

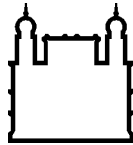
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

POROS FORMADOS PELOS RECEPTORES P2X7 E TRPV1: EVENTOS
COMUNS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS?

LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA

Rio de Janeiro
Abril de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA

POROS ASSOCIADOS AOS RECEPTORES P2X7 E TRPV1: EVENTOS
COMUNS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS?

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Xavier Faria

RIO DE JANEIRO

Abril de 2014

Gomes Braga Ferreira, Leonardo .

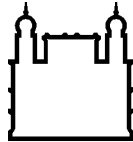
POROS ASSOCIADOS AOS RECEPTORES P2X7 E TRPV1: EVENTOS
COMUNS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS? /
Leonardo Gomes Braga Ferreira. - Rio de janeiro, 2014.
135 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Orientador: Luiz Anastácio Alves.
Co-orientador: Robson Xavier Faria.

Bibliografia: f. 105-135

1. P2X7. 2. TRPV1. 3. Macrófagos. 4. Poro. 5. Canal Iônico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA

**POROS ASSOCIADOS AOS RECEPTORES P2X7 E TRPV1: EVENTOS COMUNS EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS?**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves
Prof. Dr. Robson Xavier Faria**

Aprovada em: 08/ 04 /2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Andrea Henriques Pons - Presidente (Fiocruz)

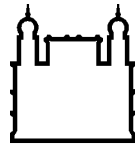
Prof. Dr. Marco Aurélio Martins (Fiocruz)

Prof. Dr. Victor Túlio Ribeiro de Resende (UFRJ)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Fiocruz)

Prof. Dr. Vinícius De Frias Carvalho (Fiocruz)

Rio de Janeiro, 08 de Abril de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho ao Criador de todas as coisas, meu Salvador, minha Lâmpada, meu refúgio e minha fortaleza, meu combustível, minha vida e meu amor. Dedico Àquele que me deu minha esposa, minha filha e minha família. Dedico a Jesus.

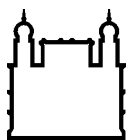
AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me aperfeiçoa diante dos desafios de cada dia. Agradeço à minha esposa, Solange, por pacientemente me suportar e fervorosamente me impulsionar à busca pela excelência. Seu amor e sua dedicação também são matéria-prima deste trabalho. Agradeço à minha filha, Letícia, pelo seu incentivo ingênuo e puro de buscar o meu nome e meus trabalhos desenvolvidos na internet. Ela diz que quer ser cientista como o papai. Agradeço à Primeira Igreja Batista de Copacabana pelo apoio e dedicação. Agradeço a Deus novamente, por Sua Graça, pela porção dobrada de quase tudo: dois pais, duas mães e dois orientadores. Aos pais e mães, um legado. Aos orientadores, dedicação. Por isso, agradeço ao Dr Luiz Anastacio Alves pelo compromisso e pelo auxílio cruciais para que eu pudesse realizar este trabalho. Agradeço ao Dr. Robson Xavier Faria que em tudo se esforça para que sempre eu tenha as melhores oportunidades. Robson é um jovem pesquisador que enxerga seus alunos de modo holístico e por isso, gerencia seus potenciais de maneira humana e ética. Por isso, busco de muitas formas humildemente contribuir para o seu progresso. Agradeço ao Laboratório de Comunicação Celular por cada instante, sem exceção. Mesmo assim, como ótimos exemplos de orientadores, cuido de adotar e agradecer aos meus orientadores informais, que mesmo sem perceberem, compartilham suas experiências e me ensinam valores importantes do mundo científico. São eles: os Doutores Ricardo Augusto de Melo Reis, Carmen Penido, Andrea Henriques-Pons, Wilson Savino, Wilson da Costa Santos, Leandro Machado Rocha, Vitor Ferreira, João Batista Calixto, Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto, Vinicius de Frias Carvalho, Patrícia Torres Bozza, Milton Ozório Moraes e Marco Aurélio Martins. Destaco o Dr. Marco Aurélio por sua liberalidade, generosidade e compreensão, pois este trabalho seria muito difícil de se realizar sem o seu auxílio. Finalmente, quero agradecer à Dra Cynthia Machado Cascabulho por sua sempre presente prontidão e ajuda nos experimentos de citometria, ao Dr Jonas Enrique Perales Aguilar pela prontidão em ceder seu laboratório para experimentos importantes e à Marcelle Caminha que muito se esforçou em me ajudar com extração de proteínas. Quero agradecer a dedicação e ajuda de Paula Fernandes Tavares Cezar de Mello e Ohanna Cavalcanti nos experimentos de biologia molecular. Além disso, agradeço à Orquidia G. Mendez-Flores por sua dedicação e auxílio e a Gabriel Ferraz pelos longos ensaios de cálcio. Por fim, agradeço pela contribuição essencial das agências de fomento: CNPq, FAPERJ e Instituto Oswaldo Cruz pelo auxílio financeiro.

“E conhecereis a verdade, e a verdade vos libertará.” João 8:32

“(Porque andamos por fé, e não por vista).”
2 Coríntios 5:7

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”
1 Samuel 7:12



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

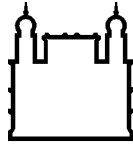
POROS ASSOCIADOS AOS RECEPTORES P2X7 E TRPV1: EVENTOS COMUNS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS?

