DANIEL RODRIGO BATISTA

**ESTUDO DOS RECEPTORES
PURINÉRGICOS EM CÉLULAS GLIAIS
DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Cassola.

**São Paulo
2008**

RESUMO

BATISTA, D. R. **Estudo dos receptores purinérgicos em células gliais do gânglio da raiz dorsal**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Receptores purinérgicos são expressos em neurônios e glia e, por certo, participam dos processos de sinalização entre estas células. Nos gânglios da raiz dorsal o soma dos neurônios sensoriais é envolto por uma camada de células satélites, que são células de glia, cuja função é desconhecida. Existem evidências de que ATP liberado pelos neurossomas ativam receptores purinérgicos nas células satélites. Até o momento a natureza destes receptores presentes nas células satélites foi pouco investigada. No presente trabalho demonstra-se a presença dos receptores purinérgicos metabotrópicos dos subtipos P2Y₁, P2Y₂ e/ou P2Y₄, e P2Y₆ nas células satélites de gânglios da raiz dorsal de ratos recém-nascidos. A prova da existência dos receptores foi a elevação na concentração intracelular do Ca²⁺, induzida pela aplicação de um agonista dos receptores. Nas culturas de mais de 24 horas, estimuladas por soro bovino fetal, proliferam de forma notável células não-neuronais, de aspecto predominantemente fusiforme. Por imunocitoquímica, demonstrou-se que estas células expressam GFAP, proteína característica da glia. Determinou-se que células fusiformes expressam receptores purinérgicos metabotrópicos, dos subtipos P2Y₁, P2Y₂ e/ou P2Y₄, e P2Y₆. As informações obtidas contribuem para o esclarecimento da sinalização entre neurônios e glia nos gânglios sensoriais da raiz dorsal.

Palavras-chave: Glia. Receptores purinérgicos. Gânglio sensorial. Células satélites. Cálcio.

ABSTRACT

BATISTA, D. R. Study of purinergic receptors in glial cells from dorsal root ganglia. 2008. 70 f. Master thesis (Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Purinergic receptors are expressed and play role in the sinalization between neurons and glia. In dorsal root ganglia the soma of the sensory neurons is surrounded by a layer of satellite glial cells, whose function is unclear. There are evidences that ATP is released by neurons to act on receptors in satellite cells. So far, the nature of the purinergic receptors of satellite cells was not fully investigated. This study shows the presence of metabotropics purinergic receptors P2Y₁, P2Y₂ and/or P2Y₄, e P2Y₆ in satellite cells from dorsal root ganglia of newborn rats. The demonstration was carried on following the transient increases in intracellular calcium concentration induced by a purinergic agonist. As time goes by, in the presence of fetal bovine serum, there is a remarkable proliferation of non-neural cells, with predominant fusiform shapes. These cells express GFAP, a protein that characterizes glial phenotype and possibly are descendent of ganglia glial cells. The cells also express P2Y₁, P2Y₂ and/or P2Y₄, e P2Y₆ receptors. These informations add on the understanding of the complex phenomena of neuron-glia interaction.

Key words: Glia. Purinergic receptors. Sensory ganglia. Satellites cell. Calcium.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Gânglio da Raiz Dorsal

Toda a informação sensorial proveniente da pele, músculos tendões e vísceras, chega ao sistema nervoso central (SNC) pelos neurônios sensoriais, cujos corpos estão nos gânglios da raiz dorsal (GRD). De morfologia pseudo-unipolar, estes neurônios formam um axônio que se bifurca a pouca distância do neurosoma. O ramo periférico segue pelos nervos espinhais para a periferia, até o terminal sensorial. O ramo central segue pela raiz dorsal até a medula espinhal, onde forma sinapses com neurônios ali presentes, ou prossegue pela medula espinhal até o bulbo. O neurosoma é desprovido de dendritos e aferências sinápticas. Isto garante que toda a informação que trafega pelo axônio seja proveniente exclusivamente da terminação sensorial que ele forma. Esta arquitetura põe o corpo celular, com capacitância elétrica elevada pela maior superfície, fora da trajetória de propagação do potencial de ação entre a periferia e a medula espinhal. Evita-se, assim o inevitável retardo que a capacitância aumentada no circuito imporia. Esta, ainda poderia formar na região um filtro de tipo passa-baixo, que limitaria a frequência máxima dos potenciais de ação na via.

Entretanto, a membrana do neurosoma é equipada com os canais dependentes de voltagem para íons, necessários para a deflagração de potenciais de ação. De fato, os potenciais de ação provenientes da periferia, na bifurcação do axônio propagam-se também em direção ao corpo celular. Aqui, além de canais para Na^+ e para K^+ , há canais para Ca^{2+} . A frequência de potenciais de ação na via influirá, portanto, na concentração citosólica de Ca^{2+} , o que pode modular a expressão gênica de acordo com a atividade na via. Ainda mais curiosa é a constatação da presença de receptores para neurotransmissores na membrana do neurosoma. A função destes receptores, localizados fora de regiões sinápticas é suscita especulações: de onde viriam os neurotransmissores e que consequência fisiológicas teria a ativação dos receptores para a fisiologia do neurônio (DEVOR, 1999).

