UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Katia das Neves Gomes

Seleção *in vitro* de Aptâmeros de RNA como ligantes do Receptor Purinérgico P2Y2

São Paulo

14/07/2010

Katia das Neves Gomes

Seleção *in vitro* de Aptâmeros de RNA como Ligantes do Receptor Purinérgico P2Y2

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2010

Katia das Neves Gomes

Seleção *in vitro* de Aptâmeros de RNA como ligantes do Receptor Purinérgico P2Y2

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. ....._____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. ....._____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. ....._____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. ....._____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. ....._____

Instituição _____

Assinatura _____

Dedicatória

Ao meu maior incentivador e exemplo

de amor e simplicidade: Jesus Cristo

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Henning Ulrich por ter me concedido a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por tudo o que ele acrescentou em minha vida como ser humano e cientificamente.

Aos meus amigos do laboratório: Arquimedes, Marcelo, Cleber, Telma, Héllio, Priscilla, Enrique, Arthur, Ariane, Hugo, Fernanda, Rogério, Michelli, Talita, Katia, Josué, Viviane, Zilda, Maynara, Ísis, Carol, Lara e Angélica que tornaram os meus dias mais alegres e com os quais eu aprendi que fazer ciência pode ser muito divertido.

Ao Rodrigo, profissionalmente, por tudo o que ele me ensinou e contribuiu na minha formação, inclusive pela ajuda com os experimentos de apoptose. Como meu noivo, pelo amor que ele tem me dedicado, o qual me ajudou a vencer muitos obstáculos e me tornou uma pessoa melhor.

À Dra. Carol Elias, ao Prof. Dr. Xavier, ao Allysson, a Jô e ao Rogério pela disposição em me ajudar nos experimentos de hibridização *in situ*, meu primeiro projeto de doutorado.

À Priscilla e Claudiana que me ajudaram com o flexstation.

Ao Enrique pela sua contribuição com os experimentos de Western Blot.

À Telma pelos ensaios de proliferação e pelas caronas!

À Maynara que se prontificou em me ajudar com os ensaios de cálcio.

À Zilda e Viviane sempre dispostas a ajudar.

À Paromita, ao Josué e ao Cleber pela ajuda, apoio e pelas discussões sobre SELEX.

Aos funcionários da secretária da pós-graduação e secretaria da Bioquímica, sempre eficientes e dispostos a ajudar. Muito Obrigada!

Ao Wilton e Adriana, a alegria de você tornou as medidas de cálcio bem mais agradáveis.

Ao Dr. Gary Weisman e à Jennifer Hamilton que gentilmente me cederam as linhagens 1321N1 selvagens e expressando o receptor P2Y2 recombinante.

Ao Chico e ao Jailton, a alegria de vocês é contagiante.

Aos meus pais Antônio e Neves e à minha irmã Andresa, que são a razão, o apoio e o amor, sempre.

Ao Juca e a Esmeralda pela confiança e demonstração de carinho.

À D. Beth por ter me acolhido em sua casa.

À Luara e a Joelle pela convivência agradável.

Aos meus sogros José Maria e Neuza, por serem meus amigos e cuidarem de mim nos momentos em que eu me sentia mais frágil.

Á minha querida amiga Tatiana e família, em especial seu pai Eliseu, pelo incentivo e apoio no início desta caminhada.

À Maristela pelo incentivo, amizade, ensinamentos... mesmo distante você é muito especial.

À Prof. Dr. Renata Guerra que me incentivou a fazer o doutorado em São Paulo.

À Andréa, Tati, Carla e Núbia que acabaram de chegar à minha vida e já fazem toda a diferença.

À Beth, você me ajudou a ver a vida por outro ângulo. Muito obrigada pela sua paciência e amizade.

À minha família da Igreja Batista de Pinheiros que me acolheu, me amou e que tem me ajudado a crescer.

Ao Elias e à Fabi, foi muito bom conhecer vocês.

Ao André, à Liz e ao Murilo, amigos para todas as horas.

Ao Arquimedes, Sandrinha, Alessandra e Elba, agradeço a Deus pela amizade de vocês.

Á minha grande amiga Jaila, pelo apoio, cumplicidade... eu aprendi com você o verdadeiro sentido da amizade.

Aos queridos, Lorival e Hildete, Noel e Flor e Tereza por me sustentarem em oração e amor.

À minha família que mesmo estando longe se fez presente.

A todos os mestres que investiram na minha educação.

À educação pública que financiou toda a minha formação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que de muitas formas contribuíram para a realização deste trabalho.

Onde se poderá achar a sabedoria?
Onde habita o entendimento?
O homem não percebe o valor da sabedoria,
Ela não se encontra na terra dos viventes...
Não pode ser comprada mesmo com o ouro mais puro,
nem se pode pesar o seu preço em prata ...
O ouro e o cristal não se comparam a ela,
e é impossível tê-la em troca de jóias de ouro...
De onde vem então a sabedoria?
Onde habita o entendimento?
Escondida está dos olhos de toda a criatura viva...
Deus conhece o caminho, só ele sabe onde ela se encontra,
pois ele enxerga os confins da terra
e vê tudo o que há debaixo dos céus...
ele olhou para a sabedoria e a avaliou;
confirmou-a e a pôs à prova.
Disse então ao homem:
'No temor do Senhor está a sabedoria,
e evitar o mal é ter entendimento.'
(Jó 28:12-28)

Aquilo, pois, que vós quereis que os outros vós façam, fazei-o também a eles, esta é a lei.

(Mateus 7:12)

Sumário

Lista de Siglas e Símbolos 9
Lista de Figuras 13
Lista de Tabelas 19
Resumo 20
Abstract 22
1-Introdução 25
1.1-Receptores Purinérgicos de ATP 25
1.2-Receptor Purinérgico P2Y2 30
1.3-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 33
1.3.1- Procedimento de seleção de ligante de RNA por SELEX. 36
1.3.2- Aplicações terapêuticas 41
1.3.3- Vantagens e limitações dos aptâmeros e de seu método de seleção (SELEX) 43
2-Objetivos 48
Objetivo Geral 48
Objetivos Específicos 48
3-Materiais e Métodos 50
3.1-Cultivo das células de astrocitoma humano 1321N1 50
3.2-Cultivo das células de carcinoma embrionário murino P19 50
3.3-Extração do RNA total 51
3.4-Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase 51
3.5- Purificação dos fragmentos de PCR 52
3.6-Clonagem do cDNA no vetor pGemT-easy e transformação das bactérias DH5α 52
3.6.1-Preparação de células de bactérias competentes 52
3.6.2-Transformação das bactérias competentes 53
3.6.3-Mini preparação do DNA plasmidial das bactérias 54
3.7- Sequenciamento 54
3.8-Preparação da membrana celular 54
3.9-Western-blot 55
3.10- Medidas da variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, por imageamento de cálcio 56
3.11-Medidas da variação de cálcio intracelular por microfluorimetria 57
3.12-Ensaio de ligação radioligante receptor 58
3.13-Protocolo de SELEX 59
3.13.1-Biblioteca combianatória de DNA 59
3.13.2-Purificação da Biblioteca 60
3.13.3- Amplificação da biblioteca por PCR sujeita a erro 60
3.13.4- Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX 61
3.13.5- Purificação dos produtos das PCRs e das reações de transcrições *in vitro* 61
3.13.6-Transcrição para a produção de moléculas de RNA marcadas com $[\alpha^{32}P]ATP$ 62
3.13.7-Transcrição *in vitro* 63
3.13.8- Seleção *in vitro* 64
3.13.9- Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR) 65
3.13.10- Estringência durante os ciclos de seleções do SELEX 67
3.13.12 Caracterização dos aptâmeros 68
3.14-Amplificação das sequências dos aptâmeros por PCR 68
3.15- Ensaio para a determinação da afinidade do conjunto dos 49 aptâmeros identificados após nove ciclos de SELEX 68

3.16- Análise de restrição para monitorar o enriquecimento de sequências durante o procedimento de SELEX. 69
3.17- Medida da apoptose por citometria de fluxo 70
3.18- Análise estatística 71
4-Resultados 74
4.1- Caracterização das células 1321N1 selvagens e expressando o receptor recombinante P2Y2 humano 74
4.2-Escolha do competidor utilizado durante o procedimento de SELEX 80
4.3-Preparação da biblioteca combinatória de RNA para o procedimento de SELEX 85
4.4- Procedimento de SELEX 90
4.5- Caracterização dos aptâmeros 98
5-Discussão 119
6-Conclusões 129
7-Referências Bibliográficas 131

Lista de Siglas e Símbolos

$\Delta[Ca^{2+}]_i$: Variação de cálcio livre intracelular

°C-Grau centígrado

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µM: Micromolar

α,β-meATP: α,β-metileno adenosina trifosfato

1321N1: Célula de astrocitoma humano 1321N1

1321N1-hP2Y2: Célula de astrocitoma humano 1321N1 expressando o receptor P2Y2 humano

1321N1-mP2Y2: Célula de astrocitoma humano 1321N1 expressando o receptor P2Y2 de camundongo

2'-F dCTP: 2'-fluor-deoxicitosina-trifosfato

2'-F dUTP: 2'-fluor-deoxiuridina-5'-trifosfato

4-Br-A23187: *4-bromo-calcium ionophore A23187*, ionóforo A23187 4-bromo-cálcio

Act: β-actina

Akt: Proteína quinase específica para resíduos de Ser/Thr

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

Ap4A: Diadenosina tetrafosfato

ATPγS: Adenonisa-5'-O-(3-tio)trifosfato

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

B_{max}: Densidade do receptor na amostra

BSA: *Bovive Serum Albumine*; Albumina de soro bovino

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

cDNA: *complementar DNA*; DNA complementar

cpm: Contagem por minuto

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO: Dimetilssulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*, ácido deoxiribonucléico

DO: Densidade óptica

EC_{50}: Concentração do agonista que desencadeia 50% da resposta máxima do receptor.

EDTA: Ácido etilenodiamínico tetra-acético

ENPP: *Ecto-nucleotide phosphophosphate/phosphodiesterase*, ecto-nucleotídeo fofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase: *Ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase*, ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

EPM: Erro Padrão da Média

ERK: *Extracellular Signal Regulated Kinase*, Quinase Regulada por Sinal Extracelular

F: Fluorescência

FITC: Fluoresceína isotiocianato

Fluo 3-AM: 4-éster de(6-Acetoximetoxi-2,7-dicloro-3-oxo-9-xantenil)-4'-metil-2,2′(etilenedioxi)dianilina-N,N,N′,N'-ácido tetraacético tetraquiis(acetoximetil)

F_{max}: Fluorescência máxima

F_{min}: Fluorescência mínima

g: Grama

GFAP: Proteína Fibrilar Ácida da Glia

GPCRs: *G Protein-Coupled Receptors*, Receptores Acoplados à Proteína G

HEPES: N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

HEPES: *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*, ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

IC_{50}: Concentração da droga que inibe a ligação de 50% do radioligante ao receptor.

Ig: Imunoglobulina

IP3: *inositol-1,4,5- trisphosphate*, inositol-1,4,5-trisfosfato

K_d: constante de dissociação, concentração da droga necessária para ocupar 50% dos sítios de ligação.

L: Litro

mg: Miligrama

min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

NDPK: *Nucleoside diphosphokinase*, nucleosídeo difosfoquinase

nM: Nanomolar

NTPDase: *Ecto-nucleosidase trifosfato defosfohidrolase*, ecto-nucleosidade trifosfato defosfohidrolase

P19: Células de carcinoma embrionário murino

P2X: Receptores purinérgicos ionotrópicos

P2Y: Receptores purinérgicos metabotrópicos

P2Y2R: Receptor purinérgico P2Y2

PBS: *Phosphate Buffer Saline*, tampão fosfato salino

PC12: Células de feocromocitoma de rato

PCR: *Polimerase Chain Reaction*, Reação da Polimerase em Cadeia

PLC: Fosfolipase C

PLC: *Phosphoinositide-Specific Phospholipase C*, Fosfolipase C Fosfoinositídeo Específica

PLC-β: *Phospholipase C β*, Fosfolipase C β

PMSF: *Fhenylmethylsulfonyl Fluoride*, fluoreto de fenilmetilsulfonil

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*, Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RFU: Unidade Relativa de Fluorescência

RNA: *Ribonucleic Acid*, ácido ribonucléico

rpm-Rotações por minuto

RT: *Reverse Transcription*, Transcrição Reversa

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia

s: Segundo

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, dodecil sultato de sódio em gel de eletroforese de poliacrilamida

SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*, evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial

SFB-Soro Fetal Bovino

TAE: Tampão ácido acético EDTA

TBE: Tampão Tris EDTA ácido bórico

TBS: *Tris-Buffered Saline*, tampão tris-salino

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Up4dC: P1-(uridina 5')-P4- (2'-deoxicitidina 5')tetrafosfato

Up4U: P1,P4-di(uridina 5'-)tetrafosfato

UTPγS: Uridine-5'-*O*-(3-tio)trifosfato

UTP: Uridina 5'-trifosfato

WT: Wild Type, células selvagens

ΔF: Variação de fluorescência.

Lista de Figuras

Figura 1.1 **Esquema representativo da técnica de SELEX para o desenvolvimento de aptâmeros de RNA.** Este procedimento é caracterizado pela repetição de passos sucessivos: a incubação da biblioteca com o alvo, a separação das sequências ligadas das não ligadas, a eluição dos oligonucleotídeos complexados ao alvo, que são subsequentemente submetidos à transcrição reversa, amplificação e transcrição, para a geração de uma nova biblioteca que será usada na próxima rodada de SELEX. Geralmente, 5 a 15 ciclos são necessários para a geração de aptâmeros com afinidade e especificidade pelo seu alvo. (Adaptado de Ulrich and Trujillo, 2008). **37**

Figura 1.2 **Estrutura química dos nucleotídeos modificados.** O potencial terapêutico e diagnóstico dos aptâmeros é aperfeiçoado pela incorporação de nucleotídeos, com substituições no grupo 2'-OH da ribose, à sequência das moléculas de RNA. Aptâmeros contendo 2'-F ou 2'-NH2-pirimidina são obtidos por transcrição *in vitro* (Adaptado de Ulrich and Trujillo). **40**

Figura 3.1 **Biblioteca de DNA e iniciadores utilizados na identificação de aptâmeros de RNA por SELEX.** As sequências dos iniciadores sense e antisense estão mostradas respectivamente acima e abaixo da sequência da biblioteca parcialmente randômica. A posição do sítio da RNA polimerase T7 está em negrito e os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados. N32: posições aleatórias em que os quatro desoxinucleotídeos (A: desoxiadenosina trifosfato, C: desoxicitidina trifosfato, T: desoxitimidina trifosfato, G: desoxiguanosina trifosfato) são incorporados com igual probabilidade. Após a síntese da fita complementar e da PCR, as fitas codificantes são transcritas in vitro gerando a mistura de RNAs utilizadas para o SELEX (Ulrich et al., 2005). **59**

Figura 3.2 **Esquema de seleção *in vitro* de aptâmeros de RNA resistentes a ação de nucleases contra o receptor P2Y2.** A biblioteca de DNA, flanqueada por sítios de ligação aos iniciadores e pelo promotor da RNA polimerase T7, é transcrita em RNA. Após a reação de ligação proteína-RNA, os oligonucleotídeos com afinidade pela proteína são selecionados via filtração. As moléculas de RNA ligadas às proteínas são retidas na membrana, enquanto que as demais são eliminadas por lavagem e filtração. Para a seleção das moléculas que se ligam especificamente ao alvo, o filtro é incubado com uma solução contendo uma alta concentração de um ligante com afinidade pelo receptor de interesse (ATPγS). Os RNAs eluídos são recuperados por extração com fenol-clorofórmio, reversamente transcritos e amplificados via PCR. O *pool* resultante é utilizado em um novo ciclo, ou então, clonado, seqüenciado e caracterizado. (2´F-Py: 2´F-pirimidina). **66**