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Leonardo Gomes Braga Ferreira

O receptor P2X7 (P2X7R) é um canal iônico expresso principalmente em células do sistema imune e está envolvido em processos celulares como inflamação, morte celular e dor. Em concentrações na faixa de micromolar de ATP, o P2X7R é permeável a cátions mono e divalentes, como os íons sódio e cálcio, embora, em concentrações na faixa de milimolar de ATP, o P2X7R apresenta a formação de um poro na membrana plasmática que permite a passagem de moléculas de até 900 Da. Entretanto, poro formado a partir da ativação do P2X7R possui a sua identidade são desconhecida até o momento. De acordo com uma das principais teorias acerca dessa questão, uma proteína distinta seria responsável pela abertura do poro do P2X7R. Nesse contexto, estudamos o envolvimento de uma outra proteína formadora de poros na membrana plasmática. O TRPV1 (em inglês: *Transient receptor potential vanilloid 1*) é um canal catiônico que participa de diversos processos fisiológicos em comum com o P2X7R, como morte celular, dor e inflamação. O composto pungente capsaicina é agonista específico do TRPV1, levando-o a um estado de ativação semelhante ao encontrado no P2X7R, levando à abertura de um poro não seletivo de mesma ordem de grandeza do P2X7R. Assim, o objetivo central de nosso estudo foi verificar a comunicação entre os dois receptores no processo de formação de seus poros. Nossos resultados mostram a expressão e a caracterização funcional do TRPV1 em macrófagos e a abertura de um poro induzido pela capsaicina. Os antagonistas do TRPV1, *ruthenium red* e capsazepina, inibiram tanto canal como poro formados pelo P2X7R, assim como, os antagonistas do P2X7R, *brilliant blue G* (BBG) e ATP oxidado, também inibiram canal e poro formados pelo TRPV1. Portanto, os resultados obtidos mostram a existência de sinalização entre os canais e poros formados pelos receptores P2X7R e TRPV1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

P2X7 AND TRPV1-ASSOCIATED PORES: COMMON EVENTS IN MURINE PERITONEAL MACROPHAGES?

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Leonardo Gomes Braga Ferreira

The P2X7 receptor (P2X7R) is an ion channel expressed mainly in cells of the immune system and is involved in cellular processes such as inflammation, cell death and pain. At concentrations ranging from micromolar ATP, P2X7R is permeable to mono- and divalent cations such as sodium and calcium ions, though in the range of millimolar concentrations of ATP, it shows a formation of a pore in the plasma membrane, which allows the passage of molecules up to 900 Da. Meanwhile, pore formed from the activation of P2X7R has its identity is still unknown. According to one of the main theories on this matter, it would be a distinct protein responsible for pore opening of P2X7R. In this context, we study the involvement of another protein forming pores in the plasma membrane. The TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) is a cationic channel that participates in various physiological processes in common with P2X7R, such as cell death, pain and inflammation. The pungent compound capsaicin is specific agonist of TRPV1, leading to a state similarly to that found in P2X7R activation, leading to the opening of a non-selective pore of the same magnitude of the P2X7R. Thus, the central objective of our study was to verify communication between the two receptors in the formation of pores process. Our results show the expression and functional characterization of TRPV1 in macrophages and the opening of a pore induced by capsaicin. TRPV1 antagonists, capsazepine and Ruthenium red inhibited as much as pore channel formed by the P2X7R as well as antagonists of P2X7R, Brilliant Blue G (BBG) and oxidized ATP, and inhibited pore channel formed by TRPV1. Therefore, the results show that there is signaling between the channels and pores formed by the P2X7R and TRPV1 receptors.

ÍNDICE

AUTOR: LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA	iii
AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xxi
1. INTRODUÇÃO	22
2. RECEPTORES P2	26
<i>Receptores Purinérgicos Acoplados à Proteína G (P2Y)</i>	26
<i>Receptores Purinérgicos Ionotrópicos (P2X)</i>	28
3. RECEPTOR P2X7	35
<i>Canal Iônico formado pelo receptor P2X7</i>	36
<i>Funções e doenças relacionadas ao receptor P2X7</i>	38
4. PORO ASSOCIADO AO RECEPTOR P2X7	40
5. RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)	48
<i>Receptor de Potencial Transitório Vaniloide subtipo 1 (TRPV1)</i>	50
6. PORO ASSOCIADO AO TRPV1	56
7. POSSÍVEL INTERAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES P2X7 E TRPV1	58
8. OBJETIVOS	60
9. MATERIAL E MÉTODOS	61
10. RESULTADOS	66
Estudo funcional e farmacológico do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos	66
A ativação do TRPV1 promove a abertura de um poro em macrófagos peritoneais de camundongos	73
Captção de corante por TRPV1 é cátion seletiva em macrófagos peritoneais de camundongos	79

