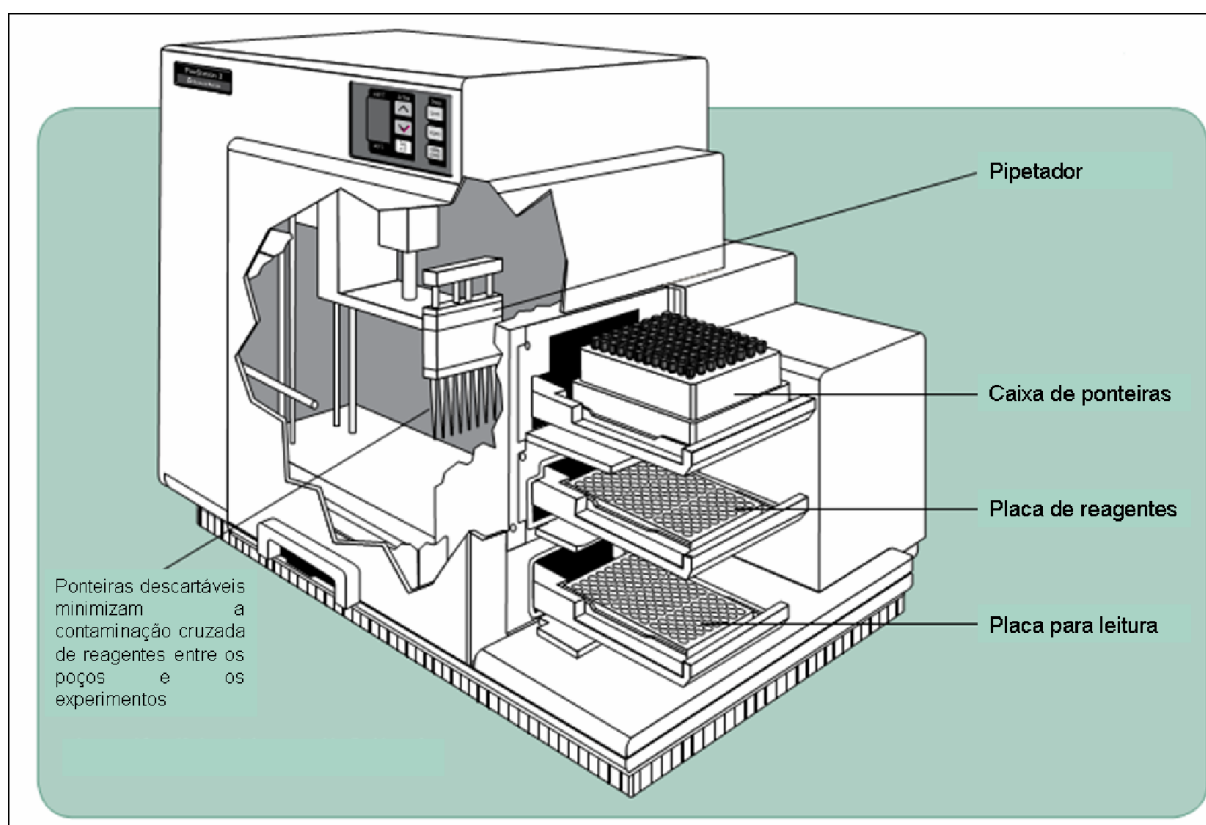


Figura 11: Sistema FlexStation. O Sistema FlexStation (Molecular Devices) consegue integrar as funções de adição dos reagentes desejados em cada um dos poços de uma coluna de cada vez e detecção do sinal de fluorescência simultaneamente. No primeiro compartimento (de cima para baixo) ficam armazenadas as ponteiros que serão utilizadas pelo braço mecânico de pipetagem para retirar os reagentes presentes em uma placa de fundo U no segundo compartimento (placa de reagentes), os quais serão adicionados na placa de teste (placa para leitura) situada no terceiro compartimento. Todas estas atividades acontecem simultaneamente com a detecção do sinal e assim, a resposta biológica é mensurada antes, durante e após a adição dos agonistas e antagonistas (Adaptado de Molecular Devices, 2006).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Padronizar uma metodologia de mensuração de cálcio intracelular e realizar a triagem de extratos de origem natural com atividade antagonista sobre os receptores purinérgicos ativados por UTP.

Objetivos específicos:

1. Padronizar o protocolo para a mensuração de cálcio intracelular na linhagem celular macrofágica J774.G8;
2. Caracterizar receptores P2 responsivos ao UTP na linhagem celular J774.G8;
3. Realizar a triagem de extratos oriundos de produtos naturais para identificar compostos com atividade antagonista sobre os receptores P2Y2 e P2Y4.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de extratos

Os extratos utilizados são oriundos da colaboração científica com o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz. As amostras (extratos) foram coletadas de diversos biomas brasileiros como, por exemplo, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga e Pantanal, além de biomas do exterior. A extratoteca é constituída atualmente por cerca de 18.000 extratos. Os extratos metanólicos foram enviados na forma de filme seco, em placas de polipropileno, com 96 poços de 250-300 µl de capacidade, fundo em “V”, não estéreis. Oitenta amostras foram distribuídas na placa, deixando-se as colunas 1 e 12 livres. Cada poço continha 200 µg de cada amostra na forma de filme seco, as quais foram ressuspensas em 1 ml de Dulbecco's PBS (DPBS) contendo 0,5% de DMSO.

2. Cultura de células

As células utilizadas no estudo pertencem à linhagem imortalizada de macrófagos murinos J774.G8 que expressam alguns subtipos de receptores P2 (Coutinho-Silva et al., 2005). As células foram mantidas em cultura em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ no frasco de cultura de 150 cm² (Corning, EUA) contendo meio DMEM (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGC, Brasil). A cada três dias, as células foram tripsinizadas e a concentração de células foi ajustada para 2x10⁶ células. Para os experimentos, as células foram cultivadas por 24 horas em placa preta de fundo claro de 96 poços (Corning, EUA) a uma concentração de 4x10⁵ células/ poço, na presença de 200 µl de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂.

3. Carregamento das células com o Fluo-4 AM

As células plaqueadas tiveram o meio de cultura substituído por 100 µl de Dulbecco's PBS (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,46 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 5,55 mM glicose, 2,5 mM probenecida (Sigma, EUA) – pH 7.4) contendo 2 µM de Fluo-4AM ou 2 µM de Fluo-3AM em experimentos mais específicos (Molecular Probes,

EUA). As células foram incubadas em estufa a 37° C por 1 hora e em seguida, os poços foram lavados por 3 vezes com 200 µl de DPBS e receberam 150 µl dessa solução.

4. Observação do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em microscópio de fluorescência

As células carregadas com Fluo-4AM ou Fluo-3AM, em alguns ensaios, foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE 2000-S na objetiva de 20x por 40 segundos e as imagens foram capturadas com o auxílio da câmera Infinity 3 (Lumenera, Canadá).

5. Mensuração do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ no FlexStation III

As placas contendo as células carregadas com o indicador de cálcio foram levadas ao equipamento FlexStation III (Molecular Devices, EUA), onde os níveis de cálcio foram mensurados em tempo real por 90 segundos, sendo que no tempo de 20 segundos ocorreu a adição dos agonistas de receptores P2, diluídos em 50 µl de DPBS, pelo seu sistema automático de pipetagem na altura de 175 µl e taxa 3, a qual é equivalente à adição de 47 µl/segundo. A fluorescência na modalidade *bottom read* foi obtida utilizando-se os comprimentos de onda: λ 485 nm (excitação) e λ 525 nm (emissão) (Hansen & Bräuner-Osborne, 2009). A duração da mensuração foi de 90 segundos e as leituras ocorreram a cada 1.52 segundos, sendo que um total de 60 leituras foram obtidas em cada poço.

Para a análise dos resultados foi determinado o ΔFU , isto é, a diferença entre o pico de fluorescência associado à máxima concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) e à fluorescência basal de cálcio (Hansen & Bräuner-Osborne, 2009). Os poços cujos sinais não retornaram a aproximadamente 30% da linha de base após o estímulo foram descartados.

6. Mensuração do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ por imageamento de cálcio

Para os ensaios de imageamento de cálcio, 4×10^5 células foram adicionadas em lamínulas de vidro retidas em uma placa de 6 poços (2 lamínulas/poço) e foram cultivadas com 1 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 1 ml de DPBS contendo 2,5 mM probenecida e 2 µM de Fluo-4AM. As células foram incubadas em estufa a 37° C por 1 hora e em seguida, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes em 1 ml de DPBS. Após este procedimento, as lamínulas contendo as células foram acomodadas em uma câmara com perfusão com capacidade para 200 µl e a fluorescência de um grupo de 10 a 20 células foram monitoradas continuamente por aproximadamente 10 minutos. A fluorescência foi

obtida utilizando-se os comprimentos de onda: λ 488 nm (excitação) e λ 525 nm (emissão), sendo as imagens de fluorescência das células capturadas por uma câmera CCD (Hamamatsu, Japão) e o processamento do sinal foi realizado com o auxílio do software *ImageMaster*, (Photon Technology, EUA).

7. Extração de RNA, RT-PCR e eletroforese

O RNA mensageiro das células J774.G8 foi extraído de uma concentração de 5×10^6 células utilizando TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies, EUA).

Em seguida, foi realizado o RT-PCR para promover a transcrição do mRNA extraído para cDNA. Assim, em 20 μ l da amostra de mRNA foram adicionados 5 μ l de OligodT e 30 μ l de água enquanto que em 4 μ l do controle de GAPDH foram adicionados 1 μ l de OligodT e 6 μ l de água e foram mantidos a 65°C por minutos. Após este tempo, foram adicionados 20 μ l e 4 μ l de *Reaction Buffer*, 5 μ l e 1 μ l de *Riboblock* RNA, 10 μ l e 2 μ l de dNTP e 5 μ l e 1 μ l da enzima transcriptase reversa nas amostras de mRNA de J774.G8 e GAPDH respectivamente. Essas amostras foram mantidas por 1 hora a 42°C, seguido por um período de 5 minutos a 70°C. Após este período, amostras de 4 μ l cDNA de J774.G8 foram aliqüotadas em 15 microtubos diferentes, onde foram adicionados 4 μ l de uma sequência de *primer* específica para um subtipo de receptor P2 diferente, descritas no Quadro 4. Tanto essas 15 amostras quanto a amostra de GAPDH foram tratadas com 5 μ l de Tampão 10x, 4 μ l de Mg^{2+} , 0,4 μ l de dNTP, 0,2 μ l de *Taq polimerase* e 32,4 μ l de água, sendo conduzidas para a etapa de PCR, onde foram submetidas a 35 ciclos de variações da temperatura: 94°C por 45 segundos, seguido de 54°C (P2Y11), 55°C (P2Y6), 57°C (P2X1), 58°C (P2X3, P2Y14 e P2Y13), 60°C (P2Y2, P2X2, P2X5, P2X6, P2Y12, P2Y1, P2Y4 e GAPDH) ou 65°C (P2X4 e P2X7) por 1 minuto e 72°C por 45 segundos.

A última etapa foi a eletroforese, no qual amostras de 10 μ l de cDNA amplificado foram aplicadas no gel de agarose 2%, onde permaneceram por aproximadamente 90 minutos sendo submetidas a uma voltagem constante de 95v. Após este período, o gel contendo as amostras foi corado com brometo de etídeo e observado no transiluminador.

Quadro 4 – Sequência de primer dos receptores P2

Subtipo de receptor P2	Sequência de <i>Primer</i>
P2X1	Forward: ATGTCCTCGGCATATTTGAA Reverse: ATTGTGCAGAGAACCCAGAA
P2X2	Forward: TTCATCGTGCAGAAAAGCTACC Reverse: TGGATGCTGTTCTTGATGAGGA
P2X3	Forward: CTTACCTATGAGACCACCAAG Reverse: CGGTATTTCTCCTCACTCTCTG
P2X4	Forward: TGCTCATCCGCAGCCGCAAAGT Reverse: AGTGGTCGCATCTGGAATCTCGG
P2X5	Forward: ACTTCCCTGCAGAGTGCTGT Reverse: GGCAGCTTTATCAAGGTCACA
P2X6	Forward: TATGTGATGACCAGGAACTG Reverse: CTCCAGATCTCACAGGTCCT
P2X7	Forward: GGCAGTTCAGGGAGGAATCATGG Reverse: AAGCGCCAGGTGGCATAGCTC
P2Y1	Forward: CTGTTGAGACTTGCTAGACCTC Reverse: ATGTTCAATTTGGCTCTGGC
P2Y2	Forward: GTCGCTTCAACGAGGACTTC Reverse: GCCAGGAAGTAGAGCACAGG
P2Y4	Forward: TGGCATTGTCAGACACCTTG Reverse: AAGCAGACAGCAAAGACAGTC
P2Y6	Forward: CGCTTCCTCTTCTATGCCAA Reverse: GTAGGCTGTCTTGGTGATGTG
P2Y11	Forward: CAGCGTCATCTTCATCACC Reverse: GCTATACGCTCTGTAGGC
P2Y12	Forward: CTGCCAAGTCATTTTCTGGA Reverse: AGCATGCTCATCAAGGAATTT
P2Y13	Forward: AGGGGTTTTGTGTGCACTTT Reverse: CTGACTGCTGTGGTGCTCAT
P2Y14	Forward: GCTGTCCCCAACATCATTCT Reverse: GTTTTGGGGTAACTCGCAGA
GAPDH	Forward: ATCACCATCTTCCAGGAGCG Reverse: CCTGCTTCACCACCTTCTTG

8. Ensaio de citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram cultivadas por 24 horas em placa de 96 poços (Corning, EUA) a uma concentração de 4×10^5 células/ poço, na presença de 200 μ l de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Após esse período, as células tiveram o meio de cultura substituído por 200 μ l de DPBS e foram tratadas com os extratos que demonstraram atividade antagonista (JA2, JA5, JB2, JB7, P2B6, P5C1 e P5F3) na concentração de [50 μ g/ml] e Triton-X [1%] por 15 e 60 minutos, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com UTP [10 μ M] por 2 minutos, sendo novamente mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. Os sobrenadantes das células foram coletados para o ensaio de avaliação da atividade da enzima desidrogenase láctica (LDH) de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Brasil).

9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados primeiramente pelo teste *D'Agostino e Pearson* para verificar se eles seguiam uma distribuição Gaussiana (Normal). Em caso positivo para este padrão de distribuição, foi utilizado um teste com parâmetro compatível e pós-teste adequado descritos na legenda. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os gráficos e testes estatísticos foram produzidos com o auxílio do programa *GraphPad Prism*® versão 5 (EUA).

RESULTADOS

1. Padronização do protocolo para a mensuração de cálcio intracelular na linhagem celular J774.G8.

Com o objetivo de realizar um ensaio para a triagem de extratos oriundos da extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou, com quem tínhamos colaboração científica, buscamos padronizar um protocolo que permitisse a execução desta tarefa de forma rápida e com baixo custo. Para isso, o primeiro passo antes do início da padronização do protocolo foi fazer um breve levantamento de artigos e capítulos de livro na literatura que utilizavam o FlexStation III como plataforma de avaliação de cálcio intracelular a fim de averiguarmos as condições de carregamento celular utilizadas. Além disso, também foi feita uma consulta na biblioteca do site do fabricante do FlexStation III, a Molecular Devices, a fim de obtermos informações lançadas através de notas de aplicação. Os dados referentes às condições básicas encontradas nos protocolos estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5 - Condições de carregamento celular descritas em diferentes artigos.

Solução-tampão de carregamento	Protocolos	Referências
Meio de cultura	2	Camarda et al., 2009; Lydford et al., 2011.
Dulbecco's PBS (DPBS)	1	Namovic et al., 2012.
Solução Salina Balanceada de Hank's (HBSS)	2	Molecular Devices, 2010; Luo et al., 2011.
Tampão Hepes Krebs-Ringer modificado	1	Broom et al., 2008.
Solução tampão de sacarose	1	Broom et al., 2008.
Solução Kit de cálcio Biosciences	1	YaQin et al., 2013.
Uso de probenecida	Protocolos	Referências
(1 mM- 2,5 mM)	6	Sullivan et al., 1999; Broom et al., 2008; Camarda et al., 2009; Molecular Devices, 2010; Lydford et al., 2011; YaQin et al., 2013.
Concentração do Fluo-4 AM	Protocolos	Referências
2 μ M	2	Molecular Devices, 2010; Luo et al., 2011.
3 μ M	1	Camarda et al., 2009.
4 μ M	1	Namovic et al., 2012.
2.5 mM	1	Broom et al., 2008.
Uso de ácido plurônico	Protocolos	Referências
0,01% - 0,06%	3	Sullivan et al., 1999; Camarda et al., 2009; Molecular Devices, 2010.

Continuação do Quadro 5

Temperatura	Protocolos	Referências
37°C	6	Sullivan et al., 1999; Broom et al., 2008; Camarda et al., 2009; Luo et al., 2011; Lydford et al., 2011; YaQin et al., 2013.
Ambiente	1	Sullivan et al., 1999.
Tempo de incubação	Protocolos	Referências
30'	1	Camarda et al., 2009.
60'	6	Sullivan et al., 1999; Broom et al., 2008; Luo et al., 2011; Lydford et al., 2011; Namovic et al., 2012; YaQin et al., 2013.
180'	1	Sullivan et al., 1999.
Tipo celular	Protocolos	Referências
CHO	2	Camarda et al., 2009; Lydford et al., 2011.
1321N1	1	Namovic et al., 2012.
Hek 293	2	Luo et al., 2011; YaQin et al., 2013.
SH-SY5Y	1	Broom et al., 2008
RBA-2	1	Broom et al., 2008
Jurkat	1	Sullivan et al., 1999.
ECV304	1	Sullivan et al., 1999.

Com base neste Quadro, o qual apresenta uma variedade de protocolos, possivelmente em virtude das diferenças entre os tipos celulares utilizados, obtivemos um panorama inicial para estabelecermos o nosso próprio protocolo, o qual tem por objetivo atender às nossas principais necessidades como: carregamento celular homogêneo, otimização de tempo, redução de gastos com reagentes e sensibilidade para a detecção de um estímulo. Com este objetivo, realizamos inicialmente alguns ensaios em microscópio de fluorescência, um ensaio simples que nos demonstrou o perfil de carregamento basal das células com o indicador de cálcio Fluo-4 de forma qualitativa. Um fato interessante deste ensaio é que conseguimos visualizar um aumento da fluorescência celular a partir da adição da Ionomicina, um ionóforo de cálcio, o que representa um indício indireto do aumento da concentração de cálcio intracelular, como ilustrado na Figura 12.

Utilizando este simples ensaio em microscopia de fluorescência conseguimos testar a nossa primeira variável que estava relacionada à necessidade da adição da probenecida ou não em nosso protocolo. A probenecida é um inibidor de transportadores aniônicos (Li et al., 2008), comumente utilizado na prevenção da saída de corantes citosólicos carregados negativamente para o meio extracelular através destes transportadores, o que pode ocasionar uma diminuição na concentração destas moléculas no citosol que conseguem captar as

variações da mobilização de cálcio. Assim, a probenecida é adicionada aos protocolos visando ao aprimoramento e aumento do carregamento basal das células com indicadores de cálcio. A partir dos resultados apresentados nas Figuras 12 e 13, percebemos que o carregamento basal das células foi muito mais homogêneo com a adição da probenecida na solução de carregamento, o que é um indicativo da expressão de transportadores aniônicos neste tipo celular, embora em ambas as situações fosse possível a observação do aumento da fluorescência celular após a adição da Ionomicina. Sendo assim, a probenecida passou a ser utilizada em nosso protocolo, visando a um carregamento celular mais eficiente e sensível para se detectar variações na mobilização de cálcio intracelular, entretanto, cabe ressaltar que alguns tipos celulares como as células HEK não necessitam da adição deste reagente, diminuindo assim, o custo dos ensaios (McClenaghan et al., 2012).

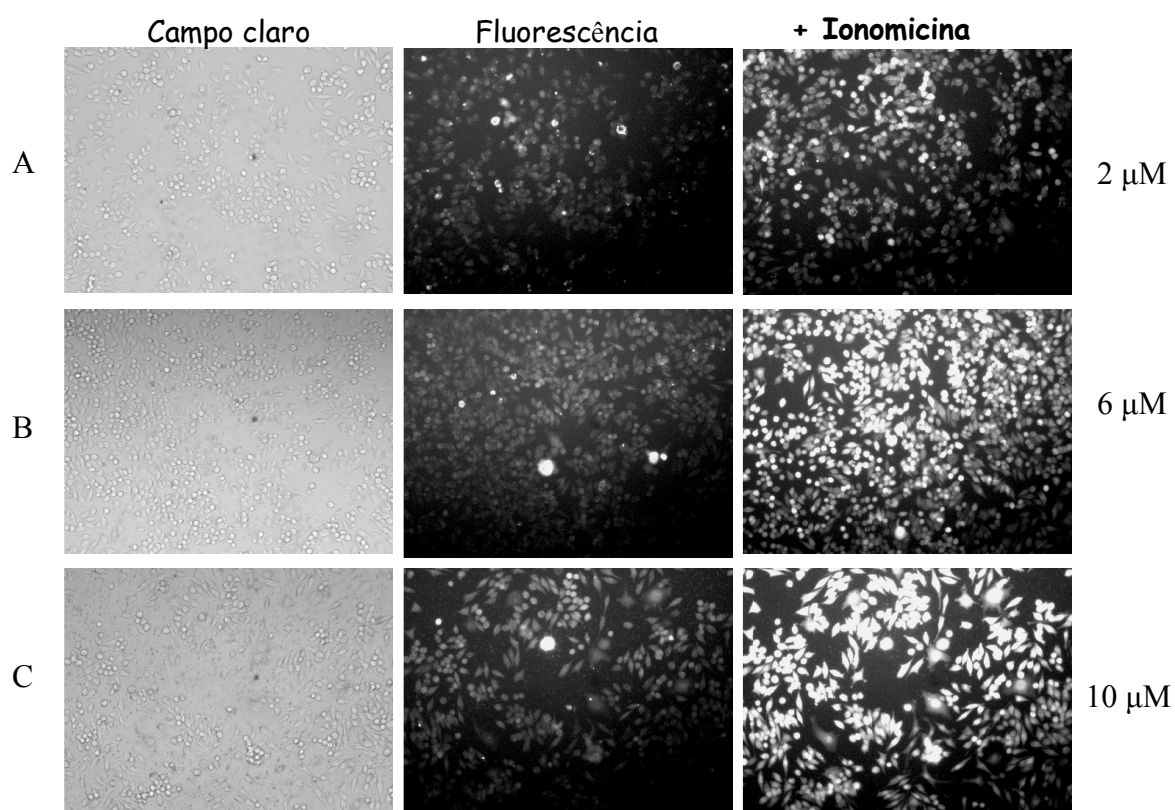


Figura 12: Carregamento celular com Fluo-4AM na ausência de probenecida. Células J774.G8 carregadas com o indicador de cálcio Fluo-4 AM em diferentes concentrações 2 (A), 6 (B) e 10 μM (C) na ausência da Probenecida [2,5 mM] foram observadas ao microscópio de fluorescência (objetiva de 20x), antes e após o estímulo com a Ionomicina [5 μM] por 30 segundos. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata.

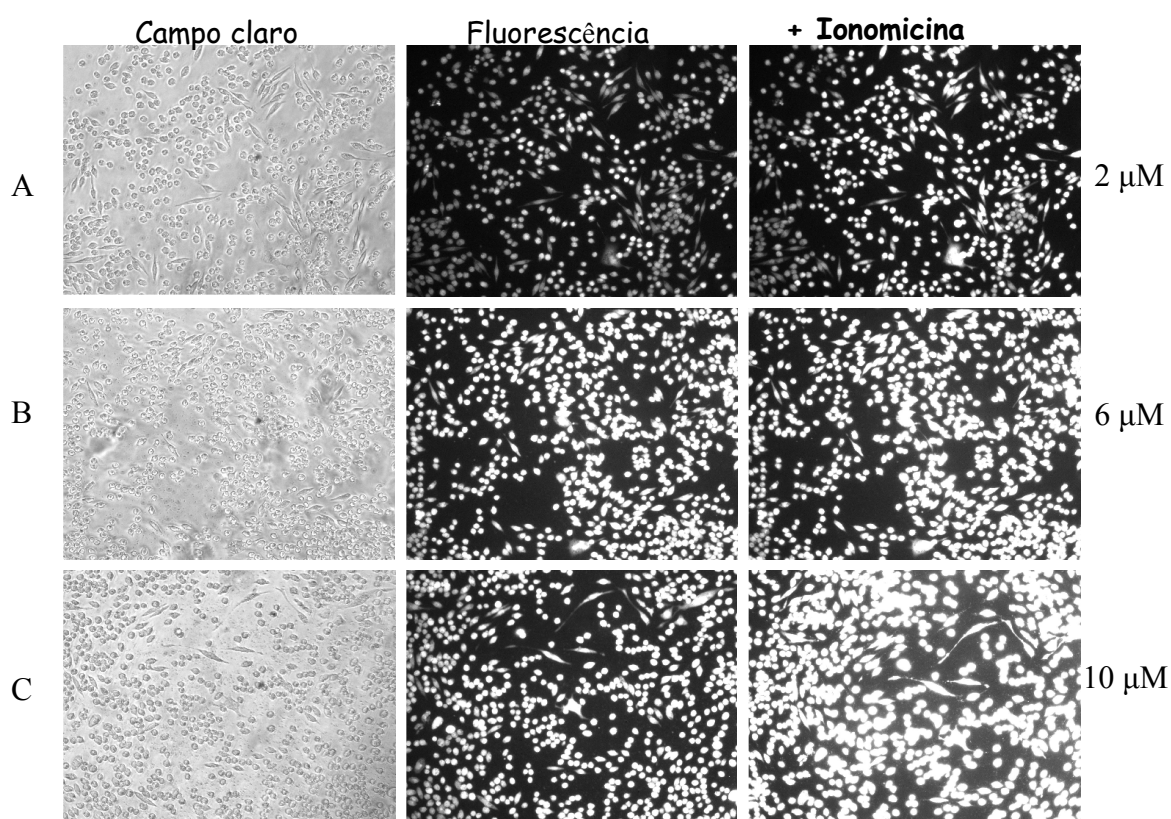


Figura 13: Carregamento celular com Fluo-4AM na presença de probenecida. Células J774.G8 carregadas com o indicador de cálcio Fluo-4 AM em diferentes concentrações 2 (A), 6 (B) e 10 μM (C) na presença da Probenecida [2,5 mM] foram observadas ao microscópio de fluorescência (objetiva de 20x), antes e após o estímulo com a Ionomicina [5 μM] por 30 segundos. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata.

A segunda variável testada diz respeito à solução de carregamento e, em virtude das diversas opções citadas na literatura, optamos por fazer uma comparação entre duas delas: meio de cultura DMEM sem fenol *red* e Dulbecco's PBS. Primeiramente, realizamos uma comparação qualitativa entre estas duas soluções de carregamento através de observação no microscópio de fluorescência como ilustrado na Figura 14. Embora tenhamos observado uma discreta diferença quanto ao *background* do meio de cultura DMEM sem fenol *red*, foi possível observar um aumento da fluorescência do Fluo-4 alguns segundos após a adição da Ionomicina em ambas as soluções de carregamento, sugerindo que elas poderiam ser utilizadas para os ensaios de mensuração de cálcio intracelular.

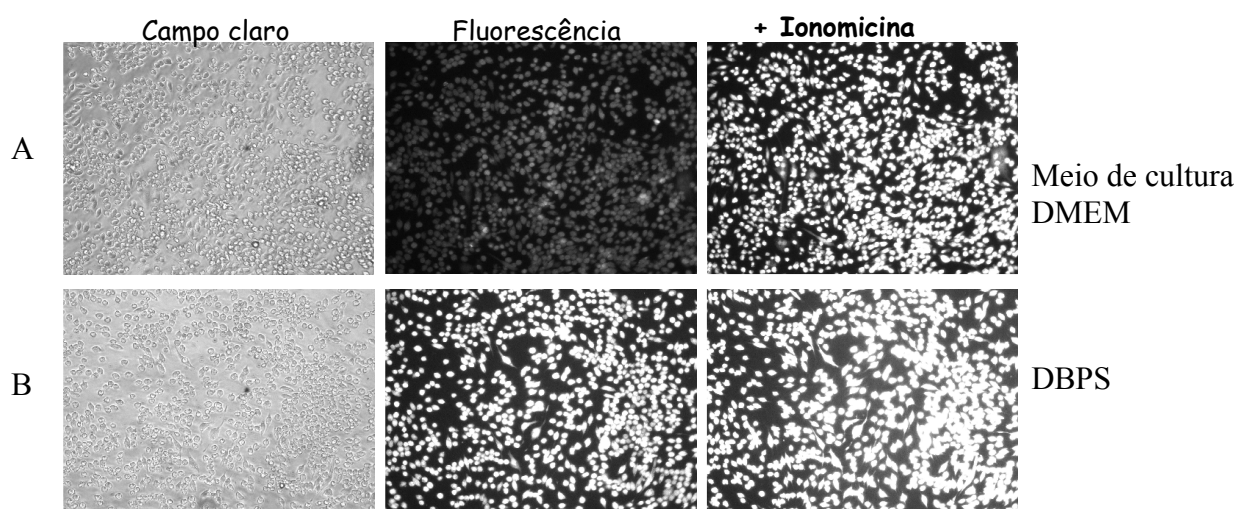


Figura 14: Comparação entre o carregamento celular com Fluo-4 obtido com as soluções de carregamento: Meio de cultura DMEM e DPBS. Células J774.G8 carregadas com 2 μM do indicador de cálcio Fluo-4 AM em duas soluções de carregamento diferentes, Meio de cultura DMEM sem fenol red (A) e DPBS (B), foram observadas ao microscópio de fluorescência (objetiva de 20x), antes e após o estímulo com a Ionomicina [5 μM] por 30 segundos. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata.

O teste qualitativo não permitiu a identificação de informações quantitativas sobre o uso dessas soluções de carregamento e por isso realizamos este mesmo experimento de comparação utilizando o leitor de placas FlexStation III, o qual forneceu os dados quantitativos apresentados na Figura 15. Nossos dados demonstraram que não existe uma diferença significativa entre elas, e, portanto, com a justificativa de redução de custos, a qual é importante no planejamento de um projeto de *screening*, a solução escolhida foi o DPBS (Zhang et al., 1999).