Figura 4.1 **Detecção do perfil da expressão gênica e protéica do receptor purinérgico P2Y2 nas células de astrocitoma humano 1321N1 selvagens e transfectadas com o vetor pLXSN contendo a sequência codificante do receptor purinérgico P2Y2 de humano.** (A) A expressão gênica do receptor P2Y2 foi detectada através de RT-PCR usando RNA total tratado (*) ou não com DNAse. A avaliação da expressão gênica da β-actina foi utilizada como controle interno para normalizar e averiguar a integridade do RNA total. Utilizou-se o padrão de massa molecular de 100 pb, SM0241, da Fermentas. (B) Detecção da expressão protéica de P2Y2R por Western Blot. WT: 1321N1 selvagem. **76**

Figura 4.2 **Elevação na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela ativação do receptor purinérgico P2Y2 em células 1321 N1 expressando o receptor purinérgico P2Y2 de humano.** Os painéis superiores representam traçados típicos da variação de $[Ca^{+2}]_i$ mediada pela ativação do receptor P2Y2 por 100 μM de ATP, 100 μM de UTP, 100 μM de ATPγS, 100 μM de α,βMeATP e 100 μM de ATP em células pré-incubadas por 10 min com 30 μM de suramina ou 100 μM de suramina (Sura). As setas indicam o momento de aplicação dos agonistas. Os painéis inferiores apresentam os valores correspondentes à $\Delta[Ca^{2+}]_i$. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de 3 experimentos independentes. O número de células estudadas em cada experimento foi de aproximadamente 45. * $p < 0,05$ comparado aos valores obtidos com a aplicação de 100 μM de ATP, **$P< 0,001$ comparado aos valores da aplicação do de 100 μM de ATP. **78**

Figura 4.3 **Curvas de concentração-ativação das células 1321N1-P2Y2 pelos agonistas ATP e ATPγS.** A mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, induzida por diferentes concentrações dos agonistas ATP (A) e ATPγS (B) foi monitorada por microfluorimetria usando Flexstation 3. Os dados apresentados no gráfico representam a média dos valores ± E.P.M de três experimentos independentes. RFU: unidade relativa de fluorescência. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prim 4. **79**

Figura 4.4 **Variação da $[Ca^{2+}]_i$ nas células de astrocitoma humano 1321N1 selvagens.** Imagens representativas da variação da $[Ca^{2+}]_i$ seguida pela estimulação das células 1321N1 por 100 μM de ATP, 100 μM αβmetilATP e 1 mM de carbamoilcolina. Ao final de cada medida o ionóforo 4-Br-A23187 era adicionado para verificar a viabilidade celular e a resposta máxima ao Ca^{2+} .Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata. **81**

Figura 4.5 **Tempo decorrido para a associação do radioligante, [α-^{32}P]ATP, ao receptor.** Experimentalmente, este ensaio é suficiente para determinar o tempo no qual não há mais aumento da ligação, uma condição chamada estado estacionário, em que a taxa de associação do radioligante é igual à sua taxa de dissociação. O estado **83**

estacionário é determinado pela medida da quantidade de radioligante associado ao receptor em vários tempos após o início da incubação. Para este gráfico o estado estacionário está entre 40 e 60 minutos. A concentração do [α-^{32}P]ATP foi de 1,7 nM, 1μCi. Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Figura 4.6 **Experimento de competição.** Várias concentrações do ligante não marcado (ATPγS, suramina) foram incubadas com o receptor na presença de uma concentração fixa do radioligante. Os dados estão apresentados como porcentagem da ligação do [α-^{32}P]ATP às células 1321N1-hP2Y2 na ausência do competidor. Em **A** está o ensaio com a suramina e em **B** com o ATPγS. As curvas foram plotadas utilizando o programa GraphPad Prism 4. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de 3 experimentos independentes para a curva de competição da suramina e 2 experimentos para a do ATPγS. **84**

Figura 4.7 **Ensaio de competição homóloga para a ligação do ATP às células de astroglioma humano 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2**. As células 1321N1-P2Y2 (2x10^5 células) foram incubadas com [α-^{32}P]ATP (1.665 nM, 1 μCi) na presença e ausência de crescentes concentrações de ATP (0.001 μM to 3000 μM).Os parâmetros Kd e Bmax foram determinados pela análise dos dados por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 4. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de 2 experimentos independentes. **86**

Figura 4.8 **Preparação da biblioteca de RNA.** Trezentos e trinta microgramas da biblioteca de DNA simples fita foram aplicados em um gel de poliacrilamida desnaturante 8%. A banda correspondente ao oligonucleotídeo de interesse, 100 bases, foi purificada e a mistura de DNA simples fita foi utilizada para a síntese da segunda fita de DNA através de uma reação enzimática com a Taq polimerase. O próximo passo foi a padronização do número de ciclos para a PCR sujeita a erro. Consideramos que em aproximadamente 8 a 10 ciclos há a amplificação de uma quantidade razoável de material sem a formação de multímeros. Após a PCR sujeito a erro, uma alíquota deste material foi utilizada para uma transcrição *in vitro* com [α-^{32}P]ATP. O produto da transcrição foi submetido a eletroforese em gel desnaturante a 8%, o qual foi auto-radiografado. **88**

Figura 4.9 **Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX.** A biblioteca de DNA simples, purificada previamente, foi utilizada como molde para a síntese enzimática da segunda fita, a qual é amplificada por uma PCR sujeita a erro. Uma alíquota desta reação é clonada em pGem Teasy. (A) Trinta e nove clones foram seqüenciados. A análise da randomicidade da biblioteca é avaliada pela porcentagem de cada nucleotídeo na amostra (C) e pela frequência dos pares dos nucleotídeos (B). Abreviações: A= desoxiadenosina monofosfato, **89**

G= desoxiguanosina monofosfato, C=desoxicitidina monofosfato, T= desoxitimidina monofosfato, N=desoxinucleotídeos não identificado na reação de sequenciamento.

Figura 4.10 **Ensaio de ligação radioligante-P2Y2 usando as coleções de RNAs selecionadas durante os ciclos reiterativos da técnica SELEX**. O enriquecimento das moléculas de RNA com afinidade pelo receptor purinérgico P2Y2 foi monitorado pela ligação específica do *pool* de RNAs radiomarcado com [α^{32}P]ATP à linhagem celular 1321 N1 selvagem (WT) e expressando o receptor recombinante P2Y2 humano (P2Y2). A ligação inespecífica foi determinada na presença de 2 mM de ATPγS. A ligação específica se refere a ligação total menos a ligação inespecífica. Em **A**: ensaio realizado com as células 1321N1-hP2Y2 e os ciclos 0, 1,2,3 e 4. Em **B**: monitoramento da afinidade do ciclo 3 pelas células 1321N1 selvagem e expressando o receptor P2Y2 recombinante. Os dados foram plotados como a razão entre a concentração de radioligante que se liga à célula pela concentração de radioligante livre. **92**

Figura 4.11 **Monitoramento da evolução do procedimento de SELEX contra o receptor purinérgico P2Y2.** Para estimar a complexidade do *pool* durante cada ciclo de SELEX, realizamos uma análise por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): 2 µg de DNA dupla fita, correspondentes à população de oligonucleotídeos de cada ciclo, foi digerido com uma combinação das endonucleases de restrição *Dde*I, *Alu*I, *Hha*I e *Ssi*I e analisado por eletroforese em um gel de poliacrilamida nativo de 16%. Os fragmentos de DNA foram corados com SYBR safe DNA gel stain. As bandas de 100 pb e de 76 pb correspondem, respectivamente, as moléculas de DNA não digeridas e digeridas pela A*lu1* na posição 14 da região constante. Linhas 1-9: ciclos1-9, linha 10: digestão da mistura dos 46 clones identificados por seqüenciamento, linha 11: sequências não digeridas, linha 12: padrão de massa molecular FastRuler Ultra Low Range, SM1238, Fermentas. **97**

Figura 4.12 **Curva para a determinação do B_{max} e do K_d, da mistura dos 46 aptâmeros caracterizados no ciclo 9, em relação à ligação destes à preparação de proteínas de membrana da célula 1321N1-hP2Y2.** Várias concentrações dos aptâmeros, radiomarcados com ^{32}P, foram incubados com 3µg de proteína do extrato de membranas das células 1321N1-hP2Y2. Após incubação, o complexo foi aplicado em um gel de poliacrilamida não desnaturante 5%. Após eletroforese, o gel foi exposto ao cassete phosphor imaging para digitalização e análise. A ligação inespecífica foi verificada na presença de 1µM da mistura dos aptâmeros não radiomarcados. A curva foi plotada utilizando o programa GraphPad Prism 4. **99**

Figura 4.13 **Estruturas secundárias dos aptâmeros A1, A2 e B7**. As seqüências dos aptâmeros foram inseridas no programa mfold para predizer a estrutura secundária dos RNAs. Os aptâmero B7, A2 e A1 são representantes das classes I, II e III, respectivamente. Os **102**

nucleotídeos das sequências consensos estão indicados com setas vermelhas.

Figura 4.14 **Ensaio de competição homóloga para a ligação do ATP às células de astroglioma humano 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2 de camundongo**. As células 1321N1-P2Y2 ($3x10^4$ células) foram incubadas com [α-^{32}P]ATP (1,7 nM) na presença e ausência de crescentes concentrações de ATP (0.1 μM a 1000 μM) para um volume final de 50 μl. Os parâmetros Kd e Bmax foram determinados pela análise dos dados por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 4. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de 2 experimentos independentes. **104**

Figura 4.15 **Ensaio de competição. A-** Curva de competição radioligante receptor. Várias concentrações dos aptâmeros não radiomarcados (A1, A2, B7 e o ciclo 5 de um procedimento de SELEX contra *Trypanosoma cruzi*) foram incubadas com $3x10^5$ células 1321N1-P2Y2 na presença de uma concentração fixa de [α-^{32}P]ATP (1,7 nM). **B-** Ensaio avaliando a capacidade dos compostos ATPγS; Aptâmeros A1, A2 e B7; ciclo 0, ciclo 5 do SELEX contra *Trypanosoma cruzi* e yeast tRNA de competir com [α-^{32}P]ATP. As concentrações dos compostos utilizadas estão especificadas no gráfico. (*) Transcrição tratada com apirase. Os dados estão apresentados como porcentagem da ligação do [α-^{32}P]ATP às células 1321N1-mP2Y2 na ausência de um competidor. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de pelo menos 4 experimentos independentes. **106**

Figura 4.16 **Ensaio de competição homóloga Aptâmero B7 e ciclo 0.** Uma concentração de 2,8 nM (137,5 fmol) do aptâmero radiomarcado com ^{32}P-ATP foi incubada com $3x10^4$ células 1321N1-P2Y2 na presença ou ausência de concentrações crescentes do mesmo não radiomarcado para um volume final de 50 μl. Os ensaios foram realizados a 25°C com um tempo de incubação de 30 min. Decorrido o tempo necessário para o equilíbrio de ligação ser atingido, as células foram lavadas duas vezes com 50 μl de meio extracelular e então solubilizadas em solução contendo 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 100 mM de citrato de sódio por 30 min. A radioatividade foi quantificada na presença de líquido de cintilação. Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4. **108**

Figura 4.17 **Ensaio de competição homóloga Aptâmero B7.** Uma concentração de 1,1 nM (55 fmol) do aptâmero radiomarcado com ^{32}P-ATP foi incubada com $3x10^4$ células na presença ou ausência de concentrações crescentes do mesmo não radiomarcado, para um volume final de 50 μl. Os ensaios foram realizados a 25°C com um tempo de incubação de 40 min. Em **A:** curva de competição realizada com as células 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y1. Em **B:** curva de competição utilizando a **110**

linhagem 1321N1 expressando o receptor P2Y4. Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4.

Figura 4.18 **Indução à apoptose de células P19 indiferenciadas.** As células P19, carenciadas e cultivadas na presença de SFB, foram submetidas aos seguintes tratamentos: 10 μM de ciclo 0 (biblioteca); 100 μM de ATP; 2,5 μM do aptâmero B7; 2,5 μM do aptâmero B7 e 100 μM de ATP, e então coradas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). As barras mostram a distribuição das células (média de três experimentos) analisadas por citometria de fluxo. O gráfico permite a comparação direta das porcentagens de células que se encontram nas seguintes condições: células necróticas (PI positivo, anexina V negativa); células mortas (anexina V/PI positivos); células apoptóticas (anexina V positiva) e células vivas (anexina V e PI negativas). Controle: células não tratadas. **113**

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 **Receptores purinérgicos, seus agonista endógenos e propriedades de suas vias de sinalização** (adaptada de Lazarowki and Boucher, 2009 e Abbracchio et al.,2008). **29**

Tabela 3.1 **Evolução da estringência de seleção durante o protocolo de SELEX.** **67**

Tabela 4.1 Estruturas primárias dos aptâmeros de RNA selecionados contra o receptor purinégico P2Y2. Após nove ciclos de seleção, as sequências de RNA foram reversamente transcritas, ligadas ao vetor pGEM T easy e transformadas em *E. coli* cepa DH5α. Cinqüenta clones foram identificados e seqüenciados. Os oligonucleotídeos foram divididos em três classes de acordo com as regiões consensos: classe I CCUCGCUG, classe II AGUUCACUUC e classe III AAUUCUC. Na tabela podem-se visualizar as posições, os nucleotídeos, e as frequências dos nucleotídeos conservados dentro das regiões randômicas das sequências analisadas. **94**

Tabela 4.2 **Indução à apoptose de células P19 indiferenciadas.** As células P19, carenciadas e cultivadas na presença de SFB, foram submetidas aos seguintes tratamentos: 2,5 μM de ciclo 0 (biblioteca); 100 μM de ATP; 2,5 μM do aptâmero B7; 2,5 μM do aptâmero B7 e 100 μM de ATP. Após duas horas de incubação, elas foram coradas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e então analisadas por citometria de fluxo. **114**

Tabela 4.3 **P-valores obtidos da comparação estatística utilizando o teste t de Student.** **115**

Tabela 4.4 **Nível descritivo do teste t (P-valor) para a comparação estatística entre células mantidas em soro e as células carenciadas.** **116**

Tabela 4.6 **Expressão Diferencial dos Receptores Purinérgicos Durante a Diferenciação Neuronal de células de carcinoma embrionário murino P19.** A expressão protéica dos subtipos dos receptores P2X e P2Y foi avaliada, por imunofluorescência, em células P19 indiferenciadas (Ind), progenitores neurais (dia 4, D4), durante a fase final da diferenciação (dia 6, D6) e em neurônios P19 (dia 8, D8) (Resende et al., 2007). **117**