Inibição cruzada entre os receptores P2X7 e TRPV1.....	80
Permeabilização em macrófagos – Inibição cruzada.....	87
PERMEABILIZAÇÃO EM GLIA – INIBIÇÃO CRUZADA	90
Liberação de citocinas após ativação do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos	92
Expressão do receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 em macrófagos peritoneais de camundongos.....	93
11. DISCUSSÃO	96
12. PERSPECTIVAS	105
13. CONCLUSÕES	106
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Superfamília dos receptores Purinérgicos.....	23
Figura 2 -Possível topologia dos receptores P1. Receptores P1 exibem 7 domínios transmembranares, porções C- e N-terminais intra- e extracelulares, respectivamente e sítio de interação com agonistas extracelular (Adaptado de (31)).....	25
Figura 3 - Possível topologia dos receptores P2Y. Receptores P2Y exibem 7 domínios transmembranares, porções Carboxi- e amino-terminais intra- e extracelulares.	26
Figura 4 - Exemplo ilustrativo de topologia de monômero dos receptores P2X e estrutura cristalina do receptor P2X4. Em (a), a estrutura cristalina do receptor P2X4 em seu estado de repouso e na ausência de agonista. Propositamente, a estrutura do formada pelo trímero está em destaque em detrimento da membrana plasmática. Em (b), observa-se topologia geral de uma subunidade de um receptor P2X, porções amino- e carboxi-terminal intracelulares, enquanto há 2 segmentos transmembranares (M1 e M2) e uma grande alça extracelular, a qual é responsável pela interação com o agonista. Figuras adaptadas de (65,84).	30
Figura 5– Exemplo ilustrativo de diferentes modalidades de patch clamp. Ao tocar superficialmente a membrana plasmática de uma célula é possível obter um selamento entre o pedaço de membrana (<i>patch</i>) e pipeta de vidro. Esse selamento promove uma resistência elétrica da ordem de Giga Ohms, permitindo registros fidedignos dos canais iônicos presente no <i>patch</i> . Após a formação do selamento ôhmico, é possível causar ruptura no <i>patch</i> inserido na pipeta de vidro, o que realiza a configuração <i>wholecell</i> . Figura adaptada de (86).....	31
Figura 6– Registro de correntes iônicas dos receptores P2X (homoméricos) a partir de sua ativação por ATP extracelular em células HEK transfectadas. Os perfis de corrente iônica demonstram o comportamento de atividade desses receptores diante de uma exposição curta (A), como em exposição prologada (B). Em destaque, os receptores circundados pela cor vermelha são os rapidamente dessensibilizados, enquanto que na cor azul, os lentamente dessensibilizados. Figura adaptada de (90)	32
Figura 7– Estrutura molecular dos principais agonistas utilizados no estudo farmacológico dos receptores P2X.....	33

Figura 8– Comparação entre as topologias dos receptores P2X e P2X7. Em destaque, apresentam-se a diferença de tamanho entre as caudas C-terminais. A cauda C-terminal do P2X7R possui 240 aminoácidos enquanto os outros dois receptores com maiores caudas (P2X2 e P2X4) possuem 118 e 28 aminoácidos, respectivamente (80,116).	36
Figura 9– Duas fases de ativação do P2X7R. A figura destaca duas fases distintas de ativação do P2X7R, caracterizadas como: Fase I - rápida (curta duração) e Fase II - lenta (longa duração). Adaptado de (179).	43
Figura 10 - Teoria dos poros e sinalização intracelular. As duas hipóteses para a formação do poro associado ao P2X7R, como descrita na figura 2. Nesta figura, são mostradas algumas das sinalizações envolvidas na hipótese que ressalta a participação da necessidade de segundos mensageiros, como o cálcio intracelular e MAP cinases. Adaptado de (183), sobre o trabalho de Faria e colaboradores em 2005 (163).	45
Figura 11 - Família dos receptor de potencial transitório (TRP). As sete subfamílias TRP contêm as porções amino- e carboxi-terminal intracelulares e segmentos de repetições de anquirina (A – verde) na porção amino-terminal. Alguns possuem um segmento conservado chamado domínio TRP. Figura extraída de Montel (197)	49
Figura 12– TRP Termorreceptores. Ao menos 6 TRP são capazes de se ativar diretamente em diferentes faixas de temperatura. O TRPV1 ativa-se entre 42 e 47°C. Os outros receptores são: <i>Transient receptor potential ankirin subtype 1</i> (TRPA1), <i>Transient receptor potential melastatin subtype 8</i> e <i>Transient receptor potential vanilloid subtype 2-4</i> . Adaptado de (198).	50
Figura 13– Topologia de um subunidade do TRPV1. Estrutura apresenta 6 domínios transmembranares (S1-S6) e o domínio TRP, conservado entre os membros da família TRP, segmentos repetidos de anquirina (201).....	52
Figura 14– Formas de dessensibilização do TRPV1. Em (A) observa-se a dessensibilização aguda, ou de curta duração. Note que a seta indica que, mesmo durante a exposição ao agonista, o receptor deixa de responder ao estímulo. Em (B), sucessivas exposições ao agonista em uma mesma concentração reduzem a resposta do receptor a esses estímulos gradativamente. Adaptado de (205).	53
Figura 15 - Principais agonistas utilizados para o estudo do TRPV1. (A) capsaicina, (B) resiniferatoxina e (C) piperina.	54
Figura 16- Exemplos de alguns antagonistas do TRPV1 (233).....	54

Figura 17 - Exemplo de uso de poro membranar como ferramenta terapêutica. A abertura do poro ativado pela capsaicina torna-se permeável a fármacos hidrofílicos, como o análogo da lidocaína, hidrofílico e impermeável à membrana, QX-314. Adaptado de (247).57

Figura 18 – Capsaicina ativa o TRPV1 promovendo corrente iônica em macrófagos peritoneais de camundongos e Glia de Müller de pinto. À esquerda, mostra-se o registro obtido a partir da exposição à capsaicina em glia de Müller e a dessensibilização após a segunda aplicação do agonista. Semelhantemente, à direita, encontram-se os registros de corrente após a exposição ao agonista e sua dessensibilização à segunda aplicação da capsaicina. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados a 37°C. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 2-3 experimentos feitos em diferentes dias. Teste t * p<0,05, ** p<0,01.67