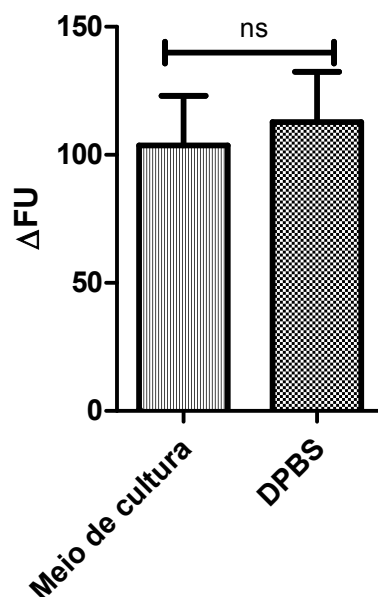


Figura 15: Comparação entre os sinais de cálcio obtidos de células em Meio de cultura DMEM e DPBS. Células J774.G8 carregadas com 2 μM do indicador de cálcio Fluo-4 AM em duas soluções de carregamento diferentes, Meio de cultura DMEM sem fenol *red* e DPBS, foram estimuladas com 5 μM de Ionomicina e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão da média de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste t não-emparelhado ($p=0,3008$).

O próximo passo da padronização do nosso protocolo incluía a escolha do indicador de cálcio mais adequado para o nosso ensaio, e optamos por fazer uma comparação entre o Fluo-4 e um outro indicador de cálcio bastante popular, o Fluo-3, o qual tínhamos à nossa disposição. Assim, iniciamos a comparação através da observação do carregamento de células com estes dois indicadores em microscópio de fluorescência, mostrado na Figura 16 e prosseguimos a comparação com a leitura no FlexStation III, que pode ser observada na Figura 17. A partir dos resultados apresentados de forma qualitativa e quantitativa, percebemos que existe uma diferença significativa entre a média de fluorescência destes dois indicadores e por isso, optamos por trabalhar com o Fluo-4 uma vez que já está descrito na literatura que existem algumas vantagens em utilizar este indicador de cálcio, como por exemplo, uma maior intensidade de emissão de fluorescência. Em virtude desta fluorescência mais eficiente, o Fluo-4 pode ser utilizado em menores concentrações para se produzir uma intensidade de sinal de fluorescência similar ao Fluo-3, reduzindo assim, o gasto de reagentes (Gee et al., 2000).

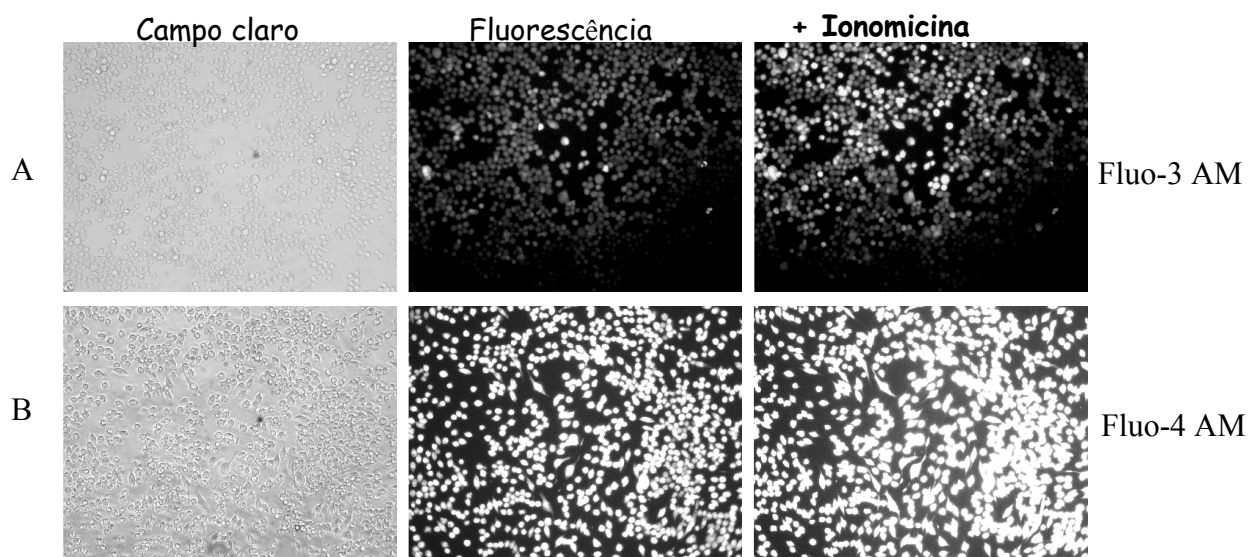


Figura 16: Comparação entre o carregamento celular obtido com o Fluo-3 e com Fluo-4. Células J774.G8 carregadas com 2 μM dos indicadores de cálcio Fluo-3AM e Fluo-4 AM foram observadas ao microscópio de fluorescência (objetiva de 20x), antes e após o estímulo com a Ionomicina [5 μM] por 30 segundos. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata.

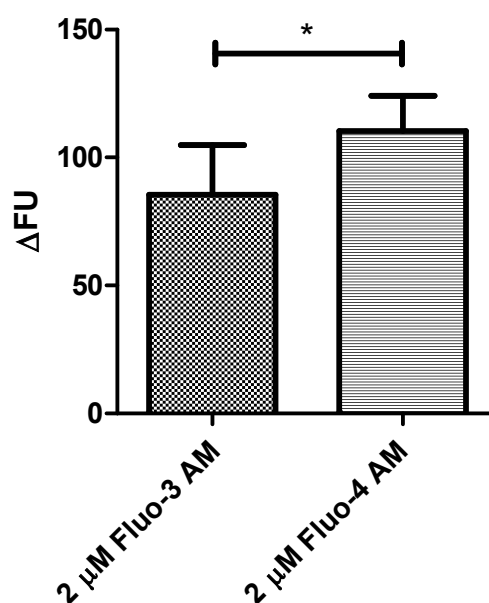


Figura 17: Comparação entre os sinais de cálcio obtidos em células carregadas com os indicadores de cálcio Fluo-3AM e Fluo-4AM no FlexStation III. Células J774.G8 carregadas com 2 μM dos indicadores de cálcio Fluo-3AM e Fluo-4 AM foram estimuladas com 5 μM de Ionomicina e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste t não-emparelhado ($p=0,0189$).

Com o indicador de cálcio definido, o próximo passo foi definir a concentração em que ele seria utilizado nos ensaios. Para isso, carregamos as células com diferentes concentrações do Fluo-4 AM e induzimos o aumento de cálcio intracelular utilizando o ATP, um agonista de receptores purinérgicos, os quais são amplamente expressos na linhagem de macrófagos murinos J774.G8 (Coutinho-Silva et al., 2005). De acordo com a Quadro 5, as concentrações utilizadas nos protocolos observados, variavam entre 2 μM e 2,5 mM, sendo que esta variação depende do tipo celular e da sensibilidade do equipamento utilizado para a leitura. A nossa faixa de teste variou entre 1-8 μM , como mostrado na Figura 18. Os critérios para a decisão da concentração a ser utilizada basearam-se na ausência de diferença significativa entre a faixa de concentrações mais próximas utilizadas na literatura (entre 2 e 4 μM) em detectar um estímulo de cálcio, no caso, promovido pelo ATP e a própria citação na literatura, além das imagens previamente registradas, conforme as Figuras 13, 14 e 16. A concentração escolhida, portanto, visando a um bom carregamento e novamente a redução dos gastos com reagentes como citado no trabalho de Zhang et al. (1999) foi a de 2 μM . Além disso, Gee e colaboradores (2000) citam que o uso de menores concentrações de indicador de cálcio pode reduzir o efeito de tampão sobre o cálcio, bem como minimizar os níveis de formação de produtos tóxicos como o formaldeído e ácido acético, produzidos pela hidrólise de éster de acetoximetil.

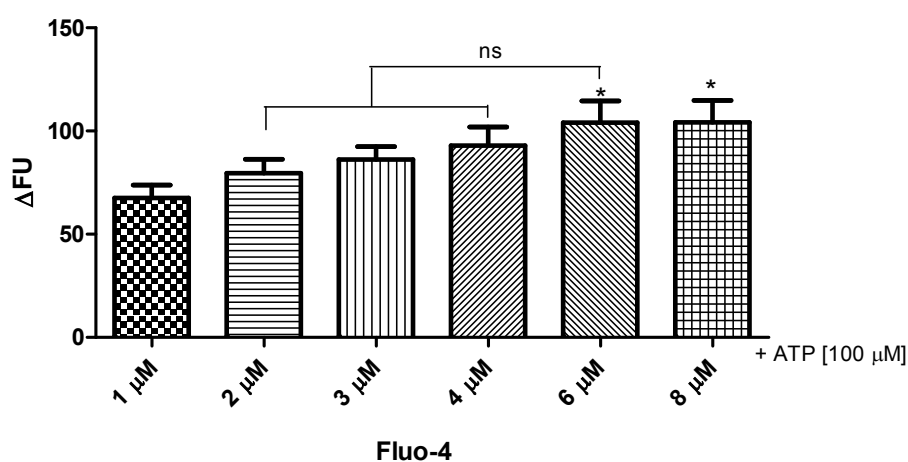


Figura 18: Mensuração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no FlexStation III após o tratamento com ATP [100 μM] em células carregadas com diferentes concentrações do indicador de cálcio Fluo-4. Células J774.G8 carregadas com diferentes concentrações de Fluo-4AM foram estimuladas com 100 μM de ATP e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 4 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p=0,2686$). O (*) simboliza diferença significativa em relação à concentração de 1 μM . ns representa ausência de diferença significativa.

Após a concentração do Fluo-4AM ser definida, realizamos uma curva concentração-resposta do ATP e da Ionomicina para certificar a sensibilidade do equipamento. Dessa forma, podemos observar nas Figuras 19 e 20, que a fluorescência celular aumentou de forma concentração-dependente ao ATP e à Ionomicina, alcançando um EC_{50} de 11 μ M e 103 nM, respectivamente. Já está descrito na literatura que o EC_{50} do ATP é de aproximadamente 10 μ M para alguns subtipos de receptores P2 que são expressos nestas células (Khakh & North, 2012). Já o EC_{50} da Ionomicina em alguns ensaios está situado em torno de 1 μ M (Ortmann et al., 2011). Por isso, os nossos resultados com o FlexStation III utilizando [2 μ M] de Fluo-4AM vão de encontro ao descrito na literatura, indicando que as condições do nosso protocolo estão adequadas para a realização do ensaio

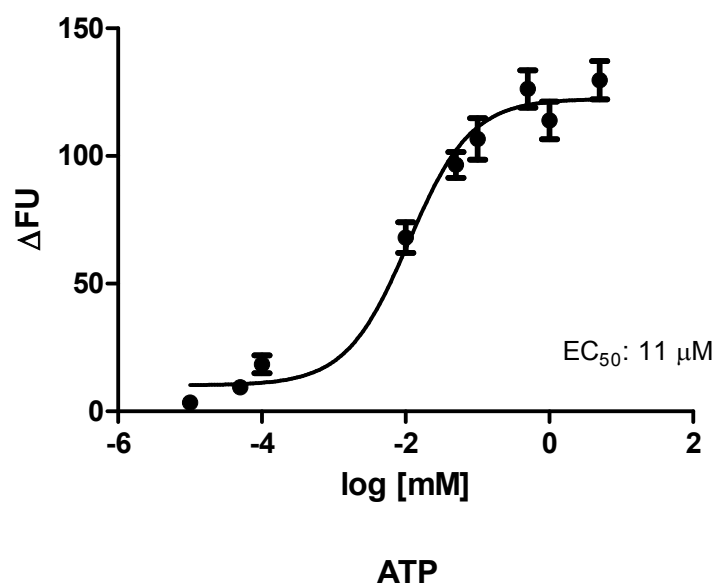


Figura 19: Curva concentração-resposta do ATP. A curva concentração-resposta do ATP foi obtida a partir de células J774.G8 carregadas com 2 μ M de Fluo-4 AM, estimuladas com diferentes concentrações de ATP e monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e erro padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes. EC_{50} : 11 μ M.

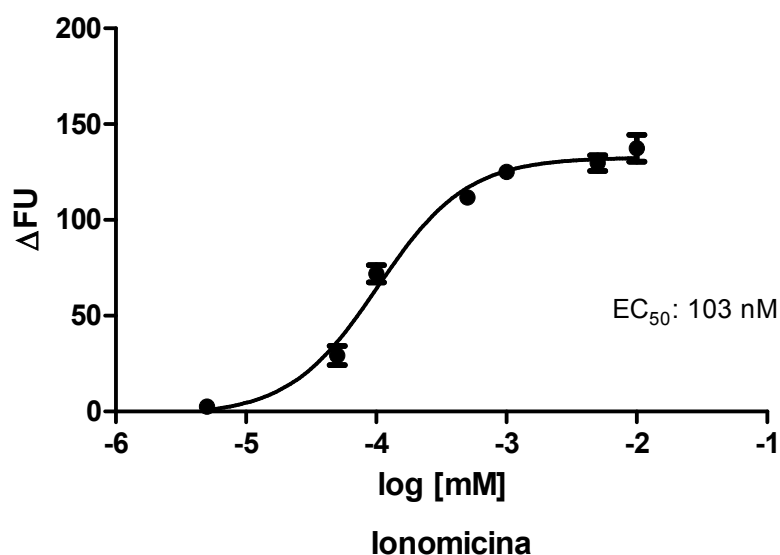


Figura 20: Curva concentração-resposta da Ionomicina. A curva concentração-resposta da Ionomicina foi obtida a partir de células J774.G8 carregadas com 2 μ M de Fluo-4 AM, estimuladas com diferentes concentrações de Ionomicina e monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e erro padrão de 4 experimentos realizados em dias diferentes. EC_{50} : 103 nM.

Finalizada a padronização do nosso protocolo, a próxima etapa consistiu na caracterização do perfil de respostas de aumento de cálcio intracelular induzido pelos agonistas em comparação com os dados da literatura. De acordo com os registros originais podemos observar que a adição do DPBS sozinho não causou nenhum tipo de variação do sinal ou provocou alguma resposta mecanossensitiva (McClenaghan et al., 2012), como visto na Figura 21a, entretanto o estímulo com o ATP aumentou os níveis de cálcio intracelular, que pode ser observado através do pico de fluorescência na Figura 21b. Este efeito foi revertido com a adição do EGTA, um quelante de cálcio, confirmando então, que a fluorescência está associada ao cálcio, mostrado na Figura 21c.

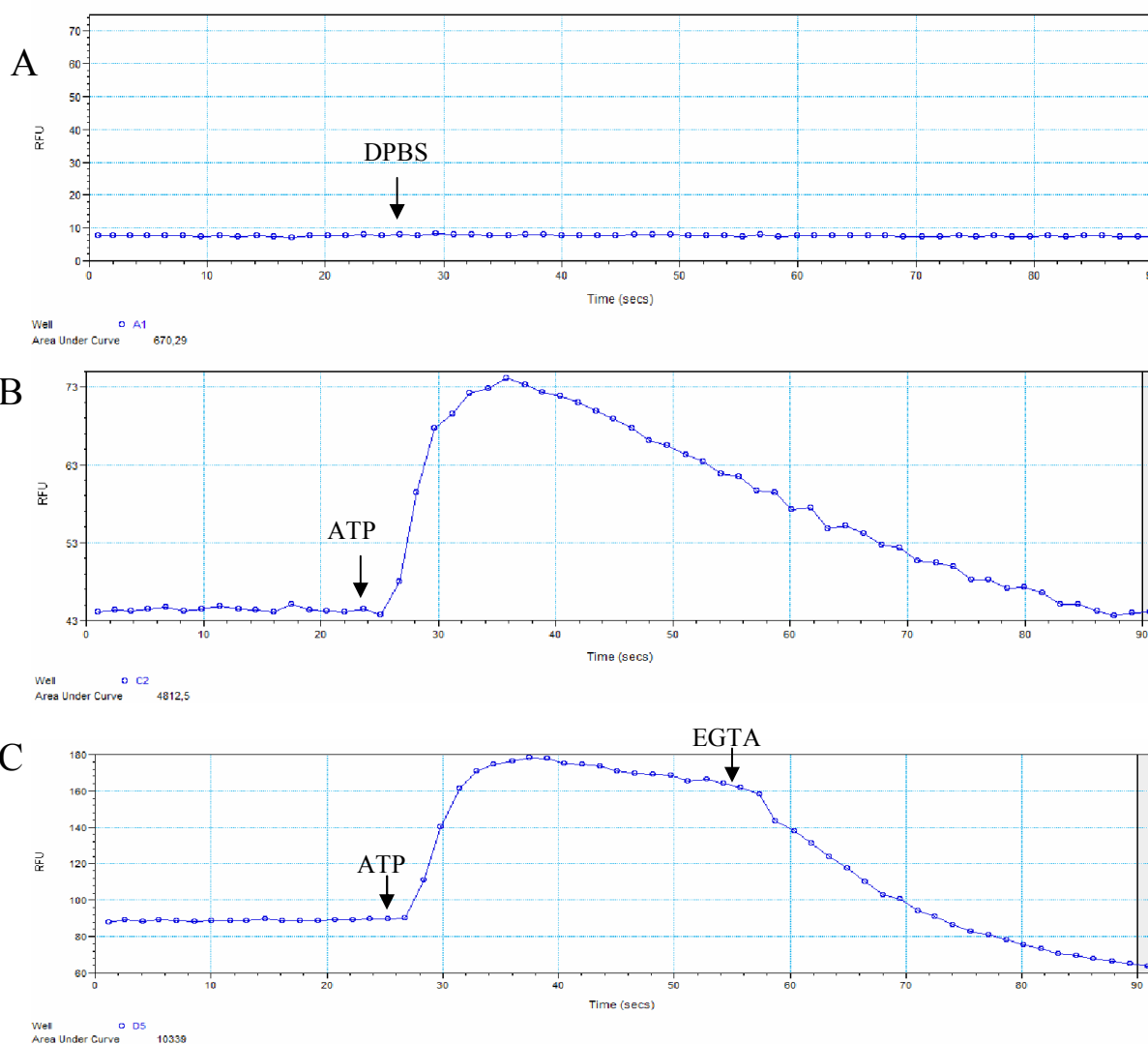


Figura 21: Registros originais do sinal de cálcio obtidos no FlexStation III. Registros originais do sinal de cálcio obtidos no FlexStation III após a adição de 50 μ l de DPBS (A), ATP [100 μ M] (B e C), ambos no tempo de 25 segundos e EGTA [20 mM] (54 segundos) (C) indicados pelas setas, em células J774.G8 carregadas com 2 μ M de Fluo-4AM. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata.

Depois de caracterizarmos o perfil de resposta de cálcio no FlexStation III com os parâmetros estabelecidos, utilizamos este mesmo protocolo para compararmos o nosso sinal com o sinal de cálcio obtido em outro sistema de mensuração da concentração de cálcio mostrado na Figura 22. Utilizando um microscópio com sistema de imageamento de cálcio, obtivemos respostas similares às obtidas no FlexStation III que incluíam um aumento da fluorescência após o estímulo com ATP e Ionomicina, sendo este efeito revertido após a adição do EGTA, confirmando assim, o nosso perfil de resposta.

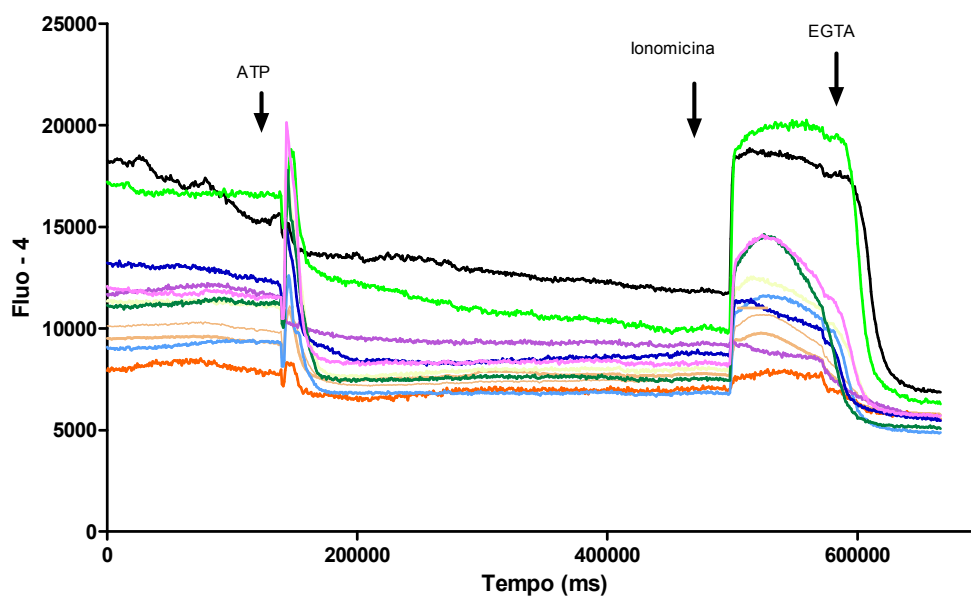


Figura 22: Registro individualizado de células carregadas com Fluo-4AM. Registro individualizado de células J774.G8 (indicado pelas diferentes cores) carregadas com 2 μM Fluo-4 AM através da técnica de imageamento de cálcio. Os períodos de tempo em milissegundos (ms) em que o ATP [100 μM], a Ionomicina [5 μM] e o EGTA [20 mM] foram adicionados estão simbolizados pelas setas. Imagem representativa de 2 experimentos realizados em dias diferentes.

2. Caracterização de receptores P2 responsivos ao UTP na linhagem celular J774.G8

A linhagem J774.G8 é uma linhagem celular imortalizada de macrófagos murinos derivada da linhagem celular J774.A1 (Fortes et al. 2004) que expressa alguns receptores purinérgicos das classes P2X e P2Y conforme demonstrado no trabalho de Coutinho-Silva e colaboradores (2005). Dessa forma, uma vez que o ATP estimulou o aumento de cálcio intracelular em nossos experimentos, o nosso objetivo foi detectar quais receptores P2 expressos nesta linhagem celular que poderiam estar promovendo esta atividade. Além disso, como a nossa meta era fazer uma triagem de antagonistas para receptores ativados por UTP, era importante observar a expressão destes subtipos na linhagem celular utilizada. Assim, realizamos experimentos para verificar a expressão de receptores P2, bem como a sua caracterização farmacológica através do uso de agonistas e antagonistas.

Visando identificar quais os receptores P2 que são expressos nas células J774.G8 utilizadas, realizamos a extração do mRNA e a sua transcrição para cDNA. Após a amplificação por PCR e eletroforese em gel, observamos os fragmentos de cDNA que correspondiam aos receptores: P2X1 (775 pb), P2X7 (186 pb), P2Y1 (683 pb), P2Y2 (850 pb), P2Y4 (544 pb), P2Y6 (480 pb), P2Y11 (274 pb) e P2Y12 (360 pb) demonstrado na Figura 23. É importante observar que todos eles, com exceção do P2Y12, estão associados com vias de sinalização de aumento de cálcio intracelular, seja via abertura de canal iônico cátion não-seletivo ou ativação do sistema PLC β /IP $_3$. O fragmento do P2X2 apresentou uma banda superior à esperada, isto é, aproximadamente 800 pb ao invés de 431 pb e por isso, a sua expressão não foi considerada.

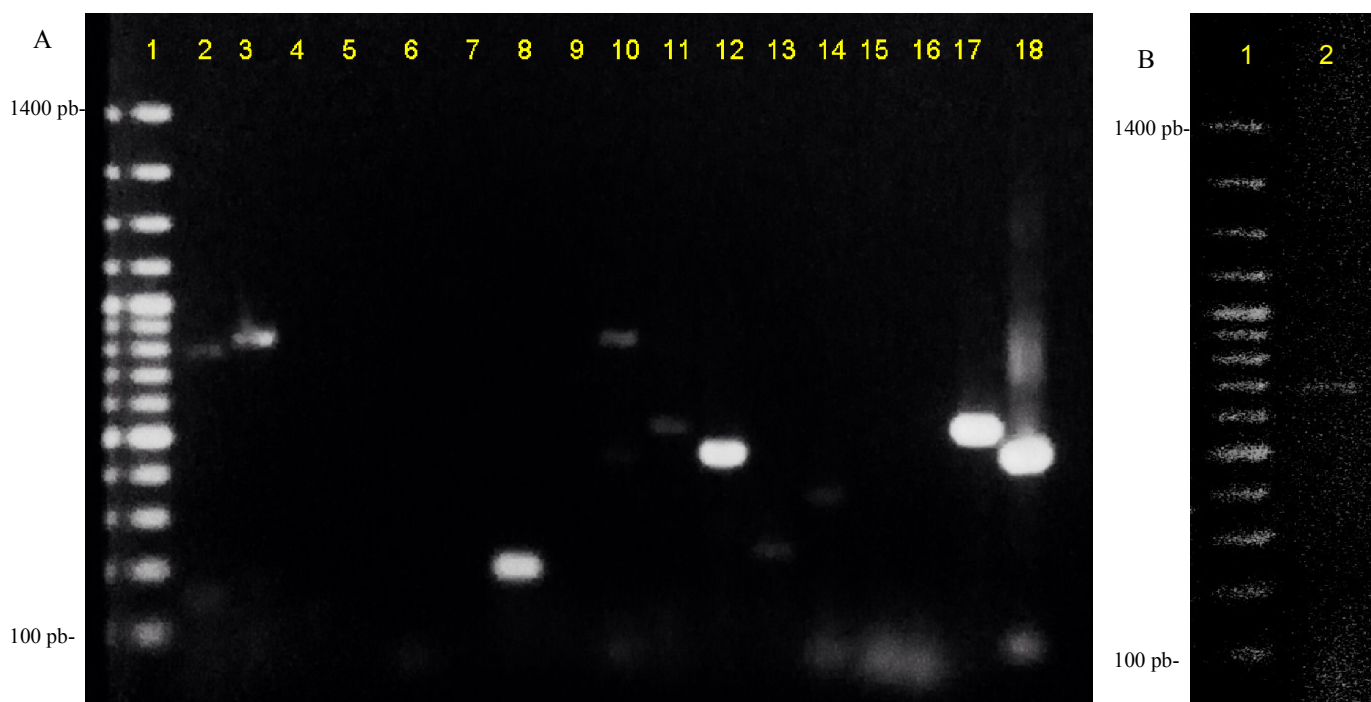


Figura 23: Fragmentos de cDNA correspondentes aos subtipos de receptores P2 expressos na linhagem J774.G8. Em (A) as colunas correspondem respectivamente aos fragmentos dos seguintes subtipos: Padrão de peso molecular (1), P2X1 (2), P2X2 (3), P2X3 (4), P2X4 (5), P2X5 (6), P2X6 (7), P2X7 (8), P2Y1 (9) (negativo), P2Y2 (10), P2Y4 (11), P2Y6 (12), P2Y11 (13), P2Y12 (14), P2Y13 (15), P2Y14 (16), GAPDH (17) e GAPDH Kit (18) e em (B) representam o Padrão de peso molecular (1) e o fragmento do P2Y1 (2), que foram adicionados ao gel e submetidos à eletroforese, sendo posteriormente corados com Brometo de Etídeo. Imagem representativa de 2 experimentos.

Após a observação dos receptores expressos na linhagem celular, realizamos a caracterização farmacológica utilizando agonistas e antagonistas para estes subtipos de receptores, uma vez que a presença de RNA mensageiro não comprova a funcionalidade desses receptores. Assim, observamos a resposta do aumento de cálcio intracelular promovida por alguns receptores P2 como demonstrado nas Figuras 24, 25 e 26. A resposta de alguns agonistas ainda foi afetada pela ausência de Ca^{2+} extracelular (PBS sem Ca^{2+}) ilustrado na Figura 24, o que aponta para a participação de canais de cálcio operados por estoque e receptores ionotrópicos que promovem um influxo de cálcio.

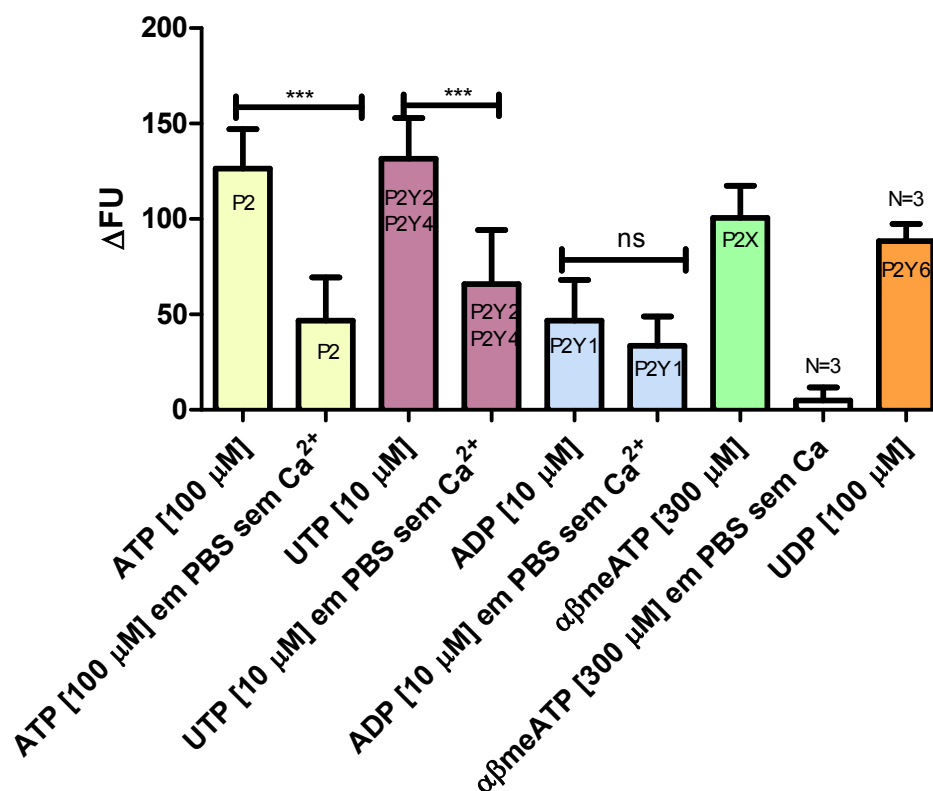


Figura 24: Resposta de aumento de cálcio intracelular induzida por agonistas de receptores P2. Células carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram estimuladas com ATP [100 μM], UTP [10 μM], ADP [10 μM] e αβmeATP [300 μM] e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata (com exceção dos grupos αβmeATP em PBS sem Ca²⁺ e UDP, cujas medidas foram realizadas em um dia) analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey (p<0,05). A comparação estatística foi feita entre o grupo com PBS com cálcio e o grupo correspondente com PBS sem cálcio. Os receptores nomeados no interior das barras correspondem aos subtipos que são ativados pelo agonista em questão. P2 significa todos os subtipos de P2X e P2Y.