Os corpos dos neurônios não estão em contato franco com o espaço extracelular do gânglio. O neurosoma está envolvido por um envelope de delgadas células gliais, denominada células satélites (CSt). Cada neurônio possui seu próprio conjunto de CSt, que é

separado dos demais por uma camada de tecido conjuntivo (Figura 1) (HANANI, 2005; PANNESE, 1981).

Figura 1: Esquema da organização entre as células satélites e os neurônios pseudo-unipolares. CSt, célula satélite; N1-6, corpo celular dos neurônios sensoriais; tc, tecido conjuntivo. Fonte: Modificado de HANANI, 2005.

Estas células gliais devem limitar o contato dos neurônios com o interstício do gânglio e com os capilares sanguíneos, constituindo uma barreira equivalente periférico à barreira hemato-encefálica no SNC. Todavia, as CSt não formam uma barreira completamente restritiva. Estudos mostram que algumas espécies químicas, como algumas proteínas marcadas com átomos radioativos, passam da corrente sanguínea para o espaço entre os neurônios e as células satélites. Conjecturas bastante difundidas dão como certo que estas células sejam capazes de interferir na composição do microambiente em torno do neurosoma. A confirmação da presença de transportadores e de enzimas que degradam neurotransmissores nestas células dão suporte a esta idéia (HANANI et al., 2002; PANNESE et al., 2003). A escassez de estudos impede conclusões sobre as funções destas células (HANANI, 2005).

Em um estudo recente, dos mais completos, Zhang et al. (2007) demonstraram a liberação de adenosina 5'-trifosfato (ATP) pelo neurosoma de neurônios do GRD, estimulada pela atividade elétrica. O ATP é um ubíquo primeiro mensageiro (maiores detalhes serão discutidos na sessão 1.4). A confirmação da liberação extrasináptica de um

neurotransmissor já seria, por si só valioso, mas os autores vão além ao mostrar que o ATP liberado, ao agir sobre receptores purinérgicos, provoca o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nas CSt circundantes (ZHANG et al., 2007).

Qual a função desta sinalização entre o neurônio sensorial e a glia? Quais as consequências do aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas CSt? Existe modulação da atividade neuronal pela glia? Estas questões vem sendo investigadas em outros tecidos neurais há cerca de 3 décadas por pesquisadores interessados no estudo da interação entre neurônio e glia. Os principais avanços neste campo estão sumarizados na seção seguinte

1.2 Células gliais: Avanços recentes

A classe das células gliais agrupa vários fenótipos que formam, com os neurônios, o tecido nervoso. Os três principais fenótipos de célula gliais são os astrócitos, os oligodendrócitos e as células de Schwann. A microglia, apesar do nome, é um macrófago, portanto, célula do sistema imunológico. Astrócitos são encontrados no encéfalo e na medula espinhal. Como o nome sugere, eles apresentam o aspecto de uma estrela, com vários prolongamentos estendo-se de um corpo central. Estes prolongamentos estão em contato com capilares, neurossomas, axônios, sinapses e outras células gliais. As funções destas células são diversas. Estão relacionadas com a manutenção das concentrações iônicas e de metabólitos no interstício neuronal em valores adequados com o funcionamento dos neurônios. Astrócitos captam neurotransmissores liberados nas fendas sináptica ou em regiões extrasinápticas, regulam as concentrações locais extracelulares de K^+ e os processo podais destas células constituem, com o endotélio dos capilares, a barreira hemato-encefálica, que controla a difusão entre o plasma e o interstício neuronal. Oligodendrócitos e Células de Schwann são responsáveis pela formação da bainha de mielina nos axônios. Oligodendrócitos são exclusivos do SNC e, assim como os astrócitos, apresentam um corpo central com diversos prolongamentos. Estes prolongamentos formam a bainha de mielina ao envolver com camadas concêntricas de membrana os axônios. As Células de Schwann formam a bainha de mielina nos axônios dos nervos periféricos e, diferentemente dos oligodendrócitos, não apresentam prolongamentos, envolvendo o axônio com o próprio soma (LEVITAN e KACZMAREK, 2002).

As funções auxiliares e ausência de excitabilidade elétrica das células gliais consolidou o conceito que são elementos de suporte físico e fisiológico para os neurônios, de células que não participam diretamente do processamento da informação. Portanto, não foi sem surpresa que ao final da década de 80 do século passado se constatou a presença de receptores a neurotransmissores em astrócitos. A detecção dos receptores funcionais nas células gliais deu-se pelo uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} , que permitiram detectar variações na concentração intracelular do íon em astrócitos estimulados pelo neurotransmissor glutamato. A presença de receptores para glutamato, ATP, ácido gama-aminobutírico, serotonina, epinefrina, acetilcolina e outros transmissores foi aos poucos confirmada nos diversos fenótipos gliais (VERKHRATSKY et al., 1998). Os estudos exaustivos mostraram que a ativação de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos resultavam na elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células gliais (DEITMER et al., 2006). A sinalização intracelular por Ca^{2+} produziu vasta literatura com publicações originais e várias revisões nos últimos anos (ARAQUE et al., 1999; DEITMER et al., 1998; FIACCO e MCCARTHY, 2006; FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2002; HAYDON, 2001; METEA e NEWMAN, 2006; ROUSSE e ROBITAILLE, 2006; VERKHRATSKY et al., 1998).