Figura 19- Ativação do TRPV1 em macrófagos é inibida por antagonistas. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em macrófagos peritoneais de camundongo e glia de Müller de pinto à 37°C. À esquerda, mostra-se o registro obtido a partir da exposição à capsaicina em glia de Müller após pré-incubação com os antagonistas capsazepina e *ruthenium red*. À direita, encontram-se os registros de corrente após a exposição ao agonista após pré-incubação com os antagonistas em macrófagos. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA p<0,05, pós teste Tukey *** p<0,001.68

Figura 20 - TRPV1 promove aumento da concentração de cálcio intracelular. Retorno da sensibilização do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) Registro característico do aumento de cálcio intracelular após exposição à capsacina e dessensibilização a uma segunda exposição após 5 minutos. (B) Amplitudes do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. Ionomicina (Ion) usada como controle positivo. Teste de Kruskal-Wallis P<0,0001, pós-teste de Dunns, *** P<0,0001 em relação à solução salina. Experimentos feitos em triplicata em 3 experimentos independentes. (C) Retorno da sensibilização. (D) Amplitudes do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. Teste de Kruskal-Wallis P<0,0001, pós-teste de Dunns, *** p<0,0001 em relação à solução salina, ### p<0,0001 para diferenças entre a primeira e segunda aplicações de capsaicina. Resultados obtidos de 2 experimentos independentes.70

Figura 21 - Resiniferatoxina (RTX) promove aumento de dos níveis de cálcio intracelular via TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) registro característico do aumento de cálcio intracelular após exposição à RTX e dessensibilização a uma segunda exposição, em torno de 43%. (B) Efeito do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. ANOVA $P < 0.0001$, pós-teste de Tukey, *** $P < 0.0001$, ### $P < 0,0001$ em relação à segunda exposição à RTX. Experimentos feitos em triplicata.72

Figura 22- TRPV1 promove captação de brometo de etídeo ao interior celular de macrófagos. Captação foi proporcional ao aumento do agonista. (A) Fotos representativas de macrófagos promovendo a captação de brometo de etídeo. (B) Região de macrófagos F4/80⁺ analisada referente à curva em azul em (D). (C) Histogramas representativos referentes à curva em vermelho em (D). (D) Valores obtidos partir da citometria fluxo (BD FACS Calibur). Em vermelho, encontram-se as curvas dos valores de captação provenientes da região característica de macrófagos, ao passo que, em azul, está a curva de valores obtidos de células F4/80⁺. Valores de EC₅₀ de 42,78 μM e de 51,06 μM para o *pool* e células F4/80⁺. Experimentos feitos em triplicata em 2-3 dias distintos. (E) Curva concentração-resposta obtida a partir de microfluorimetria (EC₅₀=65,43 μM). Experimentos feitos em triplicata em 3 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.75

Figura 23 - *Ruthenium red* inibe captação de corante após exposição à capsaicina em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) Histogramas representativos da catação de corante após o tratamento com capsaicina em relação à região de macrófagos analisada em destaque. (B) O antagonista do TRPV1 inibiu a captação de YOPRO-1 (629 Da) induzida pela capsaicina a 100uM. Ru-2 100uM promoveu em torno de 78% de redução na captação. (C) Tabela resume os resultados apresentados através dos experimentos em citometria Experimentos feitos em citometria de fluxo (BD FACS Calibur), em triplicata em 3 dias distintos. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey (***) $p < 0,0001$76

Figura 24- TRPV1 promove captação de brometo de etídeo ao interior celular de astrocitoma GL 261. Captação foi proporcional ao aumento do agonista. (A) Fotos representativas de GL 261 promovendo a captação de brometo de etídeo. (B) Valores obtidos partir da citometria fluxo (BD FACS Calibur). Valor de EC₅₀ de 20,67 μM em relação à região destacada no *dot plot*. À direita, histogramas representativos da

captação de corante. Experimentos feitos em triplicata em 3 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.....78

Figura 25- TRPV1 não promove captação de fluoresceína ao interior celular de macrófagos peritoneais de camundongos. A ativação do TRPV1 via capsaicina não foi eficaz para a captação do corante aniônico fluoresceína. Experimentos feitos em triplicata em 2 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.....80

Figura 26 - Inibição cruzada entre o P2X7R e antagonistas do TRPV1 em glia de Müller. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. À esquerda, encontram-se os registros de corrente provocados por ATP na presença ou ausência de antagonistas. Os antagonistas do P2X7R, BBG (100 nM) e ATP oxidado (300 µM) inibiram a amplitude de corrente promovida pelo ATP. Os dois antagonistas do TRPV1, Ru-2 (10 µM) e capsazepina (100 nM), inibiram as correntes induzidas pelo ATP. À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$81

Figura 27 - Inibição cruzada entre P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. (A) Corrente induzida pelo ATP 1mM que foi inibida pelo (B) antagonista do P2X7R, BBG, e pelos antagonistas do TRPV1, (C) Ru-2 e (D) capsazepina. Abaixo, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$82

Figura 28 - Inibição cruzada entre os antagonistas do P2X7R e TRPV1 em glia de Müller. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. Corrente induzida por capsaicina (CAPS) que foi inibida pelos antagonistas do P2X7R, BBG (100nM) e ATP oxidado (300 uM). À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0001$).83

Figura 29 - Inibição cruzada entre os antagonistas do P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. Corrente induzida por capsaicina que foi inibida pelos antagonistas do P2X7R, BBG (100 nM) e ATP oxidado (300 uM). À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 2-3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$84

