**RESULTADOS** 

## **4-Resultados**

# 4.1- Caracterização das células 1321N1 selvagens e expressando o receptor recombinante P2Y2 humano

A técnica de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial, SELEX, utiliza bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos para selecionar ligantes, por meio de ciclos reiterativos de enriquecimento, que possuem alta afinidade contra uma variedade de alvos protéicos.

Neste trabalho, nos propomos a identificar ligantes de RNA para o receptor purinérgico P2Y2. O passo inicial para alcançarmos o nosso objetivo foi definir como o alvo seria apresentado nos ciclos de seleção. Optamos por trabalhar com uma linhagem celular que, teoricamente, possuísse uma alta expressão do receptor P2Y2. A linhagem utilizada neste estudo foi a de astrocitoma humano 1321N1 transfectada com o vetor pLXSN contendo a sequência codificante do receptor purinérgico P2Y2 humano (1321N1-hP2Y2) (Parr et al., 1994). Foi previamente descrito que as células 1321N1 selvagens (WT) não respondem a nucleotídeos (Parr et al., 1994), este dado é particularmente importante para o nosso estudo pelo fato de que, no decorrer do desenvolvimento da técnica SELEX, caso julgássemos necessário, poderemos realizar um ciclo de seleção negativa, para diminuir a ligação dos aptâmeros de RNA a alvos inespecíficos.

Desta forma, iniciamos o nosso estudo caracterizando as linhagens 1321N1-hP2Y2 quanto à expressão gênica, protéica e funcional dos receptores P2Y2. As células 1321N1 selvagens também foram analisadas em relação aos mesmos aspectos.

A avaliação da expressão do mRNA deste receptor se deu pela transcrição reversa do RNA total das células, seguida por uma PCR utilizando iniciadores específicos para a região codificante do gene. Como pode ser observado na figura 4.1A, verificamos, tanto para as células selvagens quanto para as que expressam P2Y2R, a presença de uma banda que corresponde a um fragmento da sequência gênica do receptor amplificada, o que foi confirmado por sequenciamento. Contudo, quando o mesmo procedimento foi realizado com o RNA total tratado com DNAse, a banda, correspondente ao RT-PCR da WT, diminuiu consideravelmente. Este dado pode ser explicado se considerarmos que o nosso RNA total possivelmente possui contaminações com DNA genômico; o qual foi eliminado com o tratamento com a DNAse.

A expressão protéica do receptor foi confirmada por experimentos de Western Blot. Como pode ser visualizado na figura 4.1B, a linhagem 1321N1-P2Y2 apresenta uma expressão considerável do receptor P2Y2, contudo, em contradição a outros autores que mostraram que a linhagem 1321N1 não expressa endogenamente o subtipo P2Y2 ou qualquer outro receptor P2Y (Flitz et al., 1994, Schachter et al., 1996, Sromek and Harden, 1998, Mamedova et al., 2006), uma banda fraca também foi observada para o procedimento realizado com as células 1321N1 selvagens, indicando que esta linhagem, apesar de não responder a nucleotídeos, pode expressar em níveis baixos, mas detectáveis, o subtipo purinérgico P2Y2. Desta forma, por precaução, optamos não realizar ciclos de seleção negativa com a linhagem selvagem, já que este procedimento poderia levar à eliminação de sequências com alta afinidade pelo receptor P2Y2.

Como, fisiologicamente, os nucleotídeos liberados pelas células induzem elevações nas concentrações de cálcio citosólico, via ativação dos receptores purinérgicos, a análise funcional do receptor P2Y2, expresso pelas células 1321N1, foi estudada por imagiamento de cálcio em microscopia confocal. As variações na  $[Ca^{2+}]_i$  mediada pelo receptor P2Y2, foi avaliada na presença de algumas moléculas caracterizadas como ligantes dos receptores purinérgicos (figura 4.2).



**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. A mobilização de cálcio intracelular pelos agonistas ATP e UTP é um importante marcador funcional do receptor purinérgico P2Y2. A estimulação deste receptor desencadeia a ativação da fosfolipase C, via proteína G $\alpha$ q/11, levando a produção de inositol trifosfato e diacilglicerol, segundos mensageiros para a liberação de cálcio dos estoques intracelulares e para a ativação da proteína quinase C, respectivamente. Como pode ser observado na figura 4.2, os agonistas ATP e UTP induzem uma elevação típica na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; um pico seguido por platô. A variação na concentração de cálcio intracelular pela aplicação de 100  $\mu$ M de ATP ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 1.629 ± 360 nM) não possui uma diferença significativa da variação induzida por 100  $\mu$ M de UTP ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 1308 ± 219 nM), condizente com os dados da literatura que indicam que o receptor P2Y2 é ativado por concentrações equivalentes de ATP e UTP (Parr et al., 1994)

Avaliamos a resposta desencadeada por 100  $\mu$ M do análogo do ATP, a adenosina 5'-O-3-tiotrifosfato (ATP $\gamma$ S) (Lazarowski et al., 1995a). Esta molécula, descrita como um agonista do receptor P2Y2, desencadeou uma elevação na  $[Ca^{2+}]_i$  que corresponde a 60% da resposta do ATP. Como esperado, o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, um agonista dos subtipos P2X (Burnstock, 2007b), não induziu uma resposta detectável (figura 4.2).

O EC<sub>50</sub> do ATP e do ATP $\gamma$ S (concentração do agonista que desencadeia 50% da resposta máxima), determinado por microfluorimetria usando Flexstation 3, foi 261,82 ± 1,50 nM e 1,29 ± 1,14 µM, respectivamente (figura 4.3). Estes valores estão de acordo com os obtidos por Lazarowski et al. com a mesma linhagem. Pela medida da formação de fosfato de inositol pelos nucleotídeos, eles determinaram que o ATP é aproximadamente dez vezes mais potente que o ATP $\gamma$ S, sendo os valores do EC<sub>50</sub>, respectivamente, 230 ± 0,1 nM e 1,72 ± 0,15 µM (Lazarowski et al., 1995a)



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  $\alpha,\beta$ MeATP e 100 µM de ATP em células pré-incubadas por 10 min com 30 µM 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.



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

Avaliamos a interferência de um antagonista clássico dos receptores purinérgicos, a suramina (Sura) (Charlton et al., 1996a, 1996b, Burnstock, 2006b, 2007b), na resposta desencadeada por 100  $\mu$ M de ATP sobre o receptor P2Y2. Como pode ser observado na figura 4.2, a suramina, descrita como um fraco inibidor competitivo do receptor P2Y2 de humanos (Charlton et al., 1996a), levou a uma inibição parcial da resposta de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzidas pelo ATP. Quando incubamos as células, por 10 minutos, com 30  $\mu$ M de suramina, houve uma diminuição de 60% da resposta desencadeada pelo ATP, enquanto a incubação com 100  $\mu$ M de suramina diminuiu a resposta em 80%.

O ensaio de imagiamento de cálcio, também, foi realizado para as células 1321N1 selvagens. Condizente com os dados da literatura, estas não respondem ao ATP, ao ATPγS e ao  $\alpha$ , $\beta$ -metilenoATP, indicando que apesar do receptor P2Y2 ter sido detectado por western blot, esta linhagem não expressa subtipos purinérgicos, do tipo P2, funcionais. Como controle positivo verificamos a resposta a 1 mM de carbamoilcolina (Parr et al., 1994) (figura 4.4).

#### 4.2-Escolha do competidor utilizado durante o procedimento de SELEX

Embora a linhagem celular 1321N1-P2Y2 expresse em níveis consideráveis e funcionalmente, somente, o receptor P2Y2R, há a possibilidade do enriquecimento de aptâmeros contra outros constituintes da membrana celular, caso ciclos de seleção negativa não sejam empregados. Contudo, como não consideramos conveniente empregar as células 1321N1 selvagens para este propósito, optamos, como outros trabalhos também o fizeram (Ulrich et al., 1998, 2002), por utilizar uma molécula que se ligasse ao domínio extracelular do receptor P2Y2 e que, dessa forma, fosse capaz de eluir especificamente as sequências de RNA que interagissem com o seu domínio de ligação ao alvo. Isso diminuiria a probabilidade da seleção de sequências com afinidade a alvos inespecíficos.



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  $\mu$ M de ATP, 100  $\mu$ M  $\alpha\beta$ metilATP 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<sup>2+</sup>.Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata.

Dessa forma, o próximo passo foi a escolha de um ligante para ser usado como competidor nos ciclos de SELEX. Nossa primeira opção foi a suramina. Para avaliar a afinidade desta molécula em relação ao receptor P2Y2, utilizamos ensaios de competição radioligante receptor. De acordo com esta análise, a afinidade de ligantes pelo receptor pode ser determinada indiretamente por sua habilidade de competir, e assim inibir, a ligação de uma droga radiomarcada ao seu receptor. Em experimentos de competição, várias concentrações de um ligante não radiomarcado compete com uma concentração fixa de um radioligante por seus sítios de ligação ao receptor. Como as concentrações da droga não marcada aumentam, a quantidade de ligação do radioligante diminui. O parâmetro obtido com este experimento é a concentração de um ligante não marcado que inibe 50% da ligação de um radioligante ao seu receptor, esta é a constante de inibição ( $IC_{50}$ ) (Deupree and Bylund, 2002, Motulsky, 1995-1996). A constante de dissociação para o ligante não radiomarcado é frequentemente referida como K<sub>i</sub>, e seu valor pode ser obtido a partir do valor do  $IC_{50}$  usando a equação de Cheng-Prusoff (Cheng and Pusoff, 1973):

$$K_i = IC_{50}/1 + L/K_d$$

Onde L é a concentração do radioligante usada no experimento e o Kd é a constante de dissociação do radioligante determinado nas mesmas condições do ensaio (Deupree and Bylund, 2002, Motulsky, 1995-1996). A determinação do Kd para o ATP foi realizado por meio de um ensaio de competição homóloga que pode ser visualizado na figura 4.7.

As concentrações da suramina utilizadas neste experimento variaram de 0,5 a 3000  $\mu$ M e a concentração do radioligante, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP, foi de 1,7 nM. O tempo de incubação necessário para que a associação do [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP ao receptor estivesse em equilíbrio foi de 40 minutos (figura 4.5). O K<sub>i</sub> para a suramina foi de 127.8  $\mu$ M (intervalo de confiança de 95%: 62,73 a 260,50  $\mu$ M) (figura 4.6A).

Contudo, os efeitos da suramina não são observados somente sobre os receptores purinérgico do tipo P2 (Voogd et al., 1993), ela, também, inibe a função de proteínas G (Freissmuth et al., 1999) e da proteína quinase C (Khaled et al., 1995), é antagonista de vários receptores de fatores de crescimento (Firsching et al., 1995), entre outras funções. Desta forma, consideramos que provavelmente o uso da suramina, como um competidor durante os ciclos de SELEX, não fosse uma boa escolha, já que poderíamos selecionar aptâmeros de RNA que não fossem específicos ao P2Y2R.

Deste modo, outro ligante foi alvo do nosso estudo, o ATP $\gamma$ S, um análogo menos sensível a hidrólise por nucleotidases do que o ATP (figura 4.6B). Os ensaios de competição foram realizados com concentrações de ATP $\gamma$ S que variavam de 0,001 a 3000  $\mu$ M. Pela análise da curva de competição verificamos que K<sub>i</sub> do ATP $\gamma$ S é de 6,23  $\mu$ M (intervalo de confiança de 95%: 3,12 a 12,43  $\mu$ M).



Figura 4.5-Tempo decorrido para a associação do radioligante,  $[\alpha$ -<sup>32</sup>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 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  $[\alpha$ -<sup>32</sup>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  $[\alpha-^{32}P]$ 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.

A afinidade do ATP pelo receptor P2Y2 e a densidade do P2Y2R nas células 1321N1hP2Y2, foram determinadas por experimento de competição homóloga radioligante-receptor com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (figura 4.7). Este ensaio segue os mesmos princípios do ensaio de competição usado anteriormente, diferindo no fato de que o mesmo composto é usado como radioligante e como competidor (Deupree and Bylund, 2002, Motulsky, 1995-1996). O K<sub>d</sub> do ATP pelo receptor P2Y2 (concentração da droga necessária para ocupar 50% dos sítios de ligação) é de 3,37 ± 1,16 µM e o B<sub>max</sub> (densidade do receptor na amostra em estudo) do P2Y2R nas células 1321N1-hP2Y2 é de 1046,35 ± 165,95 fmol/10<sup>4</sup> células.

### 4.3-Preparação da biblioteca combinatória de RNA para o procedimento de SELEX

Após a análise das células 1321N1 transfectadas com cDNA do receptor purinérgico P2Y2 e da seleção do ligante utilizado durante os ciclos de seleção, iniciamos a preparação da biblioteca combinatória de RNA (figura 4.8). Assim, purificamos a biblioteca de DNA simples fita, sintetizada quimicamente pela Operon Biotechnologies, utilizando gel de poliacrilamida desnaturante 8%. Após purificação, a mistura de DNA simples fita foi convertida em dupla fita por um ciclo único de PCR seguido por amplificação por PCR sujeito a erro (Cadwell and Joyce, 1994, Ulrich et al., 2005). A PCR sujeita a erro consiste em uma PCR padrão em que algumas condições são alteradas: adiciona-se MnCl<sub>2</sub> e aumentam-se as concentrações de MgCl<sub>2</sub>, da Taq polimerase e dos desoxinucleotídeos de pirimidina. O intuito é aumentar a frequência de erros da PCR e diminuir o viés no tipo de mutação gerada, reduzindo, desta forma, a chance da amplificação da biblioteca resultar na diminuição da sua diversidade (figura 4.8).