Resumo

(Gomes, K.N.) **Seleção *in vitro* de Aptâmeros de RNA como ligantes do Receptor Purinérgico P2Y2.** 142 p. 2010. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Vários estudos têm apontado a sinalização e os receptores purinérgicos, representados em mamíferos pelos receptores ionotrópicos (P2X1 – P2X7) e metabotrópicos (P2Y1,2,4,6, 11,12,14), como um sistema primitivo, envolvido não somente na sinalização neuronal, mas também em muitos outros processos vitais incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária e nos processos de diferenciação, proliferação e morte celular, que ocorrem no desenvolvimento e na regeneração tecidual. Condizente com as descrições da literatura, dados do nosso laboratório, baseados na farmacologia dos receptores purinérgicos, sugeriram o envolvimento do subtipo P2Y2 na proliferação e na neurogênese *in vitro* de células de carcinoma embrionário P19. Tendo em vista a ausência de agonistas e antagonistas específicos para a maioria dos subtipos de receptores purinérgicos, o que vem dificultando a elucidação das funções exatas desses receptores em processos fisiológicos e patológicos, optamos para o *screening* de uma biblioteca combinatória de oligonucleotídeos para a identificação de ligantes de alta afinidade e especificidade para o receptor P2Y2 (procedimento de SELEX, Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Essa abordagem envolve passos reiterativos de seleção *in vitro* de moléculas de RNA, estabilizadas por substituição do grupo 2´OH das pirimidinas por um átomo de flúor, que possuem afinidade pelo receptor, até que a mistura de RNAs, originalmente de 10^{13} diferentes seqüências que adotam uma gama de estruturas secundárias e terciárias, esteja purificada para uma população homogênea de ligantes de alta afinidade pelo receptor P2Y2. O processo envolve a transcrição *in vitro* da biblioteca de DNA para RNA, a apresentação desta ao alvo, a eluição dos ligantes específicos, denominados aptâmeros, e a regeneração da biblioteca de DNA por RT-PCR, a qual, após uma reação de transcrição *in vitro*, gera a

mistura de RNAs para o próximo ciclo de seleção. Neste trabalho, nós utilizamos como alvo o receptor P2Y2 recombinante humano expresso na linhagem de células de astroglioma humano 1321N1. Ao final de nove ciclos de SELEX, nós isolamos 46 sequências que foram agrupadas em três classes estruturais, de acordo com a presença de regiões consensos. A mistura destas moléculas se ligou ao receptor P2Y2 humano com uma constante de dissociação de 164 nM. Um dos clones isolados, o aptâmero B7, se ligou preferencialmente ao receptor P2Y2 (K_d 184 nM), em relação aos receptores P2Y1 e P2Y4 recombinantes expressos em células 1321N1. A interação deste aptâmero não foi dependente da espécie, uma vez que ele foi capaz de se ligar tanto ao receptor P2Y2 de origem humana como murina. A atividade biológica do aptâmero foi avaliada em células P19 (sabidamente expressando receptores P2Y2 endógenos), na qual a proteção do ATP contra a apoptose, provavelmente interagindo com o receptor P2Y2, foi anulada na presença deste aptâmero em uma concentração mil vezes menor do que a do ATP. Além de confirmar a viabilidade da técnica SELEX para identificar ligantes subtipos-específicos dos receptores purinérgicos, o aptâmero anti-P2Y2 serve como ferramenta fundamental para definir demais funções fisiológicos deste receptor. Passos de otimização das sua propriedades como ligante e biodisponibilidade tornarão este aptâmero um composto de alta relevância farmacêutica.

Palavras Chaves: Receptores purinérgicos, P2Y2, SELEX, aptâmero.

Abstract

(Gomes, K.N.) **In vitro selection of RNA aptamers as ligands of P2Y2 purinergic receptors.** 2010.142 p. PhD Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Many published studies have focused on purinergic signaling and receptors, represented by ionotropic (P2X1 – P2X7) and metabotropic (P2Y1,2,4,6,11,12,14) subtypes as a universal system which is not only involved in neuronal signaling, but also in various other vital processes including immune response, inflammation, platelet aggregation as well as differentiation, proliferation and cell death occurring during development and tissue regeneration. In agreement with other published reports, results of our laboratory based on overlapping purinergic receptor pharmacology suggest the participation of the P2Y2 subtype in proliferation and in vitro neurogenesis of P19 embryonal carcinoma cells. In view of the lack of availability of specific agonists and antagonists for most purinergic receptors making the elucidation of exact functions of these receptors in their cellular context almost impossible, we used a combinatorial oligonucleotide library approach, denominated SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) for the development of high-affinity and specificity ligands for the P2Y2 receptor. This approach is based on re-iterative steps of in vitro selection of 2´-fluoro-pyrimidine-modified RNA molecules for receptor-binding affinity from an RNA pool containing 10^{13} different sequences and secondary and tertiary structures until this pool is purified to a homogeneous population of ligands with high affinity to the P2Y2 receptor. The combinatorial DNA library is in vitro transcribed into RNA followed by target presentation of the RNA library and elution of the target-binders, denominated aptamers, and RT-PCR amplification in order to restore the DNA library used for in vitro transcription for next SELEX cycle. Following nine SELEX cycles using 1321N1 human astroglial cells expressing recombinant human P2Y2 receptors as target, we isolated 46 aptamer sequences which, based on consensus sequence motifs, were grouped in three

structural groups. The mixture of the isolated sequences bound themselves to human P2Y2 receptors with a dissociation constant (K_d) of 164 nM. One of the isolated clones, the aptamer denominated B7, bound itself to P2Y2 receptors in preference to P2Y1 and P2Y4 recombinant receptors expressed in 1321N1 cells. The binding activity of the aptamer was not limited to P2Y2 receptors of human origin, as the aptamer also interacted with mouse P2Y2 receptors. The capability of the aptamer of affecting the biological activity of P2Y2 receptors was verified in P19 cells in which ATP-induced protection against apoptosis, mediated by P2Y2 receptors, was abolished in the presence of the aptamer. In addition to providing a proof of principle for the feasibility of developing purinergic subtype-specific ligands by using the SELEX technique, the anti-P2Y aptamer provides a fundamental tool for gaining insights of physiological functions of this receptor in various cellular contexts. Moreover, steps of optimization of receptor binding properties and aptamer half-life in vivo will turn this aptamer into a compound of high pharmaceutical relevance.

Keywords: Purinergic receptors, P2Y2, SELEX, aptamer.

INTRODUÇÃO

1-Introdução

1.1-Receptores Purinérgicos de ATP

A molécula de adenosina 5'-trifosfato, o ATP, foi descoberto, simultaneamente e independentemente, na Alemanha e nos Estados Unidos por Karl Lohman (Lohman, 1929) e por Ciro Hartwell Fiske e Subarrow Yellagaprada (Fiske and SubbaRow, 1929) em 1929 (Maruyama, 1991). A primeira noção de que as purinas, em adição ao seu papel intracelular, também atuam como potentes moléculas sinalizadoras extracelulares, nasceu em 1929, quando Drury e Szent-Györgyi constataram que a administração intravenosa de adenosina era capaz de promover alterações nos batimentos cardíacos, diminuição da pressão arterial e inibição da contração intestinal (Drury and Szent-Györgyi, 1929).

Trinta anos depois, Pamela Holton, usando um método específico para a detecção de ATP (Firefly Luminescence Method, descrito por Strehler and Totter, 1952, 1954), observou que a estimulação elétrica de nervos auriculares de coelho resultou em elevação transitória do ATP extracelular. Com base neste experimento, Holton sugeriu que: “quando a noradrenalina é liberada a partir de terminações nervosas simpáticas, o ATP também pode ser liberado para o espaço extracelular”, estabelecendo assim uma base para a teoria de que o ATP poderia participar da transmissão no sistema nervoso (Holton, 1929).

Contudo, o conceito “transmissão purinérgica” foi introduzido por Geoffrey Burnstock em 1972 (Burnstock, 1972), a partir de seus relatos anteriores que demonstravam a existência de uma neurotransmissão inibitória mediada pelo ATP em nervos do trato gastrointestinal de animais de várias espécies (Burnstock et al., 1970). Durante algum tempo, houve resistência ao conceito da neurotransmissão purinérgica, talvez pelo fato do ATP ser bem estabelecido como uma molécula chave nas conversões de energia no ambiente intracelular, contudo, os dados que corroboravam esta idéia foram sendo confirmados e atualmente este conceito é bem estabelecido (North and Verkhratsky, 2006).

A sinalização purinérgica é iniciada com a liberação do ATP para o meio extracelular. Os mecanismos envolvidos neste processo não estão totalmente estabelecidos. Por algum tempo, acreditava-se que o ATP era liberado unicamente por células danificadas ou via exocitose (Bodin and Burnstock, 2001). Contudo, sabe-se atualmente que muitos tipos celulares liberam ATP fisiologicamente em resposta a diferentes sinais como distorção mecânica e hipóxia (Bodin and Burnstock, 2001, North and Verkhratsky, 2006). Os mecanismos de transporte atualmente debatidos incluem, além da liberação vesicular, a liberação via membros da família de proteínas ABC (ATP-Binding Cassette), hemicanais, junções tipo gap ou mesmo o receptor P2X7 (Bodin and Burnstock, 2001).

Uma vez fora da célula, o ATP e outros nucleotídeos têm uma meia vida medida em segundos, como resultado de um complexo conjunto de nucleotidases que degradam o ATP e geram ADP, AMP e adenosina. A ação das ectonuclotidases é funcionalmente importante, já que os metabólitos do ATP atuam como ligantes fisiológicos de vários receptores purinérgicos (Abbracchio et al., 2008). As famílias das ectonucleotidases incluem: as E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases), fosfatase alcalina e a ecto-5’-nucleotidase. Individualmente, as enzimas diferem na especificidade ao substrato e na formação do produto: as E-NTPDases e E-NPPs hidrolisam o ATP e ADP a AMP, o qual é posteriormente quebrado à adenosina pelas ecto-5’-nucleotidases. As fosfatases alcalinas hidrolisam igualmente nucleosídeos tri, di e monofosfato. Os dinucleosídeos polifosfatos, o NAD+ e o UDP açúcares são substratos unicamente das E-NPPs (Zimmermann, 2001, Abbracchio et al., 2008,). Algumas dessas enzimas possuem distribuição característica em diferentes tipos celulares e são reguladas durante processos fisiológicos e patofisiológicos, provavelmente em associação com a sinalização purinérgica (Novak, 2003).

Desta forma, como uma molécula de sinalização extracelular, o ATP e seus metabólitos exercem suas funções via uma ampla variedade de receptores, denominados receptores purinérgicos (a nomenclatura segue Alexander et al., 2008), sendo que estes são divididos em duas classes distintas: os receptores P1, ativados por adenosina, e os receptores P2, sensíveis ao ATP e a seus análogos (subdivisão proposta por Burnstock em 1978). Os receptores de adenosina pertencem à família de receptores de membrana acoplados à proteína G e englobam quatro subtipos: A1, A2A A2B e A3. Os receptores P2 por sua vez são subdivididos em P2X e P2Y (Abbracchio et al., 2008).

Os receptores P2X são canais iônicos operados por ligante. Sete subunidades destes receptores já foram identificadas (P2X1-P2X7), sendo que estas podem formar receptores homodiméricos e/ou heterodiméricos, agrupando três subunidades. A ligação do ATP aos receptores P2X desencadeia uma mudança conformacional e um poro transmembranar é revelado, permitindo o influxo de cátions como o Na^{+} e o Ca^{+2} (Abbrancchio et al., 2008, Dale and Frenguelli, 2009).

Os receptores P2Y pertencem à superfamília de receptores de membrana acoplados à proteína G, apresentando a topologia típica desta família (sete α-hélices transmembrana, um domínio N-terminal extracelular e um domínio C-terminal intracelular). Até o momento foram clonados e caracterizados oito subtipos em mamíferos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14, sendo que estes apresentam uma diversidade relativamente alta na composição de aminoácidos (19-55% de similaridade), mostrando diferenças significativas em seus perfis farmacológicos e operacionais. Ao contrário dos receptores P2X, que em ambiente fisiológico, são ativados por ATP, os subtipos de receptores P2Y possuem farmacologia diferenciada: os receptores purinérgicos de humano P2Y1 (ADP), P2Y6 (UDP), P2Y12 (ADP) e o P2Y13 (ADP) são ativados principalmente por nucleosídeos difosfato, o P2Y14 por UDP glicose, enquanto os receptores P2Y2 (ATP, UTP), P2Y4 (UTP) e P2Y11

(ATP) são ativados por nucleosídeos trifosfato. (Abbracchio et al., 2006, Abbracchio et al., 2008) (tabela 1.1).

Com base na similaridade filogenética, na presença de aminoácidos importantes para a ligação dos ligantes e na seletividade de acoplamento a subtipos da proteína G, os membros da família de receptores P2Y foram divididos em dois subgrupos: o composto por P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 e o subgrupo formado por P2Y12, P2Y13 e P2Y14. O primeiro subgrupo usa principalmente G_q/G_{11} para ativar a PLC (fosfolipase C), levando à formação de IP3 (inositol 1,4,5-trifofosfato) e à mobilização de cálcio a partir de estoques intracelulares, enquanto os receptores do segundo subgrupo se acoplam quase exclusivamente à membros da família de proteínas $G_{i/o,}$ levando à inibição da adenilato ciclase e à inibição de canais iônicos. Também é possível o acoplamento do mesmo receptor P2Y à diferentes proteínas G, indicando que a sinalização desencadeada por um agonista específico envolva distintas conformações ativas do receptor (Abbracchio et al., 2006, Abbracchio et al., 2008). Como exemplo há o receptor P2Y11, sua ativação pelo ATP leva à elevação dos níveis de cAMP, de IP3 e do cálcio citosólico, enquanto sua ativação pelo UTP desencadeia a mobilização de cálcio para o citosol sem o aumento da concentração de cAMP e de IP3 (White et al., 2003) (tabela 1.1).

Tabela 1.1- Receptores purinérgicos, seus agonista endógenos e propriedades de suas vias de sinalização (adaptada de Lazarowki and Boucher, 2009 e Abbracchio et al., 2008).

	Agonista endógenos (humano)	**Sinalização**
Receptores P1		
A1, A3	Adenosina	Gi → ↓AC/↓cAMP
A2a, A2b	Adenosina	Gs → AC/cAMP
Receptores P2X		
P2X1-P2X7	ATP	Canal de cátion operado por ATP
Receptores P2Y		
P2Y1	ADP	Gq/PLCβ→ Ca^{2+}/PKC
P2Y2	ATP=UTP	Gq/PLCβ→ Ca^{2+}/PKC
P2Y4	UTP	Gq/PLCβ→ Ca^{2+}/PKC
P2Y6	UDP	Gq/PLCβ→ Ca^{2+}/PKC
P2Y11	ATP	Gq/PLCβ→ Ca^{2+}/PKC e Gs→AC/cAMP
P2Y12	ADP	Gi → ↓AC/↓cAMP
P2Y13	ADP	Gi → ↓AC/↓cAMP
P2Y14	UDP-glicose, UDP-galactose	Gi → ↓AC/↓cAMP

PLC: fosfolipase C, PKC: proteína quinase C, AC: adenilato ciclase , cAMP: AMP cíclico, ↓: inibição.

Várias descrições da literatura têm apontado os receptores purinérgicos como um sistema primitivo, envolvido não somente na sinalização neuronal, mas também em processos como: resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária e em eventos como a diferenciação, proliferação e morte celular, que ocorrem no desenvolvimento e na regeneração tecidual (para revisão Burnstock 2006a, 2007a, Burnstock and Knight, 2004, Abbracchio and Burnstock, 1998).

Contudo, em muitos casos, a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores purinérgicos envolvidos em cada processo e, portanto, a identificação de prováveis alvos terapêuticos, tem sido dificultada pela reduzida disponibilidade de ligantes específicos para cada subtipo destes receptores (von Kügelgen, 2006). Desta forma, pretendemos utilizar a técnica SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), como uma abordagem, para o desenvolvimento de ligantes específicos contra o receptor purinérgico P2Y2 (para revisão Ulrich et al., 2004, 2005, 2006).