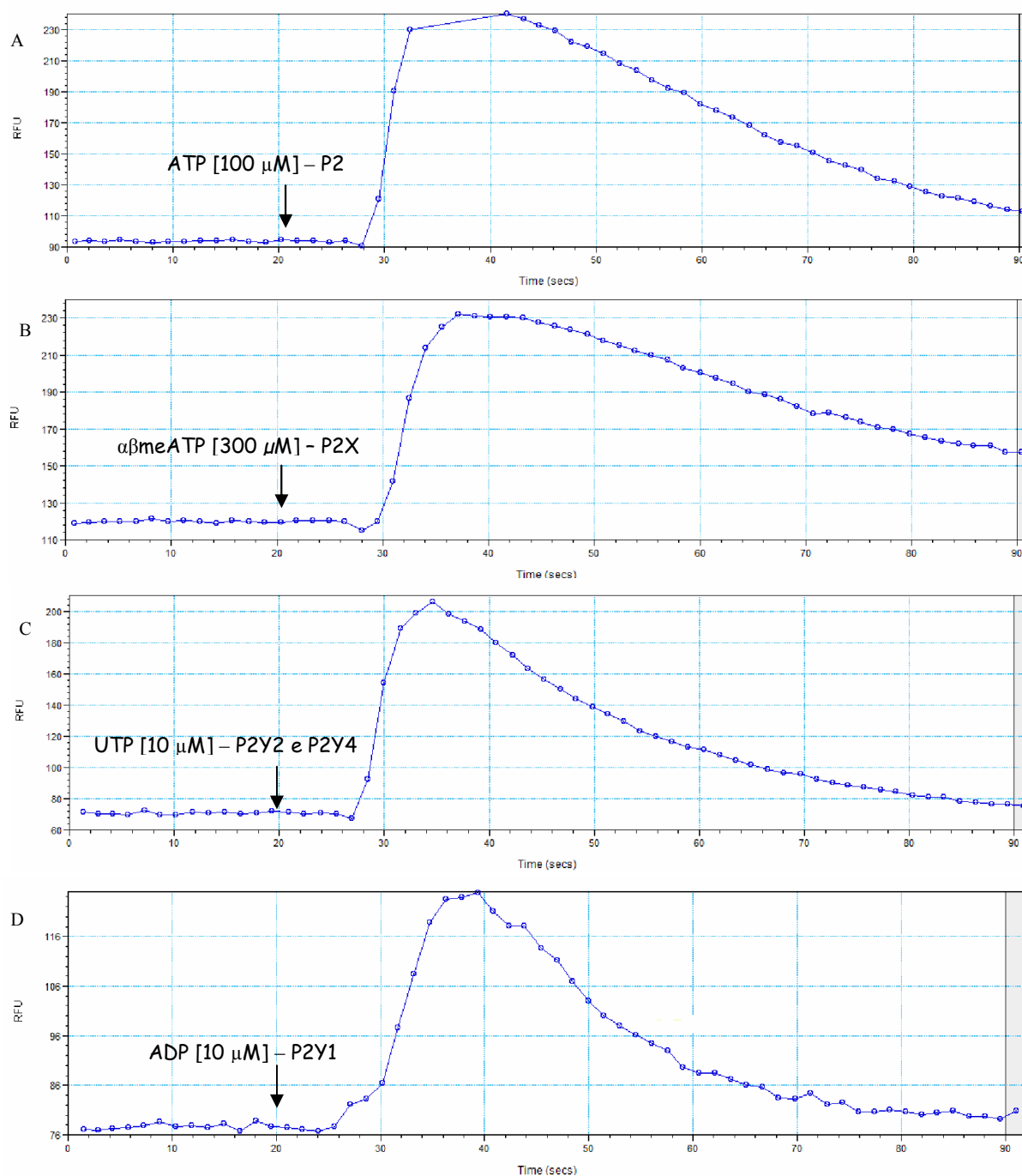


Figura 25: Registro original do sinal de cálcio promovido por agonistas de receptores P2. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram estimuladas com ATP [100 μM] (A), $\alpha\beta\text{meATP}$ [300 μM] (B), UTP [10 μM] (C) e ADP [10 μM] (D) e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata. As setas indicam os momentos de adição dos agonistas no tempo de 20 segundos.

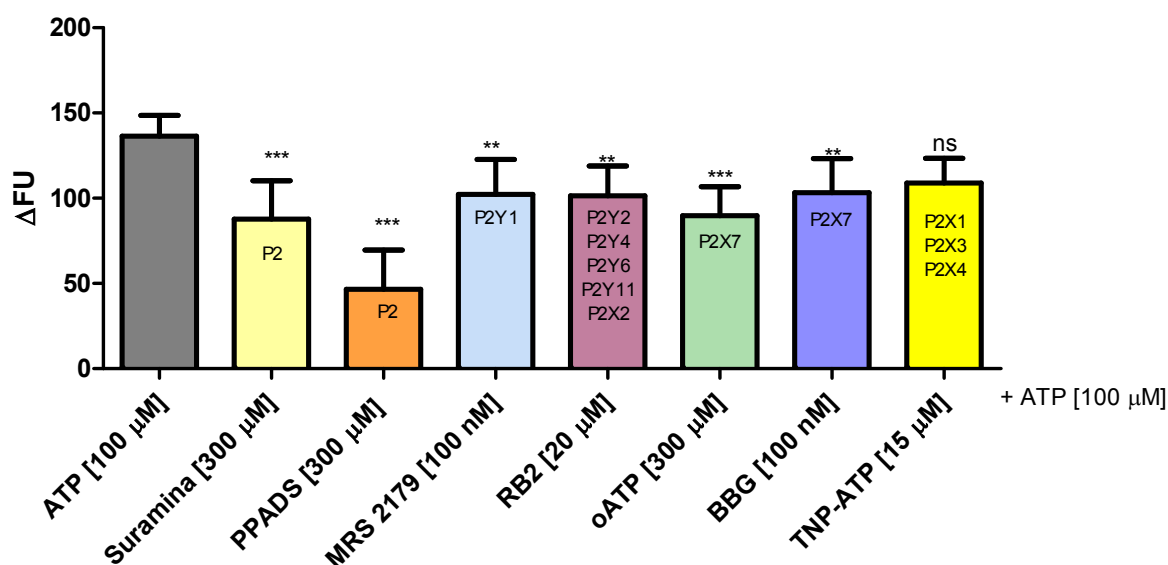


Figura 26: Efeito dos antagonistas de receptores P2 sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo ATP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], PPADS [300 μM], MRS 2179 [100 nM], RB2 [20 μM], oATP [300 μM], BBG [100 nM] e TNP-ATP [15 μM] por 15 minutos. Após os tratamentos, as células foram estimuladas com ATP [100 μM] e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). ns representa ausência de diferença significativa. A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo ATP. Os receptores nomeados no interior das barras correspondem aos subtipos que são inibidos pelo antagonista em questão. P2 significa todos os subtipos de P2X e P2Y.

O resumo da caracterização de receptores P2 expressos na linhagem J774.G8 encontra-se no Quadro 6 e observando-a, podemos perceber a expressão funcional ao menos dos receptores P2X7 e P2Y1, cujos antagonistas (BBG, oATP e MRS2179) inibiram significativamente o aumento do cálcio intracelular promovido pelo ATP. Ainda podemos perceber a expressão dos receptores P2Y2, P2Y4 e P2Y6, em virtude das respostas de aumento de cálcio intracelular promovido pelos seus agonistas fisiológicos. O $\alpha\beta\text{meATP}$ é um agonista não-seletivo de receptores P2X e portanto, pode estar ativando os receptores P2X1 e P2X7 expressos, os quais foram detectados através da técnica de RT-PCR. Já os antagonistas Suramina, RB2 e PPADS são antagonistas não-seletivos de receptores P2 e inibiram significativamente a resposta de cálcio promovida pelo ATP, enquanto que o TNP-ATP, um antagonista de P2X1, P2X3 e P2X4 não conseguiu promover este efeito.

Quadro 6 - Resumo da caracterização dos receptores P2 expressos na linhagem celular J774.G8

Subtipo	Literatura - J774 (Coutinho-Silva et al., 2005).	RT-PCR	Agonistas fisiológicos	Antagonistas
P2X1	-	+	NT	NT
P2X2	+	-	NT	NT
P2X3	-	-	NT	NT
P2X4	+	-	NT	NT
P2X5	-	-	NT	NT
P2X6	-	-	NT	NT
P2X7	+	+	NT	+ (BBG, α ATP)
P2Y1	+	+	+ (ADP)	+ (MRS2179)
P2Y2	+	+	+ (UTP)	NT
P2Y4	+	+	+ (UTP)	NT
P2Y6	+	+	+ (UDP)	NT
P2Y11	NT	+	NT	NT
P2Y12	NT	+	NT	NT
P2Y13	NT	-	NT	NT
P2Y14	NT	-	NT	NT

(-) Ausente; (+) Presente; (NT) Não testado.

Finalizada a padronização do protocolo e caracterização farmacológica de receptores P2 expressos nas células J774.G8, o próximo passo foi a realização do ensaio de triagem para a identificação de antagonistas para os receptores P2Y2 e P2Y4, os subtipos que são ativados por UTP extracelular, o qual promoveu um aumento de cálcio expressivo assim como o ATP extracelular, como mostrado anteriormente na Figura 24.

3. Triagem de extratos oriundos de produtos naturais para identificar compostos com atividade antagonista sobre os receptores P2Y2 e P2Y4.

Antes de iniciarmos a triagem dos extratos oriundos de produtos naturais, precisávamos identificar o efeito de antagonistas de referência para os receptores P2Y2 e P2Y4. Por isso, realizamos um ensaio de antagonismo utilizando o Reactive Blue 2 (RB2) e a Suramina, os quais são utilizados como antagonistas parciais dos receptores P2Y2 e P2Y4, respectivamente (Jacobson e Boeynaems, 2010), bem como o PPADS cuja ação antagonista sobre P2Y foi observada recentemente (Anikina et al., 2014) como mostrado na Figura 27.

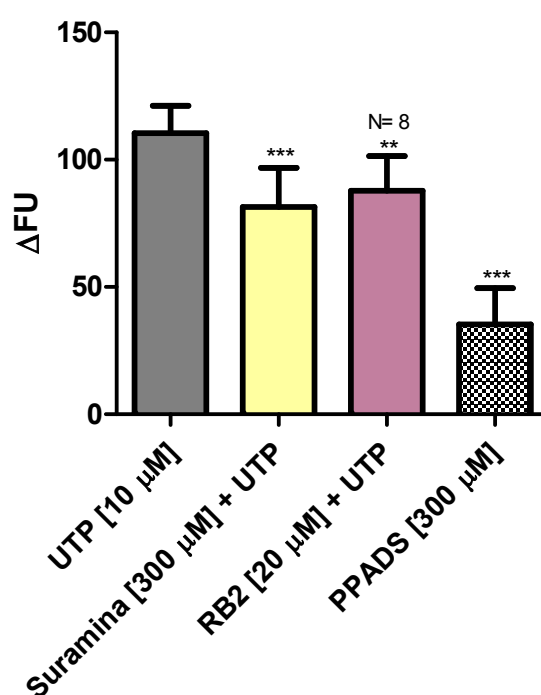


Figura 27: Efeito dos antagonistas dos receptores P2Y2 e P2Y4 sobre a inibição do aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e PPADS [300 μM] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM] e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP.

A partir do perfil de resultados obtidos no experimento anterior, iniciamos a triagem de novos extratos visando à descoberta de possíveis antagonistas dos receptores P2, mais especificamente P2Y2 e P2Y4 que são ativados pelo UTP. Em nossos ensaios, a Ionomicina funcionou como um controle de aumento de cálcio intracelular e o UTP sozinho funcionou como o controle de atividade dos receptores P2Y2 e P2Y4. A Suramina e o RB2 funcionaram como os controles negativos com inibidores de referência e o DMSO foi um controle negativo em que o efeito de aumento de cálcio não é esperado. Ele foi de suma importância uma vez que foi utilizado na solubilização dos extratos e nos experimentos, percebemos que ele não demonstrou nenhuma atividade sobre o aumento de cálcio intracelular, o que poderia interferir nos resultados. Assim, realizamos a triagem de 78 extratos conforme mostrado nas Figuras 28-32, sendo que 7 extratos demonstraram uma atividade inibitória (JA2, JA5, JB2, JB7, P2B6, P5C1 e P5F3). Esses extratos parecem ter inibido de forma parcial a resposta de cálcio induzida pelo UTP de forma mais potente que os antagonistas Suramina e RB2.

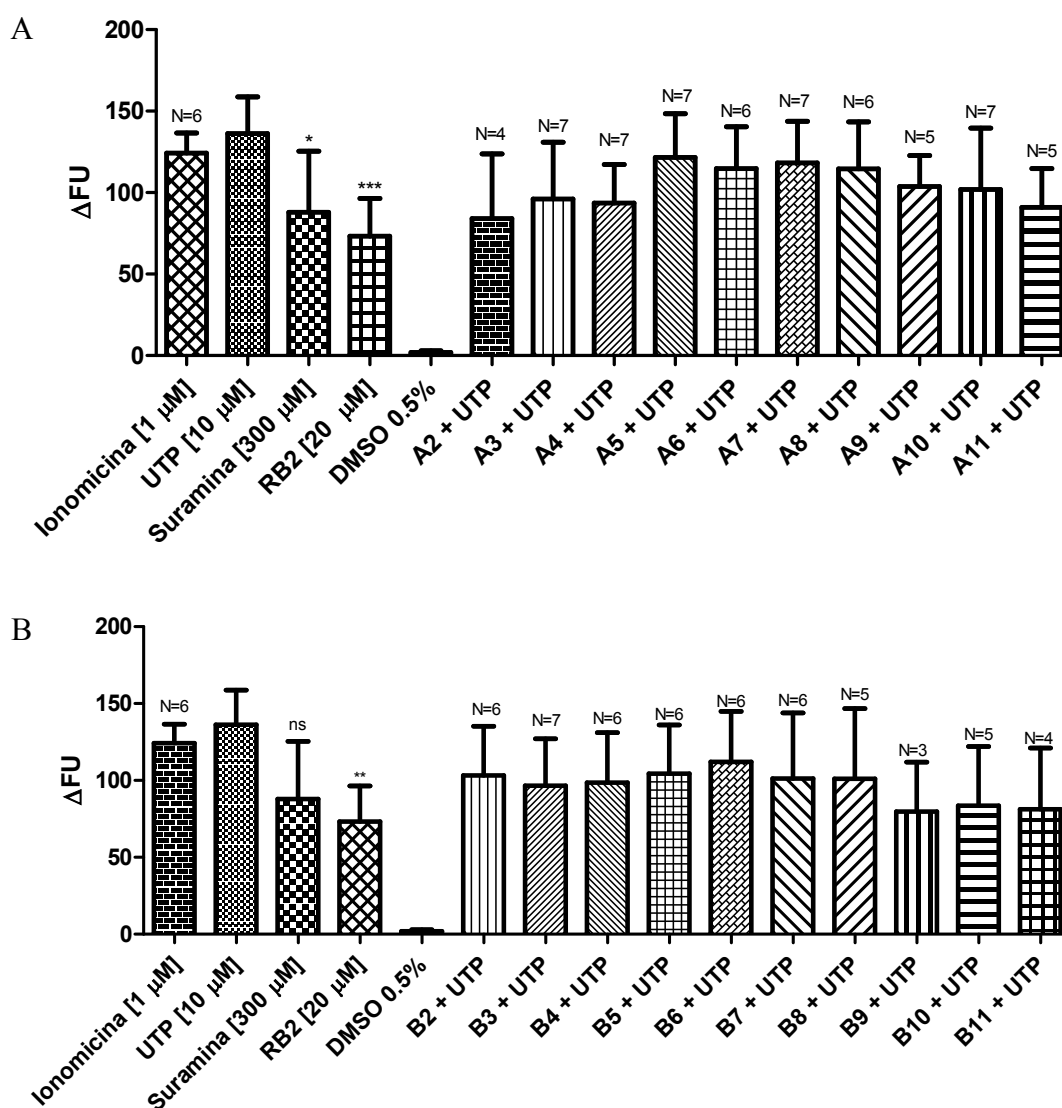


Figura 28: Efeito dos extratos dos grupos A e B sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e os extratos [50 μg/ml] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM], Ionomicina [1 μM] e DMSO 0,5% e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9.

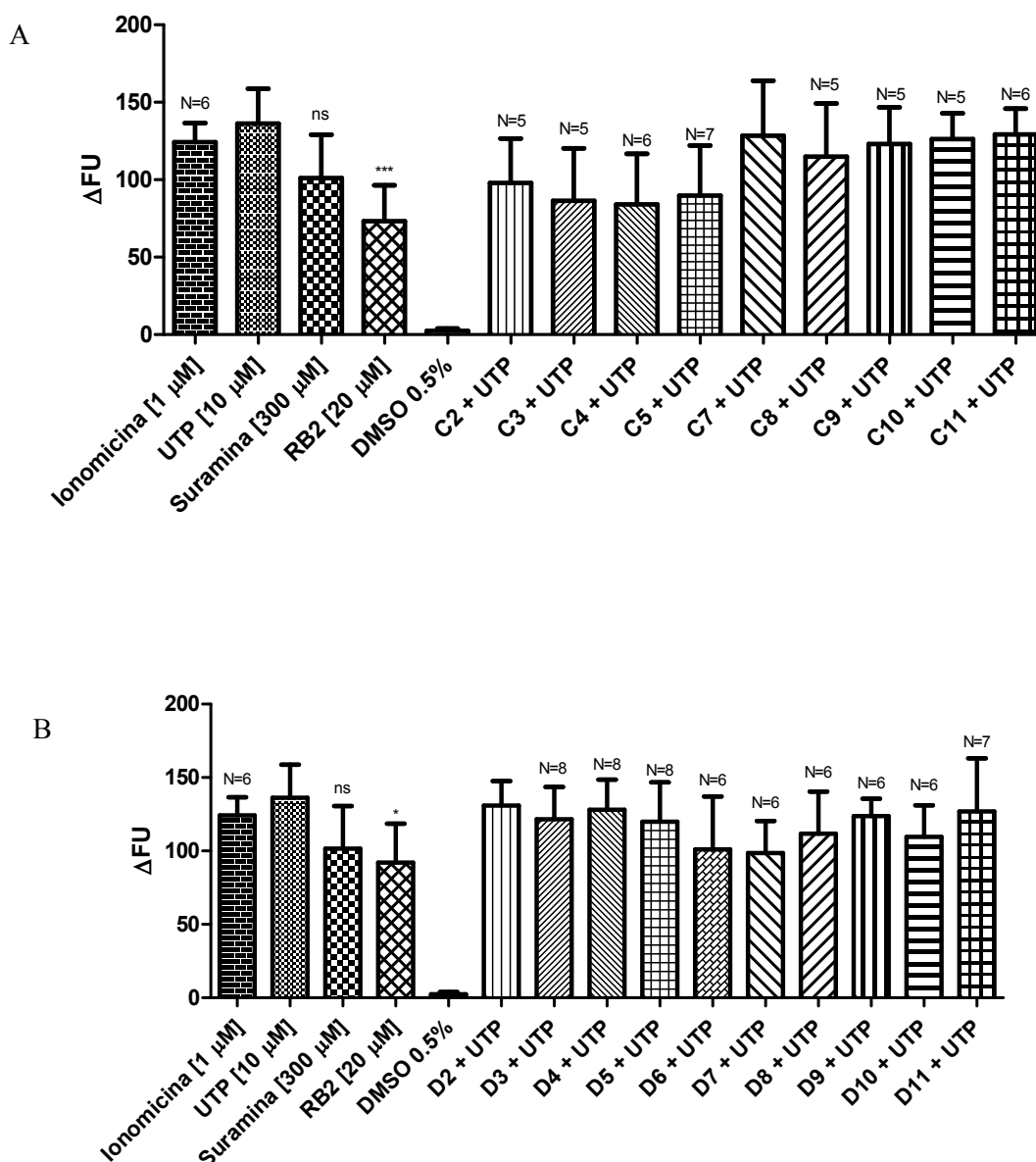


Figura 29: Efeito dos extratos dos grupos C e D sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e os extratos [50 μg/ml] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM], Ionomicina [1 μM] e DMSO 0,5% e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9.

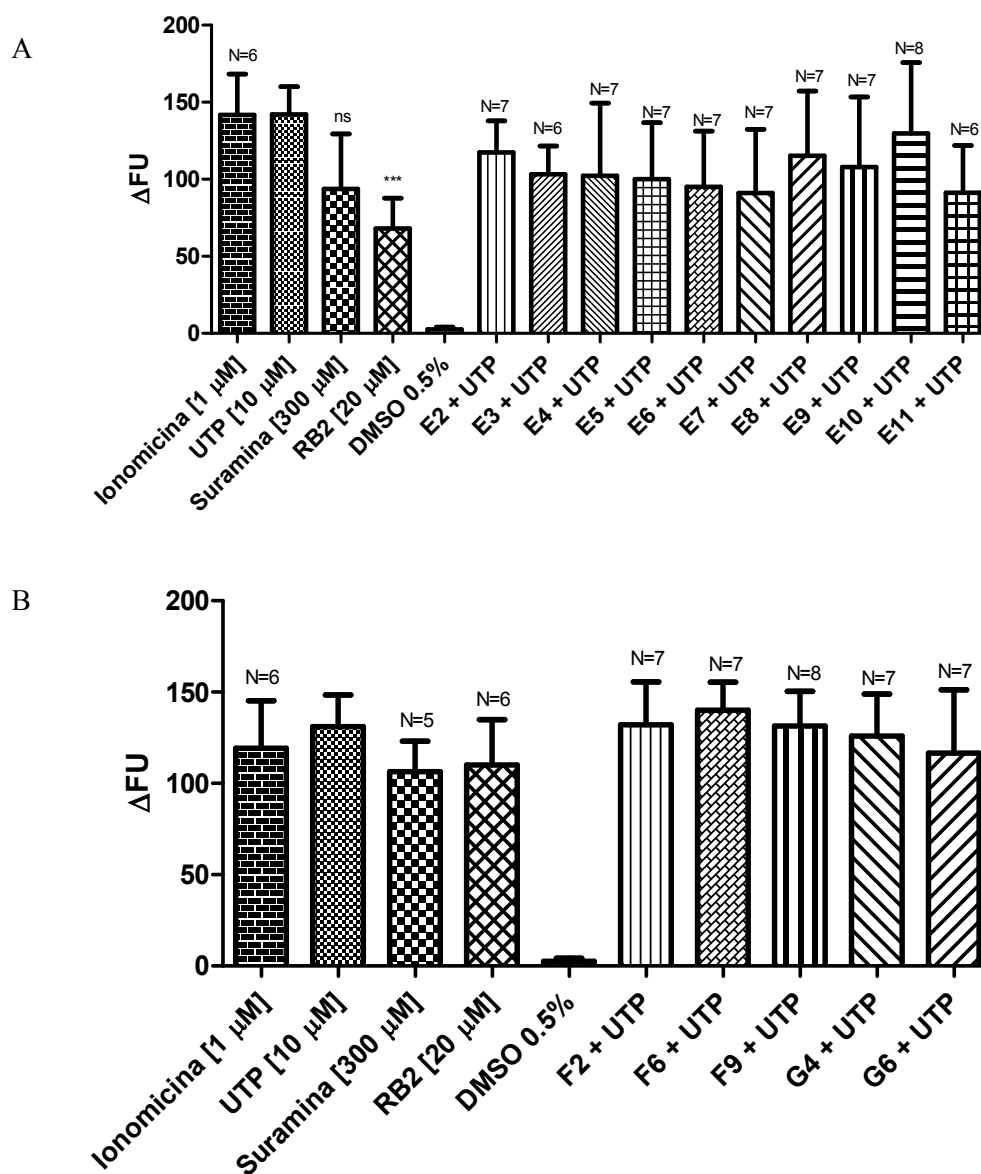


Figura 30: Efeito dos extratos dos grupos E e F sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e os extratos [50 μg/ml] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM], Ionomicina [1 μM] e DMSO 0,5% e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9.

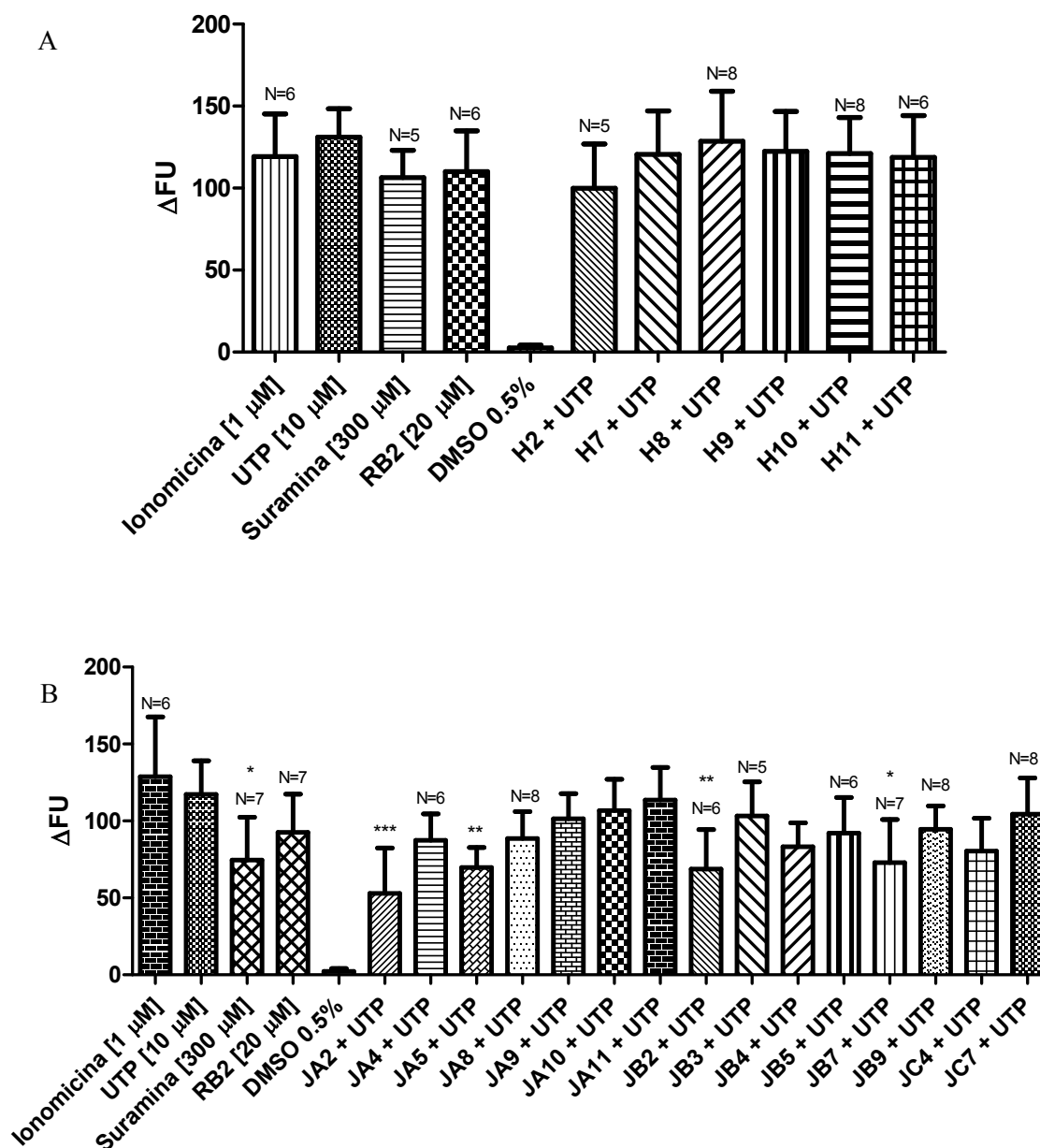


Figura 31: Efeito dos extratos dos grupos H e J sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e os extratos [50 $\mu\text{g/ml}$] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM], Ionomicina [1 μM] e DMSO 0,5% e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9.

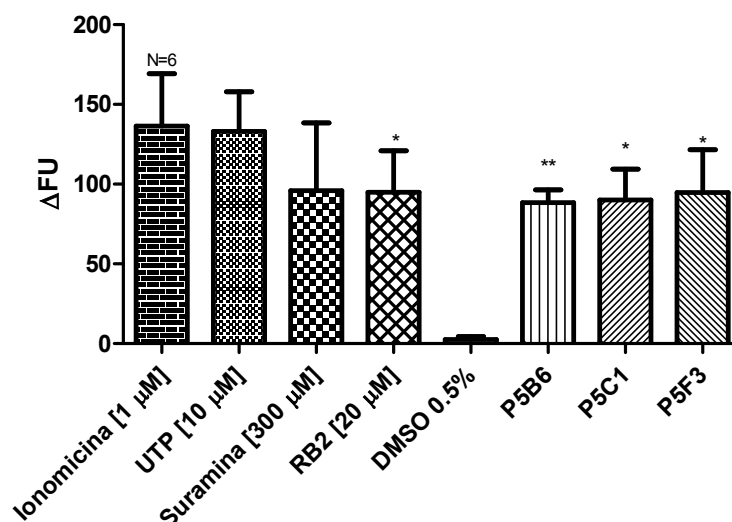


Figura 32: Efeito dos extratos do grupo P sobre o aumento de cálcio intracelular induzido pelo UTP. Células J774.G8 carregadas com 2 μM de Fluo-4AM foram tratadas com Suramina [300 μM], RB2 [20 μM] e os extratos [50 $\mu\text{g/ml}$] por 15 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 μM], Ionomicina [1 μM] e DMSO 0,5% e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo UTP. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9.

Com a identificação dos extratos que apresentaram atividade antagonista sobre o aumento de cálcio induzido pelo UTP, o próximo passo foi avaliar se essa ação era decorrente de algum tipo de citotoxicidade proveniente deles. Para isso, as células tratadas com os extratos JA2, JA5, JB2, JB7, P2B6, P5C1 e P5F3 por 15 ou 60 minutos tiveram seus sobrenadantes coletados para a quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica, que pode ser liberada em situações de lesão na membrana plasmática. De acordo com os resultados mostrados na Figura 33, podemos observar que esses extratos não ofereceram nenhum tipo de citotoxicidade no tempo de 15 e 60 minutos de tratamento e com isso, podemos concluir que a atividade de inibição do aumento de cálcio induzido pelo UTP não é decorrente de morte celular.