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<sup>5</sup> células) foram incubadas com  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (1,7 nM, 1 µCi) na presença e ausência de crescentes concentrações de ATP (0.001 µM to 3000 µM). Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 4 segundo a equação Y=(Bmax\*[radiomarcado])/([radiomarcado] + [não marcado] + Kd) + I. Onde Y é a ligação total, Bmax é a medida da densidade do receptor na amostra, [radioligante] é a concentração do radioligante, [não marcado] é a concentração da droga não radiomarcada, Kd é a concentração do ligante radioativo necessário para ocupar 50% dos receptores e I é o valor de Y no patamar inferior da curva e corresponde à ligação inespecífica do radioligante. Os dados apresentados são os valores médios ± E.P.M de 2 experimentos independentes

Os ciclos de amplificação foram padronizados para evitar a formação de produtos fragmentados ou dímeros, o que também resultaria em perda de diversidade. Após este procedimento, uma alíquota da PCR foi utilizada para uma transcrição teste com  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP e com os ribonucleotídeos modificados 2'-F'dCTP e 2'-F'dUTP (figura 4.8).

Para a análise da randomicidade, uma alíquota da PCR sujeita a erro foi clonada em vetor bacteriano. Trinta e nove clones foram sequenciados e suas sequências foram analisadas quanto à porcentagem de cada nucleotídeo presente na região randômica e quanto à distribuição dos motivos estruturais (tais como AA, AC, AG, AT) (Ulrich et al., 2005). Como pode ser observado na figura 4.9, a biblioteca apresenta uma alta complexidade, todas as 39 sequências são diferentes e não apresentam similaridade entre si. No entanto, ela não apresenta uma distribuição homogênea dos nucleotídeos e dos motivos estruturais, o que pode ser resultado da síntese química ou do próprio procedimento de amplificação da biblioteca, devido à inabilidade da Taq polimerase de replicar sequências com lesões geradas durante a síntese química e de porções ricas em sequências repetidas, eventos que tentamos evitar com a PCR sujeita a erro. Contudo, estes resultados não são suficientes para confirmar o viés da biblioteca, uma amostra de 39 oligonucleotídeos, sobre um conjunto de aproximadamente 10<sup>13</sup> sequências, é muito pequena para, diante dos valores observados, inferir essa conclusão.



Padronização do número de ciclos na PCRc

Trancrição teste com [α-32P]ATP

**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  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP. O produto da transcrição foi submetido à eletroforese em gel desnaturante a 8%, o qual foi auto-radiografado.





**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). A: desoxiadenosina monofosfato, G: desoxiguanosina monofosfato, C: desoxicitidina monofosfato, T: desoxitimidina monofosfato, N: desoxinucleotídeos não identificado na reação de sequenciamento.

A biblioteca foi sintetizada pela Operon Biotechnologies na escala de 1  $\mu$ M, sendo composta de aproximadamente 10<sup>17</sup> sequências, a alíquota preparada para a seleção *in vitro* foi de 360 pmol, com 10<sup>14</sup> variantes, contudo estima-se que 10% a 40% destas não são amplificada devido a problemas na síntese química (Ulrich et al., 2005), o que reduz a diversidade para aproximadamente 10<sup>13</sup> sequências. Após amplificação e transcrição, iniciamos o procedimento de SELEX com 4 nmol da biblioteca de RNA, o que corresponderia a 10<sup>15</sup> transcritos.

### 4.4- Procedimento de SELEX

Após avaliarmos todas as condições que consideramos importantes para o sucesso do procedimento de SELEX, iniciamos os ciclos de seleção. A coleção de RNAs foi incubada com a preparação de proteínas de membranas das células 1231N1-hP2Y2. Após incubação, o complexo proteína-RNA foi filtrado em membrana de nitrocelulose e as moléculas inespecíficas foram eliminadas. A membrana de nitrocelulose foi incubado durante 40 minutos com excesso do competidor ATPγS (2 mM). As moléculas ligadas ao sítio do competidor no receptor P2Y2 foram deslocadas, eluídas, purificadas por fenol-clorofórmio e precipitadas com etanol e acetato de sódio. Os oligonucleotídeos recuperados foram reversamente transcritos e então amplificados por PCR. O produto resultante foi utilizado como molde para a síntese da biblioteca de RNA enriquecida, a qual foi utilizada em um novo ciclo de seleção.

Para confirmar, se o protocolo que desenvolvemos para efetuar os ciclos de seleção da técnica de SELEX estava sendo realmente eficaz, usamos um experimento de competição com as coleções de oligonucleotídeos obtidos nos ciclos 0 (biblioteca), 3 e 4. Os RNAs foram radiomarcados com  $ATP(\alpha$ -<sup>32</sup>P) por meio de uma transcrição *in vitro*. Como competidor

utilizamos 2 mM de ATPγS. O ensaio foi realizado com a linhagem 1321N1 selvagem e expressando o receptor P2Y2.

Como esperado, utilizando as células 1321N1-hP2Y2, a ligação específica cresceu no decorrer dos ciclos (22% da ligação total no ciclo 0; 47% no ciclo 1; 37% no ciclo 2; 53% no ciclo 3 e 74% no ciclo 4), indicando que está ocorrendo o enriquecimento das moléculas de RNA com maior afinidade pelo receptor P2Y2. Em relação às células selvagens, a ligação específica do ciclo 3 foi de apenas 6% em relação à ligação total, sendo que a ligação total a estas células corresponde a apenas 28% da ligação total às células 1321N1-hP2Y2. Estes resultados sugerem que o protocolo que desenvolvemos para o SELEX está sendo eficiente (figura 4.10).

Tentamos utilizar a mesma abordagem anterior para monitorar o enriquecimento das sequências nos ciclos subseqüentes, contudo, não conseguimos detectar um aumento na ligação total e na ligação específica, ao contrário, a ligação específica diminuiu para aproximadamente 40% da ligação total, acreditamos que este resultado se deve ao fato de que com o enriquecimento das sequências com afinidade pelo receptor P2Y2, a concentração do competidor (2mM de ATPγS) não foi suficiente para deslocar as moléculas de RNA com afinidade pelo alvo. Somado a isso, como a contagem de radioligante utilizada era elevada ( $\cong$  1 milhão de cpms por poço), provavelmente, o *background* da ligação inespecífica ocultou o real valor da ligação total e da específica.



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  $[\alpha^{32}P]ATP$  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 ATP $\gamma$ S. 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.

No decorrer do procedimento de SELEX, a pressão de seleção foi progressivamente elevada. 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.

Após 9 ciclos de SELEX (o número de ciclos foi baseado nos trabalhos de Ulrich et al., 1998 e 2002), a coleção de oligonucleotídeos resultante foi clonada em vetor bacteriano e os respectivos insertos foram identificados por seqüenciamento. Como pode ser observado na tabela 4.1, cinqüenta clones foram obtidos e divididos em três classes de acordo com a presença de sequências consensos: classe I CCUCGCUG, classe II AGUUCACUUC e classe III AAUUCUC. Para a identificação destas, as regiões randômicas dos aptâmeros foram alinhadas e comparadas na procura de regiões conservadas (tabela 4.1). **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. **Classe I** 

Aptâm	ero Sequência (5'-3')									
A5	CACUGG <u>CCUCGCUG</u> GAACGCUCCGACUCUCGC									
B1	GCACUUAGUGUGCCUCGCUGGUCCACCCACAU									
C5	UUAAUGCCUCGCUGGAAGUCUCCACUAAUAGC									
D7	UGCUCGCACCUGGAUGUCCUGAUGUCUCUGGCC									
D2	GGCGUAACUCGCGCCUGAUGACUUGACCCUGA									
в7 <b>,</b> Еб	, G4 GGUCGAUUGAUCCUCGCGCCUUACUCCAGGCU									
C4	AUUGACCUCGCCCACAACCGAUCCAUUAGGU									
E3	CACCUGCAAGGGCCUGGGUGUCAGUCGCUCCA									
E4	AGCUCUCGGUUCGCUCUCUAGCGAUUUAUUUG									
С7	AAGUCUGCCGGUGUUGUCUUUUCCCUAACUGA									
A7	GCGCUGCCUAGCGUGACAGCUUGCAUUGCGGU									
В2	AGUAGAUAUCGCCACGCCGCUGCUGGUCCAUC									
D5	AAGCCAGCUUGCUUAGACUCCUCCCUAUAUGC									
F5 <b>,</b> H3	CACUCGGUGGUAGCUCGAUCCGCCCAAUUGUC									
C2,H1	AGUACGUCUCGAUGCACCAGUGAAUUGUCCCU									
F4	AAACCUAGAUCUCUGUGAGUUCUCUCCUCCUAG									
НG	ACCGCGGGAUGCUCACUGAGCAUCUUGUCCCA									
C1	CGUUAAGUUCUUACCACCCCCCCCAUCGGUA									
F1	GCCCACUAAUUGGCACUGAUUGAACGCUCCGAC									
A6	GUUAACGCUAGUUUGGCGUUUCCCCAGUCGAA									
G6	AUCCUGCAGAGCCUGG UGGUAGUGUCACCUGA									
cons	consenso CCUCGCUG									
nosi	$\operatorname{posizion} 1 2 3 4 5 6 7 8$									

consenso					CCUCGCUG				
posição	1	2	3	4	5	6	7	8	
consenso	С	С	U	С	G	С	U	C OU G	
frequência	16	24	22	20	20	15	17	22	

**Tabela 4.2**- 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 pode-se visualizar as posições, os nucleotídeos, e as frequências dos nucleotídeos conservados dentro das regiões randômicas das sequências analisadas.

Cla	isse II
Apt	câmero Sequência (5'-3')
A1	AGUUCACUUCAGAGUUGUCUCAGCCUAAUUCCU
С6	AGUUCACUUCGAUCAGCAUGCUGAUCUUCCCA
F2	AGUUCACUUCAUGCAAUUUGCGUGUUCUCCAA
FЗ	AGUUGGGUUGCUAGUCUCCUUGGCACUAGGCC
B8	UUACGCCUGAUGGAAGU CGGUUCACCAUGGUA
G3	CUUAAUGCGCGAUGUCAGU CGAUUCGCUCCCA
E1	AGU CCUUUCUUUGUCGACCCCCAAUCCCUC
D4	UAAUAAGAUGGUAAGGUGACUUCUCAGGUG
В4	CCGUGGUUUCGGUGGCAGUU UUCCCUAAGGUC
В3	CGUCUUGCGGCUUAGGUGUCCUGAUCACUUCC
E7	AGUUCGGAUUCGUGCGCGUGUCUGCGUAUCCU
G5	AGUUUUGAUCGUCCUUGACGCUCCUUAGGUUG
G2	CGCUAGGGCUUAGAGUGGCGUUCAUCCCGAGG
H2	ACGCCAGACUAUGCGGUAGUUGA UGCCUCCA
A8	AG UCG UCUAAUCUCUACUCCCAAUGGGAGGUA
D6	GUGAGCCGGAUGACCGUUGGCAUCAUUCCGUG

consenso AGUUCACUUC										
posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
consenso	А	G	U	U	С	A	C ou G	U	U	С
frequência	14	16	13	12	9	6	11	12	15	14

Classe III		
Aptâmero	Sequência	(5′-3′)

A2	UGUUGGUCCAC <u>AAUUCUC</u> UCUUGUCCUCG
A4	CAGCUGGUCAUGGUGGCGGACGAAUUCUGGCC
G7	AAUUGGGUUCCAUCCGCCUUCUCCGCAGGGA
Н5	AACUCUG <u>CAUUCUA</u> CCGCUUCACAGCGACCA
G1	GCUAAUGCUUCUUGCAUUAGCAGUCCUUGUC
C3	AGUCUAGCUUUCCUGAUAGGGA <u>CAUUCUC</u> GCA
H7	GCGCUACACGCCUAGUUGUCCUGAAUCCCAAG
Fб	AGUAGCAUC <u>CGUUAUG</u> UGAUUAAAUUCGCCCA
D1	UGACCGU <u>GGUUAUA</u> CCGCACAUUGAGAUCGCC

consenso	AAUUCUC							
posição	1	2	3	4	5	6	7	
consenso	A OU C	A OU G	U	U	С	U	С	
frequência	8	7	9	9	5	9	5	

Como os experimentos com radioligante não foram bem sucedidos em detectar o enriquecimento de sequências individuais no decorrer dos ciclos de seleção, utilizamos uma nova abordagem para alcançarmos este objetivo. Digerimos as coleções de oligonucelotídeos recuperados em cada ciclo do SELEX com as enzimas de restrição Alu1, Hha1, DdeI, Acil. Para este ensaio, fizemos uma análise de restrição dos clones seqüenciados do ciclo 9 (http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php) e selecionamos as enzimas que digeriam o maior número de sequências (Hha1 possui pelo menos um sítio em 16 % das sequências, Alu1 em 14%, DdeI em 18%, AciI em 22%), que possuíam condições de digestão semelhantes (temperatura e tampão) e estivessem disponíveis para compra no mercado.

Como pode ser observado na figura 4.11, com as condições empregadas no ensaio, o perfil de restrição dos ciclos permaneceu semelhante até o ciclo 6. Nos ciclos 7, 8 e 9 é possível observar uma banda fraca de aproximadamente 60 pb, sugerindo o enriquecimento de sequências individuais e/ou de famílias no decorrer do procedimento. Trabalhos que conseguiram visualizar um padrão definido de bandas de restrição realizaram as reações de digestão com a biblioteca de DNA marcadas com <sup>32</sup>P (Bartel and Szostack, 2003, Pestourie et al., 2006). É provável que a sensibilidade do método que usamos não seja adequada ou que a composição das sequências obtidas com os nove ciclos de seleção ainda seja bastante heterogênea para verificarmos um padrão de bandas de restrição definido.