A escolha do receptor purinérgico P2Y2 como alvo para o desenvolvimento de ligantes específicos, baseia-se em resultados obtidos previamente em nosso laboratório. Empregando a linhagem de carcinoma embrionário P19 como modelo para a diferenciação neuronal, Resende et al., usando diversos agonistas e antagonistas dos receptores purinérgicos, demonstraram a participação dos receptores P2Y1 e P2Y2 na indução da proliferação e no processo de diferenciação neuronal deste modelo (Resende et al., 2007 e 2008). Não cogitamos ter como alvo o receptor P2Y1 pelo fato de que este, juntamente com o receptor P2Y12, é um dos poucos subtipos purinégicos que possui ligantes sintéticos específicos descritos (Abbrancchio et al., 2006).

1.2-Receptor Purinérgico P2Y2

O receptor purinérgico P2Y2 já foi clonado e caracterizado farmacologicamente em várias espécies incluindo: humanos, ratos e camundongos (Parr et al., 1994, Chen et al., 1996, Lustig et al., 1993). Este receptor é amplamente distribuído no corpo humano, sendo que o seu mRNA já foi detectado em tecidos do músculo esquelético, coração, sistema nervoso, baço, pulmão, medula óssea, linfócitos, macrófagos e com um nível menor de expressão no fígado, estômago e pâncreas (Moore et al., 2001).

O receptor P2Y2 é estimulado por ATP e UTP, com similar potência e eficácia, e pelos nucleotídeos modificados UTPγS e ATPγS (Parr et al., 1994, Lustig et al., 1993, Lazarowski et al., 1995a, Lazarowski et al.,1995b). Quando sua atividade é estudada em condições que garantem a ausência de enzimas conversoras de nucleotídeos, o ADP e UDP não atuam como agonistas (Nicholas et al., 1996), indicando que pelo menos três resíduos de fosfato são necessários para sua ativação. Em adição aos nucleosídeos trifosfato, o P2Y2R responde aos dinucleotídeos, diadenosina tetrafosfato (Ap4 A; Patel et al., 2001), Up4U (diquafosol, INS365; Pendergast et al., 2001) e Up4dC (denufosol, INS 37217 Kellerman et al., 2002), sendo que os dois últimos estão em teste clínico para o tratamento de pacientes com a síndrome dos olhos secos (Tauber et al., 2004) e fibrose cística (Yerxa et al., 2002), respectivamente.

A suramina atua como um fraco antagonista competitivo dos receptores P2Y2 de humanos (Charlton et al., 1996a, 1996b). AR-C126313 e AR-C118925 também os inibem com afinidade na faixa de micromolar (Kindon et al.,1998). Alguns flavonóides e seus derivados, como a tangeretina, foram capazes de bloquear, de forma não competitiva, o receptor P2Y2 em células NG108-15 (hibridomas de neuroblastoma de camundongo X glioma de rato) (Kaulich et al 2003).

Apesar dos inúmeros esforços no sentido de desenvolver ligantes contra o receptor P2Y2, é importante ressaltar que, as moléculas até então descritas possuem limitações quanto à seletividade, potência e resistência às nucleotidases (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009).

Trabalhos da literatura têm descrito a relevância destes receptores em diversos processos biológicos: a ativação do receptor P2Y2 no epitélio das vias aéreas promove a absorção de Na^+, a secreção de Cl^- dependente e independente de CFTR (Regulador de Condutância transmembranar da fibrose cística), bem como o batimento ciliar e a secreção de

muco, processos que estão alterados em determinadas patologias que acometem as vias respiratórias, como a fibrose cística e a bronquite crônica (Kellerman, 2002; Kellerman et al., 2002, Yerxa et al., 2002; Novak, 2003, Lazarowski and Boucher, 2009). Na conjuntiva, seus agonistas estimulam a secreção de lágrimas, sendo alvos para terapia de pacientes com síndrome dos olhos secos (Yerxa, 2001).

A estimulação do receptor P2Y2 também está associada ao aumento da síntese e/ou liberação de ácido araquidônico, prostaglandinas e óxido nítrico (Weick et al., 2003, Xu et al., 2003) e a elevação da sua expressão em células musculares é regulada por agentes que medeiam a inflamação, incluindo, interleucina(IL)-1β, interferon (IFN)-γ e fator de necrose tumoral (TNF)-α (Hou et al., 2000).

Em astrócitos, Camden et al. demonstraram que a ativação de P2Y2R estimula o processamento da proteína precursora do amilóide (APP) dependente da α-secretase, gerando o peptídeo não amiloidogênico e neuroprotetor sAPPα. Esta descoberta sugere o papel neuroprotetor do P2Y2R em desordens neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (Camden et al.,2005).

Além disso, trabalhos têm demonstrado a relevância destes receptores em mecanismos de sobrevivência celular e neuroproteção em casos de injúria neuronal. Por exemplo, usando análises de microarranjo de cDNA e RT-PCR, Chorna et al. observaram que o receptor P2Y2 regula positivamente a expressão de genes conhecidos por modular a neuroproteção, incluindo o fator de crescimento de nervos 2 (FGF-2), neurotrofina 3, bem como proteínas da matrix extracelular CD44 e o precursor de fibronectina. Consistente com esta observação, no mesmo trabalho, Chorna et al. verificaram que o meio condicionado das células de astroglioma 1321N1 (expressando o receptor P2Y2 recombinante) tratadas com UTP, estimulou o crescimento de neuritos em células de feocromocitoma PC-12 (Chorna et al., 2004).

A diversidade de respostas celulares mediadas pelo P2Y2R é devida, em parte, às suas características estruturais, as quais os capacitam a estimular diferentes vias de transdução de sinal. Em adição à via clássica, que ativa a PLCβ_1, via G$\alpha_{q/11}$, levando à hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em IP3 e diacilglicerol, segundos mensageiros para a liberação de cálcio de estoques intracelulares e para a ativação da PKC, respectivamente; o receptor P2Y2 contém em sua calda C-terminal dois sítios de ligação a SH3 (PXXP, em que P é uma prolina e X é qualquer aminoácido) que interagem diretamente com a tirosina quinase Src para transativar os receptores do fator de crescimento epidermal (EGF), do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Liu et al 2004, Seye et al., 2004 McGarrigle and Huang, 2007). O P2Y2R também contém, na primeira alça extracelular, uma sequência Arg-Gly-Asp que o acopla às integrinas $\alpha_v\beta_3/\beta_5$, sendo que esta interação é necessária para ativar as proteínas G_0 e G_{12} e iniciar os eventos que culminam com a migração celular (Bagchi et al., 2005, Liao 2007).

Diante do que foi apresentado acima, consideramos que o desenvolvimento de novos ligantes contra o receptor P2Y2 terá uma importante contribuição no estudo dos receptores purinérgicos.

1.3-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)

A química combinatória é uma importante tecnologia para a indústria, bem como para pesquisas biotecnológicas e farmacêuticas, e tem sido utilizada para a identificação de novos materiais com propriedades desejadas. Esta ferramenta é caracterizada pela síntese e análise simultânea de grandes bibliotecas constituídas de compostos relacionados, mas estruturalmente distintos, sendo que a probabilidade de sucesso na identificação de moléculas

funcionais cresce com a diversidade da biblioteca (Stoltenburg et al., 2007, Ulrich and Trujillo, 2008).

Os ácidos nucléicos são compostos atrativos para a química combinatória, já que eles se dobram em estruturas secundárias e terciárias definidas e podem ser amplificados por síntese enzimática. Bibliotecas complexas de oligonucleotídeos, com aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes, podem ser obtidas por síntese química e então utilizadas para a identificação de compostos com uma função particular, tal como alta afinidade de ligação a um determinado alvo (aptâmeros) ou atividade catalítica (ribozimas e DNAzimas) (Stoltenburg et al., 2007, Ulrich and Trujillo, 2008).

Em 1990, um novo método foi descrito para selecionar, a partir de bibliotecas combinatórias de ácidos nucléicos, oligonucleotídeos que se ligam com alta afinidade e especificidade a alvos determinados.

A técnica de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, SELEX) foi desenvolvida simultaneamente e independentemente por Tuerk e Gold e por Ellington e Szostak em 1990.

Graig Tuerk e Larry Gold estudaram a interação entre a T4 DNA polimerase de bacteriófago (gap43) com o sítio de ligação ao ribossomo presente no mRNA que codifica para esta enzima. Eles selecionaram duas sequências, que se ligam à T4 DNA, polimerase de uma coleção de 65.535 moléculas de RNA modificadas aleatoriamente em posições específicas, e chamaram este processo de seleção de SELEX (Tuerk e Gold., 1990).

Andrew Ellington e Jack Szoztak usaram um procedimento de seleção similar para isolar, de uma biblioteca de RNA com 100 posições randômicas, moléculas de RNA com habilidade de se dobrarem em uma estrutura tridimensional estável e criar sítios específicos de ligação a pequenos corantes orgânicos. Eles chamaram as sequências individuais selecionadas

de aptâmeros (do latim, “aptus” significa ligar/encaixar, e do grego, “meros” significa partícula) (Ellington e Szostak, 1990).

Dois anos mais tarde, Ellington e Szostak identificaram, com sucesso, moléculas de DNA simples fita, a partir de uma biblioteca de oligonucleotídeos, capazes de reconhecerem e se ligarem a corantes orgânicos do mesmo modo que os aptâmeros de RNA (Ellington e Szostak., 1992).

Desde então, a técnica de Selex tem sido usada para selecionar, de bibliotecas combinatórias complexas de oligonucleotídeos (aproximadamente 10^{15} sequências diferentes), moléculas de RNA e DNA com alta afinidade e especificidade (aptâmeros) contra uma ampla variedade de alvos, que incluem: íons (Ciesiolka et al., 1995), nucleotídeos (Sassanfar and Szostak, 1993), ácidos nucléicos (Ko et al., 1999), carboidratos (Yang et al., 1998), aminoácidos (Geiger et al., 1996), peptídeos (Bock et al.,1992), antibióticos (Berens et al., 2001), alvos complexos como receptores de membrana (Ulrich et al., 1998, 2002) e células inteiras (Wang et al., 2003, Homann and Göringer, 1999), entre outros.

Uma expressiva parcela dos aptâmeros identificados se liga aos seus alvos com afinidade e especificidade semelhante à dos anticorpos monoclonais, sendo capazes, por exemplo, de diferenciar o ATP do dATP (Sassanfar and Szostak, 1993) ou ainda discriminar células PC12 diferenciadas em neurônios de célula PC12 parentais (Wang et al., 2003).

A utilização de oligonucleotídeos como ligantes ou inibidores de proteínas, baseia-se na propriedade das moléculas de DNA e RNA de reconhecer epítopos protéicos específicos, semelhante à interação RNA-proteína e DNA - proteína existentes na célula. As estruturas tridimensionais de alguns aptâmeros complexados aos seus ligantes foram determinadas e revelaram que a especificidade e afinidade da ligação deles aos seus alvos são conferidas pela combinação das seguintes propriedades: compatibilidade estrutural, preciso empilhamento de anéis aromáticos, interações de van der Waals e eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Na

presença do alvo, com a formação do complexo de ligação, o aptâmero sofre mudanças conformacionais adaptativas. O dobramento em uma estrutura tridimensional definida permite ao aptâmero encapsular completamente substâncias pequenas pela geração de um bolso de ligação específica. Para as moléculas com alta massa molecular, como proteínas, diferentes estruturas da superfície do alvo são envolvidas pela interação com o aptâmero (Hermann and Patel, 2000).

1.3.1- Procedimento de seleção de ligante de RNA por SELEX.

Os passos fundamentais para a seleção de aptâmeros de RNA, utilizando a técnica de SELEX, estão ilustrados na figura 1.1 e correspondem basicamente ao: desenho da biblioteca, interação entre a coleção de candidatos e a molécula alvo, separação dos oligonucleotídeos livres dos que interagem com o alvo, amplificação das moléculas selecionadas, clonagem, sequenciamento e caracterização dos aptâmeros.

O ponto básico da técnica de SELEX é a síntese de uma biblioteca de ssDNA contento aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes, que a princípio, podem adotar estruturas tridimensionais únicas. As sequências geradas possuem basicamente três regiões: uma randômica com 16 a 75 posições, nas quais os quatro nucleotídeos são incorporados com igual probabilidade. As regiões aleatórias são sintetizadas pela adição de uma mistura definida dos quatro nucleotídeos durante a síntese química em fase sólida do DNA. Flanqueando a sequência randômica, há duas regiões constantes, necessárias para o anelamento dos iniciadores, para a digestão com enzimas de restrição e, no caso dos aptâmeros de RNA, para a transcrição *in vitro* com a T7 RNA polimerase (Ulrich et al., 2006).

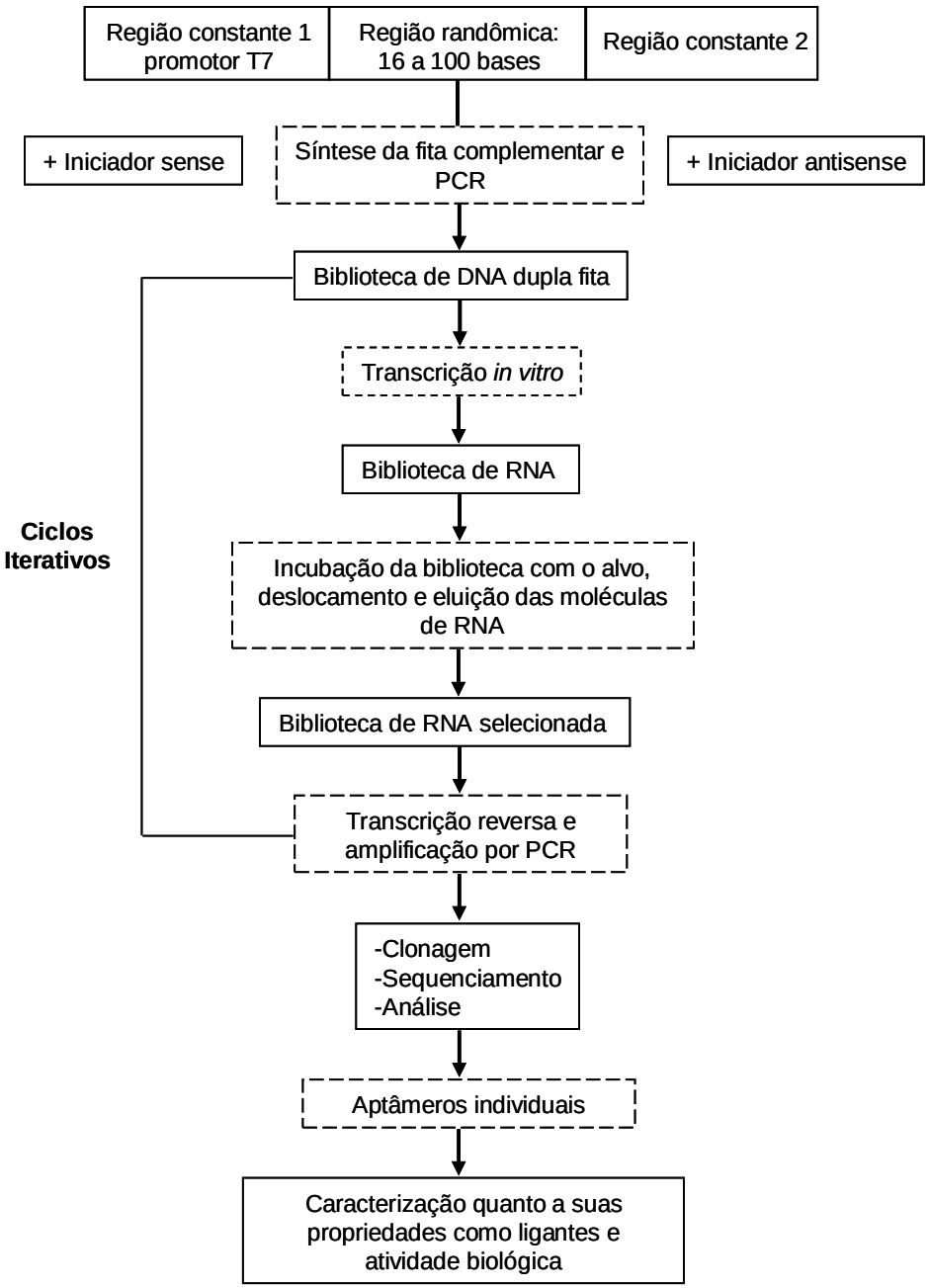

Figura 1.1- Esquema representativo da técnica de SELEX para o desenvolvimento de aptâmeros de RNA. Este procedimento é caracterizado pela repetição de passos sucessivos: a incubação da biblioteca com o alvo, a separação das sequências ligadas das não ligadas, a eluição dos oligonucleotídeos complexados ao alvo, ao quais são subsequentemente submetidos à transcrição reversa, amplificação e transcrição, para a geração de uma nova biblioteca que será usada no próximo ciclo de SELEX. Geralmente, 5 a 15 ciclos são necessários para a geração de aptâmeros com afinidade e especificidade pelo seu alvo.
(Adaptado de Ulrich and Trujillo, 2008).