Como em outros fenótipos celulares, as $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basais em células de glia variam de 25 a 400 nM (VERKHRATSKY et al., 1998). A concentração extracelular de Ca^{2+} livre é da ordem de 1,2 mM. A baixa concentração intracelular é mantida ao custo de energia (ATP), consumida por Ca^{2+} -ATPases da membrana celular e do retículo endoplasmático ou indiretamente pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que se vale do gradiente favorável ao influxo de Na^+ mantido pela Na^+/K^+ -ATPase. A sinalização por Ca^{2+} se dá pelo aumento rápido da sua concentração, em volumes restritos do citoplasma. Por suas propriedades físico-químicas, o Ca^{2+} se coordena com vários sítios, em diversas proteínas, modificando-lhes a estrutura terciária. Assim, dá-se a sinalização.

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, associado à ativação de receptores, ocorre de duas diferentes maneiras. Há receptores ionotrópicos associados a canais para cátions, entre eles o Ca^{2+} . Quando ativados ocorre aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por influxo do íon, vindo do compartimento extracelular. Receptores metabotrópicos, por sua vez, interagem com as proteínas G_q e G_{11} promovem o aumento da concentração intracelular de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Este segundo mensageiro pode ativar receptores (IP_3R), presentes na membrana do retículo endoplasmático. A ativação destes receptores, que são parte de canais para Ca^{2+} , leva ao

efluxo do Ca^{2+} do retículo para o citoplasma. Desta forma, o aumento transitório na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não depende diretamente da Ca^{2+} no meio extracelular. Os IP_3Rs também são modulados pela $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ROMAN, 2003). Ocorrem três subtipos ($\text{IP}_3\text{R-1}$, 2 e 3) distintos quanto à sensibilidade ao IP_3 e ao Ca^{2+} . A co-expressão dos subtipos é determinante para a complexidade do decurso temporal do transiente de Ca^{2+} (IINO, 2000).

Em alguns fenótipos gliais foram observados canais iônicos dependentes de voltagem permeáveis a Ca^{2+} (Ca_v) cuja ativação decorre da despolarização da membrana pelo influxo de cátions (Na^+ e Ca^{2+}) por um receptor ionotrópico (VERKHRATSKY et al., 1998). Também a depleção do Ca^{2+} do retículo endoplasmático pode promover o influxo de Ca^{2+} através da membrana celular plasmática por processo conhecido como “store-operated calcium entry” (NILIUS, 2003). A expressão diversos mecanismos assim como de receptores ionotrópicos e metabotrópicos para o mesmo agonista em uma mesma célula determina a variedade e a complexidade no decurso temporal dos transientes de Ca^{2+} observados nos diversos fenótipos celulares (BERRIDGE et al., 2003; KNOT et al., 2005; VERKHRATSKY et al., 1998).

1.3 A comunicação entre neurônio e glia

Desde o princípio ficou claro que a posição das células gliais, próximas aos sítios sinápticos, permitia a estas detectarem a atividade dos neurônios pela ativação de seus receptores pelos neurotransmissores que vazavam da fenda sináptica, e que estes neurotransmissores promoviam o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ das células gliais.

Importante para o esclarecimento da interação entre neurônio e glia foi a descoberta da comunicação glia-glia, via ATP (COTRINA et al., 1998; GUTHRIE et al., 1999). As evidências vieram da observação da propagação por astrócitos contíguos de ondas de Ca^{2+} . Pensou-se que esta propagação dava-se pela difusão de mensageiros intracelulares, Ca^{2+} e IP_3 , através das junções comunicantes entre os astrócitos. Hassinger et al. (1996) demonstraram, porém, que esta onda de Ca^{2+} propagava-se por células não contíguas. A observação que a propagação célula a célula era bloqueada por antagonistas de receptores para ATP, conhecidos como receptores purinérgicos, ou pela adição da enzima apirase, que rapidamente degrada o ATP extracelular (INNOCENTI et al., 2000), esclareceu que a sinalização

intercelular dava-se por ATP liberado pelos astrócitos. A liberação de ATP por astrócitos foi demonstrada *in situ* (NEWMAN e ZAHES, 1997) e *in vitro* (WANG et al., 2000). Estudos recentes demonstram que a propagação de ondas de Ca^{2+} também decorre em parte pela difusão de segundos mensageiros pelas junções comunicantes, e que a importância da rota, intracelular ou extracelular, varia de acordo com da região do cérebro investigada (BURNSTOCK, 2007a).

Parpura et al. (1994) demonstraram que os transientes de Ca^{2+} nos neurônios estavam associados à modulação da atividade de neurônios. Em co-cultura de astrócitos e neurônios foi observado que o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em astrócitos induzia, em seqüência, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em neurônios. Detectou-se que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em astrócitos promovia a liberação de glutamato por estes. O transiente de Ca^{2+} em neurônios era impedido pela administração de antagonistas de receptores para glutamato.