Figura 30 - Inibição cruzada entre o P2X7R e antagonistas do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Imageamento de cálcio mostra em (A) o registro representativo do campo analisado ao microscópio. Após exposição ao ATP, os macrófagos foram incubados com Ru-2, que foi suficiente para inibir os efeitos de um nova exposição ao ATP. (B) Gráfico em barra representa a amplitude do sinal (ponto máximo subtraído de ponto mínimo) do gráfico (A). N=63 células totais em 3 experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis $P < 0,0001$, pós-teste de Dunns, *** $P < 0,0001$ em relação ao tratamento com ATP. (C) Tratamento com agonista seletivo do P2X7R BzATP (N=20 células em 1 dia de experimento), que foi inibido tanto pelo antagonista competitivo do TRPV1 capsazepina (D). N=29 células em 1 dia de experimento, como pelo Ru-2. N=23 células em 1 dia de experimento.86

Figura 31- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação dos P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) *Ruthenium red* (RU-2) foi capaz de promover a inibição do poro associado ao receptor P2X7 após ativação com adenosina trifosfato (ATP) 5mM. (B) Gráfico de barras mostra a inibição do poro associado ao receptor P2X7 em células pré-tratadas por capsazepina (CAZ) e RU-2. N=4 experimentos em dias distintos. ANOVA $P < 0,05$, pós-teste ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,0001$) em relação com tratamento m ATP 1mM e ### ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo.....87

Figura 32- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Sem a participação de Hemicanais formadores de poros. Tratamentos com BBG reduziu a formação do poro associado ao receptor TRPV1, enquanto os bloqueadores gerais de hemicanais não. Tratamento com RNA de interferência para panexina-1 não inibiu a formação dos poros do TRPV1 e P2X7. Experimentos realizados em triplicata e em 3 dias

independentes. ANOVA $P < 0,05$, pós-teste tukey * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,0001$) em relação controle negativo.88

Figura 33- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação dos receptores P2X7R e TRPV1. Tratamentos com *ruthenium red* e capsazepina reduziram a formação do poro associado ao receptor P2X7R. BBG inibiu a captação de corante após tratamento com capsaicina. Antagonistas do TRPV1: RR (*ruthenium red*), CPZ (capsazepina). Antagonista do P2X7R: BBG (*brilliant blue G*). Experimentos realizados em triplicata e em 3 dias independentes. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.91

Figura 34 - Poro do TRPV1 não promove ruptura da membrana plasmática em macrófagos peritoneais de camundongos. Sob as mesmas condições de tratamento para abertura de poro, as células foram expostas à capsaicina (Cap) por 30 e 60 minutos. Experimentos realizados em duplicata e em 2 dias independentes ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$ em relação ao padrão do fabricante e o controle negativo (CN), “ns” (não significativo).92

Figura 35 - A ativação de TRPV1 em macrófagos induz a liberação de citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos. Macrófagos tratados com capsaicina (cap) (100 μ M) por 24 horas promove a liberação das citocinas IL-6 e IL-10. A liberação dessas citocinas foram inibidas pelo antagonista do TRPV1. O BBG e ATP oxidado (ATP ox), antagonistas do P2X7 também inibiram a liberação dessas citocinas através do TRPV1. CN- controle negativo. ANOVA $p = 0,0083$, pós-teste de Tukey * ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo, # ($p < 0,05$) em relação ao tratamento com capsaicina, em experimentos de 2 dias independentes realizados com kit CBA (BD) por citometria.93

Figura 36 - Macrófagos peritoneais de camundongos expressam o Receptor de Potencial Transitório Vaniloide subtipo 1. (A) Macrófagos estão marcados com o marcador específico para o tipo celular, IBA-1 (em vermelho). TRPV1 marcado em verde e núcleo corado com DAPI (em azul). (B) Sobreposição de tubulina (em vermelho) e TRPV1 (em verde). (C) Macrófagos estão marcados com o marcador específico para o tipo celular, F4/80 (vermelho). TRPV1 (em verde) e núcleo corado com DAPI (azul). Esses experimentos realizados em dois dias distintos.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos receptores P1 e vias de transdução de sinal.....	24
Tabela 2 - Distribuição dos receptores P2Y e vias de transdução de sinal	27
Tabela 3 - Distribuição dos receptores P2X e vias de transdução de sinal	29
Tabela 4 - Principais agonistas usados nos estudos farmacológicos dos receptores P2X.....	33
Tabela 5 - Efeito inibitório de cátions extracelulares sobre o receptor P2X7	37
Tabela 6 - Efeito inibitório de ânions extracelulares sobre o receptor P2X7	37
Tabela 7- Exemplos de agentes formadores de poro.....	47
Tabela 8 - Exemplos de células e/ou tecidos que expressam o TRPV1	55
Tabela 9 - Responsividade dos macrófagos peritoneais ao tratamento com capsaicina	71
Tabela 10 - Responsividade dos macrófagos peritoneais ao tratamento com resiniferatoxina.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Trifosfato de adenosina

Ru-2 - *Ruthenium red*

TRP - Receptor de potencial transitório

TRPV1 - Receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 (do inglês: *Transient receptor potential vanilloid subtype 1*)