A coleção de oligonucleotídeos pode ser usada diretamente para a seleção dos aptâmeros de DNA. Para os aptâmeros de RNA, a fita complementar do ssDNA é obtida por síntese enzimática com a Taq DNA polimerase e a biblioteca de RNA é gerada por transcrição *in vitro* (Ulrich et al., 2005, 2006, Stoltenburg et al., 2007).

A etapa de seleção, no procedimento de SELEX, destina-se a encontrar as moléculas com maior afinidade pelo alvo de interesse. A biblioteca de oligonucleotídeos é incubada com o alvo por um período determinado. As sequências com baixa ou nenhuma afinidade tendem a permanecer livres na solução, enquanto que as demais associam-se ao alvo. O complexo aptâmero-alvo é separado das moléculas livres por um dos vários métodos disponíveis, que incluem: adsorção em filtro de nitrocelulose, separação por *gel-shift*, eletroforese capilar, entre outros (Chandra and Gopinath, 2006).

As moléculas de RNA ou DNA são eluídas dos seus sítios de ligação, coletadas e amplificadas por RT-PCR ou por PCR, respectivamente. A coleção de dsDNA resultante, enriquecida com sequências com afinidade pelo alvo, é preparada para um novo ciclo de SELEX. Para os aptâmeros de DNA, o dsDNA é desnaturado para a purificação da fita sense, utilizada no procedimento, e no caso dos de RNA, a biblioteca é gerada por transcrição *in vitro* (Ulrich et al., 2005, 2006).

Uma sequência de eventos de ligação ao alvo, seleção e amplificação é chamada de ciclo de SELEX. Estes passos são repetidos várias vezes até estabilizar a afinidade da biblioteca pelo seu alvo. O número de ciclos necessários depende de uma variedade de parâmetros, tal como a concentração e as características do alvo, a biblioteca de oligonucleotídeos usada, as condições de seleção, a proporção entre as moléculas do alvo e dos oligonucleotídeo e a eficiência do método de separação (Ulrich et al., 2005, 2006, Bunka and Stockley, 2006, Stoltenburg et al., 2007).

Após sucessivas rodadas de seleção há o aumento de sequências funcionais, juntamente com a diminuição da diversidade da biblioteca. O procedimento é finalizado quando já não se observa elevação na afinidade do conjunto de moléculas pelo seu alvo. Então, no caso de aptâmeros de RNA, a coleção final de oligonucleotídeos é reversamente transcrita em cDNA, o qual é amplificado por PCR e clonado em vetor bacteriano. Clones são isolados e aproximadamente 40 aptâmeros individuais são identificados por sequenciamento (Ulrich et al., 2005). As regiões previamente randômicas são alinhadas, comparadas para a busca de motivos conservados, e as estruturas secundárias são previstas utilizando um algoritmo baseado na minimização de energia livre das estruturas formadas (Zuker et al., 1999). Aptâmeros com sequências conservadas são caracterizados quanto à afinidade e especificidade de ligação ao alvo. Adicionalmente, experimentos de mutação e truncamento podem ser realizados para definir as regiões mínimas necessárias para o reconhecimento do alvo (Ulrich et al., 2005, Bunka and Stockley, 2006, Stoltenburg et al., 2007).

Etapas adicionais podem ser introduzidas no procedimento para melhorar a especificidade das sequências. Passos de seleção negativa e subtração são recomendados para minimizar o enriquecimento de oligonucleotídeos com ligação inespecífica, ou para direcionar a seleção de moléculas contra epítopos específicos do alvo. Por exemplo, na seleção de aptâmeros contra proteínas recombinantes expressas na superfície celular, ciclos de seleção negativa, contra células que não expressam o alvo, são indicados para a eliminação das sequências que se ligam aos demais constituintes da membrana. Neste passo, as moléculas que se associam à membrana são eliminadas, enquanto as demais são coletadas e usadas para dar continuidade ao procedimento (Ulrich et al., 2005).

Para implementar a biodisponibilidade e bioestabilidade dos aptâmeros em fluidos biológicos, a técnica de SELEX tem sido aperfeiçoada em alguns pontos. A habilidade da T7 RNA polimerase de incorporar nucleotídeos modificados na posição 2’OH da ribose por 2’F

ou 2'NH_2 permite o isolamento de aptâmeros com maior biodisponibilidade (figura 2.1), cuja meia vida em fluidos biológicos passa de 8 segundos para até 48 a 72 horas (de Smidt et al., 1991, Pieken et al., 1991, Ulrich et al., 2004). A estabilidade, também, foi aumentada pela introdução de outros nucleotídeos modificados, 2'-O-metil nucleotídeo e 4'-tio pirimidina (Chelliserrykatill and Ellington, 2004, Kato et al., 2005) ou pela utilização de Spiegelmers (L-RNA ou L-DNA em vez de D-RNA ou D-DNA) (Klussmann et al., 1996).

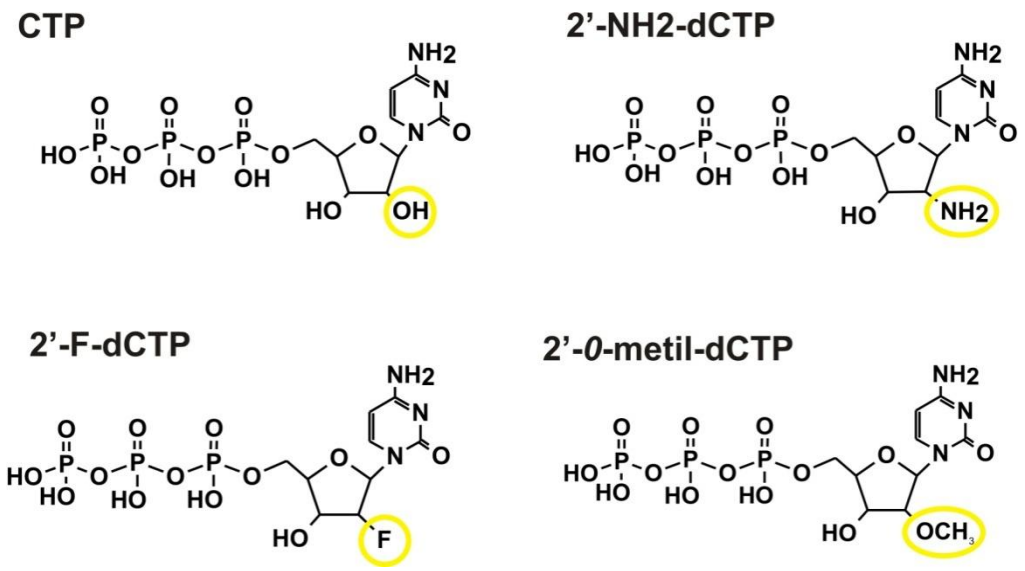

Figura 1.2- Estrutura química dos nucleotídeos modificados. O potencial terapêutico e diagnóstico dos aptâmeros é aperfeiçoado pela incorporação de nucleotídeos, com substituições no grupo 2'-OH da ribose, à sequência das moléculas de RNA. Aptâmeros contendo 2'-F ou 2'-NH2-pirimidina são obtidos por transcrição *in vitro*, enquanto os contendo 2'-O-metil-pirimidina são gerados por síntese química.
(Adaptado de Ulrich and Trujillo).

A biodisponibilidade dos aptâmeros tem sido implementada pelo acoplamento de grupos volumosos, como o polietilenoglicol, colesterol ou biotina-estreptavidina, à calda 5' ou 3' da sequência de RNA. Este procedimento tem reduzido a depuração renal e, portanto, aumentado o tempo de meia vida dos aptâmeros no plasma (Dougan et al., 2000, Ruckman et al., 1998, Boomer et al., 2005, de Smidt et al., 1991).

A técnica de SELEX permite a seleção de aptâmeros com alta seletividade e especificidade contra uma variedade de alvos, contudo não há um protocolo de seleção comum a todos os alvos. O desenho do procedimento de SELEX depende do alvo, da biblioteca de oligonucleotídeos e da aplicação e características desejadas para os aptâmeros que serão selecionados (Stoltenburg et al., 2007).

1.3.2- Aplicações terapêuticas

Os aptâmeros são sequências de oligonucleotídeos simples fita, que formam uma estrutura tridimensional estável capaz de se ligar a uma ampla variedade de moléculas alvos. Ao longo dos últimos 20 anos, a investigação e o desenvolvimento dos aptâmeros demonstraram o seu potencial como uma nova e efetiva classe de moléculas terapêuticas. De fato, em 2004 o FDA (US Food and Drug Administration) aprovou o primeiro aptâmero de RNA para o tratamento da degeneração macular relacionada ao envelhecimento, o produto farmacêutico Macugen™ (pegaptanib sodium injection da Pfizer-Eyetech Pharmaceuticals) antagoniza de forma eficiente e seletiva a ação da isoforma 165 do fator de crescimento endotelial-vascular (VEGF) (Bell et al., 1999, Eyetech Study Group, 2002, Ishida et al., 2003, Trujillo et al., 2007).

O desenvolvimento do Macugen™ como um agente terapêutico é um exemplo que ilustra todos os passos da seleção de um aptâmero como uma ferramenta para a pesquisa básica até sua aprovação pelo FDA para o uso clínico (Ulrich et al., 2006). Três diferentes procedimentos de SELEX foram necessários para o desenvolvimento do Macugen™. Jellinek et al. foram os primeiros a selecionar aptâmeros que bloqueavam a interação entre VEGF e seu receptor (Jellinek et al., 1994). Estes aptâmeros serviram para demonstrar que era possível selecionar moléculas bioativas contra o VEGF por SELEX, contudo, eles não possuíam nenhuma relevância terapêutica, já que não eram protegidos contra a atividade de nucleases.

Consequentemente, novas seleções de SELEX foram realizadas usando nucleotídeos modificados (Green et al., 1995, Ruckman et al., 1998), sendo que a seleção utilizando uma biblioteca 2'-fluor-pirimidina originou o Macugen™. Ruckman et al., realizaram 12 ciclos de SELEX e isolaram três aptâmeros com os valores de K_d de ligação ao alvo variando de 5 a 50 pmol/L (Ruckman et al., 1998). Algumas purinas dessas sequências foram modificadas pela substituição do 2'-OH da ribose por 2'-O-metil, a fim de aumentar a estabilidade da estrutura e a resistência a nucleases sem uma significante redução da afinidade (os valores de Kd ficaram entre 49 e 130 pmol/L). Estes aptâmeros exibiram especificidade pelo $VEGF_{165}$, não apresentado ligação detectável a proteínas relacionadas, como o $VEGF_{121}$ ou o fator de crescimento de plaquetas ($PIGF_{129}$). Estas moléculas foram então avaliadas por suas habilidades de inibir a ligação do VEGF a dois de seus receptores, Flt-1 (fms-like tyrosine kinase receptor) e KDR (kinase inset domain-containing receptor). Usando VEGF marcado com ^{125}I, os valores do IC_{50} para o Flt-1 e KDR variaram de 50 a 300 pmol/L e 2 a 60 pmol/L, respectivamente.

O monitoramento da inibição do VEGF *in vivo*, pela medida da permeabilidade vascular em modelo animal, foi usado para avaliar o potencial terapêutico do aptâmero de VEGF. O teste foi realizado em cobaias e o aptâmero mais efetivo foi capaz de retardar a permeabilidade vascular em 58% a uma dose de 1µmol/L (Ruckman et al., 1998).

Os estudos farmacocinéticos do aptâmero de VEGF, renomeado para NX-1838, foi conduzido em macacos Rhesus. Este aptâmero foi conjugado a uma molécula de polietilenoglicol de 40 kDa e por meio de administração intravenosa, mostrou-se que o seu tempo de meia vida foi de 9,3 h e sua depuração foi de 6,2 ml/h. A administração subcutânea resultou em uma absorção de 80% com o pico de concentração de 4,9 µg/ml após 8 a 12 horas (Tucker et al., 1999). Os estudos pré-clínicos e clínicos do NX-1838, renomeado para Macugen™, foram conduzidos pela Eyetech Pharmaceuticals Inc., para o tratamento de

degeneração macular relacionada com a idade e para edema macular diabético (Eyetech Study 2002, 2003).

Além do Macugen™ outros aptâmeros estão sendo submetidos a investigações pré-clínicas e clínicas, como: o aptâmero ARC1779, com atividade antitrombótica, se liga ao domínio A1 do fator de von Willebrande (Cosmi, 2009). O sistema REG-1, que consiste do aptâmero RB006 contra o fator IXa da coagulação e da sua sequência complementar RB007 que atua como antídoto. Este par de aptâmeros foi projetado para melhorar a terapia atual usada nos distúrbios da coagulação sanguínea. O efeito mediado por RB006 foi dose dependente e durou até 30 horas em voluntários que receberam 60mg da droga. O oligonucleotídeo antídoto RB007 neutralizou o efeito exercido por RB006 dentro de 1 a 5 min (Nimjee et al., 2006, Dyke et al., 2006 Chan et al., 2008). O aptâmero AS1411, também conhecido como AGRO100, está em teste para o tratamento de câncer (Girvan et al., 2006). O aptâmero ARC1905, um potente antagonista do componente C5 da cascata do sistema complemento, está sendo testado por sua eficiência em inibir a excessiva ativação do sistema complemento na degeneração macular relacionada com a idade (Archemix Website, Majumder et al., 2009).

1.3.3- Vantagens e limitações dos aptâmeros e de seu método de seleção (SELEX)

Inúmeras publicações discutem sobre a seleção dos aptâmeros, suas propriedades e aplicações. Para finalizar, as principais vantagens e limitações destas moléculas e de sua tecnologia, comparadas ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais para os mesmos alvos, estão resumidas abaixo:

- O processo de SELEX é aplicável a diferentes classes de alvos. Moléculas com estrutura simples, complexa ou uma mistura de compostos sem a composição

previamente definida, podem ser utilizados como alvos para a seleção de aptâmeros com sucesso.