Combinados, estes resultados favorecem a hipótese que astrócitos detectem a atividade neuronal que resulta na liberação de ATP na sinapse, e propaguem a informação por cadeias de astrócitos, na forma de uma onda de Ca^{2+} , para modular a atividade de neurônios em uma região remota, via liberação de transmissores. Desta forma, haveria no tecido nervoso um sistema de comunicação em paralelo com a propagação de informação por cadeias de neurônios (ARAQUE et al., 1999; BURNSTOCK, 2007a).

1.4 Receptores purinérgicos

Como se evidenciou na breve revisão acima, o ATP é um dos principais sinalizadores extracelulares no processo de comunicação entre neurônios e células da glia. A hidrólise do ATP é a principal fonte de energia livre para os processos metabólicos da célula. As primeiras evidências que o ATP também atua como um sinalizador intercelular surgiram com o trabalho Drury e Szent-Györgyi em 1929, que descreveram o efeito vasodilatador e depressor cardíaco do ATP e da adenosina. Em 1972, Burnstock propôs, com base em evidências experimentais, que ATP atua como um neurotransmissor, cunhando o termo “nervos purinérgicos”. Implícito neste conceito esta a existência de um receptor para ATP na membrana pós-sináptica. Em 1976 consagrou-se o termo receptor purinérgico. Diferentemente dos demais neurotransmissores “clássicos”, o ATP é liberado não só pelos terminais pré-sinápticos dos

neurônios, mas também pelos terminais pós-sinápticos. Com o tempo, detectou-se a presença destes receptores em vários fenótipos não-neuronais, nos mais diversos tecidos. Hoje em dia sabe-se que a sinalização purinérgica está envolvida em muitos mecanismos, incluindo secreção endócrina e exócrina, resposta imune, dor, inflamação, agregação de plaquetas, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular (BURNSTOCK, 2007b).

1.4.1 Classificação dos receptores purinérgicos

Em 1978 distinguiram-se dois tipos de receptores purinérgicos, identificados como P1 e P2, que respondiam seletivamente a adenosina e ATP, respectivamente. Em 1985 estabeleceu-se a distinção de dois tipos de receptores P2 quanto a sua farmacologia: P2X e P2Y. Apenas o segundo respondia ao adenosina 5'-difosfato (ADP). Em 1994, Abbracchio e Burnstock consolidaram a classificação dos receptores P2 em duas grandes famílias, com base em estrutura molecular e mecanismo de ação: A família P2X englobaria canais iônicos dependentes de ligantes (receptores ionotrópicos) e a família P2Y englobaria receptores ligados a proteína G (receptores metabotrópicos) (BURNSTOCK, 2007b).

1.4.1.1 Receptores P1

Receptores P1 são receptores metabotrópicos cujo agonista endógeno é a adenosina. Quatro diferentes subtipos de receptores P1 foram clonados e caracterizados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Todos são membros da superfamília de receptores ligados à proteína G. Como todos os representantes desta superfamília, estes apresentam 7 segmentos transmembrana (TMs), o terminal amino voltado para o extracelular e o terminal carboxil pra o intracelular. Entre os segmentos transmembrana (TMI-TMVII) os receptores P1 humano apresentam 39-61% de identidade entre si e apenas 11-18% de identidade com os receptores P2Y (BURNSTOCK, 2007b). Há regiões nos TMs que são cruciais para formação do sítio de ligação ao agonista. A exceção da alça extracelular, que liga os TMs IV e V. nenhuma outra região extracelular participa na formação deste sítio (BURNSTOCK, 2007a). A ativação destes receptores leva principalmente à modulação das concentrações intracelulares de AMPc (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos receptores metabotrópicos P1.

Subtipo	Agonista endógeno	Agonista seletivo	Antagonista seletivo	Proteína-G efetora	Efeito
A ₁	Adenosina	CCPA	DPCPX	G _i	↓ AMPc
A _{2A}	Adenosina	CGS 21680	KF17837	G _s	↑ AMPc
A _{2B}	Adenosina	NECA	MRS1751	G _s	↑ AMPc
A ₃	Adenosina	CI-IB-MECA	3008F20	G _i , G _q /G ₁₁	↓ AMPc, ↑ IP ₃

Fonte: Modificado de BURNSTOCK, 2007b e RAVELIC & BURNSTOCK, 2007.

1.4.1.2 Receptores P2X

Receptores P2X são proteínas de membrana que formam canais para íons na bicamada lipídica da membrana celular. Os canais são seletivos a cátions, sem discriminá-los. Por alguns passam o Na⁺ e o K⁺ e, os outros são permeáveis também ao Ca²⁺.