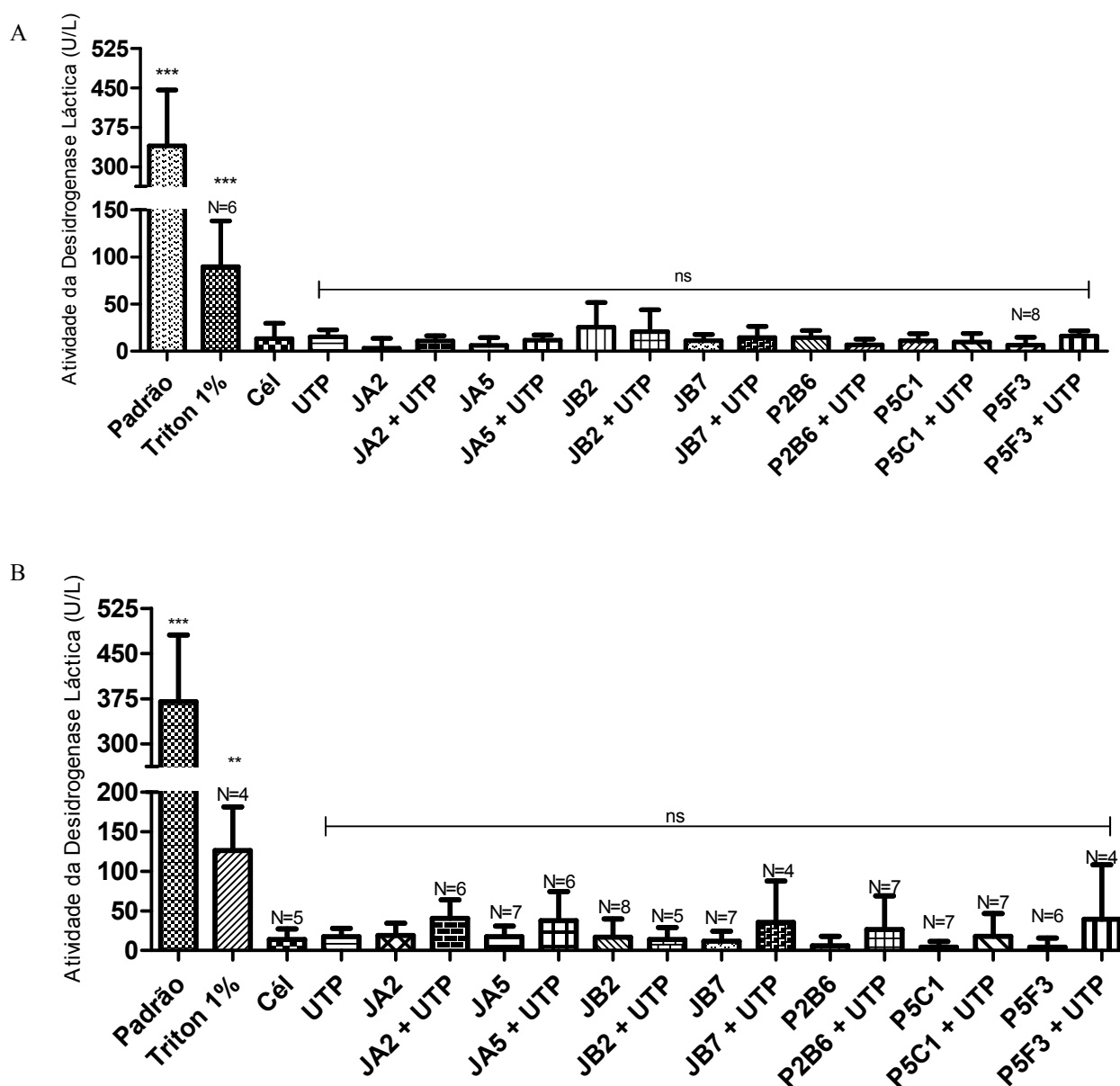


Figura 33: Avaliação da citotoxicidade dos extratos. Células J774.G8 foram tratadas com Triton-X 1% e os extratos [50 µg/ml] por 15 minutos (A) e 60 minutos (B). Em seguida, as células foram tratadas com UTP [10 µM] por 2 minutos e após este período, todas as células tiveram os seus sobrenadantes coletados para a mensuração da atividade da enzima desidrogenase láctica. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados pelo teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ($p < 0,05$). A comparação estatística foi feita em relação à resposta produzida pelo grupo célula. O N em cima das barras representa o número poços avaliados, sendo que as barras sem este número apresentam um N=9. ns representa ausência de diferença significativa.

DISCUSSÃO

O primeiro passo antes de iniciarmos a padronização do protocolo foi fazer um levantamento de artigos que utilizavam o FlexStation como plataforma de leitura da $[Ca^{2+}]_i$ e das condições descritas para fazer o carregamento das células que estão resumidas no Quadro 5. Com base neste Quadro, que reflete um pouco da heterogeneidade em relação aos protocolos, foi possível observar algumas condições que foram mais homogêneas, como a temperatura, o tempo de incubação e o uso da probenecida e assim, obter um panorama inicial para padronizarmos o nosso próprio protocolo.

O primeiro aspecto que nos atentamos inicialmente foi quanto ao uso da probenecida, um inibidor de transportadores aniônicos muito utilizado na otimização do carregamento celular, visto que muitas células, incluindo macrófagos da linhagem J774.G8, expressam esses transportadores, os quais removem corantes permeáveis às células, como Fura-2 AM, Lúcifer Yellow e Carboxifluoresceína, diminuindo assim, a marcação das células (Steinberg et al., 1987). O indicador de cálcio Fluo-4 AM também possui a característica de permeabilidade celular, uma vez que possui em sua estrutura um grupo acetoximetil que lhe confere esta propriedade, porém este sofre hidrólise pelas esterases intracelulares, ficando carregado negativamente, podendo assim, ser removido pelos transportadores aniônicos (Bruton et al., 2012). Para confirmar se as células J774.G8 são capazes de remover o indicador de cálcio Fluo-4 AM, fizemos um teste de observação em microscópio de fluorescência utilizando células incubadas ou não com a probenecida na solução de carregamento (Figuras 12 e 13). Conforme observado nessas figuras, as células J774.G8 expressam esses transportadores aniônicos, visto que um carregamento mais eficaz foi alcançado na presença da probenecida. Assim, confirmamos alguns dados da literatura que mostraram que a probenecida é essencial para o carregamento ótimo em linhagens celulares derivadas de macrófagos. Contudo, em alguns tipos celulares como as células HEK não necessitam da adição deste reagente, o que pode contribuir para a diminuição do custo dos ensaios (McClenaghan et al., 2012).

A segunda variável que foi submetida a teste foi a solução-tampão de carregamento. Para isso, fizemos uma comparação entre duas das soluções descritas no Quadro 5: Meio de Cultura DMEM e Dulbecco's PBS, como demonstrado nas Figuras 14 e 15. Como não houve diferença significativa no sinal dos grupos, optamos por utilizar a segunda solução por motivos de redução de custos com reagentes, o qual é importante no planejamento de um projeto de *screening* de muitas amostras conforme citado no trabalho de Zhang e colaboradores (1999).

Seguido a escolha da solução de carregamento e continuando a padronização do nosso protocolo, chegamos à etapa de definição do indicador de cálcio mais adequado para o nosso ensaio e por isso, fizemos uma comparação entre dois indicadores de cálcio bastante populares no meio científico: o Fluo-3 AM e o seu análogo, o Fluo-4 AM. Estes dois indicadores de cálcio já vêm sendo amplamente utilizados no campo de triagem de alto desempenho para alvos moleculares, como receptores metabotrópicos, que resultam na mobilização de cálcio (Li et al., 2008). Sendo assim, estes dois indicadores de cálcio foram submetidos a testes qualitativos e quantitativos, através do imageamento via microscópio de fluorescência e leitura no FlexStation III, respectivamente, como mostram as Figuras 16 e 17. A partir dos resultados obtidos podemos perceber que existe uma diferença significativa entre a fluorescência basal do Fluo-3 e do Fluo-4. Entretanto, já está descrito na literatura que o Fluo-4 foi desenvolvido com base na estrutura química do Fluo-3, contudo a substituição de duas moléculas de flúor por duas moléculas de cloro, resultou em vantagens que o tornaram bastante utilizado no meio científico. Entre estas vantagens estão: maior absorvância na faixa de 488 nm, o que produz uma fluorescência mais intensa quando utilizado em fontes de laser argônio e microscópios equipados com filtros de fluoresceína, alta emissão de fluorescência, alta taxa de permeabilização celular e uma ampla faixa dinâmica de indicação da $[Ca^{2+}]$ apresentando um $K_d(Ca^{2+})$ de 345 nM, comparado ao $K_d(Ca^{2+})$ de 325 nM do Fluo-3 (Gee et al., 2000). Em virtude dos resultados encontrados na literatura que apontam para diferenças na sensibilidade de detecção do sinal de cálcio entre o Fluo-3 e o Fluo-4 na presença de um estímulo, como por exemplo, o trabalho de Gee e colaboradores (2000), o que também foi encontrado em nosso trabalho, optamos por utilizar o Fluo-4 em nossos ensaios. Além de poder ser utilizado em menores concentrações para se produzir uma intensidade de sinal de fluorescência similar ao Fluo-3, o que reduz o gasto de reagentes possivelmente pela metade, a economia em se utilizar o Fluo-4 pode chegar até 30%, se compararmos os preços dos dois reagentes, uma vez que o valor do Fluo-3 é maior, assim como o consumo deste reagente.

Outra característica que foi determinada e que é de extrema importância, especialmente no que diz respeito ao custo de um procedimento de triagem é a concentração dos reagentes. Segundo Zhang et al. (1999), algumas características que devem ser levadas em consideração no desenvolvimento de ensaios é a otimização da velocidade, eficiência, detecção do sinal e baixo consumo de reagente. Por isso, pensar em qual é a melhor concentração do reagente que seja capaz de detectar um bom sinal e ao mesmo tempo reduza ao máximo o consumo deste é importante para reduzir o custo de um procedimento de triagem. Visando este objetivo, as células J774.G8 foram carregadas com diferentes concentrações do indicador de cálcio Fluo-4AM que variaram de 1 a 8 μ M, visto que essa

faixa se aproxima da utilizada na literatura, como demonstrado no Quadro 5. Essas células foram estimuladas com 100 μM de ATP, um agonista de receptores purinérgicos, os quais são amplamente expressos nessa linhagem de macrófagos murinos (Figura 18) e com isso, observamos apenas diferença entre as concentrações de 6 e 8 μM , comparadas com a menor concentração que foi 1 μM . No entanto, as concentrações de 2 a 4 μM , que estão descritas no Quadro 5, não apresentaram diferença em relação às outras, o que nos levou a opção pela concentração de 2 μM , visto que já havíamos observado também que esta concentração apresentava um carregamento celular homogêneo como mostrado nas Figuras 13, 14 e 16, o que não foi observado na concentração de 1 μM (dados não mostrados). Além disso, conforme citado no trabalho de Gee e colaboradores (2000), o uso de menores concentrações de indicador de cálcio podem reduzir o efeito de tampão sobre o cálcio, bem como minimizar os níveis de formação de produtos tóxicos como o formaldeído e ácido acético, produzidos pela hidrólise de éster de acetoximetil, além de reduzir o consumo de reagentes.

Ainda no processo de padronização, realizamos testes para certificar a sensibilidade do equipamento, utilizando dois estímulos de mobilização de cálcio intracelular diferentes: o ATP e a Ionomicina. Conforme mostrado nas Figuras 19 e 20, o ATP induz o aumento de cálcio via ativação de receptores purinérgicos (Ravelic & Burnstock, 1998), enquanto a Ionomicina atua como um ionóforo de cálcio, transportando este íon através da membrana plasmática do meio extracelular para o meio intracelular, bem como induzindo a ativação de correntes de cálcio ativadas pela liberação do cálcio (Liu & Hermann, 1978; Fasolato et al., 1993). Assim, podemos perceber que o indicador de cálcio utilizado na concentração definida (2 μM) conseguiu responder a um aumento de cálcio intracelular promovido pelo ATP e pela Ionomicina de forma concentração-dependente, apresentando os EC_{50} de 11 μM e 103 nM, respectivamente, sendo que eles vão de encontro ao descrito na literatura (Ortmann et al., 2011; Khakh & North, 2012), o que indica que as condições do nosso protocolo estavam adequadas para a realização do ensaio.

Estudando ainda a concentração escolhida, 2 μM , podemos observar algumas características desejáveis nos registros originais: a uniformidade do sinal basal; o pico de sinal em resposta ao estímulo com o ATP, indicando um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$; o retorno do sinal à faixa basal após um período de resposta, os quais ocorrem na faixa de segundos ou milésimos deste; e por fim, uma diminuição da resposta de cálcio na presença do EGTA, o qual é um quelante deste íon.

Finalizada a padronização, realizamos um teste de imageamento de cálcio, um outro método de mensuração da mobilização de cálcio intracelular, a fim de validarmos o nosso protocolo e compararmos o perfil de respostas obtidas. As células foram carregadas com o

Fluo-4AM de acordo com o nosso protocolo, sendo posteriormente estimuladas com ATP e Ionomicina. Assim, como mostrado na Figura 22, observamos uma similaridade entre as respostas: presença de um pico de sinal a partir do estímulo com o ATP e a Ionomicina, e reversão da resposta na presença do EGTA, o que confirmou o nosso perfil de resposta e nos forneceu uma segurança antes de iniciarmos os nossos ensaios.

Com o protocolo estabelecido, passamos para uma etapa de elucidação dos subtipos de receptores purinérgicos que poderiam ser detectados pela nossa técnica utilizando-se a linhagem celular de macrófagos murinos J774.G8. As células J774.G8 pertencem à uma linhagem imortalizada de macrófagos murinos derivadas de linhagem J774.A1 (Fortes et al., 2004), que expressam receptores purinérgicos P2 como demonstrado no trabalho de Coutinho-Silva e colaboradores (2005). Assim, visando confirmar os subtipos de receptores purinérgicos expressos nas células, utilizamos a técnica de RT-PCR, que está demonstrada na Figura 23, e observamos a expressão dos receptores: P2X1, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2Y12. No trabalho de Coutinho-Silva e colaboradores (2005), foi observada a expressão dos receptores P2X4 e P2X7 através das técnicas de imunomarcação, *western blot* e *patch clamp*, embora todos os receptores P2X demonstraram alguma intensidade de marcação com anticorpos e o P2X2 apresentou uma banda fraca na segunda técnica. Nos nossos experimentos, a banda de P2X2 apareceu em uma banda superior à esperada, isto é, em aproximadamente 800 pb ao invés de 431 pb. O P2X1, presente em nosso RT-PCR, não foi observado no trabalho mencionado, embora os autores não descartem a possibilidade de expressão deste receptor uma vez que ele tenha apresentado baixos níveis de intensidade na técnica de imunomarcação, o que não foi confirmado pela técnica de *western blot* (Coutinho-Silva et al., 2005). Além disso, no trabalho de Buell e colaboradores (1996) e Adrian e colaboradores (2000) foi demonstrada a expressão do P2X1 em células HL60, uma linhagem celular de promielócitos, bem como em macrófagos diferenciados. Já os receptores P2Y que foram identificados por RT-PCR encontram-se o P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2Y12 sendo que estes três primeiros também foram identificados no trabalho de Coutinho-Silva e colaboradores (2005), embora a expressão do P2Y11 não tenha sido averiguada neste trabalho. Apesar disso, foi demonstrado recentemente no trabalho de Sakaki e colaboradores (2013) que o receptor P2Y11 parece participar da ativação de macrófagos derivados da linhagem celular THP-1 estimulada com LPS. Já o receptor P2Y12 foi observado em macrófagos peritoniais residentes de camundongos por Isfort e colaboradores (2011).

Baseando-se nestes resultados de RT-PCR, seguimos para a etapa de identificação dos receptores P2 expressos neste tipo celular a partir de ensaios de caracterização farmacológica, utilizando os agonistas para os subtipos encontrados como mostrado nas Figuras 24 e 25. As

células responderam ao estímulo de [100 μ M] de ATP, um agonista não-seletivo dos receptores P2, assim como ao UTP [10 μ M], agonista dos receptores P2Y2 e P2Y4, ADP [10 μ M], agonista de P2Y1 e P2Y12 e $\alpha\beta$ meATP [300 μ M], um agonista de receptores P2X, bem como ao UDP [100 μ M], o que sugere a expressão funcional destes receptores. A diminuição da resposta do ATP e do UTP na ausência de cálcio extracelular sugere a participação de canais de cálcio operados por estoque e receptores ionotrópicos no aumento de cálcio intracelular via influxo através da membrana (Azimi et al., 2014). Além disso, Jacob e colaboradores (2013) citam que em linhagens celulares de macrófagos de ratos e camundongos, os receptores que estão funcionalmente implicados no aumento dos níveis de cálcio intracelular induzidos pelo ATP são P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2X4 e P2X7.

Nesta perspectiva também realizamos o teste de alguns antagonistas de receptores P2 para verificar a habilidade destes em inibir a resposta promovida pelo ATP. Assim, foram testados os seguintes antagonistas: Suramina [300 μ M], um antagonista não-seletivo de receptores P2, o PPADS [300 μ M], um antagonista de receptores P2, o MRS 2179 [100 nM], um antagonista seletivo do receptor P2Y1, o RB2 [20 μ M], um antagonista de P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2X2, o ATP oxidado [300 μ M], um antagonista irreversível do receptor P2X7, o BBG [100 nM], um antagonista do receptor P2X7 nesta concentração e TNP-ATP [15 μ M], um antagonista dos receptores P2X1, P2X3 e P2X4 como mostrado na Figura 26. Estes antagonistas, com exceção do TNP-ATP, apresentaram uma inibição significativa do aumento de cálcio intracelular induzido pelo ATP. Essa inibição ocorreu de forma parcial, uma vez que outros receptores purinérgicos poderiam ser ativados pelo agonista, o que explica o influxo de cálcio remanescente.

O fato que a resposta do UTP destacou-se em relação aos demais agonistas, mostrando-se equipotente em relação ao ATP, pode ser indício da alta expressão dos receptores P2Y2 e/ou P2Y4 funcionais na membrana plasmática de células J774.G8 ou uma amplificação da resposta de cálcio. Além disso, estes receptores carecem de agonistas e antagonistas seletivos (Jacobson & Boeynaems, 2010), o que estimula a busca por novas moléculas que apresentem estas atividades, o que possivelmente irá contribuir com o desenvolvimento de novas funções e papéis funcionais associados a estes receptores aliados aos já descritos na literatura, como ativação e inibição de canais iônicos, proliferação e migração celular e dor, por exemplo. Por isso, em virtude do nosso objetivo de descobrir um antagonista para estes receptores, era importante obter um perfil de inibição do aumento de cálcio induzido pelo UTP. Para isso, utilizamos os antagonistas Reactive Blue 2 (RB2) e a Suramina, os quais apresentam atividade antagonista parcial para os receptores P2Y2 e P2Y4, respectivamente (Jacobson e Boeynaems, 2010) e o PPADS, um antagonista de P2X que

bloqueia também o receptor P2Y2 (Anikina et al., 2014). Conforme mostrado na Figura 27, os três inibiram significativamente a mobilização de cálcio induzida pelo UTP.

Após a padronização dos parâmetros necessários à realização do ensaio, finalmente chegamos à etapa de triagem de extratos oriundos de produtos naturais. Os produtos naturais vêm sendo utilizados há muitos anos no tratamento de diversas doenças humanas, sendo considerados ainda, uma importante fonte para a descoberta de novos fármacos em virtude da riqueza de espécies biológicas dos quais são derivados, além das milhares de estruturas químicas ainda não relatadas que podem ser encontradas (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Yunes & Cechinel Filho, 2001; Butler, 2004; Koehn & Carter, 2005; Barreiro & Bolzani, 2009). Além disso, já foram descobertos vários produtos naturais com atividade sobre os receptores P2, incluindo o receptor P2Y2 (Faria et al., 2012). Em vista disso, os produtos naturais podem contribuir significativamente para a descoberta de novos antagonistas dos receptores P2Y ativados por UTP, o que poderá trazer avanços da terapia doenças relacionadas aos receptores purinérgicos. Dessa forma, conseguimos realizar a triagem de 78 extratos, sendo que 7 deles (JA2, JA5, JB2, JB7, P2B6, P5C1 e P5F3) demonstraram uma possível atividade antagonista. Esses extratos inibiram de forma parcial a resposta de cálcio induzida pelo UTP de forma mais potente que os antagonistas Suramina e RB2 e ainda não apresentaram citotoxicidade após 15 e 60 minutos de tratamento.

Além disso, três desses extratos (P2B6, P5C1 e P5F3) apresentam atividade antagonista identificada apenas para o receptor P2X7 (Soares-Bezerra, 2012) através de uma metodologia baseada na propriedade deste receptor em permitir a passagem de moléculas de até 900 Da quando ativado pelo ATP em concentrações acima de 100 μM (Ravelic & Burnstock, 1998). Assim, esta metodologia quantificava a incorporação do Iodeto de Propídeo em células tratadas com extratos e estimuladas com altas concentrações de ATP e a partir dela, foram identificados esses três extratos, nomeados de P2B6, P5C1 e P5F3 em virtude da confidencialidade requerida ao processo de patenteamento, com atividade antagonista sobre o receptor P2X7.

Contudo experimentos complementares poderão confirmar se esses sete extratos possuem ação antagonista sobre os receptores P2Y2 e/ou P2Y4 a partir de experimentos com os agonistas seletivos MRS 2768 (P2Y2R) e MRS 4062 (P2Y4R), o que poderá descartar a participação dos receptores P2Y6, os quais podem ser ativados pelo produto da hidrólise do UTP em UDP pelas ectonucleotidases. A identificação do IC_{50} desses extratos poderá ainda trazer informações acerca de sua faixa de atividade. Além disso, ensaios funcionais de migração e proliferação celular e liberação de citocinas, além do teste em células primárias

poderão fornecer uma resposta mais próxima da realidade fisiológica. Já a realização do teste de validação z poderá confirmar o real significado do efeito dos extratos com atividade antagonista no ensaio realizado e por fim, através de técnicas de cromatografia que visem a purificação dos compostos presentes nos extratos, seguida de técnicas de elucidação estrutural, poderemos identificar o princípio ativo, o qual poderá apresentar atividade na faixa de nanomolar ou abaixo disso. Acreditamos com isso, que estes achados podem representar um avanço para a Farmacologia de Receptores Purinérgicos.

CONCLUSÕES

- O protocolo para o carregamento ótimo de macrófagos murinos da linhagem celular J774.G8 foi estabelecido a partir do uso de Dulbecco's PBS contendo [2,5 mM] de probenecida e 2 μ M de Fluo-4AM, condições em que conseguimos resultados que apontavam para a realização adequada do ensaio.;
- A linhagem celular J774.G8 expressa os receptores P2X1, P2X7, P2Y1, P2Y6, P2Y11, P2Y12, incluindo os subtipos P2Y2 e P2Y4, que são ativados por UTP;
- Foi realizada a triagem de 78 extratos a partir do ensaio proposto de mensuração de cálcio intracelular, sendo que os extratos JA2, JA5, JB2, JB7, P2B6, P5C1 e P5F3 bloquearam parcialmente as repostas de aumento de cálcio induzidas pelo UTP e não apresentaram citotoxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, Ramsey BW; TIGER-1 Investigator Study Group. Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 1;183(5):627-34.

Adrian K, Bernhard MK, Breitingner HG, Ogilvie A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 21;1492(1):127-38.

Alves LA, Bezerra RJ, Faria RX, Ferreira LG, da Silva Frutuoso V. Physiological roles and potential therapeutic applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules.* 2013 Sep 5;18(9):10953-72.

Andó RD, Mészáros B, Gyires K, Illes P, Sperlág B. A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 2010 Mar;159(5):1106-17.

Anikina TA, Anisimova IN, Zverev AA, Sitdikov FG, Zefirov TL. Involvement of P2Y(2,4) receptors in the regulation of myocardial contractility in growing rats. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Jan;156(3):299-302.

Arkin MR, Connor PR, Emkey R, Garbison KE, Heinz BA, Wiernicki TR, Johnston PA, Kandasamy RA, Rankl NB, Sittampalam S. FLIPR™ Assays for GPCR and Ion Channel Targets. In: Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, Glicksman M, Inglese J, Lemmon V, Li Z, McGee J, McManus O, Minor L, Napper A, Riss T, Trask OJ, Weidner J, editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-2012.

- Azimi I, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Calcium influx: pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(4):945-60.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005 Dec 22;78(5):431-41.
- Barreiro EJ, Bolzani VS. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quím. Nova*. 2009;32(3):679-88.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):11-21.
- Bhakuni DS, Rawat DS. Bioactive marine natural products. New York: Springer, 2005.
- Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildreorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, Sluyter R, Stokes L. Probenecid blocks human P2X7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. *PLoS One*. 2014 Mar 26;9(3):e93058.
- Bonadei I, Sciatti E, Vizzardì E, D'Aloia A, Raddino R, Metra M. New frontiers in the management of acute coronary syndromes: cangrelor and elinogrel. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2014;9(1):22-7.
- Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M. Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013 Feb 1;2013(2):83-99.
- Broom DC, Matson DJ, Bradshaw E, Buck ME, Meade R, Coombs S et al. Characterization of N-(Adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)]-2-chloro-benzamine, a P2X₇ Antagonist in Animal Models of Pain and Inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(3):620-33.
- Bruton JD, Cheng AJ, Westerblad H. Methods to detect Ca²⁺ in living cells. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:27-43.

- Buchthal F, Folkow B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand.* 1948 Apr 20;15(2):150-60.
- Buell G, Michel AD, Lewis C, Collo G, Humphrey PP, Surprenant A. P2X1 receptor activation in HL60 cells. *Blood.* 1996 Apr 1;87(7):2659-64.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 1970 Dec;40(4):668-88.
- Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience.* 1976 Aug;1(4):239-48.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L, Straub RW, eds. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones.* New York: Raven Press; 1978. p. 107-118.
- Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(8):793-803.
- Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* 2006a Mar;27(3):166-76.
- Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* 2006b Mar;58(1):58-86.
- Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* 2006c Jan;147 Suppl 1:S172-81.
- Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays.* 2012 Mar;34(3):218-25.
- Burnstock G. Introduction and perspective, historical note. *Front Cell Neurosci.* 2013 Nov 21;7:227.
- Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004 Dec;67(12):2141-53.

Calo-Fernández B, Martínez-Hurtado JL. Biosimilars: company strategies to capture value from the biologics market. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2012 Dec 12;5(12):1393-408.

Camarda V, Fischetti C, Anzellotti N, Molinari P, Ambrosio C, Kostenis E, Regoli D, Trapella C, Guerrini R, Severo S, Calo G. Pharmacological profile of NOP receptors coupled with calcium signaling via the chimeric protein $G\alpha_{q15}$. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2009;379(6):599-607.

Cavaliere F, Nestola V, Amadio S, D'Ambrosi N, Angelini DF, Sancesario G, Bernardi G, Volonté C. The metabotropic P2Y4 receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis*. 2005 Feb;18(1):100-9.

Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*. 1998 Jan/Fev;(21)1:99-105.

Cechinel Filho V, Yunes RA. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: Métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia e patente*. Chapecó: Argos, 2001.p.47-75.

Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Górecki DC, Persechini PM, Bisaggio RC, Mendes AN, Marks J, Burnstock G, Dunn PM. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2005 Feb 15;69(4):641-55.

Cuisset T, Gaborit B, Dubois N, Quilici J, Loosveld M, Beguin S, Loundou AD, Moro PJ, Morange PE, Alessi MC, Dutour A, Bonnet JL. Platelet reactivity in diabetic patients undergoing coronary stenting for acute coronary syndrome treated with clopidogrel loading dose followed by prasugrel maintenance therapy. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 20;168(1):523-8.

Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5441-7.

Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929 Nov 25;68(3):213-37.

Emmelin N, Feldberg W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother.* 1948 Dec;3(4):273-84.

Faria R, Ferreira L, Bezerra R, Frutuoso V, Alves L. Action of natural products on P2 receptors: a reinvented era for drug discovery. *Molecules.* 2012 Nov 1;17(11):13009-25.

Filippov AK, Simon J, Barnard EA, Brown DA. Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels. *Br J Pharmacol.* 2003 Jan;138(2):400-6.

Fasolato C, Hoth M, Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):20737-40.

Fortes FSA, Pecora IL, Persechini PM, Hurtado S, Costa V, Coutinho-Silva R, Braga MBM, Silva-Filho FC, Bisaggio RC, de Farias FP, Scemes E, de Carvalho ACC, Goldenberg RCS. Modulation of intracellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J Cell Sci.* 2004;117(20):4717-26.

Galvez-Llompart M, Zanni R, García-Domenech R. Modeling natural anti-inflammatory compounds by molecular topology. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9481-503.

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of Fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium.* 2000 Feb;27(2):97-106.

Ghanem E, Robaye B, Leal T, Leipziger J, Van Driessche W, Beauwens R, Boeynaems JM. The role of epithelial P2Y2 and P2Y4 receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Br J Pharmacol.* 2005 Oct;146(3):364-9.

Gillespie JH. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol.* 1934 Feb 28;80(4):345-59.

Ginsborg BL, Hirst GD. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol.* 1972 Aug;224(3):629-45.

Hansen KB, Bräuner-Osborne H. FLIPR[®] assays of intracellular calcium in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol.* 2009;552:269-78.

Heilbronn E, Knoblauch BH, Müller CE. Uridine nucleotide receptors and their ligands: structural, physiological, and pathophysiological aspects, with special emphasis on the nervous system. *Neurochem Res.* 1997 Aug;22(8):1041-50.

Hochhauser E, Cohen R, Waldman M, Maksin A, Isak A, Aravot D, Jayasekara PS, Müller CE, Jacobson KA, Shainberg A. P2Y2 receptor agonist with enhanced stability protects the heart from ischemic damage in vitro and in vivo. *Purinergic Signal.* 2013 Dec;9(4):633-42.

Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 1959 Mar 12;145(3):494-504.

Huggins C, Olsen C. Comparison of photina luminescent calcium mobilization assays on both the FlexStation 3 and FLIPR^{TETRA} Systems. FlexStation Application Note #6. 2010. [acesso 05 fev 2015]. Disponível em: http://mms.technologynetworks.net/app_notes/MD04.pdf

Isfort K, Ebert F, Bornhorst J, Sargin S, Kardakaris R, Pasparakis M, Bähler M, Schwerdtle T, Schwab A, Hanley PJ. Real-time imaging reveals that P2Y2 and P2Y12 receptor agonists are not chemoattractants and macrophage chemotaxis to complement C5a is phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286(52):44776-87.

Itokawa H, Morris-Natschke SL, Akiyama T, Lee KH. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med*. 2008 Jul;62(3):263-80.

Jacob F, Pérez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal*. 2013 Sep;9(3):285-306.

Jacobson KA. P2X and P2Y Receptors. *Tocris Reviews* N° 33. 2010. [acesso 05 fev 2015]. Disponível em: http://www.komabiotech.co.kr/pdf/purinergic_receptors_review.pdf.

Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):419-36.

Jacobson KA, Boeynaems JM. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today*. 2010 Jul;15(13-14):570-8.

Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, Sak K, Rolland C, Perez C, Nauze M, Champagne E, Tercé F, Gachet C, Perret B, Collet X, Boeynaems JM, Barbaras R. The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Nov;62(21):2508-15.

Kaczmarek-Hájek K, Lőrinczi E, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors – recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):375-417.

Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006 Aug 3;442(7102):527-32.

Khakh BS, North RA. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. 2012 Oct 4;76(1):51-69.

Kennedy C, Burnstock G. Evidence for two types of P2-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol*. 1985 Apr 23;111(1):49-56.

- Kim CH, Kim HY, Lee HS, Chang SO, Oh SH, Lee JH. P2Y4-mediated regulation of Na⁺ absorption in the Reissner's membrane of the cochlea. *J Neurosci*. 2010 Mar 10;30(10):3762-9.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Mar;4(3):206-20.
- Lau OC, Samarawickrama C, Skalicky SE. P2Y2 receptor agonists for the treatment of dry eye disease: a review. *Clin Ophthalmol*. 2014 Jan 30;8:327-34.
- Lazarowski, ER. Research Focus. CF/Pulmonary Research & Treatment Center. 2011 [acesso em 03 fev 2015]. Disponível em: <http://www.med.unc.edu/cfpulmcenter/about-us/faculty/lazarowski>.
- Lewinsohn TM, Prado PI. How many species are there in Brazil? *Conserv. Biol*. 2005 Jun;19(3):619-24.
- Li X, Llorente I, Brasch M. Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD calcium assay kits. *Curr Chem Genomics*. 2008 Oct 10;2:10-5.
- Li HQ, Chen C, Dou Y, Wu HJ, Liu YJ, Lou HF, Zhang JM, Li XM, Wang H, Duan S. P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta induced self-uptake by microglia. *Mol Cell Biol*. 2013 Nov;33(21):4282-93.
- Li N, Lu ZY, Yu LH, Burnstock G, Deng XM, Ma B. Inhibition of G protein-coupled P2Y2 receptor induced analgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Mol Pain*. 2014 Mar 18;10:21.
- Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*. 1978 Sep 10;253(17):5892-4
- Luo J, Zhu Y, Zhu MX, Hu H. Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. *J Vis Exp*. 2011;(54).

Lydford S, Monnet L, Averbek P. Monitoring receptor mediated changes in $[Ca^{2+}]_i$ using single- and dual-wavelength indicators on the FlexStation Benchtop Multi-Mode Microplate Reader. FlexStation Application Note #3. 2011. [acesso 05 fev 2015]. Disponível em: <http://www.moleculardevices.com/Support/Information-Center/Application-Notes.html>.

Marcus DC, Scofield MA. Apical P2Y₄ purinergic receptor controls K⁺ secretion by vestibular dark cell epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jul;281(1):C282-9.

Maruoka H, Jayasekara MP, Barrett MO, Franklin DA, de Castro S, Kim N, Costanzi S, Harden TK, Jacobson KA. Pyrimidine Nucleotides with 4-Alkyloxyimino and Terminal Tetraphosphate δ -Ester Modifications as Selective Agonists of the P2Y₄ Receptor. *J Med Chem*. 2011 Jun 23;54(12):4018-33.

Mathes C, Friis S, Finley M, Liu Y. QPatch: the missing link between HTS and ion channel drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2009 Jan;12(1):78-95.

McClenaghan C, Zeng F, Verkuyl JM. TRPA1 agonist activity of probenecid desensitizes channel responses: consequences for screening. *Assay Drug Dev Technol*. 2012 Dec;10(6):533-41.

Michelson AD. Advances in antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:62-9.

Molecular Devices. FlexStation 3 Microplate Reader: a five-mode microplate reader with integrated fluid transfer. Brochure. 2006. [acesso 05 fev 2015]. Disponível em: <http://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000618/equip/flexstation/information-flex/Equipement.pdf>

Molecular Devices. Measuring intracellular calcium with the FLIPR[®] I and FLIPR³⁸⁴ Fluorometric Imaging Plate Reader Systems. FLIPR Application Note. 2010. [acesso 08 fev 2015]. Disponível em: <http://labs.pbrc.edu/cellbiology/documents/pHBCECF.pdf>.

Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 2011 Aug;9(8):e1001127.

Motovska Z, Kala P. Benefits and risks of Clopidogrel use in patients with coronary artery disease: evidence from randomized studies and registries. *Clin Ther.* 2008;30 Pt 2:2191-202.

Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Grimm M, Jakob T, Martin SF, Di Virgilio F, Boeynaems JM, Virchow JC, Idzko M. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy.* 2010 Dec;65(12):1545-53.

Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. Diquafosol ophthalmic solution for dry eye treatment. *Adv Ther.* 2012 Jul;29(7):579-89.

Namovic MT, Jarvis MF, Donnelly-Roberts D. High throughput functional assays for P2X receptors. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012; Chapter 9: Unit 9.15.

Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Oct;303(1):66-73.

Orhan IE. Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. *Bioimpacts.* 2014;4(3):109-10.

Ortmann B, Valentin S, Atze K, Breuer N, Franke S, Kühn M, de Bruin L. Monitoring Intracellular Ca²⁺ Fluxes with Clonetics™ primary sensors using the LUMIstar Omega. Application Note 216, Rev. 06/2011. <http://www.bmglabtech.com/media/35216/1043894.pdf>

Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, Erb L, Petris MJ, Weisman GA. P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol.* 2010 Jun;41(2-3):356-66.

- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep;50(3):413-92.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* 7^a ed. Rio de Janeiro; 2012.
- Sakaki H, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y₁₁ receptor. *PLoS One.* 2013;8(4):e59778.
- Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan 28;15(2):2024-52.
- Soares-Bezerra RJ, Calheiros AS, da Silva Ferreira NC, da Silva Frutuoso V, Alves LA. Natural products as a source for new anti-inflammatory and analgesic compounds through the inhibition of purinergic P2X receptors. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013 Apr 29;6(5):650-8.
- Soares-Bezerra, RJ. Triagem de extratos vegetais e fúngicos de diferentes biomas brasileiros para identificação de antagonistas de receptores P2 com foco no receptor P2X₇. 29 de outubro de 2012. 199 f. Tese – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.
- Stachon P, Peikert A, Michel NA, Hergeth S, Marchini T, Wolf D, Dufner B, Hoppe N, Ayata CK, Grimm M, Cicko S, Schulte L, Reinöhl J, von zur Muhlen C, Bode C, Idzko M, Zirlik A. P2Y₆ deficiency limits vascular inflammation and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Oct;34(10):2237-45.
- Steinberg H, Newman AS, Swanson JA, Silverstein SC. Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol.* 1987 Dec;105(6 Pt 1):2695-702.
- Sullivan E, Tucker EM, Dale IL. Measurement of [Ca²⁺] using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). *Methods Mol Biol.* 1999;114:125-33.

Tackett BC, Sun H, Mei Y, Maynard JP, Cheruvu S, Mani A, Hernandez-Garcia A, Vigneswaran N, Karpen SJ, Thevananther S. P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Dec 1;307(11):G1073-87.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1089-125.

Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, Karpen SJ. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):393-402.

Tsien, RY. Monitoring Cell Calcium. In: Carafoli E, Klee C, eds. *Calcium as a Cellular Regulator*. New York: Oxford University Press, 1999. p. 28-54.

van der Weyden L, Rakyan V, Luttrell BM, Morris MB, Conigrave AD. Extracellular ATP couples to cAMP generation and granulocytic differentiation in human NB4 promyelocytic leukaemia cells. *Immunol Cell Biol*. 2000 Oct;78(5):467-73.

von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2006 Jun;110(3):415-32.

Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA; PLATO Investigators, Freij A, Thorsén M. Ticagrelor versus Clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1045-57.

Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, González FA, Seye CI, Erb L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2005;31(1-3):169-83.

Weisman GA, Camden JM, Peterson TS, Ajit D, Woods LT, Erb L. P2 receptors for extracellular nucleotides in the Central Nervous System: role of P2X7 and P2Y2 receptor interactions in neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2012 Aug;46(1):96-113.

White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Apr;27(4):211-7.

YaQin J, Qi Y, ShiYou L. Cellular fluorescent high-throughput screening assays of the ATP-gated P2X7 receptor. *Chin Sci Bull*. 2013 Aug;58(23):2812-9.

Yunes, RA, Cechinel Filho V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: Métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia e patente*. Chapecó: Argos, 2001.p.17-44.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73.

Manuscrito com os resultados da dissertação

The Screening of Natural Product Antagonists for UTP-Activated P2Y Receptors by Intracellular Calcium Measurements

Ferreira NCS¹, Soares-Bezerra RJ¹, Silva CM¹, Oliveira CS¹, Alves LA^{1*}.

1. Laboratory of Cellular Communication, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: alveslaa@gmail.com

Adress: Laboratório de Comunicação Celular – Sala 28B Pav 108 IOC – Fiocruz
Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ – Brasil – Cep: 21045-900.
Tel: +55-21-2562-1841

Abstract

P2Y2 and P2Y4 receptors are physiologically activated by UTP and promote an increase of intracellular calcium via PLC β / IP₃. They are widely expressed in many cell types and acts on ion flux and water secretion, among others. P2Y2 agonists have been developed to treat cystic fibrosis and dry eye disease, but the lack of selective ligands impairs the discovery of new physiological functions associated with these receptors. This can be solved by the search for new compounds with possible antagonistic activity. Intracellular calcium measurements using a FlexStation III equipment can be a tool for the screening of novel compounds, since these receptors are coupled to signaling pathways that lead to an increase of intracellular calcium. In the present study we have improved several analyses conditions in order to apply a FlexStation III in the screening for P2 receptor antagonists, which increase intracellular calcium concentrations. After optimizing the equipment, we obtained seven natural product extracts that partially block calcium mobilization induced by UTP and that not present citotoxicity.

Keywords: P2Y2, P2Y4, UTP, antagonist, screening, calcium.

1. Introduction

Purinergic receptors are plasma membrane receptors activated by extracellular purines and pyrimidines. These receptors are subdivided into two families, according to the main physiological ligand: P1 receptors, which are activated by adenosine, and P2 receptors, that are activated by nucleotides. P2 receptors are classified into two classes: ionotropic P2X receptors (P2XR) and metabotropic P2Y receptors (P2YR) (Ralevic & Burnstock, 1998).

P2YR receptors are G-protein-coupled receptors that have eight subtypes cloned in mammals: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 and P2Y14 (Ralevic & Burnstock, 1998). These subtypes are divided into two groups according to the signaling pathway promoted by the G-protein. The P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 and P2Y11 subtypes are coupled to the G_q protein and activate PLC β , that forms diacylglycerol and IP₃, which in turn induce an increase of intracellular calcium from stores via IP₃R activation in the endoplasmic reticulum. The P2Y12, P2Y13 and P2Y14 subtypes are coupled to the G_i protein and inhibit adenylyl cyclase, causing a decrease in cAMP formation (Ralevic & Burnstock, 1998; Jacobson & Boeynaems, 2010).

P2Y2 and P2Y4 receptors are physiologically activated by UTP and promote an increase of intracellular calcium via PLC β / IP₃ (Jacobson & Boeynaems, 2010). They are expressed in many cell types such as epithelial cells, monocytes, macrophages, neutrophils, cardiomyocytes and organs, including the brain, heart, kidneys, liver, spleen and muscle (Peterson et al., 2000). They present effects on the chloride secretion of epithelial cells from the airway and eyes, and induce water secretion in epithelial cells from the bowel. These functions are important because they promote surface lubrication and mucus hydration, which can aid in the treatment of diseases such as cystic fibrosis, dry eye disease and chronic constipation (Burnstock, 2006; Jacobson & Boeynaems, 2010). Because of this, pharmaceutical companies have been applying efforts to search for new P2Y2 agonists to treat cystic fibrosis and dry eye disease.

P2Y2R also has a role in neuroprotection, chemokinesis and in the proliferation of hepatocytes and tumor cells (Weisman et al., 2005; Jacob et al., 2013; Thevananther et al., 2004; Tackett et al., 2014). P2Y4R participates in Na⁺, K⁺ and Cl⁻ regulation processes, but its functions are not completely characterized due to its expression in the same tissues and cell types that express P2Y2R, where they are activated by the same

physiological ligand, UTP (Marcus & Scofield, 2001; Ghanem et al., 2005; Kim et al., 2010; Maruoka et al., 2011). Therefore, the lack of selective ligands impairs the discovery of new functions associated with these receptors. This can be solved with the search for novel compounds with antagonistic activity on these receptors.

In this context, methodologies for intracellular calcium measurements emerge as a tool for the screening of novel compounds, since these receptors are coupled to signaling pathways related to the increase of intracellular calcium. These methodologies have demonstrated importance in high performance evaluations, due to the advantage of screening many compounds in a short period of time. Thus, the aim of this study was improve an intracellular calcium measurement protocol that allows the detection of natural product compounds with antagonist activity on P2Y receptors activated by UTP using a FlexStation III equipment.

2. Material and methods

Reagents

Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), including ATP, UTP, ADP, UDP, $\alpha\beta$ -meATP, Suramin, DMEM culture medium, NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , Glucose, Probenecid and Ionomycin. Fetal bovine serum was obtained from Cultilab (Campinas, SP, Brazil) and Fluo-4 AM was obtained from Life Technologies (CA, USA).

Cell culture

J774.G8 is a murine macrophage cell line that widely expresses P2 receptors. The cells were routinely maintained in culture with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. The medium was changed every three days and the cells were adjusted to a concentration of 2×10^6 cells per 150 cm^2 cell culture flask (Corning). Cell viability was analyzed by the Trypan blue assay and the calcium assays were conducted only when the range of viability was above 90%.

Calcium assays

J774.G8 cells were plated in a concentration of 4×10^5 cells/well in a 96-well black-wall and clear-bottom plate (Corning), and maintained in culture with 200 μl of

DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24h. Subsequently, the medium was replaced by 100 µl of Dulbecco's PBS (DPBS) (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, 5.55 mM Glucose and 2.5 mM Probenecid – pH 7.4) containing [2 µM] Fluo-4 AM, and the cells were incubated for 60 minutes at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Extracellular Fluo-4 was then removed by three consecutive washes with 200 µl of DPBS and the cells then received a volume of 150 µl of DPBS. The cells were treated with antagonists or extracts [50 µg/ml] for 15 minutes. The plate was then placed into the FlexStation III equipment, which performed the addition of the agonists in each well, diluted in 50 µl of DPBS. The mobilization of intracellular calcium was measured in real time prior, during and after the addition of the agonists at λ (excitation): 485 nm and λ (emission): 525 nm. The total measurement runtime was 90 seconds and the agonists were added at 20 seconds. The readings were conducted every 1.52 seconds and a total of 60 readings were obtained for each well. The ΔFU, i.e. the difference between the fluorescence peak associated with the maximum concentration of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) and the basal fluorescence of calcium were determined as mentioned in the study by Hansen and Brauner-Osborne (2009). The wells which signal did not return to approximately 30% of the baseline after stimulation were discarded.

In one experiment intracellular calcium mobilization was measured on a fluorescence microscope coupled to a PTI calcium imaging system (NJ, USA).

RNA extraction, RT-PCR and electrophoresis

The mRNA was isolated from the J774.G8 cell line from a concentration of 5x10⁶ cells using TRIzol (Life Technologies, CA, USA), according to the manufacturer's specifications. Then, 20 µl of mRNA was reverse transcribed at 42°C for 1 hour and at 70°C for 5 minutes using 1 µl of reverse transcriptase enzyme. Next, 4 µl of cDNA samples were used with 4 µl of a primer sequence specific for each P2 receptor subtype, as shown in Table 1. These samples were used for the RT-PCR analysis in a 50 µl reaction volume containing 5 µl of Buffer 10x, 4 µl Mg²⁺, 0.4 µl dNTP, 0.2 µl Taq polimerase and 4 µl of water. Cycling conditions were: 94°C for 45 seconds, followed by 35 cycles of 54°C (P2Y11), 55°C (P2Y6), 57°C (P2X1), 58°C (P2X3, P2Y14 and P2Y13), 60°C (P2Y2, P2X2, P2X5, P2X6, P2Y12, P2Y1, P2Y4 and GAPDH) or 65°C (P2X4 e P2X7) for 1 minute and 72°C for 45 seconds. PCR products

were accessed through the electrophoresis technique, using a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining in a transilluminator.

Assay for detection of Lactate Dehydrogenase (LDH)

The detection of LDH activity in the supernatants of cells previously incubated by 15 and 60 minutes in the presence of the extracts [50 µg/ml] was performed by the instructions from the kit for detection of LDH purchased from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil).

Data analysis

Each sample was measured in triplicate and all experiments were performed on at least three independent days. All data are presented as means ± S.D.M., while the curves are presented as means ± S.E.M. In order to test if the samples follow a Gaussian distribution, the D' Agostino and Pearson (normality test) was used. If the data follow a Gaussian distribution, an appropriate parametric test was applied, if not; an appropriate non-parametric test was applied. The conducted tests were specified in the figure legends and were two-tailed paired. P values of 0.05 or less were considered significant.

The graphs and statistical analyses were performed by GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Table 1 – Primer sequence of P2 receptors

P2 receptor subtype	Primer sequence
P2X1	Forward: ATGCCTCGGCATATTTGAA Reverse: ATTGTGCAGAGAACCCAGAA
P2X2	Forward: TTCATCGTGCAGAAAAGCTACC Reverse: TGGATGCTGTTCTTGATGAGGA
P2X3	Forward: CTTACCTATGAGACCACCAAG Reverse: CGGTATTTCTCCTCACTCTCTG
P2X4	Forward: TGCTCATCCGCAGCCGCAAAGT Reverse: AGTGGTCGCATCTGGAATCTCGG
P2X5	Forward: ACTTCCCTGCAGAGTGCTGT

	Reverse: GGCAGCTTTATCAAGGTCACA
P2X6	Forward: TATGTGATGACCAGGAACTG Reverse: CTCCAGATCTCACAGGTCCT
P2X7	Forward: GGCAGTTCAGGGAGGAATCATGG Reverse: AAGCGCCAGGTGGCATAGCTC
P2Y1	Forward: CTGTTGAGACTTGCTAGACCTC Reverse: ATGTTCAATTTGGCTCTGGC
P2Y2	Forward: GTCGCTTCAACGAGGACTTC Reverse: GCCAGGAAGTAGAGCACAGG
P2Y4	Forward: TGGCATTGTCAGACACCTTG Reverse: AAGCAGACAGCAAAGACAGTC
P2Y6	Forward: CGCTTCCTCTTCTATGCCAA Reverse: GTAGGCTGTCTTGGTGATGTG
P2Y11	Forward: CAGCGTCATCTTCATCACC Reverse: GCTATACGCTCTGTAGGC
P2Y12	Forward: CTGCCAAGTCATTTTCTGGA Reverse: AGCATGCTCATCAAGGAATTT
P2Y13	Forward: AGGGGTTTTGTGTGCACTTT Reverse: CTGACTGCTGTGGTGCTCAT
P2Y14	Forward: GCTGTCCCCAACATCATTCT Reverse: GTTTTGGGGTAACTCGCAGA
GAPDH	Forward: ATCACCATCTTCCAGGAGCG Reverse: CCTGCTTCACCACCTTCTTG

3. Results

Establishment of a protocol for the detection of intracellular calcium mobilization

Our primary aim was to discover new antagonists for P2Y receptors activated by UTP, so a protocol for the detection of intracellular calcium mobilization was first established. The first step was to standardize the concentration of the calcium indicator, Fluo-4 AM. In this context, we investigated concentrations ranging from 1 to 8 μ M. We used ATP [100 μ M] to stimulate the cells, due to its activity as a main physiological P2

receptor agonist, which is widely expressed in J774.G8 cells. As observed in Figure 1, there is no significant difference between the concentration range used by many authors, i.e., 2 - 4 μM , according to the literature (Camarda et al., 2009; Molecular Devices, 2010; Luo et al., 2011; Namovic et al., 2012) and, because of this, the elected concentration was of 2 μM .

Next, two assays were performed to verify Fluo-4 AM sensibility in detecting increased of intracellular calcium. Based on this, we used ATP, a purinergic receptor agonist, and Ionomycin, a calcium ionophore that promotes a massive transport of this ion from the extracellular to intracellular medium. Fluo-4 fluorescence increased in the presence of ATP and Ionomycin in a concentration-dependent manner, as displayed in Figure 2, with an EC_{50} of 11 μM for ATP and 103 nM for Ionomycin.

Characterization of calcium responses induced by P2 receptors

In order to characterize the calcium responses acquired by the FlexStation III equipment, we analyzed the original records. These indicate that the DPBS addition alone did not cause any signal variation, as shown in Figure 3A. The ATP stimulus, on the other hand, increased intracellular calcium levels, which can be noted by the fluorescence peak displayed in Figure 3B. This effect was reversed with the addition of EGTA, a calcium chelating agent, confirming that the fluorescence is associated to calcium, as shown in Figure 3C.

To validate the results acquired by the FlexStation III, we compared the signal to another calcium signal, using the same protocol to observe the calcium signal using a microscope coupled to a calcium imaging system. As seen in Figure 4, similar responses using both instruments were obtained, including a fluorescence increase after the ATP and Ionomycin stimuli, which was reversed after the addition of EGTA.

Characterization of P2Y receptors responsive to UTP in J774.G8 cells

The RT-PCR technique was performed in order to verify which P2 receptors are expressed in J774.G8 cells. As seen in Figure 5, the cDNA fragments correspond to P2X1 (775 bp), P2X7 (186 bp), P2Y1 (683 bp), P2Y2 (850 bp), P2Y4 (544 bp), P2Y6 (480 bp), P2Y11 (274 bp) and P2Y12 (360 bp). All these receptors, except the P2Y12R, are associated with signaling pathways of intracellular calcium increases via the opening of a non-selective cation ion channel or PLC β /IP $_3$ system activation. However, we investigated the response of P2 receptor subtypes expressed in J774.G8 cells using

selective agonists. As shown in Figure 6, this cell line presents P2X and P2Y receptors, including UTP-activated P2Y receptors, i.e., P2Y2 and P2Y4. Interestingly, we observed that some agonists present a lower response without extracellular calcium, which points towards store-operated calcium channels and the participation of ionotropic agents.

Next, we obtained the profile of P2Y2 and P2Y4 antagonists by performing an antagonism assay using Reactive Blue 2 (RB2) and Suramin, because they present a slight selectivity for P2Y2 and P2Y4, respectively and PPADS, an antagonist for P2Y2R (Jacobson & Boeynaems, 2010). As shown in Figure 7, RB2, Suramin and PPADS can partly inhibit UTP-induced intracellular calcium mobilization.

Finally, we tested 78 extracts from a natural library and 7 of them demonstrated an antagonist activity without cause toxicity to cells, as shown in Figures 8 and 9.

4. Discussion

P2Y2 and P2Y4 are purinergic receptors physiologically activated by UTP that cause an increase in PLC β / IP₃ (Jacobson & Boeynaems, 2010). They are expressed in many cell types such a epithelial cells and leukocytes, and even in organs such as the brain, heart, kidneys, liver, spleen and muscle (Peterson et al., 2000), where they play important roles. Likewise, these P2Y receptors are associated with certain diseases such as cystic fibrosis, dry eye disease, Alzheimer's disease and cancer (Weisman et al., 2005; Burnstock, 2006; Jacobson & Boeynaems, 2010). Thus, pharmaceutical companies have been developing drugs that act on these P2Y receptors, especially P2Y2, in order to treat diseases such as cystic fibrosis and dry eye disease (Accurso et al., 2011; Nakamura et al., 2012; Lau et al., 2014). However, the lack of selective ligands that act on P2Y2 and P2Y4 receptors compromises the discovery of new functions associated with these receptors, which can be solved by the search of new antagonist compounds (Marcus & Scofield, 2001; Ghanem et al., 2005; Kim et al., 2010; Maruoka et al., 2011). Therefore, the aim of this study was to improve a methodology for the detection of intracellular calcium mobilization, in order to improve the discovery of molecules with antagonistic activity on UTP-activated P2Y receptors. For this reason, we established a protocol to evaluate intracellular calcium mobilization.

First, the concentration of the calcium indicator Fluo-4AM was standardized, a widely used practice in high throughput screening assays for molecular targets, such as metabotropic receptors that induce an increase of intracellular calcium (Li et al., 2008).

We chose a 2 μM concentration (Figure 1) because of the homogenous cellular staining in cells (data not shown) and due to the fact that there were no significant differences between other concentrations. In addition, it is important to use the lowest concentration that results in the desired signal, thereby reducing reagent consumption and expenses during screening (Zhang et al., 1999). Gee and coworkers (2000) also demonstrated that the use of the lowest concentrations of calcium indicators can reduce the buffer effect on calcium, as well as minimize the levels of toxic products such as formaldehyde and acetic acid, which are produced through the hydrolysis of acetoxymethyl esters. Furthermore, by using this concentration we demonstrated that the cells were able to react to different stimuli that increase intracellular calcium levels in a concentration-dependent manner, as shown in Figure 2. The EC_{50} for ATP was 11 μM , which can activate UTP-responsive P2Y receptors. The EC_{50} for the calcium ionophore Ionomycin, was 103 nM. When using 2 μM of Fluo-4AM we observed some expected characteristics for the calcium signals, such as the uniformity of the basal signal, the peak of the signal after the ATP stimulus, indicating an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the return of this signal to the basal level after the response time, which in calcium events usually occurs in seconds. In addition, a decrease of calcium responses in the presence of EGTA, a calcium chelating agent, was also observed. A similar response profile was obtained using another instrument for intracellular calcium measurements, as shown in Figure 4.

In sum, we investigated what P2 receptors subtypes are expressed in the J774.G8 murine macrophage cell line. Using the RT-PCR technique, as seen in Figure 5, we detected the expression of P2X1, P2X2, P2X7, P2Y2, P2Y6 and P2Y11. These P2 receptors subtypes have been described in macrophages in many studies applying molecular and pharmacological techniques (Buell et al., 1996; Adrian et al., 2000; Coutinho-Silva et al, 2005; Sakaki et al., 2013). Furthermore, all these receptors are associated with signaling pathways of intracellular calcium increases via the opening of a non-selective cation ion channel or PLC β /IP $_3$ activation system. Therefore, we characterized these subtypes using the following agonists: ATP [100 μM], a non-selective P2 receptor agonist, UTP [10 μM], a P2Y2 and P2Y4 receptor agonist, ADP [10 μM], a P2Y1 receptor agonist, $\alpha\beta\text{meATP}$ [300 μM], a P2X receptor agonist and UDP [100 μM], a P2Y6 receptor agonist (data not shown). These data show the functional expression of these receptors. The decrease in the response for ATP and UTP in the absence of extracellular calcium suggest the participation of store-operated

calcium channels and ionotropic receptors to amplify the increase of intracellular calcium (Azimi et al., 2014).

Then, we obtained the profile of P2Y2 and P2Y4 antagonists using Reactive Blue 2 (RB2) and Suramin, because they present a slight selectivity for P2Y2 and P2Y4 respectively and PPADS which is an antagonist for P2Y2R (Jacobson & Boeynaems, 2010). These antagonists partially block the intracellular UTP-induced calcium mobilization. Finally, we tested some extracts from a natural library and 7 of them demonstrated an antagonist activity without cause toxicity to cells.

Taken together, our results contributed to the improvement of a methodology for the screening of new compounds with P2Y2 and P2Y4 receptor antagonistic activity.

5. Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERJ, CNPq and the Oswaldo Cruz Institute.

Figure legends

Figure 1: Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ on a FlexStation III after ATP treatment [100 μ M] in cells stained with different Fluo-4 concentrations. Cells stained with different Fluo-4 concentrations of were stimulated with [100 μ M] ATP and monitored for 90 seconds on a FlexStation III equipment. Data is presented as Means \pm S.D.M. of four independent experiments. The results were analyzed by ANOVA and Tukey tests and $p < 0.05$. (*) indicates significant differences when compared to the 1 μ M concentration.

Figure 2: ATP and Ionomycin curves. The ATP (A) and Ionomycin (B) curves were obtained from cells stained with 2 μ M of Fluo-4 on a FlexStation III equipment. Data is presented as Means \pm S.E.M. of three independent experiments.

Figure 3: Original records of calcium signals obtained on a FlexStation III. Original records of calcium signals obtained on a FlexStation III equipment after the addition of 50 μ l of DPBS (A), ATP [100 μ M] (B and C), at 25 seconds, and EGTA [20 mM] (54 seconds) (C) indicated by the arrows in cells stained with 2 μ M of Fluo-4. Representative images from three independent experiments.

Figure 4: Individual records of cells stained with Fluo-4AM. Individual records of cells stained with 2 μM of Fluo-4AM (indicated by different colours) obtained on a fluorescence microscope coupled to a PTI calcium imaging system. The time of the addition of ATP [100 μM], Ionomycin [5 μM] and EGTA [20 mM] are indicated by the arrows. Representative graph from two independent experiments.

Figure 5: cDNA fragments corresponding to the P2 receptors subtypes expressed in the J774.G8 cell line. In (A), the columns correspond to fragments of the following subtypes: Molecular weight standard (1), P2X1 (2), P2X2 (3), P2X3 (4), P2X4 (5), P2X5 (6), P2X6 (7), P2X7 (8), P2Y1 (9), P2Y2 (10), P2Y4 (11), P2Y6 (12), P2Y11 (13), P2Y12 (14), P2Y13 (15), P2Y14 (16), GAPDH (17) and GAPDH Kit (18) and in (B) correspond to Molecular weight standard (1) and P2Y1 (2). Samples and standards were run on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Representative image from two experiments.

Figure 6: Increase of intracellular calcium induced by P2 receptor agonists. Cells stained with 2 μM of Fluo-4AM were stimulated with ATP [100 μM], UTP [10 μM], ADP [10 μM] and $\alpha\beta\text{meATP}$ [300 μM] and monitored for 90 seconds on a FlexStation III equipment. Data is presented as Means \pm S.D.M. of three independent experiments. The results were analyzed by ANOVA and Tukey tests and $p < 0.05$. (*) indicates significant differences in relation to respective group without Ca^{2+} . The receptors named inside the bars correspond to subtypes activated by the agonist.

Figure 7: Response of P2Y2 and P2Y4 antagonists on the inhibition of the intracellular calcium increase induced by UTP. Cells stained with 2 μM of Fluo-4AM were treated with Suramin [300 μM] and RB2 [20 μM] for 15 minutes. Cells were then stimulated with UTP [10 μM] and monitored for 90 seconds on a FlexStation III equipment. Data is presented as Means \pm S.D.M. of three independent experiments.