Cap - capsaicina

ION - ionomicina

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno

NF-κB - Fator nuclear kappa B

ATP - Adenosina Trifosfato

ADP - Adenosina difosfato

LPS - Lipopolissacarídeo

UTP - Uridina trifosfato

UDP - Uridina difosfato

GTP - Guanosina trifosfato

EL1 - Alça extracelular 1

EL2 - Alça extracelular 2

EL3 - Alça extracelular 3

EL4 - Alça extracelular 4

IL1 - Alça intracelular 1

IL2 - Alça intracelular 2

IL3 - Alça intracelular 3

IL4 - Alça intracelular 4

TM - Segmento transmembranar

M1 - Segmento transmembranar 1

M2 - Segmento transmembranar 2

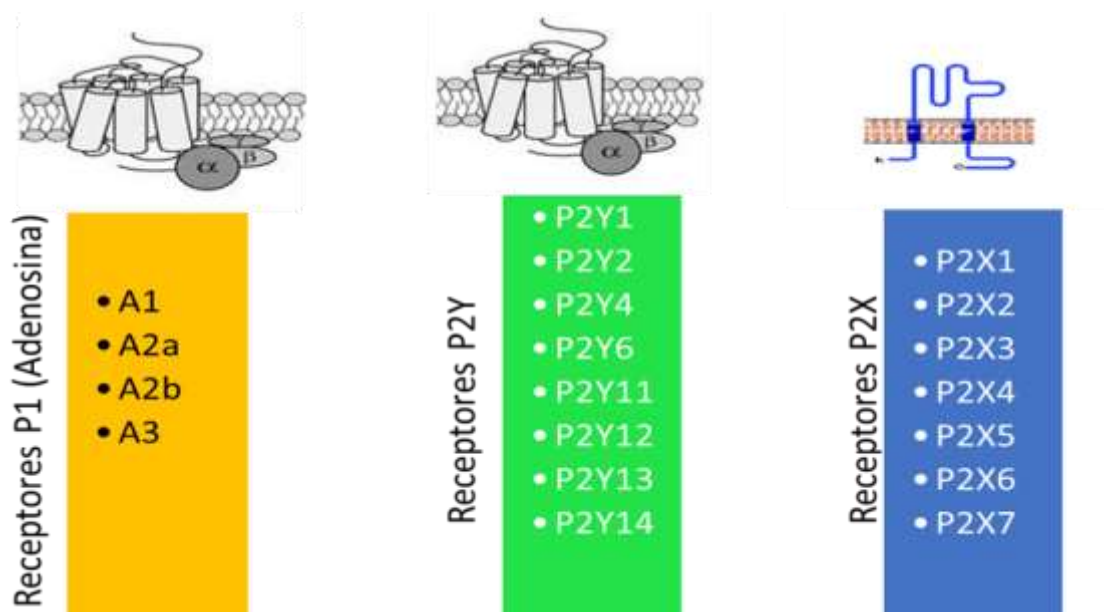
1. Introdução

Sinalização celular é um processo vital pelo qual a célula interage com o seu entorno. A sinalização se realiza através do contato célula-célula e/ou célula-ambiente, destacando-se os fatores mecânicos e ambientais que modulam a fisiologia celular, como a ativação por estímulo luminoso direto do canal iônico “Channelrhodopsin-2” encontrado em algas e aqueles ativados diferentes gradientes químicos e temperatura como os receptores de potencial transitório (1–3). Podemos destacar dentro dessa rede complexa a sinalização extracelular promovida através de moléculas purínicas como adenosina trifosfato (ATP), Uridina trifosfato (UTP) e seus derivados. Além de serem moléculas importantes para a obtenção de energia, como classicamente são descritas, elas atuam também em eventos, como a transmissão sináptica (4,5) e como moléculas sinalizadoras de perigo de acordo com a teoria do perigo (6,7). Os efeitos da molécula de ATP no meio extracelular já são conhecidos há mais de 40 anos. Sua capacidade de alterar o volume celular (8), a aderência ao substrato (9) e o transporte de glicose (10) foram já descritos. Em 1975, já havia a proposta de estudar os efeitos do ATP extracelular sobre o metabolismo de células cancerosas (11).

Evolutivamente, as estruturas rudimentares de células primitivas seriam capazes de promover o monitoramento ambiental à aquisição de nutrientes, identificadores de hostilidades como a escassez de alimentos e de níveis de acidez e temperatura tóxicos (3,12,13). Representantes dessas estruturas, os canais iônicos responderiam aos sinais de perigo - exposição à luz, a odores e a algumas substâncias químicas, como o ATP e lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas. Canais iônicos são proteínas integrais presentes em membranas capazes de responder rapidamente a determinados estímulos extra- ou intracelulares. Estes possuem alta especificidade aos seus ligantes, e uma vez formado um complexo ligante-canal iônico, haveria a possibilidade de uma mudança conformacional e abertura de uma passagem para íons (14). As consequências dessa ativação podem ser observadas a partir da regulação osmótica celular (15), do recrutamento e da ativação de mensageiros intracelulares (16) e em eventos como morte celular (17–20).

A supracitada molécula de ATP faz parte de uma rede complexa de sinalização chamada de Sinalização Purinérgica. Nesta rede, estão envolvidos: moléculas purínicas e

pirimidínicas, ectonucleotidases e receptores metabotrópicos e ionotrópicos. A partir da descoberta de que a molécula de ATP poderia agir como neurotransmissor fez com que o princípio de Dale fosse desconstruído (5,21). A prerrogativa de que uma célula nervosa libera exclusivamente um tipo de neurotransmissor foi negada à medida que os estudos sobre essa sinalização fossem evoluindo. O artigo seminal, em 1929, de Drury e Szent-Györgyi apontava o papel extracelular de compostos purínicos sobre o músculo cardíaco e vasos sanguíneos (22). No entanto, somente a partir da década de 70 a sinalização purinérgica foi reconhecida. Burnstock e colaboradores “(re)descobriram” a sinalização purinérgica e deram início à caracterização molecular e farmacológica dos receptores ativados por purina e pirimidinas (23,24). Como resultados, foi descrita a superfamília dos receptores purinérgico inicialmente proposta em 1978 e subdivisões de acordo com as características biofísicas e farmacológicas (25). Atualmente, a superfamília dos receptores purinérgicos (como mostra os esquema na figura 1 é formada pela família P1, ativada pela adenosina e acoplados a uma proteína G, com quatro membros:A1, A2a, A2b e A3. Aqueles ativados pelo ATP, formam os receptores P2. Em mamíferos a família do receptores P2 é subdividida entre os metabotrópicos P2Y e os ionotrópicos P2X. Em mamíferos os oito P2Y encontrados são: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14; enquanto que os sete P2X são: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7



(26).