As subunidades que formam os receptores P2X apresentam duas alfas-hélices transmembrana (TMI e TMII) unidas por uma longa alça extracelular. Os terminais amino e carboxil encontram-se voltados para o intracelular. O poro do canal é formado por regiões no TMII. O sítio de ligação do ATP está na alça extracelular, adjacentes aos TMs. Sete subunidades foram clonadas e seqüenciadas (P2X₁₋₇). A identidade entre elas varia de 30 a 50%. Até a presente data é desconhecido o número de subunidades que compõe um receptor funcional. Conjectura-se que o canal seja um trímero destas sub-unidades, e podem ser homoméricos ou heteroméricos (BURNSTOCK, 2007b; GEVER et al., 2006).

Não há agonistas seletivos para os subtipos de receptores P2X, embora se possa classificá-los segundo a afinidade pelo ligante ATP ou análogos (Tabela 02). Homômeros formados pelas subunidades P2X₁ e P2X₃ podem ser distinguidos dos demais por sua rápida dessensibilização e sensibilidade ao agonista α - β metileno-adenosina 5'-trifosfato (α - β -meATP). Homômeros P2X₂, P2X₄ e P2X₅ têm como característica a lenta dessensibilização e baixa sensibilidade ao agonista α - β -meATP. O receptor formado por P2X₇ não apresenta dessensibilização, permanecendo condutivo na presença do agonista (BURNSTOCK, 2007a,b; GEVER et al., 2006; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). Se a aplicação do agonista perdurar por segundos, ocorre um grande aumento condutividade do canal, e surgimento de permeabilidade a cátions orgânicos de até 900 daltons, como N-methyl-D-glucamine (NMDG) e o YO-PRO-1. A explicação para este fenômeno ainda não é definitiva, havendo

duas hipóteses: A primeira sugere que o poro do receptor P2X₇ se alargue e perca a seletividade. A segunda sugere a abertura de um outro canal de membrana, ainda não identificado, pela interação com os terminais carboxila do receptor P2X₇ (NORTH, 2002). Recentemente, antagonistas seletivos foram desenvolvidos para os receptores P2X₁, P2X₃ e P2X₇ (Tabela 2) (GEVER et al., 2006).

Tabela 2: Características farmacológicas dos receptores ionotrópicos P2X.

Subtipo	Agonistas	Antagonistas seletivos
P2X ₁	2-MeSATP = ATP = α - β -meATP = β - γ -MeATP	RO-1, NF864, NF449
P2X ₂	ATP $\geq$ ATP γ S $\geq$ 2-MeSATP $\gg$ α - β -MeATP	
P2X ₃	2-MeSATP $\geq$ ATP $\geq$ α - β -meATP $\gg$ β - γ -MeATP	RO-3, A-317491
P2X ₄	ATP $\gg$ α - β -meATP	
P2X ₅	ATP $\gg$ α - β -meATP	
P2X ₆	Esta subunidade não forma homômeros funcionais	
P2X ₇	BzATP $>$ ATP $\geq$ 2-MeSATP $\gg$ α - β -meATP	4,5-diarylimidazolin, AZD9056, A-740003

α - β -meATP, α - β metileno-adenosina 5'-trifosfato; ATP γ S, adenosina 5'-(3-tiotrifostato); β - γ -MeATP, β - γ metileno-adenosina 5'-trifosfato; BzATP, 3'-O-(4-benzoil-benzoil) adenosina 5'-trifosfato; 2-MeSATP, 2-metiltioadenosina 5'-trifosfato

Fonte: Modificado de GEVER et al. 2006.

1.4.1.3 Receptores P2Y

Assim como os receptores P1, receptores P2Y são receptores metabotrópicos,. Esta família agrupa também receptores cujos agonistas são derivados da uracila, conhecidos como receptores pirimidinérgicos. Foram identificados oito receptores P2Y em humanos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Os números indicam a ordem cronológica em que foram clonados Os números que faltam representam receptores que não ocorrem em mamíferos (p2y₃ em aves, p2y₈ em *Xenopus*) ou receptores que possuem certo grau de identidade com os receptores P2Y, mas que não respondem a nucleotídeos (p2y₅, p2y₇, p2y₉, p2y₁₀ e p2y₁₅). Assim como os receptores P1, os receptores P2Y pertencem à superfamília dos receptores de membrana ligados à proteína G, apresentando a topologia típica desta família (7 TMs, terminal amino voltado para o extracelular e o carboxil pra o intracelular). Nos TMs 3, 6 e 7 estão resíduos de aminoácidos com carga positiva, que formam o sítio de ligação dos

nucleotídeos. Provavelmente estes resíduos interagem com as cargas negativas dos grupos fosfatos dos nucleotídeos (ABBRACCHIO et al., 2006).

Receptores P2Y apresentam um baixo nível de identidade entre si (19-55%) (BURNSTOCK, 2007a). Do ponto de vista filogenético e estrutural, dois subgrupos foram caracterizados de acordo com a porcentagem de identidade das seqüências de aminoácidos. Estes dois grupos também diferem quanto à proteína G com a qual interagem. O primeiro grupo contém subtipos P2Y_{1,2,4,6} e ₁₁ que interagem com as proteínas G_q e G₁₁, responsáveis pela ativação da PLCβ para produção de IP₃ e diacilglicerol (DAG). O segundo grupo contém os subtipos P2Y_{12, 13} e ₁₄ que interagem com as proteínas G_i e G₀, responsáveis pela inativação da adenilil ciclase. Sabe-se ainda que o receptor P2Y₁₁ interage igualmente com as proteínas G_q/ G₁₁ e G_s (Tabela 3) (ABBRACCHIO et al., 2006).