Figure 8: Effect of the a group of extracts on the increase in intracellular calcium induced by UTP. J774.G8 cells labeled with 2 μM Fluo-4AM were treated with Suramin [300 μM], RB2 [20 μM] and extracts [50 $\mu\text{g/ml}$] for 15 minutes. Then, cells were stimulated with UTP [10 μM], Ionomycin [1 μM] and 0.5% DMSO in FlexStation

III and monitored for 90 seconds. Mean and standard deviation of 3 experiments performed on different days in triplicate analyzed by one-way ANOVA and Tukey post-test ($p < 0.05$). Statistical comparison was made in relation to the response produced by UTP. The N upon the number of bars refers to the number of wells evaluated and that the bars without this feature has a $N = 9$.

Figure 9: Evaluation of cytotoxicity of the extracts. J774.G8 cells were treated with 1% Triton-X and extracts [50 $\mu\text{g/ml}$] for 15 minutes (A) and 60 min (B). Then, the cells were treated with UTP [10 μM] for 2 minutes, and after this period, have their supernatants collected for measurement of lactate dehydrogenase enzyme activity. Mean and standard deviation of 3 experiments performed on different days in triplicate analyzed by one-way ANOVA and Tukey post-test ($p < 0.05$). Statistical comparison was made in relation to the response produced by the cell group. The N upon the number of bars refers to the number of wells evaluated and that the bars without this feature has a $N = 9$.

Figure 1

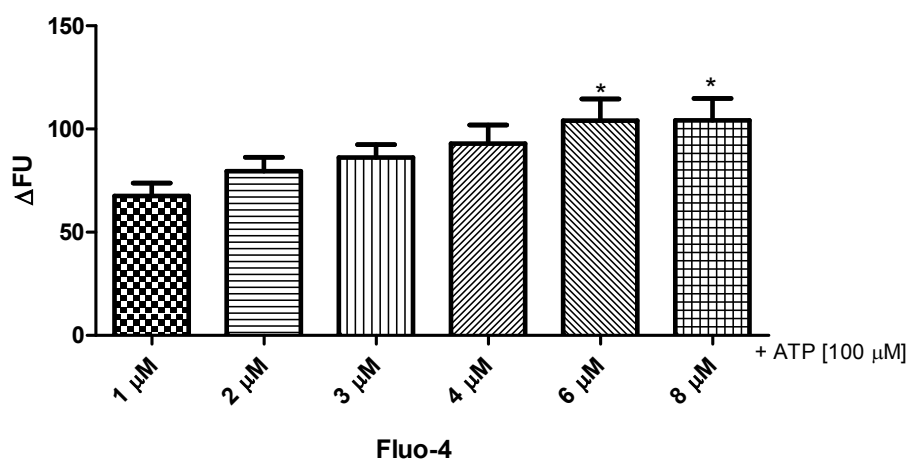
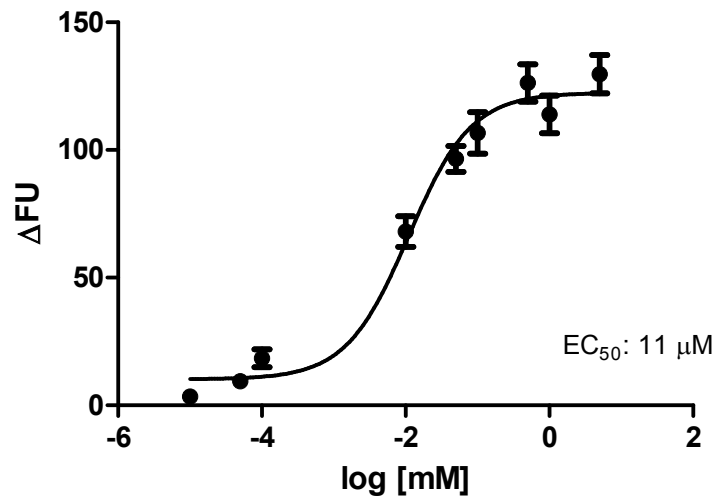


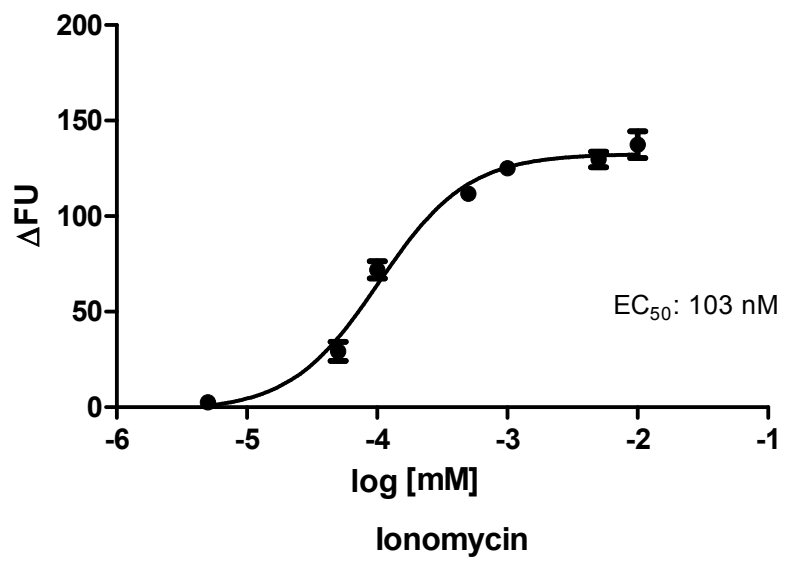
Figure 2

A



ATP

B



Ionomycin

Figure 3

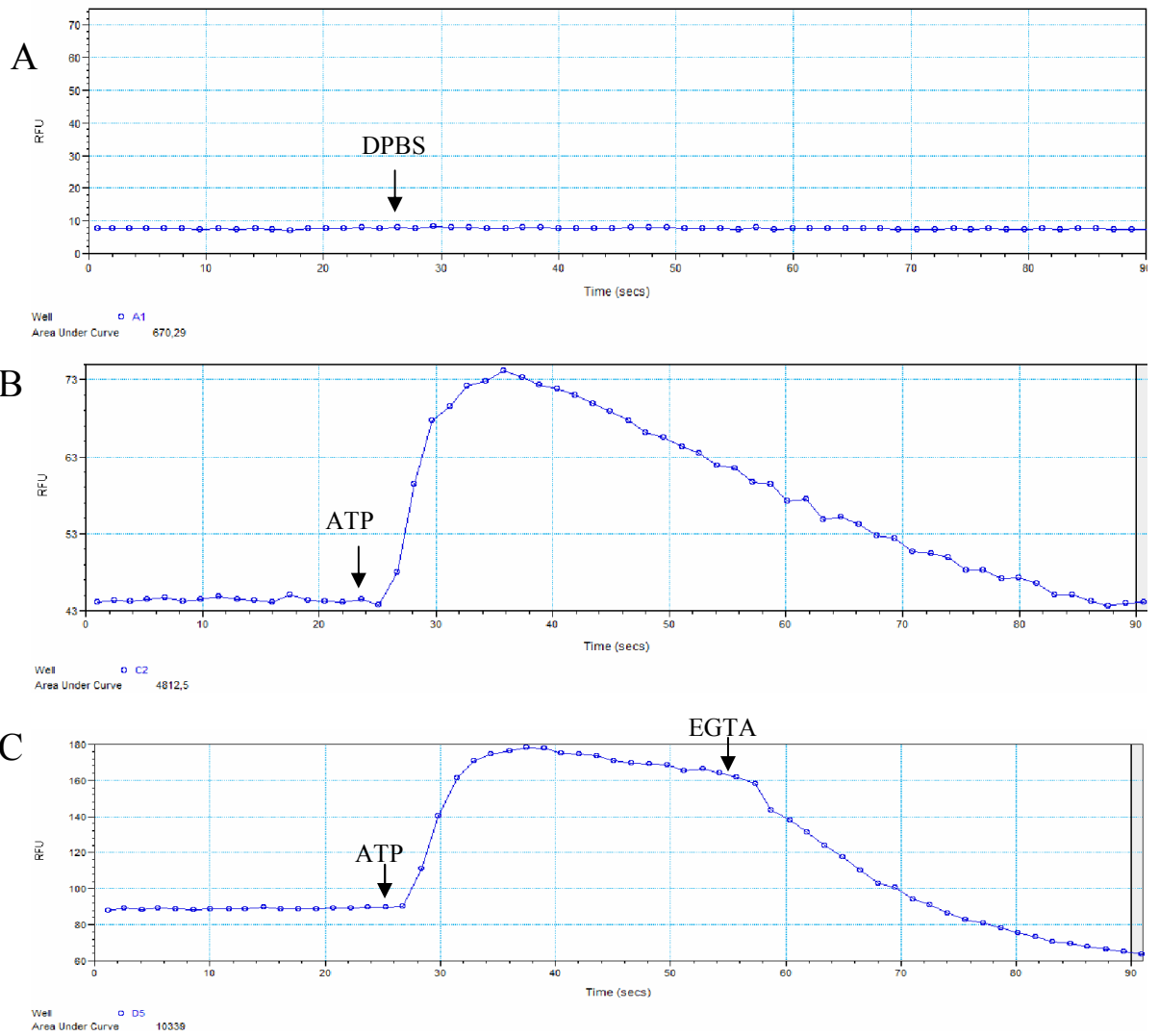


Figure 4

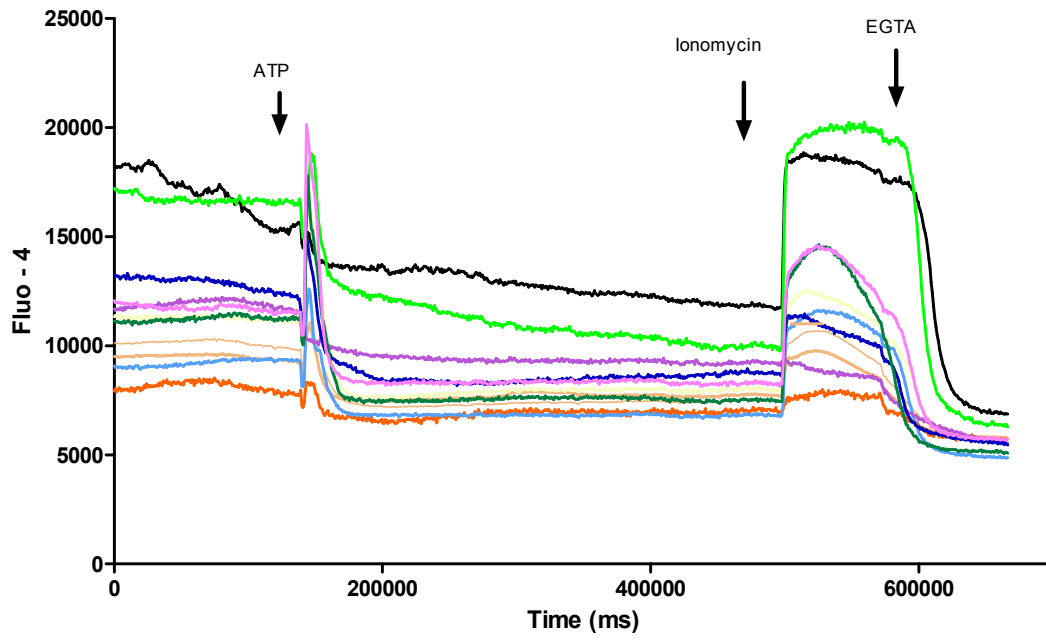


Figure 5

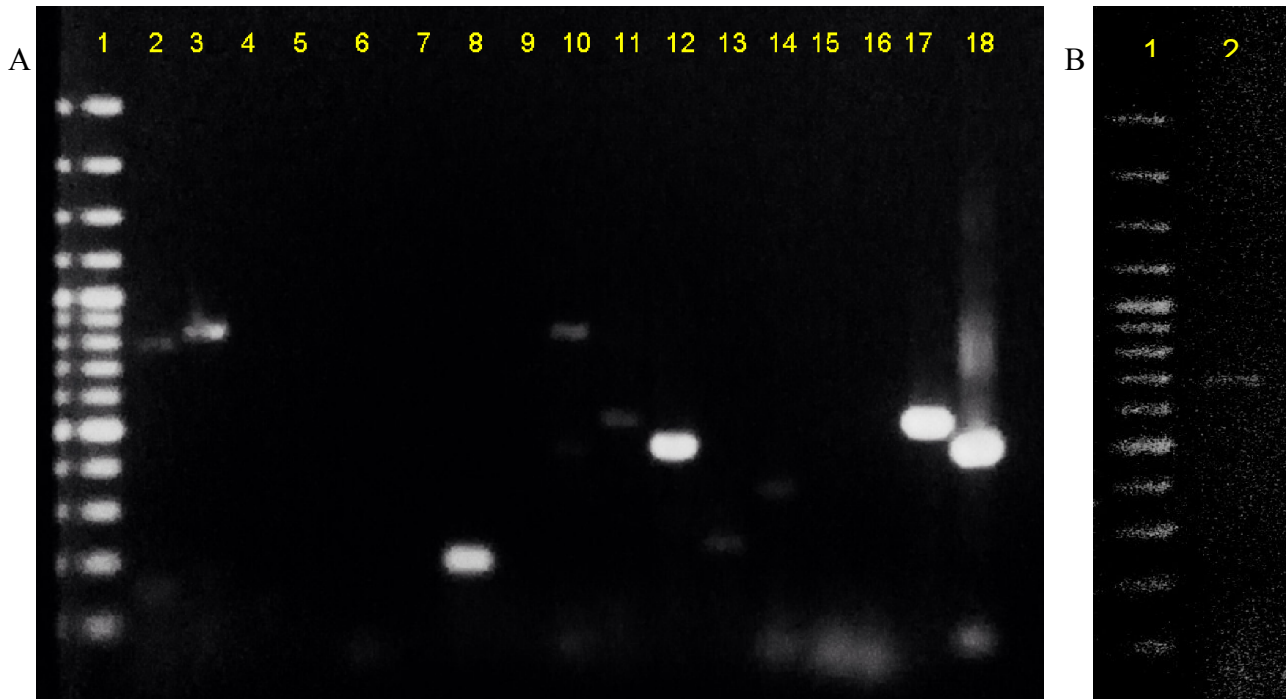


Figure 6

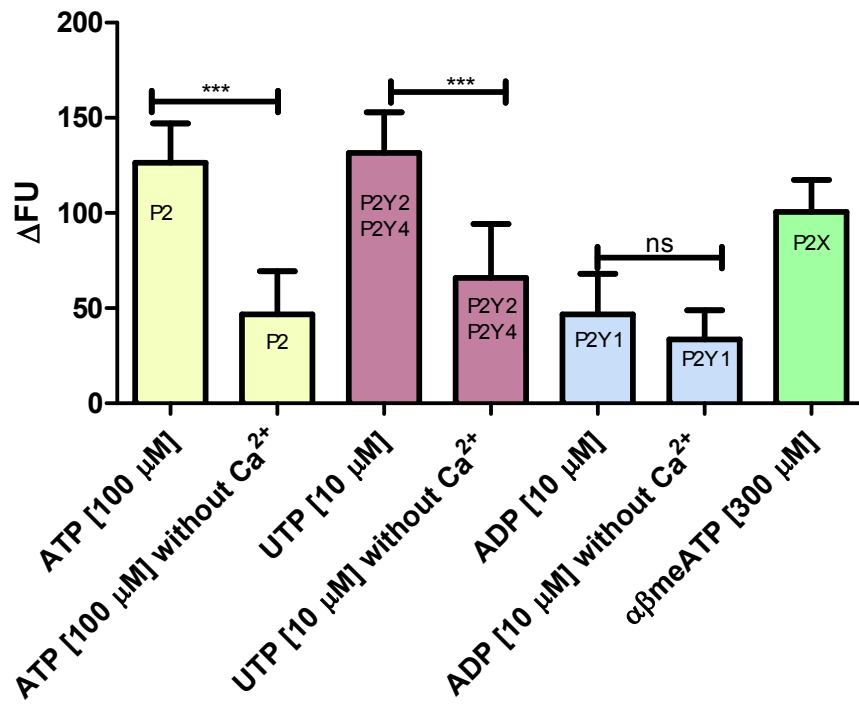


Figure 7

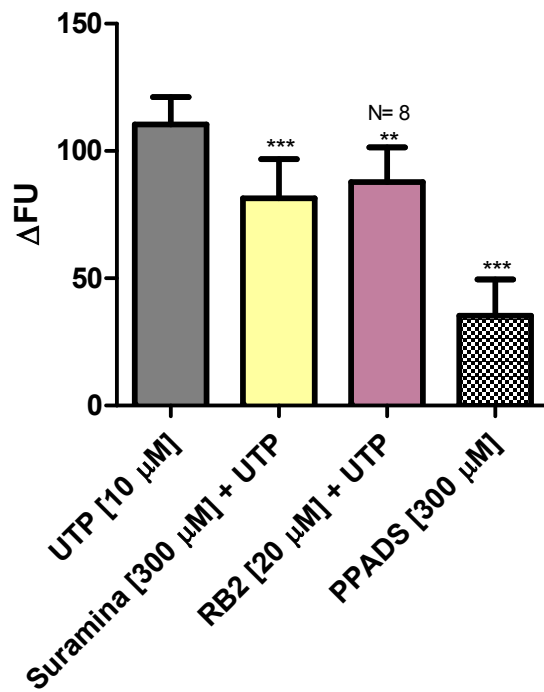


Figure 8

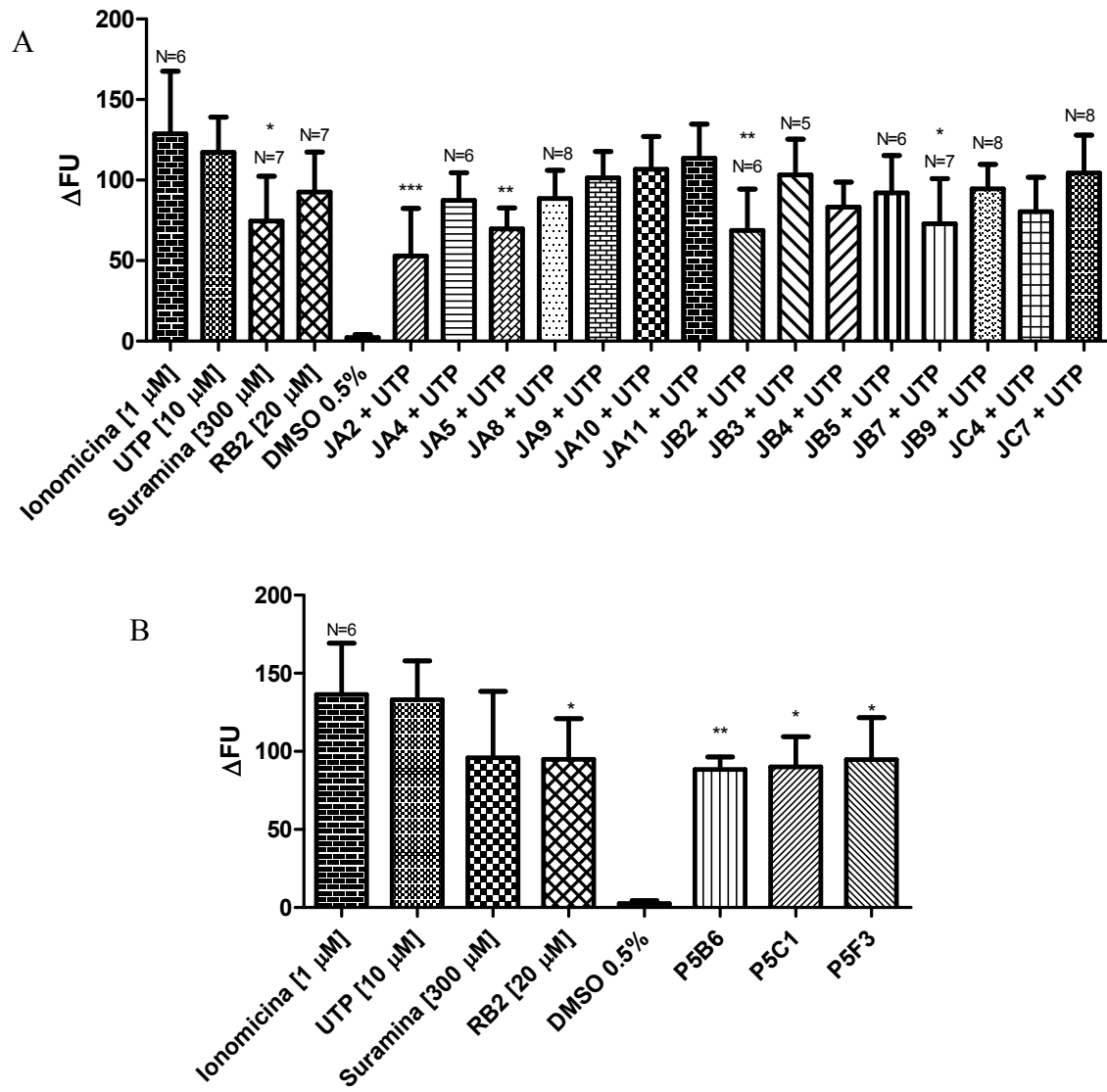
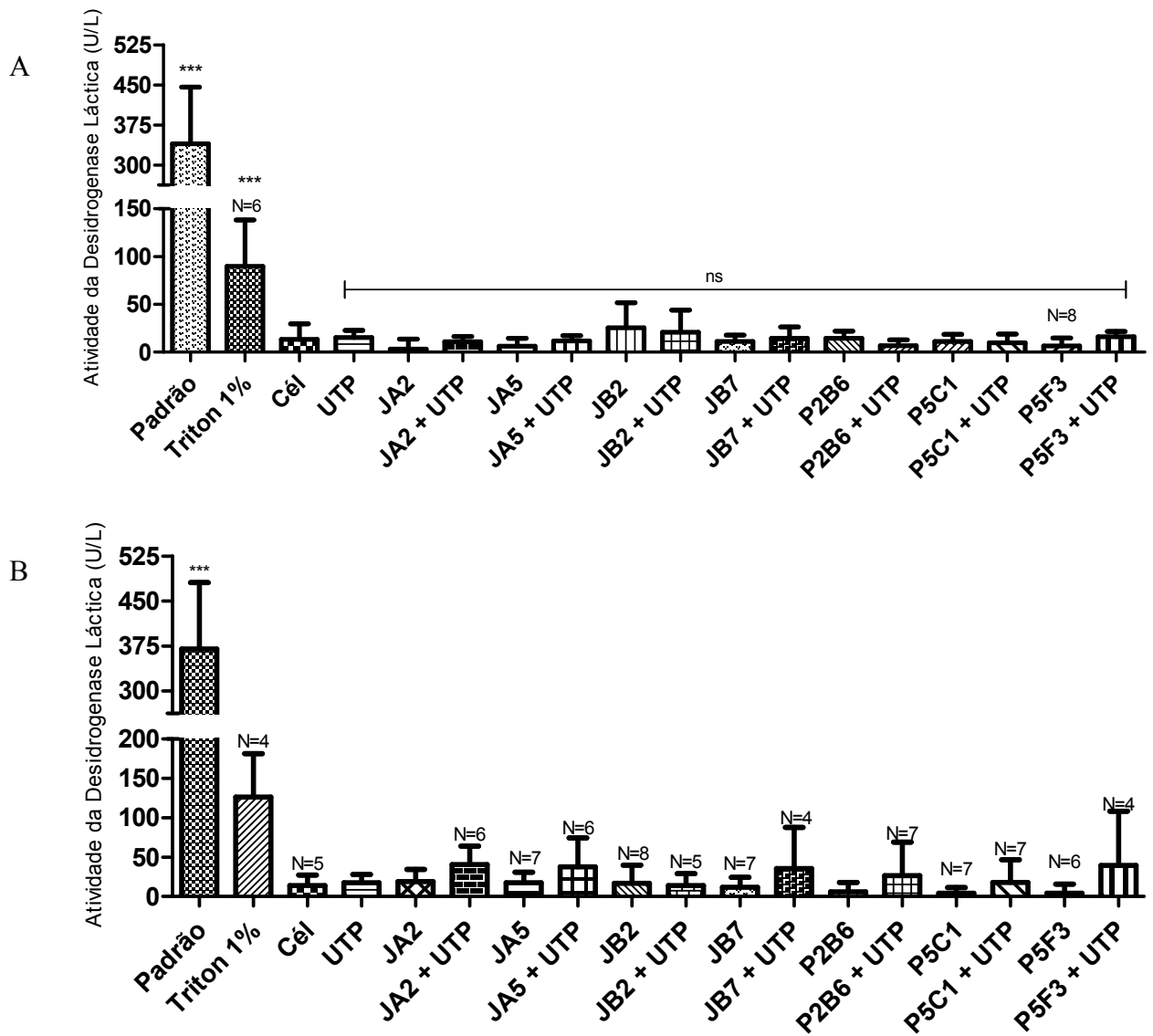


Figure 9



References

Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, Ramsey BW; TIGER-1 Investigator Study Group. Denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Mar 1;183(5):627-34.

Adrian K, Bernhard MK, Breitingner HG, Ogilvie A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jun 21;1492(1):127-38.

Azimi I, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Calcium influx: pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(4):945-60.

Buell G, Michel AD, Lewis C, Collo G, Humphrey PP, Surprenant A. P2X1 receptor activation in HL60 cells. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2659-64.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*. 2006b Mar;58(1):58-86.

Camarda V, Fischetti C, Anzellotti N, Molinari P, Ambrosio C, Kostenis E, Regoli D, Trapella C, Guerrini R, Severo S, Calo G. Pharmacological profile of NOP receptors coupled with calcium signaling via the chimeric protein $G\alpha_{q15}$. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;379(6):599-607.

Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Górecki DC, Persechini PM, Bisaggio RC, Mendes AN, Marks J, Burnstock G, Dunn PM. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2005 Feb 15;69(4):641-55.

Ghanem E, Robaye B, Leal T, Leipziger J, Van Driessche W, Beauwens R, Boeynaems JM. The role of epithelial P2Y2 and P2Y4 receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Br J Pharmacol*. 2005 Oct;146(3):364-9.

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of Fluo-4 Ca²⁺ -indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000 Feb;27(2):97-106.

Hansen KB, Bräuner-Osborne H. FLIPR[®] assays of intracellular calcium in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol*. 2009;552:269-78.

Jacob F, Pérez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal*. 2013 Sep;9(3):285-306.

Jacobson KA, Boeynaems JM. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today*. 2010 Jul;15(13-14):570-8.

Kim CH, Kim HY, Lee HS, Chang SO, Oh SH, Lee JH. P2Y4-mediated regulation of Na⁺ absorption in the Reissner's membrane of the cochlea. *J Neurosci*. 2010 Mar 10;30(10):3762-9.

Lau OC, Samarawickrama C, Skalicky SE. P2Y2 receptor agonists for the treatment of dry eye disease: a review. *Clin Ophthalmol*. 2014 Jan 30;8:327-34.

Li X, Llorente I, Brasch M. Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD calcium assay kits. *Curr Chem Genomics*. 2008 Oct 10;2:10-5.

Luo J, Zhu Y, Zhu MX, Hu H. Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. *J Vis Exp*. 2011;(54).

Marcus DC, Scofield MA. Apical P2Y4 purinergic receptor controls K⁺ secretion by vestibular dark cell epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jul;281(1):C282-9.

Maruoka H, Jayasekara MP, Barrett MO, Franklin DA, de Castro S, Kim N, Costanzi S, Harden TK, Jacobson KA. Pyrimidine Nucleotides with 4-Alkyloxyimino and Terminal Tetrphosphate δ-Ester Modifications as Selective Agonists of the P2Y 4 Receptor. *J Med Chem*. 2011 Jun 23;54(12):4018-33.

Molecular Devices. Measuring intracellular calcium with the FLIPR[®] I and FLIPR³⁸⁴ Fluorometric Imaging Plate Reader Systems. FLIPR Application Note. 2010. [acesso 08 fev 2015]. Disponível em: <http://labs.pbrc.edu/cellbiology/documents/pHBCECF.pdf>.

Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. Diquafosol ophthalmic solution for dry eye treatment. *Adv Ther*. 2012 Jul;29(7):579-89.

Namovic MT, Jarvis MF, Donnelly-Roberts D. High throughput functional assays for P2X receptors. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012; Chapter 9: Unit 9.15.

Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, Erb L, Petris MJ, Weisman GA. P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol*. 2010 Jun;41(2-3):356-66.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998 Sep;50(3):413-92.

Sakaki H, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PLoS One*. 2013;8(4):e59778.

Tackett BC, Sun H, Mei Y, Maynard JP, Cheruvu S, Mani A, Hernandez-Garcia A, Vigneswaran N, Karpen SJ, Thevananther S. P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Dec 1;307(11):G1073-87.

Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, Karpen SJ. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):393-402.

Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, González FA, Seye CI, Erb L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2005;31(1-3):169-83.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73.

Manuscrito em forma de revisão produzido durante o Mestrado

A High Throughput Screening Technique Based on Calcium Measurement to Search New Antagonists for P2 Receptors

Ferreira NCS¹; Alves LA¹; Soares-Bezerra RJ^{1,*}

¹Laboratory of Cellular Communication, Oswaldo Cruz Institute – Fiocruz, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: romulo@ioc.fiocruz.br;
Tel: +55-21-2562-1809; Fax: +55-21-2562-1772.

Abstract

P2 purinergic receptors have been related to many pathophysiological conditions, which turns them as an important therapeutic targets. Actually, many research groups and pharmaceutical companies are joint effort to looking for a specific molecule for each receptor subtype, which could be useful as new medicines in the “purinergic treatment” of some diseases. In this context, the screening field has grown to attempt this necessity, but the need for high throughput (HTS) assays implementations to agilize the actual screening methods remains necessary. In this sense, calcium indicators show to be a promising tool, since they can be useful for P2 receptors because they are associated with signaling pathways of increase of intracellular calcium. In this work, we will discuss about the applicability of these dyes in the HTS context for the screening of new molecules with activity on the P2 receptors.

Keywords: Calcium dyes, P2R, HTS, agonists, antagonists.

Abbreviations:

cAMP: cyclic Adenosine Monophosphate;

PLC: Phospholipase C;

AC: Adenylyl cyclase.