Figura 1 - Superfamília dos receptores Purinérgicos

Receptores de Adenosina (P1)

Os receptores P1 são ativados pelo nucleosídeo adenosina e são receptores acoplados à proteína G, atuam sobre mensageiros intracelulares e exercem papéis críticos no funcionamento do organismo (Tabela 1). Sua estrutura possui 7 domínios transmembranares, cujos componentes N- e C-terminais são extracelulares e intracelulares, respectivamente (figura 2). Os receptores de adenosina são expressos em diversos tecidos no organismo, com destaque para os tecidos cardíaco e nervoso, desempenhando papéis-chave na manutenção do funcionamento dos mesmos, tais como na modulação cronotrópicos, dromotrópicos e inotrópicos no tecido cardíaco (27). Por outro lado, sob a óptica do tecido nervoso, esses receptores podem exercer ações pontuais em casos de potenciais danos a esse tecido nobre. Em casos de hipóxia e/ou isquemia, já é descrita a liberação de adenosina para o ambiente extracelular (28,29). Como a adenosina possui efeitos inibitórios na condução do estímulo nervoso, ela pode representar uma vantagem biológica no sentido de retardar o consumo e/ou dispêndio energético de células sob essas condições (30).

Tabela 1 - Distribuição dos receptores P1 e vias de transdução de sinal

	Distribuição	Proteína G	Função (intracelular)	
A1	Cérebro, coração, baço, rim, fígado, testículo	$G_{i/o}$	\downarrow AMPc, \uparrow IP3, \uparrow K ⁺ , \downarrow Ca ²⁺	Subtipos de receptores P1: distribuição e vias de transdução de sinal. IP3,
A2a	Cérebro, coração, baço, rim, fígado, testículo, pulmão, útero, músculo esquelético	G_s	\uparrow AMPc	
A2b	Cérebro, rim, fígado, testículo, pulmão, pele útero, músculo esquelético	G_s, G_q	\uparrow AMPc \uparrow IP3	
A3	Cérebro, baço, rim, fígado, testículo, pulmão, útero, bexiga	G_i, G_q	\downarrow AMPc \uparrow IP3	

inosina trifosfato; AMPc, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; Gs, proteína G estimulatória, eleva concentração de AMPc (\uparrow AMPc); Gi, proteína G inibitória; Gq, proteína G estimulatória, eleva concentrações de IP3 (\uparrow IP3). (Tabela adaptada de (26))

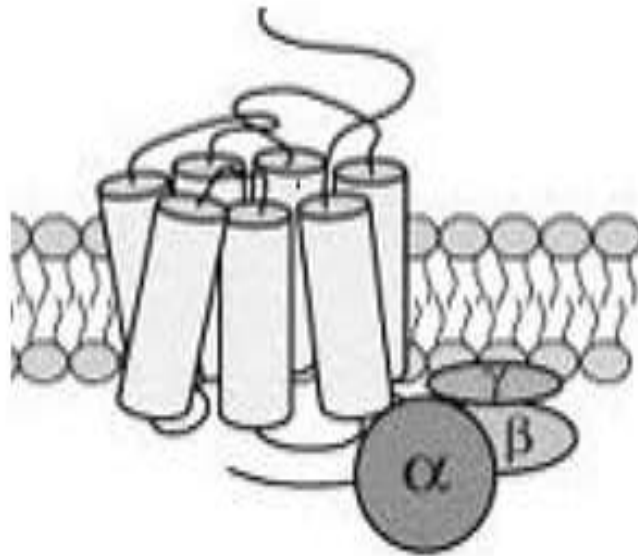
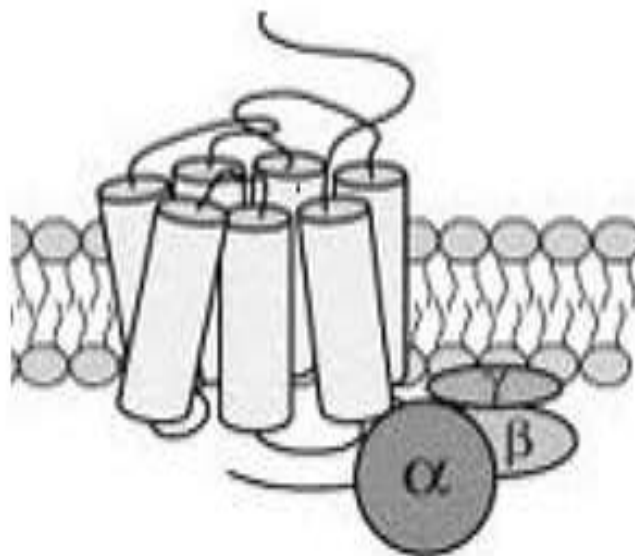


Figura 2 - Possível topologia dos receptores P1. Receptores P1 exibem 7 domínios transmembranares, porções C- e N-terminais intra- e extracelulares, respectivamente e sítio de interação com agonistas extracelular (Adaptado de (31)).