**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 não desnaturante a 16%. Os fragmentos de DNA foram corados com SYBR safe DNA gel stain. A banda de 100 pb corresponde ao material não digerido, enquanto as de 86 pb e 14 pb corresponde às moléculas de DNA digeridas pela *Alu1* 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), seta vermelha: posição da banda de aproximadamente 60 pb que indica o enriquecimento de moléculas no decorrer do procedimento de SELEX.

#### 4.5- Caracterização dos aptâmeros

Para avaliar se o conjunto dos 46 aptâmeros identificados por seqüenciamento, após 9 ciclos de SELEX, possui afinidade pelo receptor P2Y2, misturamos estas sequências (dsDNA), de forma que cada uma delas estivesse presente com a mesma concentração, usamos este material como molde para transcrição *in vitro* e realizamos um ensaio de saturação. Neste experimento, várias concentrações do radioligante (conjunto de aptâmeros marcados com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP) são incubadas com o receptor (preparado de membrana das células 1321N1-hP2Y2), produzindo crescentes concentrações do complexo ligante-receptor. A equação para a hipérbole resultante é:

#### Y=Bmax\*X/(Kd+X)

Onde Y é o valor da ligação específica do radioligante ao receptor e se refere à ligação total do radioligante menos a ligação não específica deste. A ligação não específica representa a radioatividade na presença de 1 $\mu$ M dos aptâmeros não radiomarcados. X é a concentração do radioligante livre e, portanto capaz de interagir com o receptor. O K<sub>d</sub> é a concentração em que 50% dos receptores são ocupados pelo ligante radioativo.

Como a concentração do ligante radioativo aumenta, um ponto é alcançado quando a quantidade de radioligante ligado ao receptor não mais aumenta. Este é o valor do  $B_{max}$  e é a medida da densidade do receptor na preparação de células que interage com o ligante. (Deupree and Bylund, 2002).

As concentrações dos aptâmeros radiomarcados utilizadas neste experimento variaram de 0,77 a 118,70 nM. A concentração do competidor, aptâmero não radiomarcado, foi de 1 μM.

O gráfico do ensaio de saturação está apresentado na figura 4.12. O valor do Kd foi de 164,3 nM e o do Bmáx foi de 333,3 pmol/mg de proteínas do preparado de membrana das células 1321N1-P2Y2.



**Figura 4.12- Curva para a determinação do B**<sub>max</sub> e do K<sub>d</sub>, 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 <sup>32</sup>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.

Observando que a mistura dos 46 transcritos se ligava ao preparado de membrana das células 1321N1-hP2Y2 com uma afinidade na faixa de nanomolar, escolhemos três aptâmeros, representantes das três classes, para iniciarmos os ensaios de caracterização: o clone B7, cuja sequência se repetiu três vezes, e A1 e A2, representantes das famílias 2 e 3 respectivamente, que dentro do que consideramos como sequência consenso, eram os que possuíam os motivos mais conservados.

Os aptâmeros B7, A1 e A2, representantes das classes I, II e III, tiveram suas estruturas secundárias preditas utilizando um algoritmo com base na minimização da energia

livre das estruturas formadas, o programa M-fold (Mathews et al., 1999, Zuker, 1999). A estrutura secundária é construída de subestruturas, as quais contribuem aditivamente para a energia livre da molécula. As energias livres são calculadas de amplas tabelas contendo parâmetros derivados de investigações cinéticas e termodinâmicas de compostos modelos (Schuster, 2006). Em geral, é esperado que os nucleotídeos das regiões consensos estejam localizados em grampos ou alças, estruturas candidatas a interagirem com o receptor. Como pode ser observado na figura 4.13, um dos clones que optamos por trabalhar inicialmente, o aptâmero A2, não tem sua sequência consenso localizada em regiões como grampos ou alças. Contudo, isto não invalida a utilização deste aptâmero. Os programas de minimização da energia livre geram estruturas secundárias subótimas e ótimas termodinamicamente que podem ajudar o pesquisador a apontar regiões potenciais dentro da sequência de nucleotídeos. No entanto, esta ferramenta computacional não leva em consideração características peculiares da amostra.

O programa utilizado neste trabalho, Mfold V3.2, faz suas predições considerando a concentração de NaCl de 1M e ausência de cátions divalentes. O tampão em que os aptâmeros foram solubilizados possui 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2mM de CaCl<sub>2</sub>. A cadeia fosfodiéster dos oligonucleotídeos é polianiônica, a presença de cátions propicia o apropriado dobramento das sequências (Lilley et al., 2003). Os metais requisitados, em especial cátions divalentes, podem ser muito específicos. Por exemplo, a ribosima ligase da classe I, bem como ela foi originalmente selecionada, requer Mg<sup>2+</sup> (Glasner et al., 2002), enquanto outros oligonucleotídeos selecionados *in vitro* necessitam de Pb<sup>2+</sup> (Pan and Uhlenbeck, 2002) ou Ca<sup>2+</sup>(Okumoto et al., 2003). Por outro lado, também podem ser selecionadas estruturas com a especificidade alterada por cátions divalente (Lehman and Joyce, 1993, Riley and Lehman, 2003). Ainda há exemplos em que os cátions divalentes podem ser dispensados, mesmo quando o RNA foi selecionado em condições com alta

concentração de sal (Dieckmann et al., 1996, Carothers and Szostak, 2006). Desta forma, a presença e a concentração de cátions não é um parâmetro trivial quando se trata da estrutura secundária de oligonucleotídeos.

Além disso, os aptâmeros possuem nucleotídeos modificados em suas sequências (o CTP e o UTP têm o grupo hidroxila 2' substituído por um átomo de Flúor) o que, também, não é levado em consideração pelo programa. Desta forma, estas ferramentas computacionais nem sempre geram a estrutura real da sequência nas condições em que estas foram selecionadas.



**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 nucleotídeos das sequências consensos estão indicados com setas vermelhas.

Optamos por definir a afinidade dos aptâmeros em células inteiras, e não em preparado de membrana, com o qual foram realizados os ciclos de seleção e os ensaios de ligação. Contudo, alguns parâmetros precisavam ser otimizados. A massa de aptâmeros que obtínhamos, após a transcrição *in vitro* e a purificação dos transcritos, não era adequada para ensaios com volumes elevados. O melhor desempenho para os experimentos radioligante-receptor com as células 1321N1-hP2Y2 era obtido quando se utilizava placas de 24 poços, com um volume final de 200 µl, o que dispensaria massas elevadas dos transcrito. Desta foi necessário encontrar outras células 1321N1 que expressassem o receptor P2Y2 em um nível adequado para que os experimentos pudessem ser realizados em placas de 96 poços com um volume final de 50 ul. O laboratório do Dr. Weisman nos cedeu uma nova linhagem de 1321N1, contudo, estas eram transfectadas com o cDNA do receptor P2Y2 de camundongo.

Assim, considerando que o receptor P2Y2 de camundongo possui 89% de similaridade na sequência de aminoácidos com o de humano (Parr et al., 1994), o que torna os dados obtidos com estes altamente preditivos da atividade do receptor P2Y2 humano (Weyler et al., 2008, Sauer et al., 2009), e que nós pretendemos no futuro utilizar os aptâmeros no estudo da diferenciação neuronal de células de teratocarcinoma murino P19, nas quais os nossos dados sobre receptores purinérgicos estão concentrados, optamos por dar continuidade ao trabalho utilizando as linhagens 1321N1 expressando o receptor purinérgico P2Y2 de camundongo (1321N1-mP2Y2).

Pelo ensaio de competição homóloga radioligante-receptor com  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP e a linhagem 1321N1-mP2Y2, verificamos que o K<sub>d</sub> do ATP é de 2,14 ± 1,18 µM, mesma ordem de grandeza encontrada para as células 1321N1-hP2Y2 (3,37 ± 1,16 µM), e que o B<sub>max</sub> foi de 3154,7 ± 512,7 fmol/10<sup>4</sup> células, um valor três vezes superior ao obtido para a 1321N1-hP2Y2 (1046 ± 166 fmol/10<sup>4</sup> cels) (figura 4.14).



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 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (1,7 nM) na presença e ausência de crescentes concentrações de ATP (0.1  $\mu$ M a 1000  $\mu$ M) para um volume final de 50  $\mu$ l. 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.

Em experimentos de competição radioligante-receptor, utilizando como radioligante o  $[\alpha^{-32}P]ATP$  e como competidor concentrações crescentes dos aptâmeros, verificamos que o controle, transcrição do ciclo 5 de um procedimento de SELEX contra *Trypanosoma cruzi*, era capaz de deslocar o  $[\alpha^{-32}P]ATP$  da mesma forma que os aptâmeros (concentração dependente) (figura 4.15A). Decidimos fazer novos ensaios utilizando o ciclo zero como controle, o mesmo resultado foi verificado. Inferimos que, possivelmente, as amostras estivessem contaminadas com nucleotídeos livres, e estes seriam os responsáveis pelo deslocamento do  $[\alpha^{-32}P]ATP$ . Esta hipótese foi descartada quando as transcrições foram tratadas com apirase. Para confirmar se estes resultados eram inespecíficos, utilizamos como competidor tRNA de levedura (yeast tRNA), e de fato observamos que este diminuiu a ligação do  $[\alpha^{-32}P]ATP$  às células (figura 4.15B). Diante do observado, provavelmente, estes

resultados são devido a efeitos não específicos, tal como a captura de certos componentes do tampão ou a neutralização de cargas de proteínas da membrana celular ou mesmo do ATP. De fato, Ohuchi et al., examinando a capacidade de um aptâmero selecionado contra o receptor TbRIII (receptor do tipo III do fator de crescimento  $\beta$ ) em inibir a interação deste com TGF $\beta$ 2 (fator de crescimento  $\beta$ 2), verificou que a biblioteca, usada como controle, aumentava a interação do TGF $\beta$ 2 com TbRIII, este resultado, semelhante ao nosso, foi atribuído a efeitos inespecíficos (Ohuchi et al., 2006).

Em uma segunda tentativa para calcular a afinidade dos aptâmeros, empregamos uma nova abordagem para os ensaios de competição, os aptâmeros marcados com <sup>32</sup>P foram utilizados como radioligante e o ATP como competidor. Da mesma forma que observado nos ensaios para monitorar o enriquecimento dos ciclos de SELEX, 2 mM de ATP foi capaz de deslocar apenas 35% do radioligante da amostra.



**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  $[\alpha-^{32}P]ATP$  (1,7 nM). B- Ensaio avaliando a capacidade dos compostos ATP $\gamma$ S; Aptâmeros A1, A2 e B7; ciclo 0, ciclo 5 do SELEX contra *Trypanosoma cruzi* e yeast tRNA de competir com  $[\alpha-^{32}P]ATP$ . As concentrações dos compostos utilizadas estão especificadas no gráfico. (\*) Transcrição tratada com apirase. Os dados estão apresentados como porcentagem da ligação do  $[\alpha-^{32}P]ATP$  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.

Optamos por caracterizar inicialmente o aptâmero B7. Calculamos a sua afinidade pelas células 1321N1-mP2Y2 por um ensaio de competição homóloga, como controle realizamos o mesmo experimento com o ciclo 0 (biblioteca). A concentração do radioligante (aptâmero B7 marcados com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP) foi de 2,8 nM e as concentrações do competidor (aptâmero não radiomarcados) variaram de 0,01 µM a 16 µM. Como esperado, a ligação do ciclo 0 às células 1321N1 expressando o receptor P2Y2 é inespecífica (mesmo na maior concentração, 16 µM, o ciclo 0 não radiomarcado foi incapaz de deslocar 2,8 nM do <sup>32</sup>P-ciclo 0). O K<sub>d</sub> para o aptâmero B7 foi de 187,5 ± 1,32 nM (concentração onde 50% dos receptores estão ocupados pelo radioligantes) (figura 4.16).

A fim de avaliar a especificidade do aptâmero B7 pelo receptor P2Y2, o mesmo ensaio descrito acima foi realizado em células 1321N1 expressando, separadamente, os subtipos purinérgicos recombinantes P2Y1 (1321N1-P2Y1) e P2Y4R (1321N1-P2Y4) (figura 4.17).

A similaridade na sequência de aminoácidos entre P2Y1R e P2Y2R é de 38% (Abbracchio et al., 2006). O receptor P2Y1 possui uma ampla distribuição tecidual e está envolvido em processos como agregação plaquetária e vasodilatação (von Kügelgen, 2006). É ativado fisiologicamente pelo ADP, sendo o ATP descrito como um agonista parcial de P2Y1R e o ATPγS como agonista com potência similar ao do ADP (Avyanathan et al., 1996, Palmer et al. 1998 Abbracchio et al., 2006).

O receptor P2Y4 tem uma distribuição mais restrita, é expresso na placenta e em menor nível no pulmão e no músculo liso vascular (von Kügelgen, 2006), apresenta 41 % de identidade na sequência de aminoácidos com o P2Y2 e o subtipo de humano possui uma forte preferência para o UTP como agonista (von Kügelgen, 2006, Abbracchio et al., 2006)



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 <sup>32</sup>P-ATP foi incubada com  $3\times10^4$  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 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.
Para este ensaio, a concentração do radioligante foi de 1,1 nM e as do competidor variaram entre 0,001 a 8  $\mu$ M. Como pode ser visualizado na figura 4.16, apesar de ser observada uma competição entre o aptâmero B7 e o mesmo radiomarcado, com as concentrações do competidor utilizadas, a curva não alcançou um platô em sua base (o que subestima o valor do K<sub>d</sub>) e a ligação inespecífica foi de 45% e 47% da ligação máxima para as células 1321N1-P2Y1 e 1321N1-P2Y4, respectivamente. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), gerado pela análise dos dados, foi de 0,66 para 1321N1-P2Y1 e 0,82 para 1321N1-P2Y4. Mesmo diante destas observações, os valores do Kd foram calculados e correspondem a aproximadamente 17 (3,3  $\pm$  2,64  $\mu$ M, 1321N1-P2Y1) e 49 vezes (9,3  $\pm$  2,66  $\mu$ M 1321N1-P2Y4) o valor obtido para as células 1321N1-P2Y2.