Introduction

1. Purinergic Receptors

The history of purinergic signaling began at the end of the XIX century, with the discovery of the major purines (adenosine and xanthine) and pyrimidines (thymine, cytosine and uracil) for Ludwing Kossel [1]. Later, with the structure determination of nucleosides and nucleotides by Levene [2], several research groups have been dedicated to study its expression in humans and their biological effects. Thus, in 1929, Drury and Szent-Györgyi demonstrated in their work that adenosine and adenosine 5'-monophosphate (AMP), obtained from the cardiac muscle, could promote biological effects which include arterial dilation and blood pressure reduction, which led to the production of Lacarnol [1,3,4]. Years later, Gillespie, in 1934, observing the structure of adenosine noted that the lack on the phosphate molecule influenced in the response type and its potency, which resulted in the hypothesis that there were different types of receptors [1,3,5]. Another important finding which demonstrates the therapeutic potential associated with purinergic signaling was the discovery of the role of ATP in the neurotransmission, acting as a neurotransmitter or co-transmitter by Holton and Holton in 1953 [3].

Actually, it is known that the extracellular purines and pyrimidines are important signaling molecules in many biological processes such as: immune response, neurotransmission, smooth muscle contraction, inflammation, pain, and others. They act via membrane surface receptors known as purinergic receptors [3].

The purinergic receptors are expressed in protists, invertebrates and vertebrates, wherein they are present in virtually all tissues of mammals [3,6]. In humans, there are already known 19 subtypes of purinergic receptors, which are organized in two classes: P1 receptors, which have adenosine as a main ligand, and P2 receptors, which are activated by nucleotides, as shown in Figure 1. The P1 receptors are associated with Gs/i protein and thus, act on the protein-effector adenylyl cyclase, activating or inhibiting the formation of cAMP. P1 receptor type exhibits four subtypes: A1, A2A, A2B and A3 [3,7]. The P2 receptors are subdivided in two families: P2Y and P2X according to the pharmacological response presented [3,8].

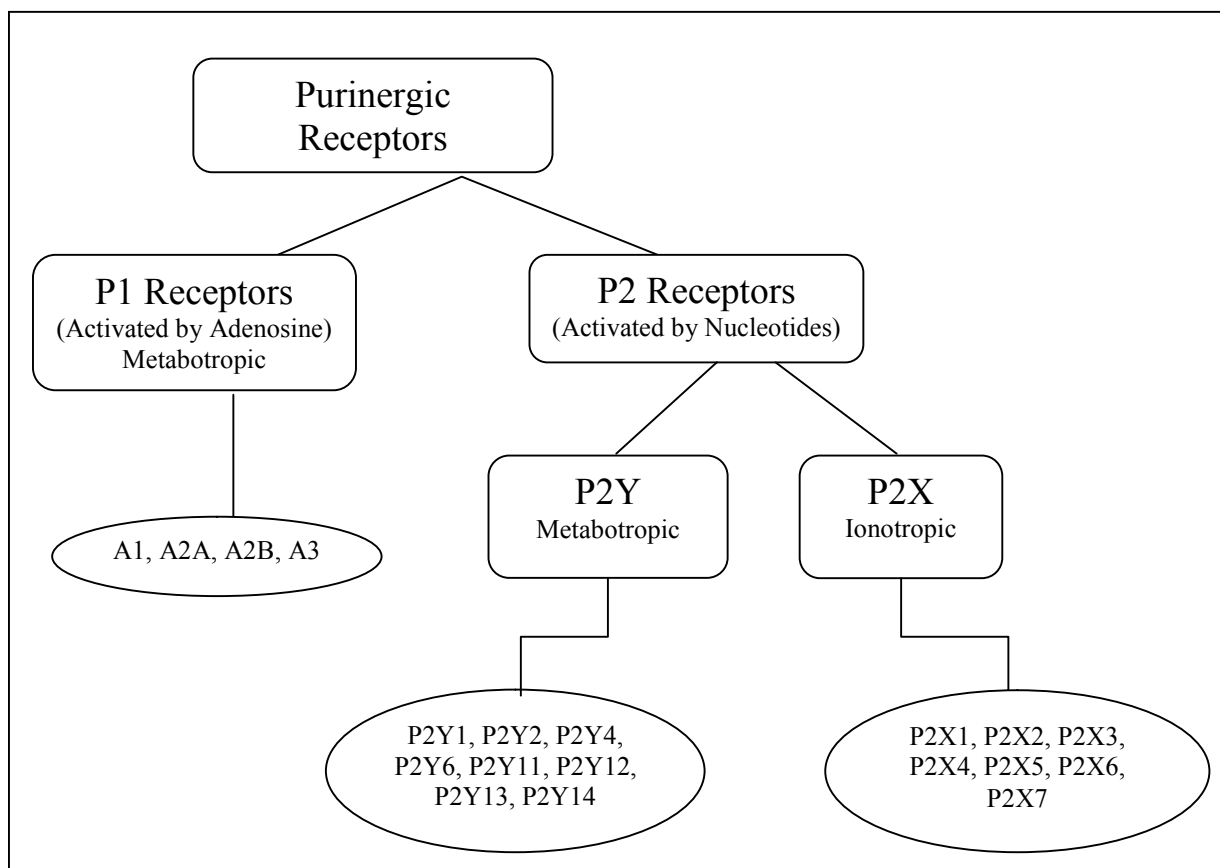


Figure 1: Classification of Purinergeric Receptors. The Purinergeric Receptors are divided in two classes: P1 and P2 receptors. The P1 receptors have four subtypes, while P2 receptors are subdivided in two families: P2Y and P2X. P2Y receptors have eight subtypes, while P2X have seven subtypes.

The P2X receptors are ionotropic cation non-selective ion channels, activated by ligands, which allow rapid influx of Ca^{2+} and Na^{+} and K^{+} efflux, in the range of 10 ms. Presently, seven subtypes for this receptors are already described: P2X1-7. However the P2X7R has the characteristic of forming a membrane pore, that allows the passage of molecules with high molecular weight (up to 900 Da) when activated by high concentrations of its mainly physiological agonist: the ATP [3,7,8]. It has been described in the literature that other subtypes of P2X receptors, as, i.e., the P2X2 and P2X4, also demonstrate the capacity to form a membrane pore similar to P2X7, although the mechanism that leads to the membrane pore origin remains unclear [9,10]. Some authors believe that the membrane pore origin is related to the dilation of the ion channel, while others support the hypothesis of a membrane protein could be the pore membrane, which is activated by some stimulus derived from these activated receptors [11,12,13,14].

The P2Y receptors have eight subtypes: P2Y1,2,4,6,11-14. These receptors are coupled to Gs/i/q protein, and thus, require slightly more time (about 100 ms) to stimulate its biological response in comparison with the P2X, since the P2YR are related to second

messengers signaling. The effectors related to the P2YR family are the adenylyl cyclase protein and the PLC/ IP₃ system, which acts in the regulation of intracellular calcium stores as described in Table 1 [7,8,15,16].

Table 1: Effectors of the P2Y Receptors

P2Y	G protein-coupled	Effector	Effect
P2Y1	Gq	PLC	↑ [Ca ²⁺] _i
P2Y2	Gq	PLC	↑ [Ca ²⁺] _i
P2Y4	Gq	PLC	↑ [Ca ²⁺] _i
P2Y6	Gq	PLC	↑ [Ca ²⁺] _i
P2Y11	Gq	PLC	↑ [Ca ²⁺] _i
	Gs	AC	↓ cAMP
P2Y12	Gi	AC	↓ cAMP
P2Y13	Gi	AC	↓ cAMP
P2Y14	Gi	AC	↓ cAMP

As previously described, the purinergic receptors are widely expressed in all types of cells, and they are associated with many different physiological pathways. Many studies had been performed to understand the expression and the role of these receptors in different cell types, through them, much has been learned about their physiological function, as indeed their participation in some diseases, which make them promising therapeutic target, as shown in Table 2.

Table 2 – Diseases associated with Purinergic Receptors and the use of agonists and antagonists as modulators

P2X Receptors			
Subtype	Diseases	Ligand associated with therapy	References
P2X1	Endotexemia	Agonist	[17]
	Disorders of the urinary tract	Agonist	[18]
	Male fertility	Antagonist	[19]
P2X2	Progressive hearing loss	Agonist	[20]
	Male fertility	Agonist	[21]
	Head and neck cancer pain	Antagonist	[22]
P2X3	Pain	Antagonist	[23-26]
P2X4	Neurophatic pain	Antagonist	[27-29]
	Tolerance to opioids	Antagonist	[30]
	Duchenne Muscular Dystrophy	Antagonist	[31,32]
	Heart Failure	Agonist	[33]
	Joint inflammation	Antagonist	[34]
P2X5	Remission of Acute Myeloid Leukemia	Agonist	[35,36]
P2X6	*	-	-
P2X7	Neurodegenerative diseases	Antagonist	[37-44]
	Nociception	Antagonist	[45]
	Inflammation	Antagonist	[46-53]
	Silicosis	Antagonist	[54]
	Cancer	Antagonist	[55,56]
	Hypertension	Antagonist	[57]
	Infectious diseases	Antagonist/ Agonist	[58-79]
P2Y Receptors			
Subtype	Diseases	Ligand associated with therapy	References
P2Y1	Cognitive deficit	Antagonist	[80,81]
	Nociception	Antagonist	[82]
	Platelet aggregation	Antagonist	[83-86]
	Atherosclerosis	Antagonist	[87]
	Astrocytic hyperactivity	Antagonist	[88]
P2Y2	Cystic Fibrosis	Agonist	[89]

	Dry eye disease	Agonist	[90]
	Asthma	Antagonist	[91]
	Sepsis	Antagonist	[92]
	Acute liver injury	Antagonist	[93]
	Cancer	Antagonist	[94-96]
	Neuroprotection	Agonist	[97]
P2Y4	Cardiac function	Agonist	[98]
	Alzheimer's disease	Agonist	[99]
P2Y6	Asthma	Antagonist	[100]
	Inflammatory diseases	Antagonist	[101-106]
	Neuropathic pain	Antagonist	[107]
P2Y11	Neuropathic pain	Antagonist	[107]
P2Y12	Platelet aggregation	Antagonist	[108-113]
P2Y13	Neuropathic pain	Antagonist	[114]
	Lowering cholesterol	Agonist	[115]
P2Y14	*	-	-

* The Physiological role remains unclear.

2. P2 receptors Antagonists

There are many antagonists described to these receptors, indeed the establishment of their use in a therapeutic context associated with purinergic receptors is still very difficult. The only exception is the P2Y12 receptor, which presents the Clopidogrel and Ticagrelor drugs that antagonize this receptor and inhibit platelet aggregation [108-113]. This occurs because the existing antagonist molecules have low selectivity for a specific receptor subtype. In this context, numerous screenings were held and currently some selective antagonists for these receptors are known. However, the therapeutic applicability of these selective molecules is not established yet, although several compounds are undergoing clinical and preclinical studies, which turns the therapy associated with purinergic receptors even more promising [15,16].

In this scenario, the search for new molecules with antagonist activity on the purinergic receptors is very important to achieve the therapeutic application of drugs that act on these receptors and thus, reinforce the purinergic therapy.

3. Natural Products: a source of drug discovery for P2 Receptors?

The use of natural products in the treatment of some diseases has been a medicinal practice for thousand years, thus constituting the basis of traditional medicines known throughout the world. Some medical practices, like the Traditional Chinese Medicine and the Japanese Medicine, in Asia, as well as, Alternative Medicine in America are some examples of this applicability [116-118].

The knowledgement about the medicinal use of these plants was orally transmitted over the centuries. In 1805, it was isolated the first pure form of a natural compound with pharmacological activity: morphine. Thereafter, several other molecules were discovered and used in therapy, such as salicin, digitoxin, quinine and pilocarpine, for example [118-120].

However, with the advancement of Synthetic Chemistry, studies with natural products stagnated due to the dogma that medicinal plants would not present scientific value. But at the end of XX century after numerous financial wastage and failures with trials and studies of chemically derived molecules, studies with natural products were returned specially due to its recognition as a primary and unique source that present a diversity of molecular structures, which were achieved during millions years of biological evolution and natural selection [121].

Currently, natural products are an important source of new drugs, since 25% of the most sold drugs worldwide are natural products or its synthetic derivatives [116]. These drugs are used to treat various diseases that afflict humanity. Among some of these diseases are inflammatory, parasitic, neurological, cardiovascular, metabolic, oncology and pain-related [122]. In the field of treatment of chronic inflammations, one of the major problems of the current therapy is the different classes of drugs with several side effects, what many authors report that a possible solution to this challenge could be the development of drugs from natural origin [123].

Natural products are obtained not only from plants, but also from fungi, marine organisms, insects and bacteria. In terms of biodiversity, Bohlin et al. 2010 [124] described in their work that the number of plants is estimated at more than 300,000 species, in addition to more than 2,000,000 species of fungi, insects and marine organisms, not even including the species of bacteria, which shows the biggest chemical and biological biodiversity in the world. The authors also cited that extracts of organisms can be randomly selected and screened for a particular activity. In this context, some research groups have already reported the agonist or antagonist activity of natural products on purinergic receptors, which may increase the

possibility of their clinical application as medicines acting on the other subtypes of purinergic receptors [125].

Although, due to the high biological richness, which presents a great demand of samples for testing, it is necessary the existence of techniques that are able to solve the problem of screening of these samples, from which only 10 to 15% are exploited for therapeutic use. In addition, some screening process spends time and can lead very months for implementation. Therefore, the development of new screening techniques should focus on a specific molecular target, as well as allow the analysis of samples quickly and efficiently, characteristics related to the High Throughput Screening (HTS) assays [117,122,123].

4. Calcium measurement as a technique for the discovery of new antagonists for Purinergic Receptors

Calcium is an important second messenger, since it is involved in almost all cellular functions and reactions, and calcium measurement experiments are performed in a variety of studies and experimental conditions [126,127]. In the context of purinergic receptors, assays measuring intracellular calcium may be useful for the discovery of antagonists of the P2X receptors and some P2YR subtypes.

The P2X receptors are cation non-selective ion channels activated by ligands and once activated, they promote an influx of Na^+ and Ca^{2+} ions and a K^+ efflux, according to the concentration gradient, as shown in Figure 2. Therefore, after the activation of P2X receptors, the intracellular calcium concentration tends to increase due to the occurrence of these signaling pathway [3,7,8,128]. Differently, the activation of Gq-protein coupled receptors, such as receptors P2Y1, 2, 4, 6 and 11, may also lead to an increase in intracellular calcium concentration through another signaling pathway [3,7,129]. The activation of Gq-protein coupled receptors stimulate phospholipase C, which leads to an increase in inositol triphosphate that acts on its receptor (IP3R) present in the membrane of the endoplasmic reticulum, leading to a release of the stored calcium into the cytosol, thereby triggering an increase in intracellular calcium concentration, as shown in Figure 3 [3,7,129]. The P2Y11 receptor may also lead to an increase in intracellular calcium concentration, or through the calcium release mechanism stocks, such as the P2YR Gq-protein coupled receptors, or even to promote calcium influx by activating of another calcium receptors in the cell membrane [3,7,129,130]. The activation of these receptors can also modulate the activation of ryanodine

receptor channels and voltage operated calcium channels, in a process that is known as Ca^{2+} - induced Ca^{2+} release [131,132].

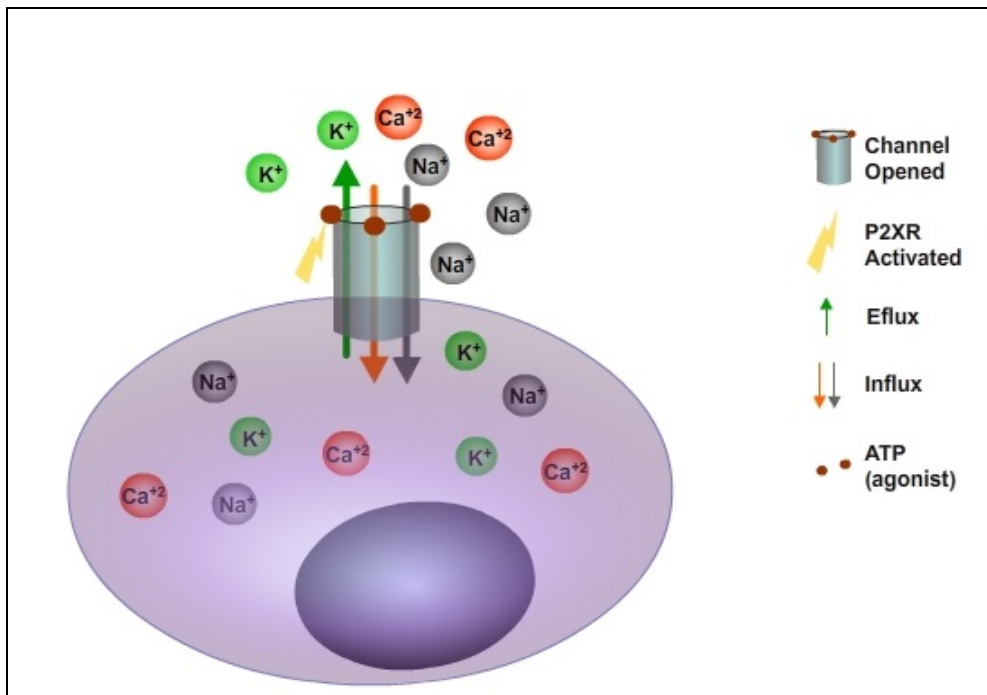


Figure 2: Mechanism of P2X receptors of increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$. P2X receptors activated form a cation non-selective ion channel, that promote an influx of Ca^{2+} , leading an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

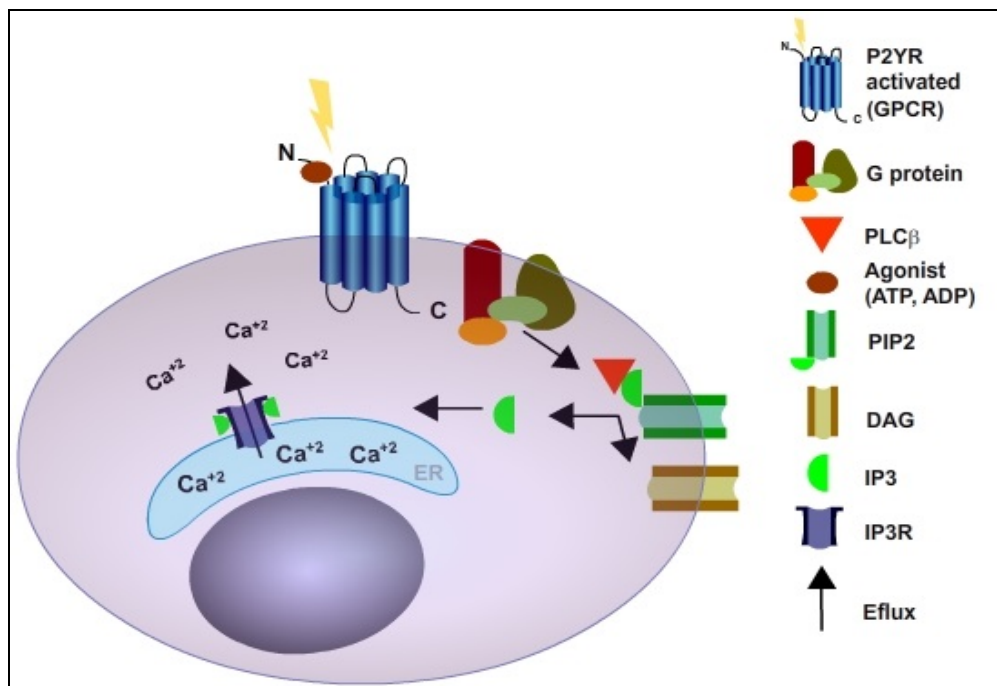


Figure 3: Mechanism of P2Y receptors of increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The P2Y receptors are coupled to G protein. Once activated, they activate the G protein coupled to them, which activated the Phospholipase C- β (PLC- β). The PLC- β hydrolyzes the Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

(PIP₂) into Diacylglycerol (DAG), that activate protein kinase C and Inositol-3-phosphate (IP₃), that activate its receptor present in the Endoplasmic Reticulum (ER), which promote an efflux of Ca²⁺, leading an increase of [Ca²⁺]_i.

Thereby, taking advantage on this P2 receptors' property, the measurement of intracellular calcium may contribute significantly for the screening of compounds with possible agonist or antagonist activity for these receptors.

There are several methods to measure the intracellular calcium concentration, among them are: **the measurement through microelectrodes selective for calcium**, which only detect the increasing calcium response in a range of seconds, thus failing in detecting faster response and transients; **measuring through the dyes of azo-bis metallochromic calcium dyes arsenazo III and antipilazo III**, which absorb light in a very specific calcium dependent manner, but with the disadvantage of being impermeable to cell membranes and it is introduced into the cell through microinjection; **measuring by photoproteins activated by calcium**, such as aequorin, although one of the biggest problems related to this approach is to insert the photoprotein into the cell, which is only possible by microinjection and in large cells only, but these recombinant photoprotein can be induced through the transfection technique [126]. Among all these methodologies, there is a methodology that improved the scenario of measurement of calcium, and is the most common and used today: the measurement of calcium from fluorescent indicators derived from calcium chelators EGTA and BAPTA [126].

This new generation of fluorescent calcium indicators has several advantages like: high affinity for Ca²⁺ and low affinity for Mg²⁺ or H⁺ and high absorbance after binding to Ca²⁺. Although these dyes are charged and they cannot pass across the membrane lipid bilayer. These indicators are associated with lipophilic groups like acetoximethyl (AM) that allow a quick and easy loading of a large number of cells instead of the most unusual load such as, for example, microinjection, electroporation or transfection, which present numerous disadvantages, including decreased in the cell viability and technical skills [126]. Thus, once inside the cytosol, the cytoplasmic esterases enzymes remove the lipophilic groups associated with them, then the indicator become trapped into the cell [126]. In some cell types, the loading of the indicator may be removed from the cytosol to the extracellular solution by organic anion transporters expressed on the plasma membrane, which is usually minimized by the addition of probenecid, a non-specific anion transport inhibitor, in the loading solution to prevent this loss [133]. Despite of the advantage on the permeability, a possible disadvantage of this method is the diffusion of the dye for some organelles such as mitochondria and

endoplasmic reticulum, thereby providing a false-positive effect to the intracellular calcium concentration [126].

The fluorescent calcium indicators based on EGTA and BAPTA are also classified in two groups: ratiometric indicators and non-ratiometric indicators. Ratiometric indicators have two wavelengths, one for the intracellular indicators and another for the extracellular forms, and have the advantage that the free and bounded forms present distinct peaks at different wavelengths and the results of these evaluations are combined in a ratio [126]. These ratiometric indicators are used for quantitative measurements and an example of the most famous dye is Fura-2AM [126,134]. There to, the measurement of intracellular calcium with the non-ratiometric indicators are based on the intensity of fluorescent light emitted. They present a little fluorescence in low concentrations of Ca^{2+} , but this fluorescence increases up to 100 times when $[\text{Ca}^{2+}]$ rises, which can make the indicator saturated with Ca^{2+} [126,134]. Despite this, these non-ratiometric indicators present a dynamic range, i.e. the difference between the intensity of indicator associated with Ca^{2+} and free indicator, generally higher than the ratiometric range, making it easier to detect modest changes in calcium levels. Fluo-3AM and Fluo-4AM are among in the most popular examples of non-ratiometric indicators. [126,134].

The ratiometric and non-ratiometric indicators are excited in the ultraviolet and in visible light spectrum, respectively [135]. The ratiometric are excited by UV light and are still used today for quantitative measurement of Ca^{2+} . One problem with this is that UV radiation is more cytotoxic than other wavelengths and may still induce the emission of cellular constituents that are excited by this wavelength, which may cause some interference on accurate assessment of the $[\text{Ca}^{2+}]$ [135]. Therefore, calcium indicators excited by visible light have the advantages of having an emission wavelength that cell autofluorescence and background and are lower, and the lower cytotoxicity compared with that promoted by ultraviolet excitation [135].

Monitoring of the fluorescence signal of the calcium indicators using confocal fluorescent microscope or fluorometer can be used to assess the activity of compounds that act on metabotropic receptors. Nonetheless, calcium assays employing these devices are not applicable for implementing screening of large numbers of samples due to the labor intensive, since a single sample can be processed at a time [136]. In order to solve this problem, specialized instruments have been developed for the processing of many samples quickly and efficiently. They function as an excellent tool for the screening of a large number of samples,

for example, a library of natural products that need to be tested using assays based on fluorescence cell, including calcium mobilization promoted by metabotropic receptors [136].

Thus, these fluorescent calcium indicators, may be associated with testing platforms for HTS, and thereby be useful for the evaluation of molecules with activity of the purinergic receptors. An example of equipment used for high-performance screening of active compounds on molecular targets that act on calcium mobilization is FlexStation System [137].

The FlexStation is a plate reader manufactured by Molecular Devices company. It acts as a platform that integrates the functions of addition of reagents in the cell assay plate using an automated pipetting system and detection of the fluorescence signal occurs in real time. Thus, the equipment adds the desired reagents in a column at a time and monitors fluorescence in bottom read mode, before, during and after the addition of them [138,139]. This property is important for calcium assays because the response of the ion mobilization is time sensitive and can be observed between 10 to 30 seconds after metabotropic receptors activation as shown in Figure 4 [140]. Besides these advantages, the user can set various parameters to optimize your test, such as: use of 96 or 384 well plates, the reading time, the time and the speed at which the reagents are added, the number of additions reagents, selection of the tips and wells to be read, among others. The FlexStation can still be integrated into a variety of robotic systems to the realization of new functions [138,139].

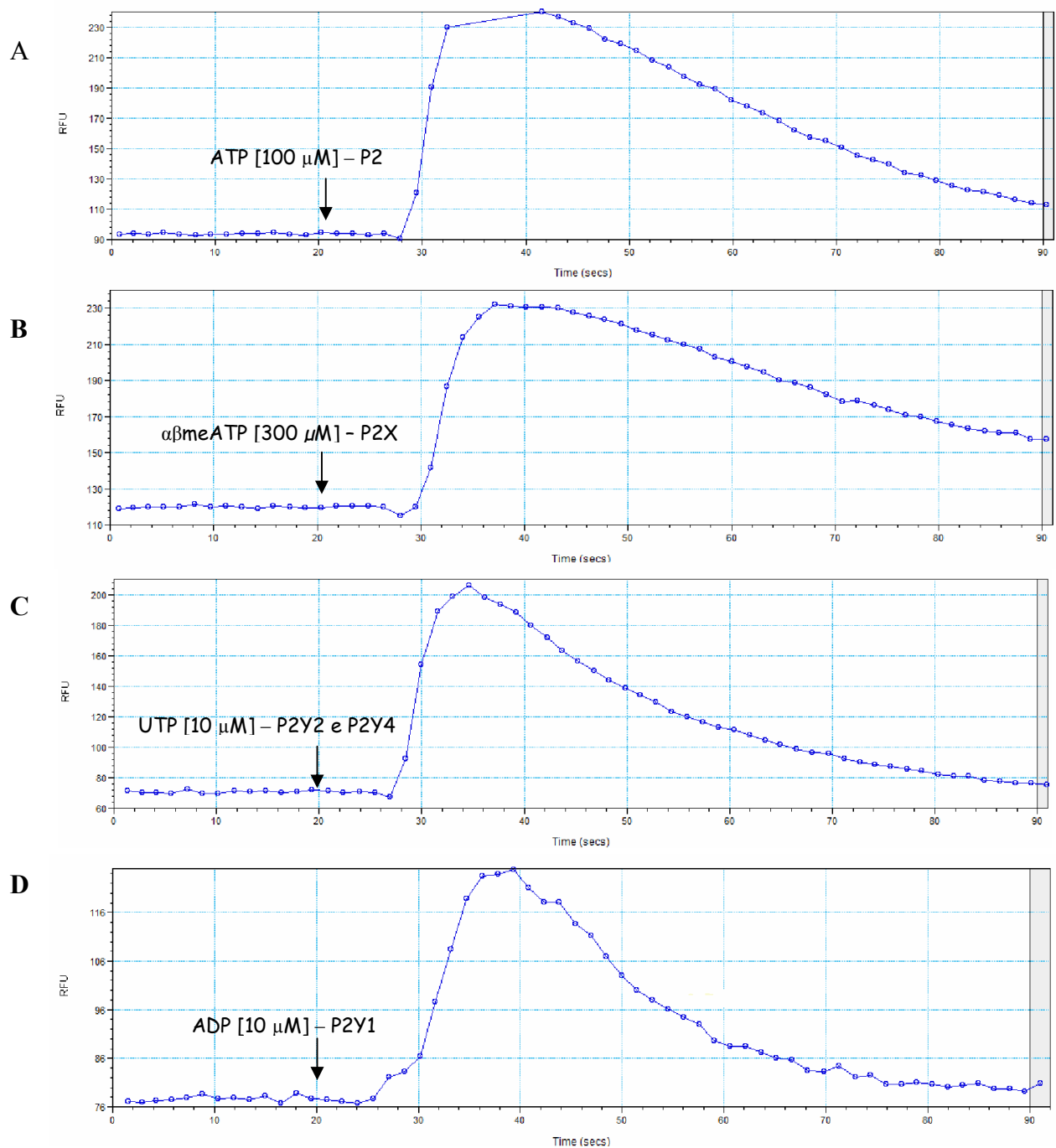


Figure 4: Original registers from calcium signal promoted by P2 agonists. Cells stained with Fluo-4AM [2 μ M] were stimulated with ATP [100 μ M] (A), $\alpha\beta$ meATP [300 μ M] (B), UTP [10 μ M] (C) and ADP [10 μ M] (D) in the time of 20 seconds as demonstrated by the arrows, were monitored for 90 seconds in FlexStation III. Representative images from three independent experiments.

Furthermore, it has been demonstrated that the FlexStation is capable of screening compounds in a safe and reproducible way [137]. Thus, the screening of compounds acting on P2 receptors can be achieved in this platform through intracellular calcium mobilization assays using calcium indicators such as Fluo-4, which has been widely used in high-

throughput screening field for discovery of active molecules on metabotropic receptors and other molecular targets that result in calcium mobilization [133].

5. Conclusions

P2 purinergic receptors play roles in many biological systems, according to their widely expression in mammals [3,6]. They are associated with many diseases and agonists or antagonists for these receptors could be useful as a medicine to treat them [17-115]. However, the lack of ligands that can be used in humans, difficulties the purinergic therapy. Thereby, the search for new compounds with activity on P2 receptors has been advancing, although actually, only the P2Y₁₂ subtype has ligands been applicable as a medicine in humans [108-113]. In this context, natural products can be studied in order to discover compounds with this desired activity, since they are an important source for the development of medicines [116-121]. But, the screening of new compounds is a labourious work, and therefore the use of high-throughput assays could make it easier [122-123]. Thus, using the property from some P2 receptors, which promotes an increase of intracellular calcium when activated, it can be used as a tool for the screening and discovery of new compounds with antagonist activity on these receptors.