- Os aptâmeros podem ser selecionados com alta afinidade e especificidade pelos seus alvos, semelhante aos anticorpos monoclonais. A maioria dos valores de Kd calculados estão na faixa de nanomolar a picomolar.
- Em contraste aos anticorpos, os aptâmeros são selecionados por um processo *in vitro* independente de animais ou linhagens celulares. Assim, o processo de SELEX é também aplicável em uma variedade de condições não fisiológicas para diagnóstico *in vitro*.
- A seleção pode ser realizada para moléculas tóxicas ou não imunogênicas.
- Várias modificações podem ser introduzidas nas etapas básicas de SELEX para direcionar a seleção de aptâmeros com características desejadas e aplicáveis aos processos de interesse.
- Vários métodos podem ser empregados para modificar os aptâmeros após o processo de seleção, a fim de melhorar a afinidade, a potência e a estabilidade metabólica destas moléculas.
- Aptâmeros podem readquirir a sua conformação original após a exposição a altas temperaturas.
- Não há evidências da imunogenicidade destas moléculas (Bouchard et al., 2010).
- Antídotos específicos para os aptâmeros podem ser desenvolvidos para reverter a sua atividade.
- Os aptâmeros podem ser expressos dentro das células (intrâmeros) sob o controle de promotores induzíveis ou constitutivos. Tal estratégia permite a investigação e a inibição da função de proteínas intracelulares (Famulok et al. 2001).

- O tamanho relativamente pequeno dos aptâmeros, em relação aos anticorpos, facilita a sua síntese e modificações químicas e permite que eles acessem epítopos protéicos que, de outra forma, estariam inacessíveis (Lee et al., 2006, Stoltenburg et al., 2007).
- Uma das principais desvantagens da técnica de SELEX é a incapacidade de se prever o sucesso de um processo de seleção. Não é possível julgar se uma molécula alvo é adequada, é necessário concluir o procedimento para verificar se um aptâmero pode ser gerado contra este alvo de forma bem sucedida. A porcentagem de êxito no procedimento de seleção automatizada, tendo como alvo proteínas homogêneas, é de aproximadamente 75% (Mayer, 2009).
- Não há um protocolo de SELEX padronizado que seja aplicável para qualquer tipo de alvo. As condições de seleção devem ser adaptadas para as circunstâncias em questão (alvo, características desejáveis para o aptâmero, aplicação, etc.) (Mayer, 2009, Stoltenburg et al., 2007, Ulrich et al., 2006).
- A maioria dos aptâmeros publicados foram selecionados manualmente. Todo o procedimento para sua geração (ciclos iterativos de SELEX, clonagem da coleção de aptâmeros e caracterização das moléculas individualmente) é trabalhoso, dispendioso, necessita de pessoal especializado e consome muito tempo (Mayer, 2009, Stoltenburg et al., 2007).
- O enriquecimento de oligonucleotídeos com ligação inespecífica é frequentemente observado. Para minimizar este problema é necessário adaptar condições ao procedimento de SELEX, como passos de seleção negativa (Stoltenburg et al., 2007).
- A obtenção dos aptâmeros por síntese enzimática possui um baixo rendimento, o que é ainda prejudicado pelo processo de purificação das sequências para a liberação dos nucleotídeos livres.

Desde a sua primeira descrição em 1990, os aptâmeros e seu procedimento de geração tem se desenvolvido em uma tecnologia madura, tornando-se uma ferramenta sofisticada para as ciências médica, biológica e química. A síntese química e enzimática dessas moléculas permite modificações estratégicas de suas estruturas, capacitando sua aplicação em processos como a validação de alvos, diagnóstico e uso como droga. (Mayer, 2009).

OBJETIVOS

2-Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver aptâmeros de RNA com afinidade pelo receptor purinérgico P2Y2.

Objetivos Específicos

1- Purificar e amplificar a biblioteca combinatória de DNA, clonar e seqüenciar uma alíquota da mesma para confirmar o tamanho e a randomicidade dos oligonucleotídeos;

2- Caracterizar as células 1321N1 de astrocitoma humano, transfectadas com cDNA do receptor purinérgico P2Y2 de humano, quanto à expressão gênica, protéica e funcional do receptor purinérgico P2Y2;

3- Selecionar o ligante utilizado, durante os ciclos de seleção, para o deslocamento das moléculas de RNA com maior afinidade a sítio específico do alvo;

4- Realizar os ciclos de seleção *in vitro* para a obtenção dos aptâmeros de RNA;

5- Caracterizar os aptâmeros de RNA selecionados;

6- Mostrar a atividade dos aptâmeros na linhagem embrionária de carcinoma murino P19, a qual expressa o receptor P2Y2 endogenamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

3-Materiais e Métodos

3.1-Cultivo das células de astrocitoma humano 1321N1

As células de astrocitoma humano 1321N1, selvagens e transfectadas com o vetor pLXSN contendo a sequência codificante do receptor purinérgico P2Y2 de humano,1321N1-P2Y2, (Erb et al., 1995) foram cultivadas em DEMEM (Dulbecco,s Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Fetal bovine serum, FBS, Cultilab, Campinas, Brazil), 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. As células 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2 foram cultivadas em meio contendo 500 μg/ml de geneticina (G418). A cultura foi mantida a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2. A mesma forma de cultivo se aplica para as células 1321N1 expressando o receptor purinérgico recombinante humano P2Y1 ou P2Y4.

As células 1321 N1 expressando o receptor P2Y2 de humano foram cedidas pelo laboratório do Dr. Fernando González (Universidade de Porto Rico, USA) e são provenientes do laboratório do Dr. Gary Weisman (Univesidade de Missouri, USA). As células 1321 N1 selvagens e expressando o receptor P2Y2 de camundongo foram cedidas diretamente pelo Dr. Weisman. As células 1321N1 expressando o receptor P2Y1 e P2Y4 também são provenientes do laboratório do Dr. Fernando González.

3.2-Cultivo das células de carcinoma embrionário murino P19

A linhagem P19 foi cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de piruvato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

A linhagem P19 foi doada pela Dra Chica Schaller (Center for Molecular Neurobiology, Hamburgo, Alemanha).

3.3-Extração do RNA total

A extração do RNA total das células 1321N1 selvagem e 1321N1-hP2Y2 foi realizada utilizando o reagente TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Contaminações por DNA genômico foram eliminadas pelo tratamento da amostra com DNAse I (Ambion Inc., Austin, TX, USA) na concentração de 1U/μg de RNA por 15 min a 37°C. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% corado com 0,5 μg/μl de brometo de etídeo. A quantificação e a verificação da pureza do RNA foram realizadas através da leitura em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Tchnologies, Inc, Wilmington, USA).

3.4-Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase

Foram utilizados 3 μg do RNA total como molde para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores randômicos, 20 U de M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus-reverse trascriptase*, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 40 U de RNAse out, 0,5 mM de cada dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$ e tampão 1X da M-MLV RT para um volume final de 20 μl. O ciclo usado na reação foi de 10 min a 20°C, 45 min a 42°C, 5 min a 95°C e 10 min a 4°C (Termociclador Master Cycler gradiente, Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Foram utilizados como molde 5 μl da reação de transcrição reversa para a amplificação da sequência de 437 pb do receptor purinérgico P2Y2. A PCR foi efetuada com 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de dNTPs, 0,4 pmol de cada iniciador (sense e antisense), 2,5 U de Taq polimerase (Fermentas Inc.) e tampão 1X da Taq polimerase para um volume final de 25 μl. Foram utilizados 35 ciclos na reação de amplificação e a temperatura de anelamento dos iniciadores foi de 62°C. As sequências dos iniciadores foram: P2Y2 sense 5'-

GACTTCAAGTACGTGCTGCTG-3'; P2Y2 antisense 5'-GCTCTACTTTGTCACCAG-3'. O produto amplificado possui 437 pb.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. A banda correspondente à seqüência gênica foi purificada e clonada no vetor PGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Após reação de seqüenciamento, verificamos se o fragmento amplificado e clonado era idêntico à seqüência dos cDNAs do receptor purinégico de humano depositada no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Variações na concentração do cDNA foram normalizadas utilizando os níveis dos transcritos de β-actina como controle interno da PCR. β-actina sense 5'-ATGGATGATGATGATATCGCCG-3', β-actina antisense 5'-GGAGTACTTGCGCTCAGGA-3'. As condições de amplificação foram iguais às usadas para o receptor P2Y2, sendo a extensão da sequência gerada 1016 pb.

3.5- Purificação dos fragmentos de PCR

Os produtos das PCRs, submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 2%, foram purificados utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante

3.6-Clonagem do cDNA no vetor pGemT-easy e transformação das bactérias DH5α

O fragmento de DNA, amplificado e purificado, foi clonado utilizando o Kit pGem-T Easy Vector System I (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.1-Preparação de células de bactérias competentes

A bactéria *Escherichia coli* DH5α, estocada à -80°C, foi cultivada em ágar Luria Bertani (LB) (triptona 1 %; extrato de levedura 1 %; cloreto de sódio 0,5 %; pH 7,5; ágar

bacteriológico 1,5 %) a 37°C durante 16 horas. Uma colônia dessa cultura foi inoculada em 3 ml de meio LB e incubada sob agitação nas mesmas condições descritas acima. Após este período, utilizou-se uma alíquota de 1 ml dessa cultura para inocular 100 ml de meio LB, mantido a 37°C e sob agitação, até atingir a DO_{600nm} próxima de 0,8. Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 1000 g, por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular foi suspenso em 40 ml de $CaCl_2$ (0,1 M) e mantido em gelo por 1 hora. Após centrifugação, as células foram resuspensas em 1 ml de $CaCl_2$ 1 M. As células competentes foram aliquotadas e usadas imediatamente ou estocadas a -80°C em presença de glicerol, em uma concentração final de 25%.

3.6.2-Transformação das bactérias competentes

Cerca de 10 ng de mistura de ligação foi adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 50 µl de bactérias DH5α competentes. Este material foi mantido em gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos. Em seguida, as células foram mantidas em 1 ml de meio LB, a 37°C, por 50 minutos. Após centrifugação a 5000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 100 µl de LB, plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 20 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase, *5 bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*), 1 mM de IPTG (isopropil-β-D Tiogalactopiranosídeo, *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*),1 µg/ml de ampicilina e crescidas a 37°C por 16 horas. As colônias brancas, contendo o inserto do DNA desejado, foram isoladas, inoculadas em 5 ml de meio LB ampicilina (1 µg/ml) e crescidas a 37°C por 16 horas.

3.6.3-Mini preparação do DNA plasmidial das bactérias

Obtivemos o DNA plasmidial das bactérias selecionadas no item anterior, utilizando o Kit Wizard SV Gel and Clean-UP System (Promega Corporation, Madison, USA), conforme as instruções do fabricante. A quantificação e a verificação da pureza do DNA plasmidial foram realizadas através da leitura em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm.

3.7- Sequenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando 100 a 200 ng de DNA, 1 pmol do iniciador M13 sense (5'-GGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), 2 µl de BigDye (Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Califórnia, USA), 3 µl do tampão de sequenciamento e água para um volume final de 15 µl. As condições de ciclagem foram: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos. Para precipitação, adicionamos à reação 25 µl de coquetel de precipitação (93% de etanol gelado, 0,1 M de NaOAc pH 5,2 e 370 µg/ml de glicogênio). A reação foi agitada, incubada por 15 minutos em gelo e centrifugada a 4000 g por 30 minutos à temperatura ambiente O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 50 µl de etanol 70% nas mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente. O excesso de etanol 70% foi eliminado do precipitado por aquecimento a 95°C por 1 minuto. As amostras foram então enviadas para o Serviço de Seqüenciamento de DNA (SSDNA), do Departamento de Bioquímica – IQUSP. O equipamento utilizado foi o seqüenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

3.8-Preparação da membrana celular

O extrato de membrana das células de astrocitoma humano 1321N1-P2Y2 foi preparado por sonicação celular e centrifugação diferenciada. Células confluentes

(aproximadamente 10^7), coletadas de garrafas de cultura de 225 cm^2 utilizando PBS com 2 mM de EDTA, foram centrifugadas a 800 g por 5 min. Após este procedimento, o precipitado celular foi ressuspenso em 1 ml de tampão sacarose (250 mM de sacarose; 20 mM de HEPES; 1 mM de EDTA; 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, PMSF; 1 μg de pepstatina e 1 μg de antipaina) e mantido em gelo até o início do processo de sonicação. O material foi sonicado (3 pulsos de 30%, por 30 s, com intervalos de 1 minuto) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado NaCl para uma concentração final de 150 mM. O material foi então submetido a uma ultra centrifugação a 100.000 g por 1 hora a 4°C. O precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de tampão de seleção (147 mM de NaCl; 2 mM de KCl; 0,2 mM de $CaCl_2$; 10 mM de HEPES) e armazenado a -80°C (modificado de Ulrich et al., 2005). A concentração de proteína foi obtida pelo método de Bradford (Bradford, 1976)

3.9-Western-blot

Para os ensaios de Western-blot, 40 μg do preparado de proteínas de membrana plasmática e marcadores de massa molecular foram desnaturados a 95° por 5 minutos e separados em condições redutoras por corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% (dodecil sultato de sódio em gel de eletroforese de poliacrilamida, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, 1970). Após separação, as proteínas foram eletroforeticamente transferidas (400 mA por 80 minutos) para uma membrana de nitrocelulose (Transblot, 0,45 μm, Bio-Rad). A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana de nitrocelulose com uma solução de Ponceau 0,1 %. Em seguida, a membrana foi descorada e bloqueada por 2 horas com solução de tampão tris-salino *Tween* (*Tris-Buffered Saline*, TBS, *tween*, T) (tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6, Tween-20 0,03 %) contendo 3% de leite desnatado. O anticorpo policlonal

para a detecção do receptor P2Y2 (RbxP2Y2 Receptor, Millipore, Califórnia, USA), diluído na concentração de 1/200 em TBS-T com 3 % de leite desnatado, foi incubado com a membrana por 12 horas a 4°C. Decorrido este período, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T, bloqueada com TBS-T e 3 % de leite desnatado por 30 minutos e, então, incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário na diluição de 1:1000 (alkaline phosphate-conjugated goat anti-rabbit IgG, KLP Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). As proteínas marcadas pelos anticorpos foram detectadas usando o kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a normalização da expressão e verificação da integridade do extrato protéico, o procedimento foi realizado nas mesmas condições para a β-actina, usando o anticorpo monoclonal anti-actina produzido em camundongo (Sigma Aldrich, Missouri, USA) na diluição de 1:5000 e o anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) na diluição 1:5000.