Para examinar a capacidade do aptâmero B7 em intervir em um processo celular envolvendo a sinalização de nucleotídeos via P2Y2, observamos se esse seria capaz de inibir a proteção à apoptose induzida pelo ATP em células P19 indiferenciadas.

A apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo de suicídio celular que permite os organismos filogeneticamente mais recentes em controlar o número de células nos tecidos e eliminar células individuais que ameaçam a sua sobrevivência. A morte por apoptose está presente tanto na vida adulta quanto no desenvolvimento embrionário, e falhas neste processo podem resultar em patologias como o câncer e doenças neurodegenerativas (Tonelli and Colli, 2008).

A morte celular programada pode ser induzida por vários estímulos, sendo que todos têm o mesmo resultado final: morte celular deliberada e sistemática. Este processo é marcado por alterações morfológicas bem definidas, incluindo a condensação da cromatina, diminuição celular e formação de corpos apoptóticos (Tonelli and Colli, 2008).



**Figura 4.17- Ensaio de competição homóloga Aptâmero B7.** Uma concentração de 1,1 nM (55 fmol) do aptâmero radiomarcado com <sup>32</sup>P-ATP foi incubada com  $3\times10^4$  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 linhagem 1321N1 expressando o receptor P2Y4. Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4.

Um dos métodos de estudo da apoptose detecta mudanças na posição da fosfatidilserina na membrana celular. Em células não apoptóticas, a maioria das moléculas de fosfatidilserina estão localizadas na camada interna da membrana plasmática, contudo logo que a apoptose é induzida, a fosfatidilserina se redistribui para a superfície externa da membrana e torna-se um sinal para o reconhecimento e remoção das células pelos macrófagos (Fadok et al., 1993, Martin et al., 1995).

O deslocamento da fosfatidilserina pode ser detectado com o anticoagulante anexina V, o qual tem alta afinidade por este fosfolipídio. A conjugação do corante isotiocianato de fluoresceína (FITC) à anexina V, permite identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo (van Engeland et al., 1998),

Com a progressão da apoptose, há alterações na permeabilidade da membrana. A utilização concomitante de marcadores de DNA de alta massa molecular, como o iodeto de propídio, e anexina V-FITC permite a distinção entre as células apoptóticas em estágio inicial e final.

Nos ensaios usando esta metodologia, verificamos que a privação de soro reduziu significativamente (figura 4.18, tabelas 4.2 e 4.4) o número de células P19 viáveis (anexina V-FITC e PI negativos). O tratamento com 100  $\mu$ M de ATP reverteu este efeito, indicando que o ATP tem uma ação protetora à apoptose induzida pela ausência de soro. Quando as células P19 indiferenciadas foram incubadas com 100 nM do aptâmero B7, o número de células apoptóticas (anexina V-FITC e anexina V-FITC/PI positivas) cresceu consideravelmente, tanto nas células carenciadas quanto nas mantidas em soro, o que indica que o aptâmero está atuando sobre um receptor purinérgico ou induzindo a apoptose por outra via (figura 4.18, tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

Para testarmos a hipótese de que o aptâmero B7 estaria agindo sobre um receptor purinérgico, tratamos as células simultaneamente com 100  $\mu$ M de ATP e 100 nM do

aptâmero. Neste caso, observamos que os níveis das células vivas e apoptóticas retrocederam aos do controle, indicando que houve uma competição entre o ATP e o aptâmero B7. Nas células privadas de soro, a incubação com 100  $\mu$ M de ATP e 100 nM do aptâmero reverteu a proteção à apoptose promovida pelo ATP, a porcentagem de células vivas decaiu de 73,79% para 27,25%, o mesmo não foi observado para a cultura mantida em meio com soro, uma plausível explicação para este dado seria a ligação inespecífica dos aptâmeros a componentes do soro, o que diminuiria o número de moléculas disponíveis para competir com o ATP pelo seu alvo (figura 4.18, tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

Estes dados sugerem que o aptâmero B7 se liga a um receptor purinérgico e que este provavelmente é o receptor P2Y2. Estudos prévios realizados em nosso laboratório caracterizaram a expressão diferencial dos subtipos purinérgicos durante a diferenciação neuronal das células de carcinoma embrionário P19 (tabela 4.5). Os dados obtidos indicam, que dentre os subtipos purinérgicos expressos em células P19 indiferenciadas, os principais responsáveis pelos aumentos transitórios na  $[Ca^{2+}]_i$ , induzidos pelo ATP, são os receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 (Resende et al., 2007, 2008), sendo que destes três subtipos, somente P2Y2R está associado à proteção induzida por nucleotídeos à apoptose (Chorna et al., 2004, Coutinho-Silva et al., 2005, Arthur et al., 2006, Burgos et al., 2007). Descrições da literatura sugerem que a ativação do receptor P2Y1 induz a apoptose em células tratadas com nucleotídeos (Sellers et al. 2001, Mamedova et al., 2006, Coutinho-Silva et al., 2005), e Solini et al., indicaram o envolvimento do receptor P2X4 na indução da apoptose por nucleotídeos em células mesangiais humanas (Solini et al., 2006).

Ainda é necessário que outros ensaios sejam realizados no sentido de averiguar se o aptâmero B7 possui afinidade por outros subtipos de receptores purinérgicos. O nosso grupo dará continuidade a este trabalho respondendo a este questionamento e também caracterizando os demais aptâmeros identificados.



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  $\mu$ M de ciclo 0 (biblioteca); 100  $\mu$ M de ATP; 100 nM do aptâmero B7; 100 nM do aptâmero B7 e 100  $\mu$ M 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.

**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: 100 nM de ciclo 0 (biblioteca); 100  $\mu$ M de ATP; 100 nM do aptâmero B7; 100 nM do aptâmero B7 e 100  $\mu$ M 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.

	Células cultivadas na presença de soro								
Tratamento	Necróticas	Mortas	Vivas	Apoptóticas	PI (total)	Anexina V (total)			
Controle	3,05 ± 0,87	4,45 ± 1,26	80,42 ± 3,46	12,09 ± 1,35	7,49 ± 2,12	16,54 ± 2,6			
Ciclo 0	3,22 ± 1,04	6,75 ± 3,23	74,59 ± 3,49	15,45 ± 0,77	9,96 ± 4,26	22,2 ± 2,46			
B7	9,36 ± 0,75	14,86 ± 1,23	40,66 ± 1,66	35,13 ± 2,22	24,21 ± 1,46	49,99 ± 2,33			
ATP	2,6 ± 0,70	6,47 ± 2,69	87,2 ± 3,27	3,72 ± 1,99	9,07 ± 2,28	10,19 ± 3,92			
B7 + ATP	3,06 ± 1,16	5,17 ± 1,90	82,46 ± 4,51	9,32 ± 4,42	8,23 ± 1,00	14,48 ± 5,61			
	Células Carenciadas								
Tratamento	Necróticas	Mortas	Vivas	Apoptóticas	PI (total)	Anexina (total)			
Controle	5,61 ± 0,16	18,62 ± 0,15	26,14 ± 0,23	49,63 ± 0,24	24,23 ± 0,22	68,25 ± 0,32			
Ciclo 0	2,77 ± 1,07	15,2 ± 2,21	28,79 ± 2,59	53,24 ± 2	17,97 ± 2,35	68,44 ± 1,64			
B7	3,16 ± 1,02	13,81 ± 0,31	3,05 ± 1,17	79,98 ± 1,55	16,97 ± 1,26	93,79 ± 1,24			
АТР	3,09 ± 1,39	8,15 ± 4,74	73,79 ± 5,76	14,97 ± 1,83	11,23 ± 6,13	23,12 ± 4,43			
B7 + ATP									

Os dados representam a média ± E.P.M de três experimentos (expressos em porcentagem do número total de células). PI: iodeto de propídio. Células Necróticas (PI positivo, anexina V negativa); Células mortas (anexina V/PI positivas); Células apoptóticas (anexina V positiva); Células vivas (anexina V e PI negativas); PI total (PI positivo e anexia V/PI positivas); Anexina total (anexina V positiva e anexia V/PI positivos)

	Células cultivadas na presença de soro						
Tratamento	Necróticas	Mortas	Vivas	Apoptóticas	PI (total)	Anexina V (total)	
Controle x Ciclo 0	0,4530	0,3199	0,1556	0,0438*	0,3336	0,1013	
Controle x B7	0,0014*	0,0010**	0,0007**	0,0005**	0,0011*	0,0002**	
Controle x ATP	0,3266	0,2339	0,0781	0,0086*	0,2840	0,0922	
Controle x B7/ATP	0,4958	0,3606	0,3423	0,2639	0,3644	0,3566	
Ciclo 0 x B7	0,0246*	0,1084	0,0193*	0,0019*	0,0818	0,0047*	
B7 x ATP	0,0007**	0,0223*	0,0003**	0,0001**	0,0021*	0,0006**	
ATP x B7/ATP	0,3526	0,3277	0,1806	0,1294	0,3536	0,2452	
Ciclo 0 x B7/ATP	0,4601	0,3576	0,1133	0,1139	0,3772	0,1197	
Ciclo 0 x ATP	0,3332	0,4753	0,0475*	0,0049*	0,3772	0,0296*	
Células carenciadas							
		Célu	ulas caren	ciadas			
Tratamento	Necróticas	Célu Mortas	ulas caren	Apoptóticas	PI (total)	Anexina V (total)	
Tratamento Controle x Ciclo 0	<b>Necróticas</b> 0,0388*	<b>Célu</b> Mortas 0,0992	ulas caren Vivas 0,1680	Apoptóticas	<b>PI (total)</b> 0,0404*	Anexina V (total) 0,4495	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7	Necróticas 0,0388* 0,0468*	Célu Mortas 0,0992 0,0009**	Ulas caren Vivas 0,1680 0,0006**	Apoptóticas           0,0780           0,0007**	<b>PI (total)</b> 0,0404* 0,0106*	Anexina V (total) 0,4495 0,0006**	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7 Controle x ATP	Necróticas 0,0388* 0,0468* 0,0761	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568	Ulas caren Vivas 0,1680 0,0006** 0,0048*	Apoptóticas           0,0780           0,0007**           0,0008**	PI (total) 0,0404* 0,0106* 0,0606	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031*	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7 Controle x ATP Controle x B7/ATP	Necróticas 0,0388* 0,0468* 0,0761 0,0331*	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568 0,0001**	Uivas 0,1680 0,0006** 0,0048* 0,3960	Apoptóticas           0,0780           0,0007**           0,0008**           0,2143	PI (total) 0,0404* 0,0106* 0,0606 0,0156*	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031* 0,3861	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7 Controle x ATP Controle x B7/ATP Ciclo 0 x B7	Necróticas           0,0388*           0,0468*           0,0761           0,0331*           0,3796	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568 0,0001** 0,2328	Uivas 0,1680 0,0006** 0,0048* 0,3960 0,0011*	Apoptóticas           0,0780           0,0007**           0,0008**           0,2143           0,0001**	PI (total)           0,0404*           0,0106*           0,0606           0,0156*           0,3108	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031* 0,3861 0,0001**	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7 Controle x ATP Controle x B7/ATP Ciclo 0 x B7 B7 x ATP	Necróticas           0,0388*           0,0468*           0,0761           0,0331*           0,3796           0,4797	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568 0,0001** 0,2328 0,1473	Uivas 0,1680 0,0006** 0,0048* 0,3960 0,0011* 0,0016*	Apoptóticas         0,0780         0,0007**         0,0008**         0,2143         0,0001**         0,0000**	PI (total)         0,0404*         0,0106*         0,0606         0,0156*         0,3108         0,1929	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031* 0,3861 0,0001** 0,0006**	
Tratamento Controle x Ciclo 0 Controle x B7 Controle x ATP Controle x B7/ATP Ciclo 0 x B7 B7 x ATP ATP x B7/ATP	Necróticas           0,0388*           0,0468*           0,0761           0,0331*           0,3796           0,4797           0,4517	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568 0,0001** 0,2328 0,1473 0,0292*	Uivas 0,1680 0,0006** 0,0048* 0,3960 0,0011* 0,0016*	Apoptóticas         0,0780         0,0007**         0,0008**         0,2143         0,0001**         0,0000**         0,00030*	PI (total) 0,0404* 0,0106* 0,0606 0,0156* 0,3108 0,1929 0,0448*	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031* 0,3861 0,0001** 0,0006** 0,0006**	
TratamentoControle x Ciclo 0Controle x B7Controle x ATPControle x B7/ATPCiclo 0 x B7B7 x ATPATP x B7/ATPCiclo 0 x B7/ATP	Necróticas           0,0388*           0,0468*           0,0761           0,0331*           0,3796           0,4797           0,4517           0,3396	Célu Mortas 0,0992 0,0009** 0,0568 0,0001** 0,2328 0,1473 0,0292* 0,0217*	Uivas 0,1680 0,0006** 0,0048* 0,3960 0,0011* 0,0016* 0,0009** 0,3699	Apoptóticas           0,0780           0,0007**           0,0008**           0,2143           0,0001**           0,0000**           0,0030*           0,0873	PI (total)           0,0404*           0,0106*           0,0606           0,0156*           0,3108           0,1929           0,0448*           0,0190*	Anexina V (total) 0,4495 0,0006** 0,0031* 0,3861 0,0001** 0,0006** 0,0004** 0,4063	

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

\*P < 0,05; \*\*P< 0,001. PI: iodeto de propídio. Células Necróticas (PI positivo, anexina V negativa); Células mortas (anexina V/PI positivos); Células apoptóticas (anexina V positiva); Células vivas (anexina V e PI negativas); PI total (PI positivo e anexia V/PI positivos); Anexina total (anexina V positiva e anexia V/PI positivos)

Células em soro X Células carenciadas							
Tratamento							
Células	Controle	Ciclo 0	Aptâmero B7	АТР	Aptâmero B7 + ATP		
Necróticas	0,0323*	0,3839	0,0026*	0,3648	0,4363		
Mortas	0,0024*	0,0881	0,2031	0,3651	0,0032*		
Vivas	0,0013*	0,0062*	0,0000**	0,0425*	0,0002**		
Apoptóticas	0,0003**	0,0002**	0,0000**	0,0036*	0,0010**		
PI (total)	0,0050*	0,1384	0,0052*	0,3587	0,0001**		
Anexina V (total)	0,0220*	0,0043*	0,0001**	0,0282*	0,0004**		

 Tabela 4.4- Nível descritivo do teste t (P-valor) para a comparação estatística entre

 células mantidas em soro e as células carenciadas.