Farmacologicamente os receptores P2Y podem ser subdivididos em: (a) receptores que respondem preferencialmente aos nucleotídeos da adenina, ATP e ADP, incluindo os receptores P2Y₁, P2Y₁₃ e P2Y₁₁; (b) receptores que respondem preferencialmente aos nucleotídeos de uracila, uridina 5'-trifosfato (UTP) ou uridina 5'-difosfato (UDP), P2Y₄ humano e P2Y₆; (c) receptores de seletividade mista, que responde igualmente ao ATP e ao UTP, P2Y₂ e P2Y₄ de roedor; e (d) receptores que respondem apenas a compostos de uracila difosfato com açúcares (UDP-glicose e UDP-galactose), como o P2Y₁₄ (Tabela 3) (ABBRACCHIO et al., 2006).

Tabela 3: Características dos receptores metabotrópicos P2Y.

Subtipo	Agonista endógeno	Agonista seletivo	Antagonista seletivo	Proteína G efetora	Efeito
P2Y ₁	ADP	MRS2365	MRS2179 MRS2279 MRS2500	G _q /G ₁₁	↑IP ₃
P2Y ₂	ATP = UTP		AR-C126313 AR-C118925	G _q /G ₁₁	↑IP ₃
P2Y ₄	ATP = UTP*			G _q /G ₁₁	↑IP ₃
P2Y ₆	UDP		MRS2578	G _q /G ₁₁	↑IP ₃
P2Y ₁₁ †	ATP	AR-C67085MX		G _s , G _q /G ₁₁	↑AMPc ↑IP ₃
P2Y ₁₂	ADP		AR-C69931MX AZD6140	G _i	↓AMPc
P2Y ₁₃	ADP		MRS2211	G _i	↓AMPc
P2Y ₁₄	UDP-Glicose			G _q /G ₁₁	↑IP ₃

AMPc, adenosina monofosfato cíclico; IP₃, Inositol 1,4,5-trifosfato.

* Receptor de roedores. O receptor humano responde preferencialmente ao UTP.

† Receptor humano. Não há equivalente em roedores

Fonte: Modificado de BURNSTOCK, 2007b.

1.4.2 Receptores purinérgicos nas células gliais

Estudos farmacológicos e de expressão de receptores revelaram uma ampla gama de receptores purinérgicos nos fenótipos gliais (Tabela 4). Inicialmente acreditava-se que a ativação dos receptores purinérgicos na glia dava-se pelo ATP liberado apenas por células danificadas ou mortas. Maiores avanços foram obtidos quando se determinou que ATP era liberado com outros neurotransmissores nas sinapses e assim podia agir sobre receptores da glia perisináptica. Portanto, pode ocorrer sinalização intercelular, mediada pelo ATP, entre neurônios e glia (FIELDS e BURNSTOCK, 2006).

Tabela 4: Receptores purinérgicos nos principais fenótipos de glia.

Receptor	Astrócito	Célula de Schwann	Oligodendrócito
Adenosina			
A ₁	R, P, F	F	R,P,F
A _{2A}	F	R, P, F	R
A _{2B}	F	R	R
A ₃	F		R
ATP ionotrópico			
P2X ₁	R, P, F		
P2X ₂	R, P, F		
P2X ₃	R, P, F		
P2X ₄	R, P, F		
P2X ₅	R, F		
P2X ₆	R, P		
P2X ₇	R, P	P, F	F
ATP metabotrópico			
P2Y ₁	R, P, F	F	F
P2Y ₂	R, F	F	F
P2Y ₄	R, F		F
P2Y ₆	R, F		F
P2Y ₁₁			F
P2Y ₁₂	F		
P2Y ₁₃			F
P2Y ₁₄	F		

Presença determinada pela detecção de mRNA (R), proteína (P) ou por evidências funcionais (F) tais como a medida da variação do Ca²⁺ intracelular por indicador fluorescente ou o registro de correntes iônicas por métodos eletrofisiológicos.

Fonte: Modificado de FIELDS & BURNSTOCK, 2006.