3.10- Medidas da variação da concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, por imageamento de cálcio

As células 1321N1-P2Y2, 2,5 x 10^4, foram cultivadas por 72 horas em placas de cultura de 35 mm de diâmetro (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA). Antes de iniciar as medidas, as células foram incubadas a 37°C por 1 hora, com 5 μM de Fluo-3 AM, 0,5 % Me_2SO e 0,1 % do surfactante plurônico F-127 em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (Matins et al., 2005). Após este período, as células foram lavadas e mantidas em meio extracelular (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 2mM de $CaCl_2$, 10 mM de glicose, 10 mM de HEPES, pH 7,4) por 10 min para garantir uma completa desesterificação do fluoróforo. As captações das imagens de variação de $[Ca^{2+}]_i$ (imageamento de $[Ca^{2+}]_i$) foram realizadas no microscópio confocal LSM 510 meta (Zeiss, Jena, Alemanha), usando

imagens do tamanho de 256 × 256 pixels e taxa de aquisição de 1 imagem por segundo. O Fluo-3 foi excitado com um feixe de laser de íon argônio no comprimento de onda de 488 nm, a luz emitida a 515 nm foi detectada usando um filtro de *long-pass* acima de 510 nm. No final de cada experimento, adicionou-se às células 5 μM de ionóforo de Ca^{2+} (4-Br-A23187) para a determinação da fluorescência máxima (*F*max), seguida de 10 mM de EGTA para determinar os valores da fluorescência mínima (*F*mín). A concentração de cálcio intracelular livre, $[Ca^{2+}]_i$, foi calculada pela equação $[Ca^{2+}]_i$= Kd do fluoróforo (F-Fmín)/(Fmáx-F) (Hallett et al., In: Siddle e Hutton, 1990), onde Kd é a constante de dissociação do fluoróforo de cálcio; que no caso do Fluo 3AM é de 450 nM (Hallett et al., 1990); F é a fluorescência da célula estimulada durante um determinado período de tempo, Fmín é a fluorescência mínima obtida após adição de 10 mM de EGTA, e Fmáx é a fluorescência máxima obtida após aplicação de 5 μM de ionóforo (4-Br-A23187). Os dados de imageamento de $[Ca^{2+}]_i$ deste estudo foram obtidos a 20-22°C

3.11-Medidas da variação de cálcio intracelular por microfluorimetria

Para monitoramento da mudança $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria usando FlexStation 3 (Molecular Device, CA), as células 1321N1-P2Y2 foram semeadas em placas de parede preta e fundo transparente (Costar, UK) 24 horas antes do experimento, a uma densidade de 3 x 10^4 células por poço. Uma hora antes das medidas, as células foram incubadas a 37°C com o Flex Calcium Kit e 2,5 mM de probenicida em um volume final de 200 µl por poço seguindo as instruções do fabricante (Molecular Device, USA). A fluorescência das amostras foi excitada a 485 nm e a emissão da fluorescência foi detectada a 525 nm. As amostras foram monitoradas a intervalos de 1,52 s por 120 s com um total de 79 leituras por poço. Após 20 s de monitoramento da intensidade de fluorescência basal para os níveis $[Ca^{2+}]_i$, as drogas foram injetadas e os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram monitorados por mais 100 s. As respostas aos

agonistas foram calculadas como a fluorescência máxima obtida após a adição da droga menos a intensidade da fluorescência basal (unidade relativa de fluorescência- RFU-*Relative Fluorescence Units*) usando o software SoftMax®Pro (Molecular Device, CA). Os dados estão relatados como a média dos valores ± erro padrão da média. Os dados foram analizados no programa GraphPad Prisma 4.

3.12-Ensaio de ligação radioligante receptor

Para os estudos de competição com as 10^5 células de 1321 N1-hP2Y2 foram cultivadas por 72 horas em placas aderentes contendo 24 poços. Os ensaios foram realizados utilizando 1,7 nM de [α-^{32}P]ATP (3000 ci/mmol), na presença ou ausência de concentrações crescentes de suramina, ATP ou de ATPγS em tampão extracelular (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 2mM de $CaCl_2$, 10 mM de glicose,10 mM de HEPES, pH 7,4), para um volume final de 200 µl. Os ensaios foram realizados a 25°C com um tempo de incubação de 40 min. Decorrido o tempo necessário para o equilíbrio de ligação ser atingido, as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de meio extracelular e então solubilizadas em solução contendo 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 100 mM de citrato de sódio por 30 min. A radioatividade retida pelas células foi quantificada na presença de líquido de cintilação em contador de cintilação. Os dados foram expressos como porcentagem da ligação máxima do radioligante ao receptor ou como a massa do radioligante ligado ao receptor. Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4.

Para os experimentos realizados com as células 1321N1 expressando o receptor P2Y2 de camundongo, utilizou-se placas de 96 poços, onde $2x10^4$ células foram cultivadas por 72 horas antes do início do ensaio. A concentração do [α-^{32}P]ATP e os tempos de incubação foram os mesmos citados anteriormente, o volume final foi de 50 µl e as células foram lavadas duas vezes com este volume.

3.13-Protocolo de SELEX

3.13.1-Biblioteca combianatória de DNA

A biblioteca de DNA simples fita, composta por duas regiões constantes de 25 e 43 bases necessárias para transcrição, amplificação e clonagem dos oligonucleotídeos, e uma região interna randômica de 32 bases, foi sintetizada pela Operon Biotechnologies Inc. (Ebersberg Germany, na escala de 1 µmol) (figura 3.1).

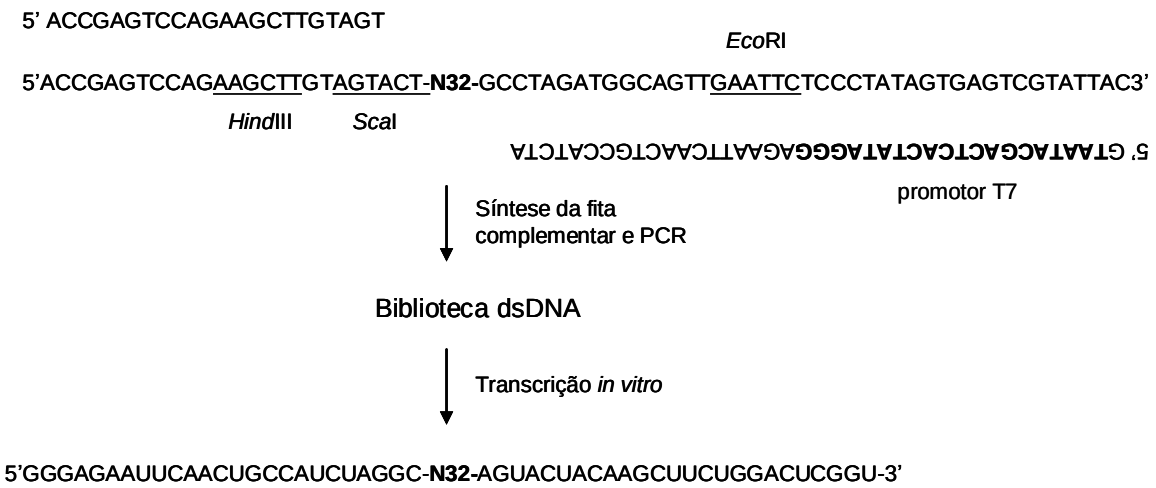

Figura 3.1- Biblioteca de DNA e iniciadores utilizados na identificação de aptâmeros de RNA por SELEX. As sequências dos iniciadores sense e antisense estão mostradas respectivamente acima e abaixo da sequência da biblioteca parcialmente randômica. A posição do sítio da RNA polimerase T7 está em negrito e os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados. N32: posições aleatórias em que os quatro desoxinucleotídeos (A: desoxiadenosina trifosfato, C: desoxicitidina trifosfato, T: desoxitimidina trifosfato, G: desoxiguanosina trifosfato) são incorporados com igual probabilidade. Após a síntese da fita complementar e da PCR, as fitas codificantes são transcritas in vitro gerando a mistura de RNAs utilizadas para o SELEX (Ulrich et al., 2005).

As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação da biblioteca é:

P 40 - 5' GTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCAACTGCCATCTA 3'

P 22 - 5' ACCGAGTCCAGAAGCTTGTAGTACT 3'

3.13.2-Purificação da Biblioteca

A coleção de oligonucleotídeos, sintetizada quimicamente, foi purificada em gel de poliacrilamida desnaturante: trezentos e trinta microgramas do DNA de fita simples, previamente aquecido a 65°C por 10 minutos na presença de tampão de corrida (20% de glicerol, 1 mg/ml de bromofenol blue, 1 mg/ml de xileno cianol), foram aplicados em um gel de poliacrilamida 8% desnaturante. Após corrida eletroforética, (150 V/cm^2, por aproximadamente 2h) o DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e a banda de interesse foi retirada do gel com a ajuda de um bisturi. O segmento do gel foi cortado em pequenos pedaços e então transferido para um tubo de microcentrífuga. O volume aproximado da amostra foi calculado e 2 volumes do tampão TBE (98 mM de tris base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA) foram adicionados ao tubo. O material foi incubado à temperatura ambiente por 12 horas em uma placa rotatória. Decorrido este período, o tampão contendo o DNA diluído foi recuperado e uma nova incubação com igual volume de TBE foi efetuada. Após nova recuperação do TBE, visualizamos na luz UV se o DNA havia sido totalmente eluído do gel. Juntamos os dois volumes de TBE e seguimos com a purificação do DNA por extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol.

3.13.3- Amplificação da biblioteca por PCR sujeita a erro

A fim de manter a diversidade da biblioteca, esta foi amplificada utilizando-se uma PCR sujeita a erro (Cadwell and Joyce, 1994). Utilizamos 360 pmol da biblioteca simples-fita, 330 μM de dGTP, 330 μM de dATP, 830 μM de dCTP, 830 μM de dTTP, l X tampão *Taq* DNA polimerase, 0,5 mM de $MnCl_2$, 7 mM de $MgCl_2$, 4500 pmol do iniciador P40 e 145U *Taq* DNA polimerase para um volume final de 3,2 ml (Ulrich et al., 2005). Esta mistura de reação foi dividida em 32 tubos e submetida a uma ciclagem inicial de: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 55°C por 5 minutos e 72°C por 30 minutos. Finalizado este passo, 150 pmol do

iniciador P22 foi adicionado em cada tubo. A temperatura de anelamento dos iniciadores e o número de ciclagens foram padronizados para dar prosseguimento à amplificação da biblioteca. As condições consideradas ideais foram 8 ciclos: de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

Uma alíquota da reação foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 8% e o material foi visualizado utilizando a marcação com brometo de etídio 0,5%. Após detectar a presença de uma única banda de 100 pb, uma alíquota de 3 µl da PCR foi clonada para posterior seqüenciamento, e o restante do material foi purificado por extração com fenol: clorofórmio e precipitação com etanol, de acordo com o protocolo descrito no item 3.13.5.

3.13.4- Análise da randomicidade da biblioteca de SELEX

Após clonagem e sequenciamento, trinta e nove sequências foram analisadas quanto à randomicidade do *pool*. A região randômica de 32 bases deve conter aproximadamente 25% de cada nucleotídeo. Os motivos estruturais, tal como AA, AC, AG, AT, devem estar igualmente distribuídos (Ulrich et al., 2005).

3.13.5- Purificação dos produtos das PCRs e das reações de transcrições *in vitro*

Os produtos das PCRs e das reações de transcrições foram purificados por extração com tampão fenol e precipitação com etanol de acordo com o protocolo modificado de Sambrook and Russel, 2001. Volumes iguais do produto da PCR e da solução fenol 24: clorofórmio 23: álcool isoamílico 1 foram misturados (USB Corporation, Cleveland, USA) e a emulsão resultante foi agitada e centrifugada a 16.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo onde se adicionou igual volume de clorofórmio, o qual foi novamente agitado e submetido à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao

sobrenadante recuperado foi adicionado 1 µl de 5mg/ml de acrilamida linear como carreador, 10% NaOAc 3M, pH 7,2 e etanol absoluto numa concentração final de 80%. O tubo foi mantido a -20° C por 12 h. Este material foi então centrifugado a 16.000 g por 30 minutos a 4° C. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e então ressuspenso em água deionizada.

A purificação dos produtos das transcrições foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, contudo utilizamos fenol saturado pH 4,5 (Amresco Inc., Sólon, USA) e solução de NaOAc 3M, pH 5,2.

A quantificação e a verificação da pureza das amostras de DNA e RNA foram realizadas através da leitura em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer).

3.13.6-Transcrição para a produção de moléculas de RNA marcadas com [α^{32}P]ATP

Para as transcrições na presença de ATP radiomarcado, usamos 10 pmol da coleção de dsDNA, 1,5 mM de 2'-F-dCTP, 1,5 mM de 2'-F-dUTP, 0,5 mM de GTP, 25 µM de ATP, 50 µCi [α^{32}P]ATP, 20 U da RNA polimerase T7, 1X do tampão da RNA polimerase T7 para um volume final de 20 µl. Após a adição de todos os reagentes em um tubo livre de RNase, este foi incubado por 1 hora a 37°C. Decorrido este período, mais 20 U da RNA polimerase T7 foram acrescentadas à reação. Após 1 hora a 37°C, o material foi tratado com 2 U de DNase por 15 min a 37°C. A reação foi finalizada pela adição de 0,4 µl de uma solução de EDTA 0,5 M e por incubação de 20 min a 65 °C. Separamos uma alíquota de 1 µl, para a análise em gel de poliacrilamida desnaturante, e o restante da reação foi purificado com a coluna de Sephadex G-50 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acordo com as instruções do fabricante, ou foi precipitado com cloreto de lítio 8 M como se segue: adicionou-se à reação 1,25 µl de LiCl e 75 µl de etanol 100%. Incubou-se por 12 horas a -20°C. Realizou-se uma centrifugação de 16.000 g por 30 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi

lavado com 50 µl de etanol 70%. O precipitado foi ressuspendido em 20 µl de água tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato). As transcrições dos ciclos de SELEX foram precipitadas com cloreto de lítio e as dos aptâmeros individuais foram purificadas com a coluna de Sephadex G-50.

O rendimento do produto da transcrição foi calculado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 8%. Diluímos 1 µl da transcrição (não purificada e após purificação) em 10 µl de água. Aplicamos 1 µl de cada uma dessas amostras em gel de poliacrilamida desnaturante 8% e após eletroforese, o gel foi exposto ao cassete *phosphor imaging* para digitalização e análise.

Para a determinação da atividade específica, a radioatividade incorporada, em 1 µl da diluição, foi quantificada por cintilação. Com base nas contagens obtidas estimou-se a quantidade de RNA sintetizado considerando que, de cada quatro nucleotídeos incorporados, um corresponde ao ATP.

3.13.7-Transcrição *in vitro*

As bibliotecas de RNA foram preparadas como se segue: para a primeira reação de transcrição usamos como molde 3,5 nmols da biblioteca de dsDNA, para as demais reações, utilizamos massas variáveis de dsDNA recuperados dos ciclos de seleção. Juntamente com o molde de dsDNA utilizamos 0,5 mM ATP, 0,5 mM GTP, 1,5 mM 2`-F-dUTP, 1,5 mM 2`-F-dCTP, 1X de tampão da RNA polimerase T7, 250 U da RNA polimerase T7 para um volume final de 360 µl. A reação foi incubada a 37°C por 12 horas. Uma alíquota de 10 µl foi tratada com 1 U de DNase (15 minutos a 37°C) e então foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 8%. Após verificar que a transcrição funcionou produzindo uma única banda 82 pb o restante da reação foi tratado com DNase (1U/µl) por 15 minutos a 37°C. Para verificar a integridade do transcrito, uma pequena alíquota da reação foi submetida à

eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 8%. Em seguida, a reação foi purificada por extração com fenol e precipitação com acetado de sódio 3 M pH 5,2 em etanol 80%. O transcrito foi ressuspenso em tampão de seleção (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 2mM de $CaCl_2$, 10 mM de HEPES, pH 7,4) e a concentração do material foi avaliada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). Aproximadamente 500 ng do transcrito foram avaliados em gel de poliacrilamida desnaturante 8%.

As transcrições dos aptâmeros foram realizadas da mesma forma do procedimento descrito acima. Contudo, para a eliminação dos nucleotídeos não incorporados, os transcritos foram purificados de gel de poliacrilamida desnaturante 8%, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook and Russell, 2001.