\* P < 0,05; \*\*P< 0,001. PI: iodeto de propídio. Células Necróticas (PI positivo, anexina V negativas); Células mortas (anexina V/PI positivos); Células apoptóticas (anexina V positiva);</li>
Células vivas (anexina V e PI negativas); PI total (PI positivo e anexia V/PI positivos);
Anexina total (anexina V positiva e anexia V/PI positivos).

**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).

	Dias da diferenciação						
Receptores	Ind	D4	D6	D8			
P2X1	n.d	+	+	n.d			
P2X2	+	++	+	+++			
P2X3	+++	++	+	n.d			
P2X4	++	+	++	+			
P2X5	n.d	n.d	n.d	n.d			
P2X6	+	++	++	+++			
P2X7	n.d	n.d	n.d	n.d			
P2Y1	+++	++	++	n.d			
P2Y2	+	++	+++	+++			
P2Y4	+++	++	++	n.d			
P2Y6	+	++	++	+++			

Os sinais + indicam a intensidade da expressão de cada receptor em cada estágio da diferenciação neuronal. n.d: marcação não detectada.

# DISCUSSÃO

### 5-Discussão

O receptor purinérgico P2Y2 possui ampla distribuição no corpo humano e está envolvido em uma série de mecanismos fisiológicos e patológicos (Burnstock, 2006a, 2007a). A ativação desses no epitélio das vias aéreas aumenta a secreção de muco, a frequência de batimentos dos cílios e o transporte de íons cloreto e água através da superfície luminal (Lazarowski and Boucher, 2009). Além disso, o P2Y2R está associado a vias de sinalização pro - inflamatórias (Weisman et al., 2005), pode inibir a neurodegeneração (Chorna et al., 2004, Franke et al., 2006, Burgos et al., 2007), modular a proliferação e diferenciação (Arthur et al.,2005, Coutinho-Silva et al., 2005, Resende et al., 2007, 2008), e regular o ciclo celular (Miyagi et al., 2006, Malam-Souley et al., 2006). Devido a essas características, o P2Y2R é um intrigante alvo para o desenvolvimento de novas drogas.

De fato, agonistas com estrutura de dinucleotídeos, Up4U e Up4dC, estão sendo submetidos a testes clínicos como novos tratamentos para a síndrome dos olhos secos e fibrose cística, respectivamente (Nichols, 2004, Deterding et al., 2005). Contudo, a potência, a eficácia e a seletividade desses dinucleotídeos são apenas moderadas (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009, Hillmann et al., 2009), e embora eles sejam metabolicamente mais estáveis do que os mononucleotídeos ATP e UTP, eles geralmente possuem uma curta meia-vida devido à hidrólise enzimática, especialmente por pirofosfatases (NPPs) (Vollmayer et al., 2003). Assim, potentes e seletivos agonistas e antagonistas seriam muito importantes para aumentar o conhecimento sobre os papéis patofisiológicos desse receptor e para explorar o seu potencial terapêutico.

A técnica SELEX é proposta como uma nova abordagem para a seleção de ligantes, a partir de uma biblioteca combinatória de oligonucleotídeos, com alta afinidade e especificidade contra uma ampla variedade de alvos, que vão desde pequenas moléculas a proteínas, ácidos nucléicos, células e organismos (Ciesiolka et al., 1995, Blank et al., 2001,

Wang et al., 2000, Daniels et al., 2003, Ulrich et al., 2002). Os aptâmeros geralmente possuem os requisitos necessários para a sua aplicação terapêutica: além da especificidade e afinidade, eles não são imunogênicos e o procedimento de SELEX aceita nucleotídeos quimicamente modificados, o que melhora a estabilidade deles em fluidos biológicos (Ulrich et al., 2006, Stoltenburg et al., 2007).

A maioria dos aptâmeros descritos até o momento foram selecionados contra proteínas solúveis e purificadas (Ohuchi et al., 2006, Shamah et al.,2007). Em geral, os melhores resultados da técnica de SELEX são obtidos quando a proteína alvo possui uma conformação estável, permitindo a constante apresentação do epítopo estrutural de um ciclo de seleção para o próximo. Muitas moléculas com potencial terapêutico e para diagnóstico são constituintes naturais da membrana, e quando o alvo exige a presença da membrana (como receptores acoplados à proteína G ou canais iônicos) ou de co-receptores para assumir sua conformação estável, é difícil ou impossível planejar um experimento de SELEX com a proteína solúvel e purificada (Ohuchi et al., 2006, Shamah et al.,2007).

Aptâmeros, contra alvos expressos na superfície celular, podem ser selecionados realizando o procedimento de SELEX contra ectodomínios da molécula, como efetuado por Du et al. na identificação de aptâmeros do receptor AMPA (Du et al., 2007), o que, contudo, nem sempre garante a atividade do aptâmero contra a proteína no seu ambiente fisiológico (Pestourie et al., 2006), ou contra o alvo presente em uma mistura complexa, como preparações de membrana ou a superfície de células intactas (Shamah et al., 2007).

Um dos trabalhos pioneiros, demonstrando que os aptâmeros podem ser selecionados contra alvos complexos e não somente contra proteínas solúveis, foi realizado por Ulrich et al. em 1998. Neste procedimento de SELEX, o alvo foi apresentado em uma preparação de membrana do órgão elétrico do *Torpedo california*, o qual é rico em receptores nicotínicos de acetilcolina. Foram empregados os métodos de separação: adsorção em filtros de nitrocelulose

e gel *mobility shift*, e a fenciclidina, inibidor dos receptores de acetilcolina, foi usada, nos ciclo de seleção empregando filtração em nitrocelulose, para eluir os aptâmeros que interagem com o seu domínio de ligação aos receptores de acetilcolina. Após nove rodadas de SELEX, duas classes de aptâmeros foram identificadas. As moléculas da Classe I são potentes inibidores da atividade da acetilcolina nas células musculares BC3H1, enquanto que as da classe II são capazes de bloquear a ligação da fenciclidina e da cocaína aos receptores nicotínicos de acetilcolina sem afetar a atividade destes, podendo,desta forma, ser eficazes em reduzir a toxicidade associada com a dependência a drogas de abuso.

Neste trabalho, optamos por utilizar como alvo o receptor P2Y2 recombinante expresso em um preparado de membrana da linhagem de astrocitoma humano 1321N1. Antes de iniciar o procedimento, esta linhagem foi caracterizada quanto a atividade do P2Y2R frente aos agonistas ATP, UTP e ATPγS e o antagonista suramina e demonstrou respostas similares às descritas na literatura (para revisão Abbranchio et al., 2006).

É importante ressaltar que as células 1321N1 selvagens, naturalmente, não expressam receptores de nucleotídeos do tipo P2 funcionais (Parr et al., 1994) o que, por consequência, diminui a probabilidade de selecionarmos moléculas com ligação inespecífica a outros subtipos purinérgicos.

Contudo, dada a complexidade da membrana celular, é de se esperar, que além do receptor P2Y2, outros constituintes da membrana também possam ser ligantes das moléculas de RNA, o que é um inconveniente no desenho do presente estudo. Para contornar esta limitação do ensaio, seria oportuno utilizar um ciclo de seleção negativa contra a linhagem 1321N1 selvagem, entretanto, como mencionado anteriormente, não consideramos isto adequado já que identificamos uma expressão ínfima de receptores P2Y2 nestas células, o que poderia ocasionar a perda de sequências com afinidade pelo alvo.

Desta forma, optamos por outro procedimento: o ATPγS foi usado em todos os ciclos de seleção para eluir especificamente as sequências de RNA ligadas ao seu domínio de ligação ao P2Y2R. Entre as drogas descritas como ligantes do P2Y2R, escolhemos o ATPγS porque sua afinidade e especificidade pelo P2Y2 são superiores às da suramina e devido à presença do tiofosfato terminal, ele é menos suscetível à degradação por ecto-nucleotidases do que os agonistas fisiológicos ATP e UTP (Abbracchio et al. 2006).

A mesma abordagem foi utilizada com sucesso em outros trabalhos, como na seleção de aptâmeros contra o receptor de acetilcolina (citado anteriormente) e na seleção de aptâmeros contra receptores do *Trypanosoma cruzi* que interagem com moléculas da superfície da célula hospedeira mediando a adesão e a invasão destas pelo parasita (Ulrich et al., 2002). Neste estudo, as macromoléculas laminina, fibronectina, sulfato de heparana e trombospondina foram utilizadas para eluir os aptâmeros que interagiam com seus receptores na superfície do *T. cruzi*, rendendo, ao final deste procedimento, aptâmeros foram identificados capazes de inibir a invasão das células de rim de macaco LLC-MK<sub>2</sub> pelo *T. cruzi*.

A biblioteca de RNA, utilizada na seleção, foi transcrita de uma biblioteca combinatória de DNA em que cada sequência possui 100 nucleotídeos (nt) com 32 posições aleatórias. O tamanho da porção randomizada comumente varia de 25 a 75 nt; sendo que bibliotecas com 30 a 40 posições randômicas foram empregadas com sucesso em outros procedimentos de SELEX contra alvos complexos como: na seleção de aptâmeros contra receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de adesão do *Trypanosoma cruzi* e contra tenascin-C (Ulrich et al., 1998, 2002, Hicke et al., 2001).

O procedimento foi iniciado com aproximadamente 56 cópias de cada um dos 10<sup>13</sup> variantes, os ciclos foram conduzidos com pressão de seleção crescente. Após nove 9 rodadas de SELEX, identificamos 46 sequências, que apesar de ainda serem heterogêneas, foram

agrupadas, baseado na conservação parcial de regiões consensos, em três famílias e se ligaram ao preparado de membrana com  $K_d$  de 164,3 nM.

Em experimentos de seleção contra alvos complexos nem sempre é obtido um conjunto homogêneo de oligonucleotídeos. Por exemplo, a seleção de aptâmeros de DNA contra a superfície de eritrócitos, resultou, após 25 ciclos, em uma coleção de moléculas com alta complexidade, que possuía poucas sequências repetidas. As duas famílias identificadas se ligavam ao alvo com afinidades entre 1,6 a 1,8 nM (Morris et al., 1998). Após 15 ciclos de SELEX contra receptores de tirosina quinase expresso em células PC12, 67 clones foram analisados. Duas sequências constituíam juntas mais de 50% dos clones, quatro outras representavam 25% e oito foram identificadas apenas uma vez. Elas não possuíam semelhança entre si e o  $K_d$  dos aptâmeros avaliados variou de 30 a 70 nM (Cerchia et al., 2005). Ulrich et al. identificou, tendo como alvo os receptores nicotínicos de acetilcolina, após 9 ciclos, duas classes de aptâmeros com afinidades de 2 e 12 nM (Ulrich et al., 1998).

A predição da estrutura secundária, das sequências das três famílias, demonstrou que nem todos os aptâmeros possuíam seus motivos conservados dentro de alças ou grampos. Contudo, como discutido anteriormente, isto não invalida a caracterização destas sequências.

O aptâmero B7, cuja sequência se repetiu em dois outros clones, teve sua afinidade de ligação à superfície das células 1231N1-mP2Y2, 1321N1-P2Y1 e 1321N1-P2Y4 determinada por ensaios de competição homóloga. Observamos que a constante de dissociação para a linhagem 1231N1-mP2Y2 foi de 187,5 nM, um valor aproximadamente 10 vezes inferior ao calculado para o ATP na mesma linhagem e, pelo menos, 17 e 49 vezes inferior ao valor obtido para as células 1321N1-P2Y1 e 1321N1-P2Y4, respectivamente.

Dando continuidade ao trabalho, determinamos a atividade biológica e B7 verificamos que este é capaz de interferir em uma função celular envolvendo a sinalização de nucleotídeos via P2Y2. O desenvolvimento e o crescimento de um organismo são processos altamente regulados que envolvem a manutenção do equilíbrio entre a proliferação e a apoptose (Hipfner et al., 2004). Na apoptose, as células, não mais necessárias ou que causarão danos ao organismo ou tecido, são eliminadas de uma maneira ordenada e limpa. Isto previne o desenvolvimento de uma resposta inflamatória que está, freqüentemente, associada com a morte celular por necrose. Injúria, estresse oxidativo e níveis extracelulares reduzidos de fatores tróficos, são exemplos de estímulos indutores que podem levar as células à apoptose (Twomey and McCarthy, 2005).