Além da atuação do ATP no SNC, há evidências da importância dos receptores purinérgicos na interação entre neurônio e glia também no sistema nervoso periférico. Os primeiros estudos da influência das células gliais sobre a transmissão sináptica foram realizados na junção neuro-muscular, a sinapse que ocorre entre o nervo motor e a fibra muscular. Esta extensa sinapse é encoberta por um tipo não mielinizante de células glial conhecida como célula de Schwann perisináptica (CSP). O estímulo tetânico do neurônio motor leva, com o tempo, à redução dos potenciais excitatórios pós-sinápticos no músculo esquelético em um processo conhecido como fadiga sináptica. Classicamente a fadiga sináptica é atribuída unicamente a depleção das vesículas com neurotransmissores no terminal pré-sináptico (HAYDON, 2001). Verificou-se que após a estimulação tetânica do nervo motor

ocorre aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nas CSP em preparações de anfíbios (JAHROMI et al., 1992; REIST e SMITH, 1992) e camundongos (ROCHON et al., 2001). Respostas similares foram obtidas com a aplicação de agonistas para receptores purinérgicos (ROBITAILLE, 1995; ROCHON et al., 2001). Determinou-se ainda que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nas CSP reduz a fadiga sináptica decorrente de estimulação tetânica do nervo motor (ROUSSE e ROBITAILLE, 2006). Estes resultados indicam que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ na PSC é mediado pelo ATP, liberado pelo neurônio motor, e este constitui uma via de comunicação entre a célula de glia e o terminal pré-sináptico (HAYDON, 2001).

6 CONCLUSÃO

As CSt do GRD expressam receptores purinérgicos do tipo P2, mas não o tipo P1. Os receptores expressos são de tipo metabotrópico (P2Y). O subtipo P2Y₁ predomina. Uma fração menor das CSt expressa o subtipo P2Y₆. Fração ainda menor expressa o subtipo P2Y₂ e/ou P2Y₄. Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro relato da presença de receptores purinérgicos metabotrópico em CSt provenientes do GRD.

Existe a possibilidade de que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nas CSt promova a liberação de transmissores capazes de ativar receptores de neurônios. O esclarecimento destas interações será alvo de futuras investigações.

Em culturas primárias de GRD ocorrem células de glia de aspecto fusiforme que expressam receptores P2Y. Os subtipos são P2Y₁, P2Y₂ e/ou P2Y₄ e o P2Y₆. A origem destas células e eventuais modificações fenotípicas deverá ser investigada em programa futuro. Existe a possibilidade das células fusiformes serem CSt que abandonam os neurosomas. Se esta hipótese for verdadeira, a modificação fenotípica envolve a expressão de receptores P2Y₂ e/ou P2Y₄ e P2Y₆.

REFERÊNCIAS*

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M.; BARNARD, E. A.; BOYER, J. L.; KENNEDY, C.; KNIGHT, G. E.; FUMAGALLI, M.; GACHET, C.; JACOBSON, K. A.; WEISMAN, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, n. 3, p. 281-341, 2006.
- ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. **Purinergic Signal.**, v. 2, n. 4, p. 595-604, 2006.
- ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R. P.; HAYDON, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci.**, v. 22, n. 5, p. 208-215, 1999.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 517-529, 2003.
- BIANCHI, B. R.; LYNCH, K. J.; TOUMA, E.; NIFORATOS, W.; BURGARD, E. C.; ALEXANDER, K. M.; PARK, H. S.; YU, H.; METZGER, R.; KOWALUK, E.; JARVIS, M. F.; VAN, B. T. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 376, n. 1-2, p. 127-138, 1999.
- BRINSON, A. E.; HARDEN, T. K. Differential regulation of the uridine nucleotide-activated P2Y4 and P2Y6 receptors. SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y4 receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 15, p. 11939-11948, 2001.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007a.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007b.
- BUTT, A. M. Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 666-675, 2006.
- COCO, S.; CALEGARI, F.; PRAVETTONI, E.; POZZI, D.; TAVERNA, E.; ROSA, P.; MATTEOLI, M.; VERDERIO, C. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 2, p. 1354-1362, 2003.
- COTRINA, M. L.; LIN, J. H.; VES-RODRIGUES, A.; LIU, S.; LI, J.; ZMI-GHADIMI, H.; KANG, J.; NAUS, C. C.; NEDERGAARD, M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 26, p. 15735-15740, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- DEITMER, J. W.; MCCARTHY, K. D.; SCEMES, E.; GIAUME, C. Information processing and transmission in glia: calcium signaling and transmitter release. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 639-641, 2006.
- DEITMER, J. W.; VERKHRATSKY, A. J.; LOHR, C. Calcium signalling in glial cells. **Cell Calcium**, v. 24, n. 5-6, p. 405-416, 1998.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 6, p. S27-S35, 1999. Suppl. 6.
- FIACCO, T. A.; MCCARTHY, K. D. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 676-690, 2006.
- FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 6, p. 423-436, 2006.
- FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 556-562, 2002.
- FLORES, R. V.; HERNANDEZ-PEREZ, M. G.; AQUINO, E.; GARRAD, R. C.; WEISMAN, G. A.; GONZALEZ, F. A. Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor. **Mol. Cell Biochem.**, v. 280, n. 1-2, p. 35-45, 2005.
- GEE, K. R.; BROWN, K. A.; CHEN, W. N.; BISHOP-STEWART, J.; GRAY, D.; JOHNSON, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. **Cell Calcium**, v. 27, n. 2, p. 97-106, 2000.
- GEVER, J. R.; COCKAYNE, D. A.; DILLON, M. P.; BURNSTOCK, G.; FORD, A. P. Pharmacology of P2X channels. **Pflugers Arch.**, v. 452, n. 5, p. 513-537, 2006.
- GUTHRIE, P. B.; KNAPPENBERGER, J.; SEGAL, M.; BENNETT, M. V.; CHARLES, A. C.; KATER, S. B. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 2, p. 520-528, 1999.
- HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 48, n. 3, p. 457-476, 2005.
- HANANI, M.; HUANG, T. Y.; CHERKAS, P. S.; LEDDA, M.; PANNESSE, E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 279-283, 2002.
- HASSINGER, T. D.; GUTHRIE, P. B.; ATKINSON, P. B.; BENNETT, M. V.; KATER, S. B. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 23, p. 13268-13273, 1996.
- HAYDON, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, n. 3, p. 185-193, 2001.
- HONKANEN, H.; LAHTI, O.; NISSINEN, M.; MYLLYLÄ, R. M.; KANGAS, S.; PAIVALAINEN, S.; ALANNE, M. H.; PELTONEN, S.; PELTONEN, J.; HEAPE, A. M. Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells. **Eur. J. Neurosci.**, v. 26, n. 4, p. 953-964, 2007.