3.13.8- Seleção *in vitro*

O transcrito foi aquecido a 65 °C por 15 minutos e então transferido para a temperatura ambiente por 30 minutos para que estes adquirissem sua conformação secundária estável (Ulrich et al., 2005). Para o primeiro ciclo de seleção, 80 µg de um preparado de proteína de membrana da célula 1321N1-P2Y2 foi incubado, por 40 minutos, com 4 nmols da biblioteca de RNA. Decorrido este período, o complexo RNA - proteína foi filtrado em membrana de nitrocelulose (Ulrich et al., 1998). A membrana foi lavada duas vezes com tampão de seleção a fim de eliminar as ligações inespecíficas dos RNAs e o complexo RNA - proteínas, presente na membrana de nitrocelulose, foi recuperado por purificação com fenol/clorofórmio e precipitação com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol absoluto. Nos demais ciclos de seleção, a massa do alvo (80 µg de um preparado de proteína de membrana da célula 1321N1-P2Y2) e o tempo de incubação (40 minutos) foram mantidos. Contudo, utilizamos concentrações crescentes da biblioteca no decorrer dos ciclos, 0,3 µg/ml de RNA transportador de levedura como competidor (para diminuir a ligação inespecífica) e

aumentamos o número de lavagens da membrana contendo o complexo RNA - proteína alvo. Para a recuperação das moléculas de RNA de interesse, o filtro contendo o complexo RNA - proteína foi incubado, durante 40 minutos, com solução contendo 2 mM do competidor ATP-γ-tiofosfato, para deslocar as moléculas de RNA que interagem especificamente com os sítios de ligação do ATP-γ-tiofosfato ao receptor. Decorrido o tempo de incubação, a solução foi recuperada e os oligonucleotídeos foram purificados e usados para a síntese de cDNA para os próximo ciclos de seleção (figura 3.2).

3.13.9- Transcrição reversa do RNA recuperado seguido de amplificação por PCR (RT-PCR)

O RNA obtido do ciclo de seleção anterior foi utilizado para transcrição reversa. Foram adicionados 100 pmol do iniciador reverso, o RNA precipitado (volume total de 20 µl) e 1X tampão da enzima de transcrição reversa AMV (*Avian Myeloblastosis Virus* enzima de trasncriptase reversa, Promega Corporation, Madison, USA). A reação foi incubada a $70^{O}C$ por 10 minutos e então foram adicionados 200 µM de cada dNTP e 50 U AMV para um volume final de 50 µl. A reação de síntese do cDNA (DNA complementar) foi de $25^{O}C$ por 10 minutos e $46^{O}C$ por 50 minutos.

Para a reação de PCR foram utilizados: 25 µl do produto do RT; 1,5 µl do *primer* P40 (100 pmol/µl), 5 U de enzima *Taq* Polimerase, 1X tampão *Taq* DNA polimerase, 6 µl de $MgCl_2$ (50 mM) para um volume final de 100 µl. A reação foi submetida às seguintes ciclagens: $94^{O}C$ por 5 minutos, número variável de ciclos de amplificação (padronizados em cada reação para evitar o aparecimento de bandas inespecíficas), $94^{O}C$ por 1 minuto, $49^{O}C$ por 1 minuto e $72^{O}C$ por 1 minuto. Uma alíquota do produto da PCR foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 8% a fim de se verificar a amplificação do DNA dupla fita no tamanho de 100 pares de base.

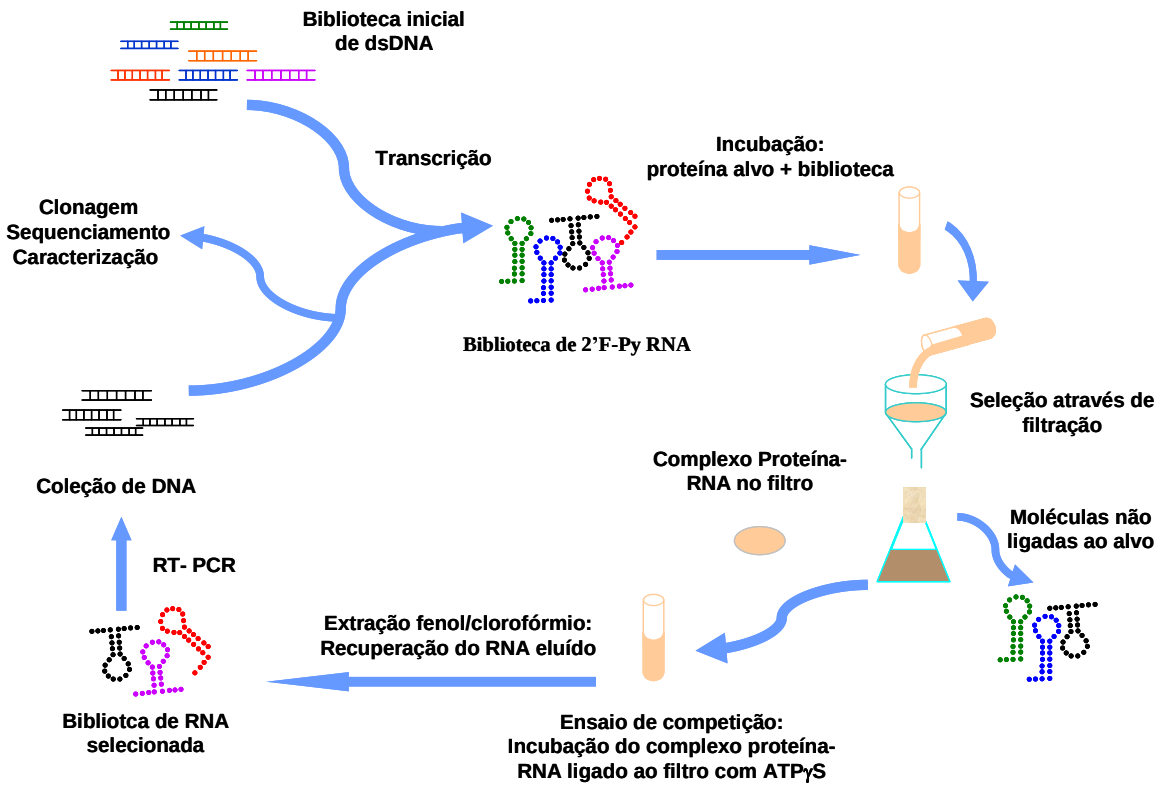

Figura 3.2- Esquema de seleção *in vitro* de aptâmeros de RNA resistentes a ação de nucleases contra o receptor P2Y2. A biblioteca de DNA, flanqueada por sítios de ligação aos iniciadores e pelo promotor da RNA polimerase T7, é transcrita em RNA. Após a reação de ligação proteína-RNA, os oligonucleotídeos com afinidade pela proteína são selecionados via filtração. As moléculas de RNA ligadas às proteínas são retidas na membrana, enquanto que as demais são eliminadas por lavagem e filtração. Para a seleção das moléculas que se ligam especificamente ao alvo, o filtro é incubado com uma solução contendo uma alta concentração de um ligante com afinidade pelo receptor de interesse (ATPγS). Os RNAs eluídos são recuperados por extração com fenol-clorofórmio, reversamente transcritos e amplificados via PCR. O *pool* resultante é utilizado em um novo ciclo, ou então, clonado, seqüenciado e caracterizado. (2´F-Py: 2´F-pirimidina).

Confirmada a eficiência da amplificação, o restante do material proveniente da reação de transcrição reversa foi amplificado por PCR nas mesmas condições anteriores, precipitado e transcrito em RNA para um novo ciclo de seleção. Vinte porcento das reações foram armazenados para ensaios funcionais posteriores.

3.13.10- Estringência durante os ciclos de seleções do SELEX

Como descrito anteriormente, a estringência foi modificada conforme a progressão dos ciclos de seleção. Alguns parâmetros foram alterados no decorrer do processo como: aumento da massa do transcrito e do número de lavagens da membrana de nitrocelulose contendo o complexo RNA-proteína. Aumentou-se o número de lavagens do filtro de nitrocelulose contendo o complexo RNA-proteína, de 2 lavagens no primeiro ciclo a 6 no ciclo 9, e a massa do transcrito, de 4 nmols no primeiro ciclo a 25 nmol no ciclo 9 (tabela 3.1).

Tabela 3.1- Evolução da estringência de seleção durante o protocolo de SELEX.

Ciclo	Massa de RNA (nmols)	Número de lavagens/ volume (µl)
1	4	1/ 200
2	4	2/200
3	6	2/200
4	6	2/200
5	6	4/200
6	9	4/200
7	15	6/200
8	11	6/400
9	25	6/400

3.13.12 Caracterização dos aptâmeros

Para a identificação dos aptâmeros selecionados a partir dos ciclos de enriquecimento, uma alíquota do produto da PCR do ciclo 9 foi clonada, utilizando o *kit* pGEM T easy Vector (Promega), e 50 clones foram sequenciados. As regiões randômicas das sequências individuais obtidas foram alinhadas e comparadas na procura de estruturas conservadas, a estrutura secundária dos aptâmeros foi prevista utilizando o programa M-fold (http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi, Mathews et al., 1999, Zuker et al., 1999).

3.14-Amplificação das sequências dos aptâmeros por PCR

Para a amplificação dos aptâmeros clonados no vetor pGEM T easy foram usados: 50 ng do palsmídio ou do DNA previamente amplificado, 0,2 µM de cada iniciador P40 e P22, 0,2 µM dos dNTPs, 5% de DMSO, 2,5 µM de $MgCl_2$, 1X de tampão da Taq polimerase, 5 U da Taq polimerase para um volume final de 50 ul. Foram utilizados 13 ciclos na reação de amplificação, a temperatura e o tempo de anelamento dos iniciadores foram de 63°C e 30 segundos.

3.15- Ensaio para a determinação da afinidade do conjunto dos 49 aptâmeros identificados após nove ciclos de SELEX.

As moléculas de RNA marcadas com [α-^{32}P] ATP foram aquecidas a 65 °C por 20 minutos e em seguida mantidas e à temperatura ambiente por 30 minutos. O transcrito radiomarcado foi então incubado com 3 µg de extrato de membrana das células expressando o receptor P2Y2 por 20 minutos. Para verificar a ligação não específica, 1 µg do RNA não marcado foi incubado, por 20 minutos em gelo, ao extrato de membrana antes da adição do material radiomarcado. A ligação específica foi considerada como a ligação total menos

ligação não específica. Após as incubações, o material foi aplicado em um gel de poliacrilamida nativo 5% e então submetido a uma corrida eletroforética, 30 mA por 6 horas. Após a eletroforese, o gel foi exposto ao cassete do *phosphor imaging* para digitalização e posterior análise.

3.16- Análise de restrição para monitorar o enriquecimento de sequências durante o procedimento de SELEX.

A concentração de oligonucleotídeos (dsDNA), de cada ciclo de seleção do procedimento da SELEX, foi avaliada em um gel de poliacrilamida nativo 8% usando o padrão de massa molecular Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (SM0241, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) e o sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel).

Dois µg do dsDNA de cada ciclo de SELEX foram digeridos com uma combinação de 10 unidades de cada uma das endonucleases de restrição, *Dde*I, *Alu*I, *Hha*I (Fermentas) por 2 horas a 37°C em 1X de tampão Tango Tm (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Decorrido este período, 10 unidades da enzima *Ssi*I (Fermentas) foram adicionadas à reação. A concentração do tampão foi elevada para 2X (melhor condição para a atividade da enzima *Ssi*I) e o material foi incubado por mais 2 horas a 37°C. As enzimas foram inativadas por uma incubação a 65°C por 20 minutos. Após precipitação com etanol e acetato de sódio 3 M, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em um gel de poliacrilamida não desnaturante de 16%. Os fragmentos de DNA foram corados e visualizados com SYBR safe DNA gel stain. O padrão de massa molecular usado no ensaio foi o FastRuler Ultra Low Range, SM1238 da Fermentas Inc.

3.17- Medida da apoptose por citometria de fluxo

As células P19 indiferenciadas foram semeadas em placas de 24 poços (Costar, UK) 24 horas antes do experimento, a uma densidade 10^5 células por poço. O ensaio foi realizado em duas condições: (1) células P19 indiferenciadas mantidas em DMEM 10% de SFB e (2) incubadas em DMEM sem SFB por 12 horas antes da adição das drogas. Para a avaliação da apoptose, as células foram submetidas aos seguintes tratamentos por 2 horas: células não tratadas; a) ciclo 0 (100 nM); b) aptâmero B7 (100 nM); c) aptâmero B7 (100 nM) e ATP (100 μM) e d) ATP (100 μM).

Após incubação, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas para se destacarem da superfície da placa, novamente lavadas com PBS e submetidas à centrifugação (200 g por 2 minutos). O sobrenadante foi eliminado e as amostras foram lavadas duas vezes em PBS gelado e mais duas vezes em tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5mM $CaCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, pH 7,4). As células foram suspensas em 100 µl do mesmo tampão com 50 µg/mL de anexina V-FITC (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) e então incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Completou-se os volumes das amostras para 500 µl (tampão ligação contendo 100 µg/ml de iodeto de propídio, PI), estas foram mantidas por 15 minutos em gelo, ao abrigo da luz, e então analizadas por citometria de fluxo usando o equipamento FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Em cada análise 50.000 eventos foram registrados e a porcentagem das células de cada grupo foi estimada por meio do programa CellQuest Software packaging.

As células que se encontram nos estágios iniciais da apoptose foram intensamente marcadas por anexina V-FITC, que emite fluorescência verde como o resultado de sua ligação preferencial aos resíduos de fosfatidilserina, translocados, no início do processo, para superfície externa da membrana plasmática. Já as células necróticas ou inviáveis foram

marcadas por iodeto de propídio (PI), que emite fluorescência vermelha, e menos intensamente por anexina V-FITC.

O ensaio permitiu a distinção de quatro grupos celulares: a) células viáveis, constituem o grupo das celular não marcadas por anexina ou iodeto de propídio; b) células no início da apoptose, marcadas intensamente por anexina V-FITC, c) células em apoptose avançada, marcadas por iodeto de propídio e por anexina V-FITC e d) células necróticas, marcadas com iodeto de propídio.

Foram utilizados os seguintes controles: células não coradas, células coradas somente com Anexina V-FITC e células coradas somente com iodeto de propídio, na presença e ausência de estaurosporina, um indutor da apoptose (Chae et al., 2000). As células incubadas com estaurosporina foram usadas para obter um controle positivo para a marcação com Anexina V-FITC e/ou Anexina V-FITC e PI.

É importante notar que os níveis basais de apoptose e necrose variam consideravelmente dentro de uma população. Assim, mesmo na ausência de um indutor de apoptose, algumas populações celulares irão conter uma pequena porcentagem de células que são positivas para apoptose (Anexina V-FITC positivas e PI negativas e/ou Anexina V-FITC e PI positivas). A população não tratada é usada para definir o nível basal de células apoptóticas e mortas. A porcentagem de células que foram induzidas para a apoptose é então determinada pela subtração da porcentagem de células apoptóticas na população não tratada da porcentagem de células apoptóticas na população tratada.

3.18- Análise estatística

Os parâmetros farmacológicos foram analisados com o programa GraphPad Prism (versão 4, GraphPad Prism, San Diego, USA). Quando não especificados, os dados

representam a média ± E.P.M. de três experimentos. A significância estatística foi calculada usando o teste *t* de student. O nível de significância estabelecido foi de 0,05 ($P < 0,05$).