References

1. Burnstock, G.; Verkhratsky, A. Early history of purinergic signalling. Purinergic signalling and the Nervous System. Springer Berlin Heidelberg: 2012, pp 7-66.
2. Levene, P.A.; Tipson, R.S. The ring structure of adenosine. Science. 1931 Nov 20;74(1925):521.
3. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev. 1998 Sep;50(3):413-92.
4. Drury, A.N.; Szent-Györgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J Physiol. 1929 Nov 25;68(3): 213-37.
5. Gillespie, J.H. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. J. Physiol. 1934 Feb 28;80(4):345-59.
6. Kaczmarek-Hájek, K.; Lőrinczi, E.; Hausmann, R.; Nicke, A. Molecular and functional properties of P2X receptors – Recent progress and persisting challenges. Purinergic Signal. 2012 Sep;8(3):375-417.
7. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. Rang & Dale Pharmacology. Elsevier: Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011; Chapters 2-4, pp. 6-65.

8. Coddou, C.; Yan, Z.; Obsil, T.; Huidobro-Toro, J.P.; Stojilkovic, S.S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev.* 2011 Sep;63(3):641-83.
9. Chaumont, S.; Khakh, B.S. Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Aug 19;105(33):12063-8.
10. Bernier, L.P.; Ase, A.R.; Boué-Grabot, E.; Séguéla, P. P2X4 receptor channels form large noncytolytic pores in resting and activated microglia. *Glia.* 2012 May;60(5):728-37.
11. Pelegrín, P. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol.* 2011 Jul;163(5):908-11.
12. Pelegrín, P.; Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 2006 Nov 1;25(21):5071-82.
13. Faria, R.X.; De Farias, F.P.; Alves, L.A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Feb;288(2):C260-71.
14. Liang, L.; Schwiebert, E.M. Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?" *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Feb;288(2):C240-2.
15. Jacobson, K.A.; Boeynaems, J.M. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today.* 2010 Jul;15(13-14):570-8.
16. von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 2006 Jun;110(3):415-32.
17. Lecut, C.; Faccinetto, C.; Delierneux, C.; van Oerle, R.; Spronk, H.M.; Evans, R.J.; El Benna, J.; Bours, V.; Oury, C. ATP-gated P2X1 ion channels protect against endotoxemia by dampening neutrophil activation. *J Thromb Haemost.* 2012 Mar;10(3):453-65.
18. Ford, A.P.; Cockayne, D.A. ATP and P2X Purinoceptors in urinary tract disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):485-526.
19. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):86-9.
20. Yan, D.; Zhu, Y.; Walsh, T.; Xie, D.; Yuan, H.; Sirmaci, A.; Fujikawa, T.; Wong, A.C.; Loh, T.L.; Du, L.; Grati, M.; Vlajkovic, S.M.; Blanton, S.; Ryan, A.F.; Chen, Z.Y.; Thorne, P.R.; Kachar, B.; Tekin, M.; Zhao, H.B.; Housley, G.D.; King, M.C.; Liu, X.Z. Mutation of the ATP-gated P2X2 receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Feb 5;110(6):2228-33.
21. Navarro, B.; Miki, K.; Clapham, D.E. ATP-activated P2X2 current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Aug 23;108(34):14342-7.
22. Ye Y, Ono K, Bernabé DG, Viet CT, Pickering V, Dolan JC, Hardt M, Ford AP, Schmidt BL. Adenosine triphosphate drives head and neck cancer pain through P2X2/3 heterotrimers. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Jun 5;2:62.
23. Burnstock, G. Targeting the visceral purinergic system for pain control. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Feb;12(1):80-6.
24. Fabbretti, E.; Nistri, A. Regulation of P2X3 receptor structure and function. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012 Sep;11(6):687-98.
25. Liu M, Yang H, Fang D, Yang JJ, Cai J, Wan Y, Chui DH, Han JS, Xing GG. Upregulation of P2X3 receptors by neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in dorsal

- root ganglions contributes to the bone cancer pain in rats. *Pain*. 2013 Sep;154(9):1551-68.
26. Wu JX, Xu MY, Miao XR, Lu ZJ, Yuan XM, Li XQ, Yu WF. Functional up-regulation of P2X3 receptors in dorsal root ganglion in a rat model of bone cancer pain. *Eur J Pain*. 2012 Nov;16(10):1378-88.
 27. Toulme, E.; Tsuda, M.; Khakh, B.S.; Inoue, K. On the role of ATP-gated P2X receptors in acute, inflammatory and neuropathic pain. In: *Translational pain research: from mouse to man*; Kruger, L.; Light, A.R., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL: USA, 2010, Chapter 10.
 28. Inoue, K.; Tsuda, M.; Koizumi, S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the Central Nervous System: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J Pharmacol Sci*. 2004 Feb;94(2):112-4.
 29. Nagata, K.; Imai, T.; Yamashita, T.; Tsuda, M.; Tozaki-Saitoh, H.; Inoue, K. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain*. 2009 Apr 23;5:20.
 30. Horvath, R.J.; Romero-Sandoval, E.A.; De Leo, J.A. Inhibition of microglial P2X4 receptors attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and μ opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2. *Pain*. 2010 Sep;150(3):401-13.
 31. Yeung, D.; Kharidia, R.; Brown, S.C.; Górecki, D.C. Enhanced expression of the P2X4 receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis*. 2004;15(2):212-20.
 32. Yeung, D.; Zablocki, K.; Lien, C.F.; Jiang, T.; Arkle, S.; Brutkowski, W.; Brown, J.; Lochmuller, H.; Simon, J.; Barnard, E.A.; Górecki, D.C. Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophic mdx mouse muscle cells. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):610-20.
 33. Yang T, Shen JB, Yang R, Redden J, Dodge-Kafka K, Grady J, Jacobson KA, Liang BT. Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2014 May;7(3):510-8.
 34. Li F, Guo N, Ma Y, Ning B, Wang Y, Kou L. Inhibition of P2X4 suppresses joint inflammation and damage in collagen-induced arthritis. *Inflammation*. 2014 Feb;37(1):146-53.
 35. Overes, I.M.; Fredrix, H.; Kester, M.G.; Falkenburg, J.H.; van der Voort, R.; de Witte, T.M.; Dolstra, H. Efficient activation of LHRH-1-specific CD8⁺ T-cell responses from transplanted leukemia patients by stimulation with P2X5 mRNA-electroporated dendritic cells. *J Immunother*. 2009 Jul-Aug;32(6):539-51.
 36. de Rijke, B.; van Horsen-Zoetbrood, A.; Beekman, J.M.; Otterud, B.; Maas, F.; Woestenenk, R.; Kester, M.; Leppert, M.; Schattenberg, A.V.; de Witte, T.; van de Wiel-van Kemenade, E.; Dolstra, H. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3506-16.
 37. Ni, J.; Wang, P.; Zhang, J.; Chen, W.; Gu, L. Silencing of the P2X7 receptor enhances amyloid- β phagocytosis by microglia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 3;434(2):363-9.
 38. Apolloni, S.; Amadio, S.; Montilli, C.; Volonté, C.; D'Ambrosi, N. Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2013 Oct 15;22(20):4102-16.
 39. Niyadurupola, N.; Sidaway, P.; Ma, N.; Rhodes, J.D.; Broadway, D.C.; Sanderson, J. P2X7 receptor activation mediates retinal ganglion cell death in a human retina model

- of ischemic neurodegeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Mar 1;54(3):2163-70.
40. Kakurai, K.; Sugiyama, T.; Kurimoto, T.; Oku, H.; Ikeda, T. Involvement of P2X7 receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats. *Neurosci Lett.* 2013 Feb 8;534:237-41.
 41. Arbeloa, J.; Pérez-Samartín, A.; Gottlieb, M.; Matute, C. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis.* 2012 Mar;45(3):954-61.
 42. Young, C.N.; Brutkowski, W.; Lien, C.F.; Arkle, S.; Lochmüller, H.; Zablocki, K.; Górecki, D.C. P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: relationship to pathology and potential target for treatment. *J Cell Mol Med.* 2012 May;16(5): 1026-37.
 43. McGaraughty, S.; Chu, K.L.; Namovic, M.T.; Donnelly-Roberts, D.L.; Harris, R.R.; Zhang, X.F.; Shieh, C.C.; Wismer, C.T.; Zhu, C.Z.; Gauvin, D.M.; Fabiyi, A.C.; Honore, P.; Gregg, R.J.; Kort, M.E.; Nelson, D.W.; Carroll, W.A.; Marsh, K.; Faltynek, C.R.; Jarvis, M.F. P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience.* 2007 Jun 8;146(4):1817-28.
 44. Sperlágh B, Illes P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Oct;35(10):537-47.
 45. Donnelly-Roberts, D.L.; Jarvis, M.F. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol.* 2007 Jul;151(5):571-9.
 46. Solini, A.; Menini, S.; Rossi, C.; Ricci, C.; Santini, E.; Blasetti Fantauzzi, C.; Iacobini, C.; Pugliese, G. The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high fat diet: possible role of NLRP3 inflammasome activation. *J Pathol.* 2013 Nov;231(3):342-53.
 47. Baldini, C.; Rossi, C.; Ferro, F.; Santini, E.; Seccia, V.; Donati, V.; Solini, A. The P2X7 receptor–inflammasome complex has a role in modulating the inflammatory response in primary Sjögren’s syndrome. *J Intern Med.* 2013 Nov;274(5):480-9.
 48. Lister, M.F.; Sharkey, J.; Sawatzky, D.A.; Hodgkiss, J.P.; Davidson, D.J.; Rossi, A.G.; Finlayson, K. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond).* 2007 Mar 16;4: 5.
 49. Lucattelli, M.; Cicko, S.; Müller, T.; Lommatzsch, M.; De Cunto, G.; Cardini, S.; Sundas, W.; Grimm, M.; Zeiser, R.; Dürk, T.; Zissel, G.; Sorichter, S.; Ferrari, D.; Di Virgilio, F.; Virchow, J.C.; Lungarella, G.; Idzko, M. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Mar;44(3):423-9.
 50. Riteau, N.; Gasse, P.; Fauconnier, L.; Gombault, A.; Couegnat, M.; Fick, L.; Kanellopoulos, J.; Quesniaux, V.F.; Marchand-Adam, S.; Crestani, B.; Ryffel, B.; Couillin, I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):774-83.
 51. Kurashima, Y.; Amiya, T.; Nochi, T.; Fujisawa, K.; Haraguchi, T.; Iba, H.; Tsutsui, H.; Sato, S.; Nakajima, S.; Iijima, H.; Kubo, M.; Kunisawa, J.; Kiyono, H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun.* 2012;3:1034.
 52. Zhao J, Wang H, Dai C, Wang H, Zhang H, Huang Y, Wang S, Gaskin F, Yang N, Fu SM. P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway. *Arthritis Rheum.* 2013 Dec;65(12):3176-85.
 53. Zhang Y, Yuan F, Cao X, Zhai Z, GangHuang, Du X, Wang Y, Zhang J, Huang Y, Zhao J, Hou W. P2X7 receptor blockade protects against cisplatin-induced

- nephrotoxicity in mice by decreasing the activities of inflammasome components, oxidative stress and caspase-3. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 Oct 12;281(1):1-10.
54. Monção-Ribeiro LC, Faffe DS, Santana PT, Vieira FS, da Graça CL, Marques-da-Silva C, Machado MN, Caruso-Neves C, Zin WA, Borojevic R, Takiya CM, Coutinho-Silva R. P2X7 receptor modulates inflammatory and functional pulmonary changes induced by silica. *PLoS One.* 2014 Oct 13;9(10):e110185.
 55. Solini, A.; Cuccato, S.; Ferrari, D.; Santini, E.; Gulinelli, S.; Callegari, M.G.; Dardano, A.; Faviana, P.; Madec, S.; Di Virgilio, F.; Monzani, F. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology.* 2008 Jan;149(1):389-96.
 56. Raffaghello, L.; Chiozzi, P.; Falzoni, S.; Di Virgilio, F.; Pistoia, V. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P -dependent mechanism. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):907-14.
 57. Ji, X.; Naito, Y.; Weng, H.; Endo, K.; Ma, X.; Iwai, N. P2X₇ deficiency attenuates hypertension and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Oct 15;303(8):F1207-15.
 58. Coutinho-Silva, R.; Perfettini, J.L.; Persechini, P.M.; Dautry-Varsat, A.; Ojcius, D.M. Modulation of P2Z/P2X₇ receptor activity in macrophages infected with *Chlamydia psittaci*. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jan;280(1):C81-9.
 59. Coutinho-Silva, R.; Stahl, L.; Raymond, M.N.; Jungas, T.; Verbeke, P.; Burnstock, G.; Darville, T.; Ojcius, D.M. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X₇R-dependent Phospholipase D activation. *Immunity.* 2003 Sep;19(3):403-12.
 60. Placido, R.; Auricchio, G.; Falzoni, S.; Battistini, L.; Colizzi, V.; Brunetti, E.; Di Virgilio, F.; Mancino, G. P2X₇ purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cell Immunol.* 2006 Nov;244(1):10-8.
 61. Takenouchi, T.; Iwamaru, Y.; Imamura, M.; Kato, N.; Sugama, S.; Fujita, M.; Hashimoto, M.; Sato, M.; Okada, H.; Yokoyama, T.; Mohri, S.; Kitani, H. Prion infection correlates with hypersensitivity of P2X7 nucleotide receptor in a mouse microglial cell line. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581(16):3019-26.
 62. Darville, T.; Welter-Stahl, L.; Cruz, C.; Sater, A.A.; Andrews, C.W. Jr.; Ojcius, D.M. Effect of the purinergic receptor P2X7 on chlamydia infection in cervical epithelial cells and vaginally infected mice. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3707-14.
 63. Yilmaz, O.; Yao, L.; Maeda, K.; Rose, T.M.; Lewis, E.L.; Duman, M.; Lamont, R.J.; Ojcius, D.M. ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cell Microbiol.* 2008 Apr;10(4):863-75.
 64. Zandberg, M.; van Son, W.J.; Harmsen, M.C.; Bakker, W.W. Infection of human endothelium in vitro by cytomegalovirus causes enhanced expression of purinergic receptors: a potential virus escape mechanism? *Transplantation.* 2007 Nov 27;84(10):1343-7.
 65. Biswas, D.; Qureshi, O.S.; Lee, W.Y.; Croudace, J.E.; Mura, M.; Lammas, D.A. ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol.* 2008 Jul 15;9:35.
 66. Chaves, S.P.; Torres-Santos, E.C.; Marques, C.; Figliuolo, V.R.; Persechini, P.M.; Coutinho-Silva, R.; Rossi-Bergmann, B. Modulation of P2X(7) purinergic

- receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect.* 2009 Sep;11(10-11):842-9.
67. Corrêa, G.; Marques da Silva, C.; de Abreu Moreira-Souza, A.C.; Vommaro, R.C.; Coutinho-Silva, R. Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect.* 2010 Jun;12(6):497-504.
 68. Ramachandra, L.; Qu, Y.; Wang, Y.; Lewis, C.J.; Cobb, B.A.; Takatsu, K.; Boom, W.H.; Dubyak, G.R.; Harding, C.V. *Mycobacterium tuberculosis* synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. *Infect Immun.* 2010 Dec; 78(12):5116-25.
 69. Taylor, J.M.; Han, Z. Purinergic receptor functionality is necessary for infection of human hepatocytes by hepatitis delta virus and hepatitis B virus. *PLoS One.* 2010 Dec 20;5(12):e15784.
 70. Costa-Junior, H.M.; Marques-da-Silva, C.; Vieira, F.S.; Monção-Ribeiro, L.C.; Coutinho-Silva, R. Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view. *Purinergic Signal.* 2011 Dec;7(4):381-92.
 71. Marques-da-Silva, C.; Chaves, M.M.; Rodrigues, J.C.; Corte-Real, S.; Coutinho-Silva, R.; Persechini, P.M. Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2011;6(9):e25356.
 72. Lee, B.H.; Hwang, D.M.; Palaniyar, N.; Grinstein, S.; Philpott, D.J.; Hu, J. Activation of P2X(7) receptor by ATP plays an important role in regulating inflammatory responses during acute viral infection. *PLoS One.* 2012;7(4):e35812.
 73. Coutinho-Silva, R.; Ojcius, D.M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 2012 Nov;14(14):1271-7.
 74. Oliveira, S.D.; Coutinho-Silva, R.; Silva, C.L. Endothelial P2X7 receptors' expression is reduced by schistosomiasis. *Purinergic Signal.* 2013 Mar;9(1):81-9.
 75. Choi, C.H.; Spooner, R.; DeGuzman, J.; Koutouzis, T.; Ojcius, D.M.; Yilmaz, Ö. *Porphyromonas gingivalis*-nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X7 receptor/NADPH-oxidase signalling and contributes to persistence. *Cell Microbiol.* 2013 Jun;15(6):961-76.
 76. He, Y.Q.; Chen, J.; Lu, X.J.; Shi, Y.H. Characterization of P2X7R and its function in the macrophages of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *PLoS One.* 2013;8(2):e57505.
 77. Santos, A.A. Jr.; Rodrigues-Junior, V.; Zanin, R.F.; Borges, T.J.; Bonorino, C.; Coutinho-Silva, R.; Takyia, C.M.; Santos, D.S.; Campos, M.M.; Morrone, F.B. Implication of purinergic P2X7 receptor in *M. tuberculosis* infection and host interaction mechanisms: a mouse model study. *Immunobiology.* 2013 Aug;218(28):1104-12.
 78. Miller, C.M.; Boulter, N.R.; Fuller, S.J.; Zakrzewski, A.M.; Lees, M.P.; Saunders, B.M.; Wiley, J.S.; Smith, N.C. The role of the P2X7 receptor in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2011 Nov;7(11):e1002212.
 79. Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, Bomfim CC, Salles EM, Bortoluci KR, Coutinho-Silva R, Hirata MH, Alvarez JM, Lasunskaja

- EB, D'Império-Lima MR. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2014 Jul 3;10(7):e1004188.
80. Chin, Y.; Kishi, M.; Sekino, M.; Nakajo, F.; Abe, Y.; Terazono, Y.; Hiroyuki, O.; Kato, F.; Koizumi, S.; Gachet, C.; Hisatsune, T. Involvement of glial P2Y1 receptors in cognitive deficit after focal cerebral stroke in a rodent model. *J Neuroinflammation.* 2013 Jul 29;10:95.
 81. Choo, A.M.; Miller, W.J.; Chen, Y.C.; Nibley, P.; Patel, T.P.; Goletiani, C.; Morrison, B. 3rd.; Kutzing, M.K.; Firestein, B.L.; Sul, J.Y.; Haydon, P.G.; Meaney, D.F. Antagonism of purinergic signalling improves recovery from traumatic brain injury. *Brain.* 2013 Jan;136(Pt 1):65-80.
 82. Chen, J.; Wang, L.; Zhang, Y.; Yang, J. P2Y1 purinoceptor inhibition reduces extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 phosphorylation in spinal cord and dorsal root ganglia: implications for cancer-induced bone pain. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Apr;44(4):367-72.
 83. Labarthe, B.; Babin, J.; Bryckaert, M.; Thérout, P.; Bonnefoy, A. Effects of P2Y1 receptor antagonism on the reactivity of platelets from patients with stable coronary artery disease using aspirin and Clopidogrel. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(1):221-31.
 84. Hechler, B.; Nonne, C.; Roh, E.J.; Cattaneo, M.; Cazenave, J.P.; Lanza, F.; Jacobson, K.A.; Gachet, C. MRS2500 [2-Iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5' bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb;316(2):556-63.
 85. Lenain, N.; Freund, M.; Léon, C.; Cazenave, J.P.; Gachet, C. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost.* 2003 Jun;1(6):1144-9.
 86. Léon, C.; Freund, M.; Ravanat, C.; Baurand, A.; Cazenave, J.P.; Gachet, C. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation.* 2001 Feb 6;103(5):718-23.
 87. Zerr, M.; Hechler, B.; Freund, M.; Magnenat, S.; Lanois, I.; Cazenave, J.P.; Léon, C.; Gachet, C. Major contribution of the P2Y1 receptor in purinergic regulation of TNF α -induced vascular inflammation. *Circulation.* 2011 May 31;123(3):2404-13.
 88. Delekate A, Füchtmeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddiss M, Petzold GC. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun.* 2014 Nov 19;5:5422.
 89. 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 Dec 5;54(11):1463-74.
 90. Yerxa, BR.; Mundasad, M.; Sylvester, RN.; Garden, J.C.; Cooper, M.; Kellerman, D.J. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y₂ agonist, in patients with mild to moderate dry eye disease. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt B):1251-7.
 91. Vanderstocken, G.; Bondue, B.; Horekmans, M.; Di Pietrantonio, L.; Robaye, B.; Boeynaems, J.M.; Communi, D. P2Y₂ receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3702-7.

92. Inoue, Y.; Chen, Y.; Hirsh, M.I.; Yip, L.; Junger, W.G. A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. *Shock*. 2008 Aug;30(2):173-7.
93. Ayata, C.K.; Ganal, S.C.; Hockenjos, B.; Willim, K.; Vieira, R.P.; Grimm, M.; Robaye, B.; Boeynaems, J.M.; Di Virgilio, F.; Pellegatti, P.; Diefenbach, A.; Idzko, M.; Hasselblatt, P. Purinergic P2Y2 receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology*. 2012 Dec;143(6):1620-9.
94. Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, Ji B, Jiang Y, Song P, Dong H, Tuo B. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem*. 2014 Jul 4;289(27):19137-49.
95. Jin H, Eun SY, Lee JS, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Res*. 2014 Aug 26;16(4):R77.
96. Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, Liu Y, You JF, Tian XX, Fang WG. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2013 Sep 17;109(6):1666-75.
97. Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, Camden JM, Erb L. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):559-78.
98. Horckmans, M.; Léon-Gómez, E.; Robaye, B.; Balligand, J.L.; Boeynaems, J.M.; Dessy, C.; Communi, D. Gene deletion of P2Y4 receptor lowers exercise capacity and reduces myocardial hypertrophy with swimming exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Oct;303(7):H835-43.
99. Li HQ, Chen C, Dou Y, Wu HJ, Liu YJ, Lou HF, Zhang JM, Li XM, Wang H, Duan S. P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta-induced self-uptake by microglia. *Mol Cell Biol*. 2013 Nov;33(21):4282-93.
100. Vieira, R.P.; Müller, T.; Grimm, M.; von Gernler, V.; Vetter, B.; Dürk, T.; Cicko, S.; Ayata, C.K.; Sorichter, S.; Robaye, B.; Zeiser, R.; Ferrari, D.; Kirschbaum, A.; Zissel, G.; Virchow, J.C.; Boeynaems, J.M.; Idzko, M. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 15;184(2):215-23.
101. Uratsuji, H.; Tada, Y.; Kawashima, T.; Kamata, M.; Hau, C.S.; Asano, Y.; Sugaya, M.; Kadono, T.; Asahina, A.; Sato, S.; Tamaki, K. P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J Immunol*. 2012 Jan 1;188(1):436-44.
102. Somers, G.R.; Hammet, F.M.; Trute, L.; Southey, M.C.; Venter, D.J. Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease. *Lab Invest*. 1998 Nov;78(11):1375-83.
103. Grbic, D.M.; Degagné, É.; Larrivée, J.F.; Bilodeau, M.S.; Vinette, V.; Arguin, G.; Stankova, J.; Gendron, F.P. P2Y6 receptor contributes to neutrophil recruitment to inflamed intestinal mucosa by increasing CXC chemokine ligand 8 expression in an AP-1-dependent manner in epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Aug;18(8):1456-69.
104. Hansen A, Alston L, Tulk SE, Schenck LP, Grassie ME, Alhassan BF, Veermalla AT, Al-Bashir S, Gendron FP, Altier C, MacDonald JA, Beck PL, Hirota SA.

- The P2Y6 receptor mediates *Clostridium difficile* toxin-induced CXCL8/IL-8 production and intestinal epithelial barrier dysfunction. *PLoS One*. 2013 Nov 22;8(11):e81491.
105. Stachon P, Peikert A, Michel NA, Hergeth S, Marchini T, Wolf D, Dufner B, Hoppe N, Ayata CK, Grimm M, Cicko S, Schulte L, Reinöhl J, von zur Muhlen C, Bode C, Idzko M, Zirlik A. P2Y6 deficiency limits vascular inflammation and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Oct;34(10):2237-45.
 106. Hao Y, Liang JF, Chow AW, Cheung WT, Ko WH. P2Y6 receptor-mediated proinflammatory signaling in human bronchial epithelia. *PLoS One*. 2014 Sep 22;9(9):e106235.
 107. Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Cervantes-Durán C, Bravo-Hernández M, Rocha-González HI, Murbartián J, Granados-Soto V. Role of spinal P2Y6 and P2Y11 receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells. *Mol Pain*. 2014 May 20;10:29.
 108. Oliphant, C.S.; Doby, J.B.; Blade, C.L.; Das, K.; Mukherjee, D.; Das, P. Emerging P2Y12 receptor antagonists: role in coronary artery disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010 Jan;8(1):93-101.
 109. Anderson, S.D.; Shah, N.K.; Yim, J.; Epstein, B.J. Efficacy and safety of ticagrelor: a reversible P2Y12 receptor antagonist. *Ann Pharmacother*. 2010 Mar;44(3):524-37.
 110. Sugidachi, A.; Yamaguchi, S.; Jakubowski, J.A.; Ohno, K.; Tomizawa, A.; Hashimoto, M.; Niitsu, Y. Selective blockade of P2Y12 receptors by Prasugrel inhibits myocardial infarction induced by thrombotic coronary artery occlusion in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Sep;58(3):329-34.
 111. Fox, S.C.; May, J.A.; Johnson, A.; Hermann, D.; Strieter, D.; Hartman, D.; Heptinstall, S. Effects on platelet function of an EP3 receptor antagonist used alone and in combination with a P2Y12 antagonist both in-vitro and ex-vivo in human volunteers. *Platelets*. 2013;24(5):392-400.
 112. Morel, O.; Muller, C.; Jesel, L.; Moulin, B.; Hannedouche, T. Impaired platelet P2Y12 inhibition by thienopyridines in chronic kidney disease: mechanisms, clinical relevance and pharmacological options. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Aug;28(8):1994-2002.
 113. Zoheir, N.; Abd Elhamid, S.; Abulata, N.; El Sobky, M.; Khafagy, D.; Mostafa, A. P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of Clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013 Jul;24(5):525-31.
 114. Kobayashi, K.; Yamanaka, H.; Yanamoto, F.; Okubo, M.; Noguchi, K. Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*. 2012 Oct;60(10):1529-39.
 115. Serhan, N.; Cabou, C.; Verdier, C.; Lichtenstein, L.; Malet, N.; Perret, B.; Laffargue, M.; Martinez, L.O. Chronic pharmacological activation of P2Y13 receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1831(4):719-25.
 116. Koehn, F.E.; Carter, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Mar;4(3):206-20.
 117. Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005 Dec 22;78(5):431-41.

118. Itokawa, H.; Morris-Natschke, S.L.; Akiyama, T.; Lee, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med*. 2008 Jul;62(3):263-80.
119. Butler, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. 2004 Dec;67(12):2141-53.
120. Njuguna, N.M.; Masimirembwa, C.; Chibale, K. Identification and characterization of reactive metabolites in natural products-driven drug discovery. *J Nat Prod*. 2012 Mar 23;75(3):507-13.
121. Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. Breve análise histórica das plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental. In: *Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna: Métodos de Estudo, Fitoterápicos e Fitofármacos, Biotecnologia, Patentes*; Yunes, R.A.; Calixto, J.B, Ed. Argos: Chapecó, SC, Brasil, 2001, pp. 17-44.
122. Saklani, A.; Kutty, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today*. 2008 Feb;13(3-4):161-71.
123. Galvez-Llompart, M.; Zanni, R.; García-Domenech, R. Modeling natural anti-inflammatory compounds by molecular topology. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):9481-503.
124. Bohlin, L.; Göransson, U.; Alsmark, C.; Wedén, C.; Backlund, A. Natural products in modern life science. *Phytochem Rev*. 2010 Jun;9(2):279-301.
125. Faria, R.; Ferreira, L.; Bezerra, R.; Frutuoso, V.; Alves, L. Action of natural products on P2 receptors: a reinvented era for drug discovery. *Molecules*. 2012 Nov 1;17(11):13009-25.
126. Bruton, J.D.; Cheng, A.J.; Westerblad, H. Methods to detect Ca²⁺ in living cells. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:27-43.
127. Petersen, O.H.; Michalak, M.; Verkhratsky, A. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):161-9.
128. Namovic, M.T.; Jarvis, M.F.; Donnelly-Roberts, D. High throughput functional assays for P2X receptors. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012, Chapter 9.
129. Kassack, M.U.; Höfgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J.M.; Sadée, W. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen*. 2002 Jun;7(3):233-46.
130. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. Artmed: Porto Alegre, RS, Brasil, 2010, pp. 879-964.
131. Glaser, T.; Resende, R.R.; Ulrich, H. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell Commun Signal*. 2013 Feb 17;11(1):12.
132. Sukhanova, KhIu.; Buryĭ, V.A.; Sahach, V.F.; Bolton, T.B.; Hordiienko, D.V. Effects of modulators of calcium metabolism on mesenteric artery contractions during activation of P2X receptors in guinea-pig. *Fiziol Zh*. 2009;55(4):74-82.
133. Li X, Llorente I, Brasch M. Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD calcium assay kits. *Curr Chem Genomics*. 2008 Oct 10;2:10-5.

134. Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M. Ca^{2+} -sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca^{2+} imaging. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013 Feb 1;2013(2):83-99.
135. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1089-125.
136. Sullivan E, Tucker EM, Dale IL. Measurement of $[\text{Ca}^{2+}]$ using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). *Methods Mol Biol.* 1999;114:125-33.
137. Lydford S, Monnet L, Averbek P. Monitoring receptor mediated changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ using single- and dual-wavelength indicators on the FlexStation Benchtop Multi-Mode Microplate Reader. FlexStation Application Note #3. 2011. [Accessed on 05 fev 2015]. <http://www.moleculardevices.com/Support/Information-Center/Application-Notes.html>.
138. Huggins C, Olsen C. Comparison of photina luminescent calcium mobilization assays on both the FlexStation 3 and FLIPR^{TETRA} Systems. FlexStation Application Note #6. 2010. [Accessed on 05 fev 2015]. http://mms.technologynetworks.net/app_notes/MD04.pdf
139. Molecular Devices. FlexStation 3 Microplate Reader: a five-mode microplate reader with integrated fluid transfer. Brochure. 2006. [Accessed on 05 fev 2015]. <http://gbiomed.kuleuven.be/english/research/50000618/equip/flexstation/information-flex/Equipement.pdf>
140. Hansen KB, Bräuner-Osborne H. FLIPR[®] assays of intracellular calcium in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol.* 2009;552:269-78.