HUANG, T. Y.; HANANI, M. Morphological and electrophysiological changes in mouse dorsal root ganglia after partial colonic obstruction. **Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 289, n. 4, p. G670-G678, 2005.

IINO, M. Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} signalling. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 82, n. 1, p. 15-20, 2000.

INNOCENTI, B.; PARPURA, V.; HAYDON, P. G. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 5, p. 1800-1808, 2000.

JAHROMI, B. S.; ROBITAILLE, R.; CHARLTON, M. P. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. **Neuron**, v. 8, n. 6, p. 1069-1077, 1992.

JEREMIC, A.; JEFTINIJA, K.; STEVANOVIC, J.; GLAVASKI, A.; JEFTINIJA, S. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 77, n. 2, p. 664-675, 2001.

KNOT, H. J.; LAHER, I.; SOBIE, E. A.; GUATIMOSIM, S.; GOMEZ-VIQUEZ, L.; HARTMANN, H.; SONG, L. S.; LEDERER, W. J.; GRAIER, W. F.; MALLI, R.; FRIEDEN, M.; PETERSEN, O. H. Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. **Mol. Interv.**, v. 5, n. 2, p. 112-127, 2005.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. Form and function in cells of the brain. In: ____ **The Neuron**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2002. p. 25-46.

MAYER, C.; QUASTHOFF, S.; GRAFE, P. Differences in the sensitivity to purinergic stimulation of myelinating and non-myelinating Schwann cells in peripheral human and rat nerve. **Glia**, v. 23, n. 4, p. 374-382, 1998.

METEA, M. R.; NEWMAN, E. A. Calcium signaling in specialized glial cells. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 650-655, 2006.

NEWMAN, E. A.; ZAHS, K. R. Calcium waves in retinal glial cells. **Science**, v. 275, n. 5301, p. 844-847, 1997.

NICHOLSON, S. M.; GOMES, D.; DE, N. B.; BRUZZONE, R. Altered gene expression in Schwann cells of connexin32 knockout animals. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, n. 1, p. 23-36, 2001.

NILIUS, B. From TRPs to SOCs, CCEs, and CRACs: consensus and controversies. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 293-298, 2003.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 4, p. 1013-1067, 2002.

PANNESE, E. The satellite cells of the sensory ganglia. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, v. 65, p. 1-111, 1981.

PANNESE, E.; LEDDA, M.; CHERKAS, P. S.; HUANG, T. Y.; HANANI, M. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. **Anat. Embryol.**, v. 206, n. 5, p. 337-347, 2003.

- PARPURA, V.; BASARSKY, T. A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-747, 1994.
- PARPURA, V.; BASARSKY, T. A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-747, 1994.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.
- REIST, N. E.; SMITH, S. J. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, n. 16, p. 7625-7629, 1992.
- ROBITAILLE, R. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 11, p. 7121-7131, 1995.
- ROCHON, D.; ROUSSE, I.; ROBITAILLE, R. Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 11, p. 3819-3829, 2001.
- ROMAN, L. M. Signal Transduction. In: BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. **Medical Physiology**. 2. ed. Filadélfia: Saunders, 2003. p. 87-114.
- ROUSSE, I.; ROBITAILLE, R. Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity. **Glia**, v. 54, n. 7, p. 691-699, 2006.
- SVENNINGSSEN, A. F.; COLMAN, D. R.; PEDRAZA, L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. **Neuron Glia Biol.**, v. 1, n. 1, p. 85-93, 2004.
- VERKHRATSKY, A.; ORKAND, R. K.; KETTENMANN, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 99-141, 1998.
- WANG, Z.; HAYDON, P. G.; YEUNG, E. S. Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. **Anal. Chem.**, v. 72, n. 9, p. 2001-2007, 2000.
- WEICK, M.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Resensitization of P2Y receptors by growth factor-mediated activation of the phosphatidylinositol-3 kinase in retinal glial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, n. 4, p. 1525-1532, 2005.
- ZHANG, X.; CHEN, Y.; WANG, C.; HUANG, L. Y. Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 23, p. 9864-9869, 2007.