A manutenção da vida celular é um componente crucial para a função de uma célulatronco. A sobrevivência destas células, em particular a inibição da apoptose, é dependente da presença de fatores tróficos e não-tróficos (Park et al., 2010, Miguel-Aliaga and Thor, 2009). As células P19 são uma linhagem de carcinoma embrionário de camundongo com capacidade de se diferenciarem em tipos celulares dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). Quando manipuladas na presença de DMSO, elas se diferenciam em células de origem endodérmica e mesodérmica, tais como células musculares cardíacas e esqueléticas (Edwards et al., 1983, McBurney et ., 1982). Quando tratadas com ácido retinóico, elas se diferenciam em neurônios e células da glia (Jones-Villeneuve et al., 1982, Martins et al.,2005, Resende et al., 2007). Nosso grupo usou esta linhagem como modelo para estudar a expressão e a atividade dos receptores purinérgicos P2X e P2Y durante a diferenciação neuronal dessas células e verificou que o ATP modula tanto a proliferação quanto a diferenciação neuronal das células P19 (Resende et al., 2007, 2008).

De fato, trabalhos da literatura têm apontado o papel protetor do P2Y2R em eventos degenerativos (Chorna et al., 2004, Burgos et al., 2007). Por exemplo, Arthur et al. demonstrou que células PC12 e neurônios da raiz dorsal são protegidos, da apoptose

desencadeada pela privação de soro, pelos nucleotídeos ATP, UTP e ATPγS. Um efeito mediado pelo receptor P2Y2 que requer Scr, ERK e Akt (Arthur et al. 2006).

Condizente com os dados até então descritos, nós demonstramos que o ATP exerce uma função protetora em células P19 indiferenciadas privadas de soro, provavelmente via o receptor P2Y2, e que o aptâmero identificado neste trabalho foi capaz de reverter a ação protetora do ATP, diminuindo a porcentagem de células vivas de 74% para 27%, semelhante ao nível das células controle (células privadas de soro que não receberam tratamento). Tendo em vista que o processo de seleção dos aptâmeros foi realizado utilizando como competidor um análogo estrutural do ATP, ATP $\gamma$ S, é provável que o aptâmero B7 iniba a atividade protetora do ATP competindo com este pelos mesmos sítios de ligação. A observação mais interessante destes dados foi que a concentração do aptâmero que promoveu este efeito, 100 nM, era 1000 vezes menor do que a concentração utilizada do ATP, 100  $\mu$ M.

Semelhante ao aptâmero identificado neste estudo, outros procedimentos de SELEX também selecionaram oligonucleotídeos com atividade biológica. Além dos exemplos citados anteriormente, Cerchia et al., utilizando como alvo receptores de tirosina quinase (RET) expressos na superfície de células PC12, identificaram o aptâmero D4, que não somente se ligou ao domínio extracelular de RET com constante de dissociação de 35 nM, como, também, na concentração de 200 nM, inibiu a autofosforilação de RET em até 70%, reduzindo drasticamente a fosforilação de ERK. Este aptâmero foi capaz, inclusive, de inibir o crescimento de neuritos induzido por GDNF nas células PC12 (Cerchia et al., 2005).

O aptâmero B7 foi o primeiro, dos 46 aptâmeros selecionados, a ter suas propriedades de ligação ao receptor P2Y2 caracterizadas. Nós acreditamos, que dentre os demais clones, é alta a probabilidade de encontrarmos aptâmeros com uma maior potência e seletividade pelo P2Y2R, uma vez que nem sempre o aptâmero, cuja sequência tem a maior representação no total de clone identificados, possui os melhores parâmetros de interação com o alvo. Por

exemplo, como no trabalho citado acima, dos 67 clones identificados após 15 ciclos de SELEX contra o RET, a sequência do aptâmero D4, o qual apresentou as melhores propriedades de interação com RET, sendo capaz inclusive de inibir sua via de sinalização, era única; enquanto o aptâmero D14, cuja sequência representava 34% dos clones, não apresentou ligação significativa ao alvo, a uma concentração de 100 nM, quando comparado ao controle (biblioteca) (Cerchia et al., 2005, Pestourie et al., 2006). Desta forma, um dos nossos próximos objetivos será caracterizar os demais aptâmeros identificados neste procedimento de SELEX.

O aptâmero B7 demonstrou propriedades que o tornam uma ferramenta relevante para definir as funções fisiopatológicas do receptor P2Y2. Outros ensaios ainda deverão ser realizados para complementar a caracterização do aptâmero B7 e para aperfeiçoar suas propriedades, como verificar a especificidade do aptâmero frente aos subtipos purinérgicos ainda não examinados; determinar o IC<sub>50</sub> do aptâmero (concentração do aptâmero necessária para inibir 50% da resposta do agonista) em relação à variação da  $[Ca^{2+}]_i$  desencadeada pelo ATP; avaliar a capacidade deste de intervir em outros processos celulares envolvendo a sinalização de nucleotídeos via P2Y2, como na diferenciação neuronal das células P19; empregar técnicas de modificações pós-SELEX para aperfeiçoar a afinidade, a atividade funcional e estabilidade metabólica deste aptâmero, por exemplo, determinar a extensão da sequência do aptâmero requerida para a interação com o receptor P2Y2.

Tais ensaios contribuirão para o desenvolvimento de compostos com propriedades farmacológicas otimizadas e com potencial terapêutico maior, até mesmo do que as apresentadas pelo próprio aptâmero B7. Em outras palavras, o aptâmero B7 poderá servir como protótipo para o desenvolvimento de novos compostos. Nesse ínterim, podemos mencionar o desenvolvimento do aptâmero Macugen<sup>TM</sup>. Jellinek et al. foram os primeiros a utilizar a metodologia de SELEX para selecionar aptâmeros que bloqueavam a interação entre

o VEGF e seu receptor. Estas moléculas não possuíam relevância terapêutica, mas foram primordiais para que o procedimento de seleção fosse aperfeiçoado gerando posteriormente o Macugen<sup>TM</sup> (Jellinek et al., 2004).

Acreditamos que o conjunto de dados obtidos neste trabalho são promissores e relevantes no estudo dos receptores purinérgicos, sendo que uma das suas principais contribuições consistiu em provar a viabilidade do procedimento de SELEX para a identificação de moléculas bioativas contra o receptor P2Y2, o que, também, se estende para os demais subtipos purinérgicos, abrindo, desta forma, para o nosso grupo e também para outros pesquisadores, uma gama de possibilidades para a geração de ligantes subtipos-específicos dos receptores purinérgicos. Destaca-se aqui mais uma vez o desenvolvimento do aptâmero Macugem<sup>TM</sup>, como citado acima.

## **CONCLUSÃO**

### **6-Conclusões**

Neste estudo, nós utilizamos a metodologia de SELEX para selecionar aptâmeros de RNA contra o receptor purinérgico P2Y2 humano expresso em células de astrocitoma humano 1321N1.

Ao final de nove ciclos de SELEX, nós isolamos 46 sequências que foram agrupadas em três famílias de acordo com a presença de regiões consensos. A mistura destas moléculas se ligou à preparação de membranas da linhagem 1321N1-hP2Y2 com uma constante de dissociação de 164 nM.

Um dos oligonucleotídeos identificados, denominado aptâmero B7, se ligou ao subtipo purinérgico P2Y2 murino expresso na superfície da linhagem 1321N1 com  $K_d$  de 184 nM (valor pelo menos 17 e 49 vezes inferior aos da sua ligação às células 1321N1-P2Y1 e 1321N1-P2Y4, respectivamente). 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 B7 foi avaliada em células P19 indiferenciadas (sabidamente expressando receptores P2Y2 endógenos), na qual a proteção conferida pelo ATP à apoptose, provavelmente via o receptor P2Y2, foi revertida na presença deste aptâmero em uma concentração mil vezes menor do que a do ATP.

O aptâmero B7 demonstrou propriedades que o tornam uma ferramenta relevante para definir as demais funções fisiopatológicas do receptor P2Y2, sendo que passos de otimização das suas propriedades como ligante e biodisponibilidade poderão torná-lo um composto de alta relevância farmacêutica.

Este estudo confirmou a viabilidade da técnica SELEX para identificar ligantes subtipos-específicos dos receptores purinérgicos, abrindo uma gamma de possibilidade para o nosso grupo e para demais pesquisadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 7-Referências Bibliográficas

Abbracchio M.P. and Burnstock G. (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* **78**: 113-145.

Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., KennedY C., Knight G., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K., Weisman G.A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy *Pharmacol Rev.* **58**: 281–341.

Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhratsky A., Zimmermann (2008) Purinergic signaling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*. **32**: 19-29.

Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A. (2008) Guide to Receptor and Channels (GRAC), 3rd edn. (2008 revision). *Br J Pharmacol.* **153** (Suppl. 2): S1-S209.

Archemix Website - http://www.archemix.com/website/products.php

Arthur D.B., Akassoglou K., Insel P.A. (2005) P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA receptor signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102:** 19138–19143.

Arthur D.B., Georgi S., Akassoglou K., Insel P.A. (2006) Inhibition of Apoptosis by P2Y2 Receptor Activation: Novel Pathways for Neuronal Survival J. Neurosci. **26:** 3798 – 3804.

Ayyanathan K., Webb T.E., Sandhu A.K., Athwal R.S., Barnard E.A., Kunapuli S.P. (1996) Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochem Biophys Res Commun* **218**:783–788.

Bagchi S., Liao Z., Gonzalez F.A., Chorna N.E., Seye C.I., Weisman G.A., and Erb L. (2005) The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with  $\alpha_5$  integrins to communicate with Go and stimulate chemotaxis. *J Biol Chem* **280**: 39058–39066.

Bartel, D.P. and Szostak J.W. (1993). Isolation of a new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* **261**: 1411–1418.

Bell C., Lynam E., Landfair D.J., Janjic N., Wiles M.E. (1999) Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **35:** 533-542.

Berens C., Thain A., Schroeder R. (2001) A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 2549–2556.

Blank M., Weinschenk T., Priemer M., Schluesener, H. (2001). Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J. Biol. Chem.* **276**: 16464–16468.

Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. (1992). Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**: 564–566.

Bodin P. and Burnstock G. (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **26**: 959-969.

Boomer R. M., Kurz M., Healy J.M., Wilson C., McCauley T.G. (2005) Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides* **15**: 183–195.

Bouchard P.R., Hutabarat R.M., Thompson K.M. (2010) Discovery and Development of Therapeutic Aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**: 237–257.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities os protein utilizating the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* **71**: 248-54.

Brookings, D.; Davenport, R. J.; Davis, J.; Galvin, F. C. A.; Lloyd, S.; Mack, S. R.; Owens R.; Sabin, V.; Wynn, J. (2007) Novel nucleotide triphosphates as potent P2Y2 agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**:562–565.

Bunka D.H.J and Stockley P. (2006) Aptamer come of age- at last. Nature 4: 588-595.

Burgos M., Neary J.T., González F.A. (2007) PY2 nucleotide receptors inhibit traumainduced death of astrocytic cells. *J. Neurochem.* **103:** 1785-1800.

Burnstock G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L (eds) Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. Raven, New York, pp 107–118

Burnstock G. (2006a) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signalling. *Pharmacol. Rev.* **58**: 8–86.

Burnstock G. (2006b) Purinergic signalling. Br J Pharmacol. 147: 172-181.

Burnstock G. (2007a) Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission *Physiol Rev* 87: 659–797.

Burnstock G. (2007b) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 64: 1471-1483.

Burnstock G. and Knight G. E. (2004) Cellular distribution functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* **240**: 31–304.

Burnstock G., Campbell G., Satchell D., Smythe A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **40**: 668–688.

Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24:509-81.

Cadwell R. C. and Joyce G. F. (1994) Mutagenic PCR. Genome Res.. 3: S136-S140.

Camden J.M., Schrader A.M., Camden R.E., Gonzalez F.A., Erb L., Seye C.I., Weisman G.A. (2005) P2Y2 nucleotide receptors enhance  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem* **280**:18696–18702.

Carothers J.M. and Szostak J.w. (2006). In Vitro Selection of Functional Oligonucleotides and the Origins of Biochemical Activity *The Aptamer Handbook, Functional Oligonucleotides and Their Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 3-28.

Cerchia L., Duconge F., Pestourie C., Boulay J., Aissouni Y., Gombert K., Tavitian B., de Franciscis V., Libri D. (2005) Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol.* **3**: e123.

Chae H.J., Kang J.S., Byun J.O., Han K.S., Kim D.U., Oh S.M., Kim H.M., Chae S.W., Kim H.R. (2000) Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res.* **42:** 373-381.

Chan M.Y., Rusconi C.P., Alexander J.H. Tonkens R.M., Harrington R.A., Becker R.C. (2008) A randomized, repeat-dose, pharmacodynamic and safety study of an antidote-controlled factor IXa inhibitor. *J Thromb Haemost*. **6**: 789-796.

Chandra S. and Gopinath B. (2007) Methods developed for SELEX. *Anal Bioanal Chem* **387**: 171–182.

Charlton S.J., Brown C.A., Weisman G.A., Turner J.T., Erb L., Boarder M.R. (1996a) PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *Br J Pharmacol.* **118:** 704–710.

Charlton S.J., Brown C.A., Weisman G.A., Turner J.T., Erb, L., Boarder, M.R. (1996b). Cloned and transfected P2Y4 receptors: Characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol* **119**: 1301–1303.

Chelliserrykatill J. and Ellington A.D. (2004) Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA. *Nature Biotechnol.* **22**:1155-1160.

Chen ZP, Krull N, Xu S, Levy A, Lightman SL (1996) Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology* **137**:1833–1840.

Cheng Y. and Prusoff W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **22**:3099-108.

Chorna N.E., Santiago-Pérez L.I., Erb L., Seye C.I., Neary J.T., Sun G.Y., Weisman G.A., González F.A. (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J Neurochem.* **91:** 119-32.

Ciesiolka J., Gorski J., Yarus M. (1995) Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>+2</sup>. *RNA* **1:** 538-550.

Cosmi B. (2009) ARC-1779, a PEGylated aptamer antagonist of von Willebrand factor for potential use as an anticoagulant or antithrombotic agent. *Curr Opin Mol Ther.* **11**: 322-328.

Coutinho-Silva R., Stahl L., Cheung K.K., de Campos N.E., de Oliveira Souza C., Ojcius D.M., Burnstock G. (2005) P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol* **288**: G1024–G1035.

Dale N. and Frenguelli B.G. (2009) Release of Adenosine and ATP During Ischemia and Epilepsy. *Current Neuropharmacology* **7:** 160-179.

Daniels D.A., Chen H., Hicke B.J., Swiderek K.M., Gold L. (2003). A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 15416–15421.

Davenport R.J., Diaz P., Galvin F.C.A., Lloyd S., Mack S.R., Owens R., Sabin V., Wynn J. (2007) Novel nucleotide triphosphates as potent P2Y2 agonists with enhanced stability over UTP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**: 558–561.

de Smidt P.C., Le Doan T., de Falco S., van Berkel, T.J. (1991) Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life and modifies the tissue distribution. *Nucleic Acids Res.* **19:** 4695-4700.

Deterding R., Retsch-Bogart G., Milgram L., Gibson R., Daines C., Zeitlin P.L., Milla C., Marshall B., Lavange L., Engels J., Mathews D., Gorden J., Schaberg A., Williams J., Ramsey B. (2005) Safety and tolerability of denufosol tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y2 receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **39**: 339–348.

Deupree J.D. and Bylund D.B. (2002) Basic Principles and Techniques for Receptor Binding, Tocris. Reviews 18.

Dieckmann T., Suzuki E., Nakamura G.K., Feigon J. (1996) Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA* **2:** 628–640.

Dougan H., Lyster D.M., Vo C.V., Stafford A., Weitz J.I., Hobbs J.B. (2000) Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol* **27**: 289–297.

Drury A.N. and Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J Physiol* **68**: 213–237

Du M., Ulrich U., Zhao X., Aronowski J., Jayaraman V. (2007) Water soluble RNA based antagonist of AMPA receptors. *Neuropharmacology* **53**: 242–251.

Dyke C.K., Steinhubl S.R., Kleiman N.S., Cannon R.O., Aberle L.G., Lin M., Myles S.K., Melloni C., Harrington R.A., Alexander J.H., Becker R.C., Rusconi C.P. (2006) First-inhuman experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity. *Circulation*. **14**: 2490-2497.

Edwards M.K.S., Harris J.F., McBurney M.W. (1983) Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Molec. Cell Biol* **3**: 2280-2286.

Ellington A.D. and Szostak J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.

Ellington A.D. and Szostak J.W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**: 850–852.

Erb L., Garrad R., Wang Y., Quinn .T, Turner J.T., Weisman G.A. (1995) Sitedirected mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem.* **270**: 4185-8.

Eyetech Study G. (2002). Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* **22**: 143–152.

Eyetech Study G. (2003). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology*. **110**: 979-986.

Fadok V.A., Lazlo D.J., Noble P.W., Weinstein L., Riches D.W. H. Henson P.M. (1993) Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J. Immunol.* **151**: 4274–4285.

Famulok M., Blind M., Mayer G. (2001) Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol* **8**: 931-939.

Firsching A., Nickel P., Mora P., Allolio B. (1995) Antiproliferative and angiostatic activity of suramin analogues. *Cancer Res* **55**: 4957–4961.

Fiske C.H., SubbaRow Y. (1929) Phosphorous compounds of muscle and liver. *Science* **70**:381–382.

Flitz T.M., Boyer J.L., Nicholas R.A., Harden T.K. (1994) Expression of a cloned P2Y-purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* **46**: 8-14.

Franke H., Krügel U., Illes P. (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch.* **452:** 622-644.

Freissmuth M., Waldhoer M., Bofill-Cardona E., Nanoff C. (1999) G protein antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 20: 237–245.

Geiger A., Burgstaller P., von der Eltz H., Roeder A., Famulok M. (1996).RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociationconstants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1029–1036.

Girvan A.C., Teng Y., Casson L.K., Thomas S.D, Jüliger S., Ball M.W., Klein J.B., Pierce W.M. Jr, Barve S.S., Bates P.J. (2006) AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin. *Mol Cancer Ther.* **5**: 1790-1799.

Glasner M.E., Bergman N.H., Bartel D.P. (2002). Metal ion requirements for structure and catalysis of an RNA ligase ribozyme. *Biochemistry* **41**: 8103–8112.

Green L. S., Jellinek D., Bell C., Beebe L. A., Feistner B. D., Gill S. C., Jucker F. M., Janjic N. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol* **2**: 683–695.

Hallet M.B., Dormer R.L.M., Campbell A.K. (1990) In peptide Hormone Action: A Practical Approch, (Siddle K and Hutton JC, eds), New York: Oxford University Press p 115-150.

Hermann T. and Patel D.J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**: 820–825.

Hicke B.J., Marion C., Chang Y.F., Gould T., Lynott C.K., Parma D., Schmidt P.G., Warren S. (2001). Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* **276**: 48644–48654.

Hillmann P., Ko G-Y., Spinrath A., Raulf A., Kügelgen I., Wolff S.C., Nicholas R.A., Kostenis E., Höltje H-D., Müller E. (2009) Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y2 receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *J. Med. Chem.* **52**: 2762–2775.

Hipfner D.R. and Cohen SM. (2004) Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 805-815.

Holton P. (1959) The liberation of adenosine triphosphate onantidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* **145**: 494–504.

Homann M. and Göringer H.U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2006–2014.

Hou M., Moller S., Edvinsson L., Erlinge D. (2000) Cytokines induce upregulation of vascularP2Y2 receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler*. *Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2064–2069.

http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi

http://mfold.burnet.edu.au/rna\_form

http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Ishida S., Usui T., Yamashiro K., Kaji Y., Amano S., Ogura Y., Hida T., Oguchi Y., Ambati J., Miller J.W., Gragoudas E.S., Ng Y.S., D'Amore P.A., Shima D.T., Adamis A.P. (2003). VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J. Exp. Med.* **198**: 483–489.

Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjic, N. (1994) Inhibition of receptor binding by highaffinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. Biochemistry **33**:10450–1056.

Jones-Villeneuve E.M.V., McBurney M.W., Rogers K.A., Kalnins V.I.J. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J.Cell. Biol.* **94:** 253-262.

Kato Y., Minakawa N., Komatsu Y., Kamiya H., Ogawa N., Harashima H., Matsuda A. (2005) New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX. *Nucleic Acids Res.* **33**: 2942-2951.

Kellerman D., Evans R., Mathews D., Shaffer C.(2002) Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**: 1463-74.

Kellerman D.J (2002) P2Y2 Receptor Agonists\*: A New Class of Clearance Medication Targeted at Improved Mucociliary. *Chest* **121**: 201S-205S.

Khaled Z., Rideout D., O'Driscoll K.R., Petrylak D., Cacace A., Patel R., Chiang L-C., Rotenberg S., Stein C.A. (1995) Effects of suramin-related and other clinically therapeutic polyanions on protein kinase C activity. *Clin Cancer Res* **1**: 113–122.

Kindon N, Meghani P, Thom S (1998) World Pat. 98/54180.

Klussmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann V.A., Furste J.P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol.* **14:** 1112–1115.

Ko J.H., Cho B., Ahn J.K., Lee Y., Park I. (1999) Probing the functional motifs of Escherichia coli 5S rRNA in relation to 16S rRNA using a SELEX experiment. *Br. Kor. Chem. Soc.* **20**: 1335–1339.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-5.

Lazarowski E.R. and Boucher R.C. (2009) Purinergic receptors in airway epithelia. *Current Opinion in Pharmacology*. **9**:262-267.

Lazarowski E.R., Watt W.C., Stutts M.J., Boucher R.C., Harden T.K. (1995a) Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol* **116**:1619–1627.

Lazarowski E.R., Watt W.C., Stutts M.J., Brown H.A., Boucher R.C., Harden T.K. (1995b) Enzymatic synthesis of UTPγS, a potent hydrolysis resistant agonist of P2U-purinergic receptors. *Br J Pharmacol* **117**:203–209.

Lee J.F, Stovall G.M., Ellington A.D. (2006) Aptamer therapeutics advance. *Current Opinion in Chemical Biology* **10:** 282–289.

Lehman N. and Joyce G.F. (1993) Evolution in vitro: analysis of a lineage of ribozymes. *Curr Biol* **3**: 723–734.

Liao Z., Seye C.I., Weisman G.A., and Erb L. (2007) The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with  $\alpha_v$  integrins to acess and activate G<sub>12</sub>. *J Cell Sci* **120**:1654–1662.

Lilley D.M. (2003). The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends Biochem Sci* **28:** 495–501.

Liu J., Liao Z., Camden J., Griffin K.D., Garrad R.C., Santiago-Perez L.I., Gonzalez F.A., Seye C.I., Weisman G.A., Erb L. (2004) Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **279**: 8212–8218.

Lohmann K. (1929) Uber die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwiss*. **17**: 624-625.

Lustig K.D., Shiau A.K., Brake A.J., Julius D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**: 5113-5117.

Majumder P., Gomes K.N., Ulrich H. (2009) Aptamers: from bench side research towards patented molecules with therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **19**: 1603-1613.

Malam-Souley R., Seye C., Gadeau A.P., Loirand G., Pillois X., Campan M., Pacaud P., Desgranges C. (1996) Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **166**:57–65.

Mamedova L.K, Gao ZG., Jacobson K.A. (2006) Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors. *Biochem Pharmacol.* **72:**1031-41.

Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace, D. M., Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phophatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**: 1545–1556.

Martins A.H., Resende R.R., Majumder P., Faria M., Casarini D.E., Tarnok A., Colli W., Pesquero J.B., Ulrich H. (2005) Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *J Biol Chem.* **280**:19576-1986.

Maruyama K. (1991) The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of Its Structure. *Journal of the History of Biology*. **24**:145-154.

Mathews D.H., Sabina J., Zuker M., Turner D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structures. J. Mol. Biol. **288**: 911–940.

Mayer G. (2009) The Chemical Biology of Aptamers The Chemical Biology of Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48:** 2672-2689.

McBurney M.W., Jones-Villeneuve E.M.V., Edwards M., Anderson P. (1982) Controlled differentiation of teratocarcinoma cells in culture. *Nature* **299**: 165-167.

McGarrigle D. and Huang X.-Y. (2007) GPCRs Signaling Directly Through Src-Family Kinases. *Sci. STKE*. 392, pe35.

Miguel-Aliaga I. and Thor S. (2009) Programmed cell death in the nervous system--a programmed cell fate? *Curr Opin Neurobiol.* **19:** 127-313.

Miyagi Y., Kobayashi S., Ahmed A., Nishimura J., Fukui M., Kanaide H. (1996) P2U purinergic activation leads to the cell cycle progression from the G1 to the S and M phases but not from the G0 to G1 phase in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **222**:652–658.

Moore D.J., Chambers J.K., Wahlin J.P., Tan K.B., Moore G.B., Jenkins O., Emson P.C., Murdock P.R. (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta* **1521**: 107–119.

Morris K.N., Jensen K.B., Julin C.M., Weil M., Gold L. (1998) High affinity ligands from in vitro selection: complex targets *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2902–2907.

Motulsky H. (1995-1996). *The GraphPad Guide to Analysing Radioligand Binding Data*. GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA p: 1–19.

Nicholas R.A., Watt W.C., Lazarowski E.R., Li Q., Harden K. (1996) Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: Identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor, *Mol Pharmacol.* **50**: 224–229.

Nichols K.K., Yerxa B., Kellerman D.J. (2004) Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy. *Expert Opin. InVestig. Drugs* **13**: 47–54.

Nimjee S.M., Keys J.R., Pitoc G.A., Quick G., Rusconi C.P., Sullenger B.A. (2006) A novel antidote-controlled anticoagulant reduces thrombin generation and inflammation and improves cardiac function in cardiopulmonary bypass surgery. *Mol Ther.* **14**: 408-415.

North A. and Verkhratsky A. (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. *Eur J Physiol*. **452**: 479–485

Novak I. (2003) ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci.* **18**: 12-17.

Ohuchi S.P., Ohtsu T., Nakamura Y. (2006) Selection of RNA aptamers against recombinat transforming growth factor- $\beta$  type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie* **88**: 897-904.

Okumoto Y., Tanabe Y., Sugimoto N. (2003). Factors that contribute to efficient catalytic activity of a small  $Ca^{2+}$ -dependent deoxyribozyme in relation to its RNA cleavage function. *Biochemistry* **42**: 2158–2165.

Palmer R.K., Boyer J.L., Schacter J.B., Nicolas R.A., Harden T.K. (1998) Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* **54**:1118–1123.

Pan T. and Uhlenbeck O.C. (1992) In vitro selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **31:** 3887–3895.

Park K.S, Kim Y.S., Kim J.H., Choi B., Kim S.H., Tan A.H., Lee M.S., Lee M.K., Kwon C.H., Joh J.W., Kim S.J., Kim K.W. (2010) Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. **89:** 509-517.

Parr C.E., Sullivan D.M., Paradiso A.M., Lazarowski E.R., Burch L.H., Olsen J.C., Erb L., Weisman G.A., Boucher R.C., Turner J.T. (1994) Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**:3275-9.

Patel K., Barnes A., Camacho J., Paterson C., Boughtflower R., Cousens D. et al. (2001) Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321  $N^6$  cells. *Eur J Pharmacol.* **430**: 203–210.

Pendergast W., Yerxa B.R., Douglass III J.G., Shaver S.R., Dougherty R.W., Redick C.C. et al. (2001) Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleotide 5'-polyphosphates *Bioorg Med Chem Lett* **11**: 157–160.

Pestourie C., Cerchia L., Gombert K., Aissouni Y., Boulay J., De Franciscis V., Libri D., Tavitian B., Ducongé F. (2006) Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target. *Oligonucleotides*. **16**: 323-35.

Pieken W.A., Olsen D.B., Benseler F., Aurup H., Eckstein F. (1991) Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* **253**: 314-317.

Resende R.R., Britto L.R.G., Ulrich H. (2008) Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Devl Neuroscience* **26**: 763–777.

Resende R.R., Majumder P., Gomes K.N., Britto L.R.G., Ulrich H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience* **146**: 1169–1181.

Riley C.A. and Lehman N. (2003). Expanded divalent metal-ion tolerance of evolved ligase ribozymes. *Biochimie* **85**: 683–689.

Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjic N. (1998) 20-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF(165)—inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7encoded domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 20556–20567.

Sambrook J. and Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sassanfar M. and Szostak J.W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364: 550–553.

Sauer R., El-Tayeb A., Kaulich M., Müller C.E. (2009) Synthesis of uracil nucleotide analogs with a modified, acyclic ribose moiety as P2Y2 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 5071-5079.

Schachter J.B, Li Q., Boyer J.L., Nicholas R.A, Harden T.K. (1996) Second messenger cascate specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1 receptor. *Br J Pharmacol* **118**: 167-173.

Schuster P. (2006) Mathematical Models on RNA Evolution, Simulations In Silico, and Concepts for In Vitro Selection. *The Aptamer Handbook, Functional Oligonucleotides and Their Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 29-45

Sellers L.A., Simon J., Lundahl T.S., Cousens D.J., Humphrey P.P., Barnard E.A. (2001) Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen- activated protein kinases and induce apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 16379–16390.

Seye C.I., Yu N., Gonzalez F.A., Erb L., Weisman G.A. (2004) The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem* **279:**35679–35686.

Shamah S., Healy J.M., Cload S.T. (2008) Complex target SELEX. Accounts of Chemical research. 41: 130-138.

Solini A., Santini E., Chimenti D., Chiozzi P., Pratesi F., Cuccato S., Falzoni S., Lupi R., Ferrannini E., Pugliese G., Di Virgilio F. (2007) Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells: evidence for a role of P2X4. *Am J Physiol Renal Physiol.* **292:** F1537-1547.

Sromek S. and Harden T.K. (1998) Agonist-induced internalization of the P2Y2 receptor. *Molecular Pharmacology* **54**: 485-494.

Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. (2007) SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* **24:** 381–403.

Strehler B.L. and Totter, J.R. (1952). Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. *Arch. Biochem.* **40**: 28-41.

Strehler B.L. and Totter, J.R. (1954). Determination of ATP and related compounds. *Methods of Biochemical Analysis* **1:** 341-356.

Tauber J., Davitt W.F., Bokosky J.E., Nichols K.K., Yerxa B.R., Schaberg A.E., et al. (2004) Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye. *Cornea* **23**: 784–792.

Tonelli R.R. and Colli W. (2008) Transdução de Sinais. Bases Moleculares da Biotecnologia. Editora Roca Ltda. 1ª Edição:153-172

Trujillo C.A., Nery A.A, Alves J.M., Martins A.H, Ulrich H. (2007) Development of the anti-VEGF aptamer to a therapeutic agent for clinical ophthalmology. *Clinical Ophthalmology* **1**: 393–402.

Tucker C.E., Chen L.S., Judkins M.B., Farmer J.A., Gill S.C., Drolet D.W. (1999) Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **732**: 203–212.

Tuerk C. and Gold L. (1990) Systematic evolutions of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505-510.

Twomey C. and McCarthy J.V. (2005) Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med.* **9:** 345-359.

Ulrich H. and Trujillo C.A. (2008) Aptâmeros: uma nova ferramenta biotecnológica. Bases Moleculares da Biotecnologia. Editora Roca Ltda, 1ª Edição: 37-54.

Ulrich H., Ippolito J.E., Pagan O.R., Eterovic V.A., Hann R.M., Shi H., Lis J.T., Eldefrawi M.E., Hess G.P. (1998) *In vitro* selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:14051–14056.

Ulrich H., Magdesian M.H., Alves M.J.M., Colli W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell surface receptors of Trypanosoma cruzi and inhibit cell invasion. *J Biol Chem* **277**: 20756–20762.

Ulrich H., Martins A.H., Pesquero J.B. (2004) RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Cytometry A*. **59**: 220-231.

Ulrich H., Martins A.H., Pesquero J.B. (2005) *RNA and DNA aptamers in cytomics analysis*. Current Protols in Cytometry.John Wiley & Sons, Inc.7.28.1-7.28.39.

Ulrich H., Trujillo C.A., Nery A.A., Alves J.M., Majumder P., Resende R.R., Martins A.H. (2006) DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **9**: 619–632.

Van Engeland M., Nieland L.J., Ramaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, **31:** 1-9.

Vollmayer P., Clair T., Goding J.W., Sano K., Servos J., Zimmermann H. (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2971–2978.

von Kügelgen I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* **110**: 415–432.

Voogd T.E., Vansterkenburg E.L.M., Wilting J., Janssen L.H.M. (1993) Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* **45**: 177–203.

Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M., Shen B., Shao N. (2003) Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J Biotechnol.* **102:** 15-22.

Wang J., Jiang H., Liu F. (2000). In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection. *RNA* **6**: 571–583.

Weick M., Cherkas P.S., Hartig W., Pannicke T., Uckermann O., Bringmann A., Tal M., Reichenbach A., Hanani M. (2003) P2 receptors in satellite glial cells intrigeminal ganglia of mice. *Neuroscience* **120**: 969–977.

Weisman G.A., Wang M., KongQ., Chorna N.E., Neary J.T. Sung G.Y. Gonzalez F.A., Seye C.I., Erb L. (2005) Molecular determinates of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol. Neurobiol.* **31**: 169-183.

Weyler S. Baqi Y. Hillmann P., Kaulich M., Hunder A.M., Mülle I.A. Müller C.E. (2008) Combinatorial synthesis of anilinoanthraquinone derivates and evaluation as non-nucleotide-derived P2Y22 receptor antagonists. *Bioorg. Med.Chem. Lett* **18**: 223-227.

White et al., (2003) Caracterization of a Ca  $^{+2}$  response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol.* **63**: 1356-1363.

Xu J., Chalimoniuk M., Shu Y., Simonyi A., Sun A.Y., Gonzalez F.A., Weisman G. A., Wood W.G., Sun G. Y. (2003) Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**: 437 - 448.

Yang Q., Goldstein I.J., Mei H.Y., Engelke D.R. (1998) DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95:** 5462–5467.

Yerxa B.R. (2001) Therapeutic use of nucleotides in respiratory and ophthalmic diseases. *Drug Dev Res* **52**: 196–201.

Yerxa B.R., Sabater J.R., Davis C.W., Stutts M.J., Lang-Furr M., Picher M., Jones A.C., Cowlen M., Dougherty R., Boyer J., et al. (2002) Pharmacology of INS37217 [P1-(uridine 5)-P4-(2-deoxycytidine 5)tetraphosphate, tetrasodium salt], a next generation P2Y2 receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:871–880.

Zimmerman H. (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* **52:** 44-56.

Zuker M., Mathews D.H., Turner D.H. (1999) Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, J. (Barciszewski & B.F.C. Clark eds.), NATO ASI Series, Kluwer, Academic Publishers, p 11- 43.

## ANEXOS

### SÚMULA CURRICULAR

#### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Katia das Neves Gomes Local e data de nascimento: Viçosa, MG, 15/03/1980

### **EDUCAÇÃO**

Colégio Anglo de Viçosa- Viçosa, Minas Gerais (1997) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais (2003)Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais (2004) Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais (2005) Habilitação em

Análises Clínicas.

Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo (2005-atual) Doutorado em Bioquímica.

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

The Cold Spring Harbor Course on Phage Display of Proteins & Peptides. Cold Springer Harbor, USA (2008).

First International Brain Research Organization (IBRO)'s Visiting Lecture Team Workshop in Neuroscience in Manaus, Manaus, Brasil (2007).

### **OCUPAÇÃO**

Bolsista de Doutorado- Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, CAPES (2005-2009)

Monitoria- Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino, PAE, Diciplina de graduação QBQ 0316N, curso Farmácia, Departamento de Bioquímica, IQ-USP (2007).

Monitoria- Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino, PAE, Diciplina de graduação QBQ 220N, curso de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, IQ-USP (2006).

PUBLICAÇÕES Artigos completos
MAJUMDER, P.; **GOMES, K. N.**; ULRICH, H. Aptamers: from bench side research towards patented molecules with therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 19, p. 1603-1613 (2009).

RESENDE, R.R.; **GOMES, K.N.**; ADHIKARI, A; ULRICH, H.; BRITTO, L.R.G. Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in vitro. *Cell Calcium*, v. 43, p. 107-121 (2008).

MAJUMDER, P.; TRUJILLO, C. A.; LOPES, C.G.; RESENDE, R.R.; **GOMES, K.N.**; YUAHASI K.K.; BRITTO, L.R.G.; ULRICH, H. New insights of purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signalling* v. 3, p. 317-331 (2007).

RESENDE, R.R.; MAJUMDER, P.; **GOMES, K.N.**; BRITTO, L.R.G.; ULRICH, H. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-d-aspartate glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience* v. 146, p. 1169-1181 (2007).

**GOMES, K.N.**; FREITAS, S.M.; PAIS, T.M.; FIETTO, J.L.; TOTOLA, A.H.; ARANTES ,R.M.; MARTINS ,A.; LUCAS, C.; SCHULLER, D.; CASAL, M.; CASTRO, I.M.; FIETTO, L.G.; BRANDÃO, R.L. Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in Saccharomyces cerevisiae *FEMS Yeast Res.* v.5, p. 767-76 (2005).

## **Capítulos de Livros**

Yuahasi K.K.; **GOMES, K. N.**; Campos M; NERY, A. A.; Nunes-Alves A; TRUJILLO, C. A.; ULRICH, H. Neurotransmitters as Main Players in the Neural Differentiation and Fate Determination Game. In: Perspectives of Stem Cells- From tools for studying mechanisms of neuronal differentiation towards therapy. Dordrecht Heidelberg London Ne: Springer Science Business Media (2009).

## **Resumos em congressos**

**GOMES, K. N.** and ULRICH, H. In vitro selection of RNA aptâmeros as specific inhibitors of P2Y2 purinergic receptor. XXXVIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Águas de Lindóia, Brasil (2009).

**GOMES, K. N** and ULRICH, H. In vitro selection of RNA aptâmeros as specific inhibitors of P2Y2 purinergic receptor. Federação de Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Águas de Lindóia, Brasil (2009).

**GOMES, K.N.**; RESENDE, R.R.; MAJUMDER, P.; ULRICH, H. *In vitro* selection of RNA aptamers as specific inhibitors of P2Y2 purinergic receptors. I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica NEUROLATAM I, Búzios, Brasil (2008).

**GOMES, K.N**; RESENDE, R.R; BRITTO, L.R; ULRICH, H. Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling, proliferation and differentiation effects during in vitro neuronal differentiation of embryonal cells. XXXVI Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Salvador, Brasil (2007).

RESENDE, R.R; **GOMES, K.N**, BRITTO, L.R; ULRICH, H.. Expression and activity of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors during neuronal differentiation in vitro. XXXV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Águas de Lindóia, Brasil (2006). **Prêmio de melhor poster SBBq. Apresentação oral** 

**GOMES, K.N**; FIETTO, J.R; FIETTO, L.G; CASTRO, I.M; BRANDÃO, R.L. Role of Protein Kinase C in the Control of Glycerol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. XXXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2004).

**GOMES, K.N**; CASTRO, I.M; FIETTO, L.G; BRANDÃO, R.L. Caracterization of a New Mutation in *Sacacharomyces cerevisiae* that relieves the pkc∆ repressive phenotype. IXXXII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2003).

**GOMES, K.N**; FIETTO, L.G; CASTRO, I.M; BRANDÃO, R.L. MSN5 and Glucose Repression pkc  $\Delta$  Mutant in *Sacchromyces cerevisiae*. XXXI Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2002).

BRANDÃO, R.L.; FIETTO, L.G; SALGADO, A.P; GOMES, K.N; TRÓPIA, M.J.M; CASTRO, I.M. Protein Kinase C and Sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. XXXI

Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2002).

**GOMES, K.N**; TRÓPIA, M.J.M; CASTRO, I.M; BRANDÃO, R.L. Isolation of the Nuclear Exportin MSN5 as a Supressor of the pkc1∆ Repressive Phenotype in *S. cerevisiae*. XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2001).

BRANDÃO, R.L; CASTRO, I.M; ANDRADE, M.A.S; TRÓPIA, M.J.M; SALGADO, A.P; **GOMES, K.N**. Multiple Roles of Protein Kinase in Yeast Cells. XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu, Brasil (2001).