2. Receptores P2

Receptores Purinérgicos Acoplados à Proteína G (P2Y)

Os receptores P2Y são estruturas ativadas por purinas e pirimidinas que são acoplados a diferentes tipos de proteínas G. Atualmente, como mencionado acima, há 8 subtipos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), dos quais os dois primeiros membros, antes conhecidos como P2Y e P2U respectivamente, foram clonados em 1993 (32,33). Estruturalmente semelhantes a outros receptores acoplados a proteína G, os receptores P2Y possuem sete domínios transmembranares e os sítios extracelulares de interação com os agonistas (34). A tabela 2 exhibe as principais propriedades farmacológicas dos receptores P2Y, enquanto que a figura 3 mostra a possível topologia geral para os receptores P2Y. Farmacologicamente, os receptores P2Y podem ser divididos entre: 1 - Preferencialmente ativados por ATP (P2Y11) (35); 2 - receptores ativados por UTP (P2Y2 e P2Y4), sendo o primeiro equipotente com ATP (36,37); 3 - preferencialmente ativados por ADP (P2Y1, P2Y12, P2Y13) (38–40); 4 - preferencialmente ativado por UDP (P2Y6) (41); 5 - preferencialmente ativado por açúcares ligados a



nucleotídeos (P2Y14) (42).

Figura 3 - Possível topologia dos receptores P2Y. Receptores P2Y exibem 7 domínios transmembranares, porções Carboxi- e amino-terminais intra- e extracelulares.

<i>P2Y</i>	Agonistas	Proteína G	Tratamento com Proteína <i>Pertussis</i> e <i>Segundos mensageiros</i>	Distribuição	Referências
<i>P2Y1</i>	ADP, ADPβS	G _{αq} e G _α	Insensível ↑IP3	Cérebro, coração, esquelético, rins, pâncreas	42,43

Tabela 2 - Distribuição dos receptores P2Y e vias de transdução de sinal

P2Y2	ATP=UTP	G _{αq/11}	Parcialmente insensível ↑IP3↑DAG↑PKC	Cérebro, coração, pâncreas, baço, macrófagos	(37,43,44)
P2Y4	UTP(humano) ATP=UTP (rato e camundongo)	G _{q/11} , G _{i/o}	Parcialmente insensível ↑IP3	Cérebro, coração, fígado, músculo esquelético	(36,45–47)
P2Y6	UDP	G _{q/11}	Parcialmente insensível ↑IP3	Baço, timo, placenta, intestino	(48–50)
P2Y11	ATP	G _s , G _{q/11}	↑PLC↑AMPc	Baço, timo, intestino	(35,51,52)
P2Y12	ADP, ADPβS	G _i	↓ AMPc	Megacariócito / plaqueta	(53,54)
P2Y13	Ap3A, ADP	G _i	Inibição ↓ AMPc	Placenta, fígado, medula óssea, pulmões	(40,55)
P2Y14	UDP-glicose, UDP-galactose	G _i	-	Placenta, tecido adiposo, estômago	(56–58)

Subtipos de receptores P2Y: agonistas, distribuição e vias de transdução de sinal. IP3, Inosina trifosfato; G_s, proteína estimulatória, eleva concentração de AMPc (↑AMPc); G_i, proteína G inibitória; G_q, proteína G estimulatória, eleva concentrações de IP3 (↑IP3); DAG – diacil glicerol; PKC – proteína cinase C; PLC - fosfolipase C.

Receptores Purinérgicos Ionotrópicos (P2X)

Os receptores P2X são estruturas formadas por trímero nos quais cada monômero é formado a partir de duas alças transmembranares (TM1 e TM2), uma grande e conservada porção extracelular e caudas C- e N-terminais intracelulares (figura 4b) (59–61). A formação de um trímero foi confirmada por diferentes metodologias. A partir de 2009, o entendimento da estrutura dos receptores P2X tornou-se mais claro com a publicação da estrutura do cristal do P2X4 de peixe zebra (figura 4a) (62–65). A estrutura desse receptor

em estado de repouso possibilitou avaliar a arquitetura do canal e reconhecer sítios importantes para o seu funcionamento. A seguir, a figura 4 mostra a topologia e a estrutura do cristal do receptor P2X4 de peixe zebra. Quanto aos mecanismos de ativação dos receptores P2X, as evidências eletrofisiológicas e os modelos matemáticos obtidos até então sugerem que o número de moléculas de ATP necessárias para ativação desses receptores se dá a partir de duas a, no máximo, três. Na primeira condição de cooperatividade, duas moléculas de ATP seriam suficientes para abrir os canais iônicos, ao passo que, na segunda condição, o maior número de moléculas de ATP (três) promoveria a dilatação de uma estrutura formadora de poro, como é o caso do P2X7R (66,67). Nesse sentido, os perfis de ativação, manutenção desta e dessensibilização fornecem uma subclassificação desses receptores como mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição dos receptores P2X e vias de transdução de sinal

P2X	Distribuição	Condutância iônica	Dessensibilização	Referências
P2X1	Bexiga urinária, músculo liso, mastócito	~18 pS	Rápida	(68–72)
P2X2	Hipófise, pâncreas, cérebro	~30pS	Lenta	(73–75)
P2X3	Coração, espinha dorsal	~22pS	Lenta	(76,77)
P2X4	Mastócito, micróglia	~8,9pS	Lenta	(72,78,79)
P2X5	Nervo trigêmeo, glândula pineal		Rápida	
P2X7	Macrófagos, micróglia, células glia	~10pS (canal iônico) ~400pS (poro)	Lenta	(72,80–83)

Subtipos de receptores P2X: Condutância iônica (pS), distribuição

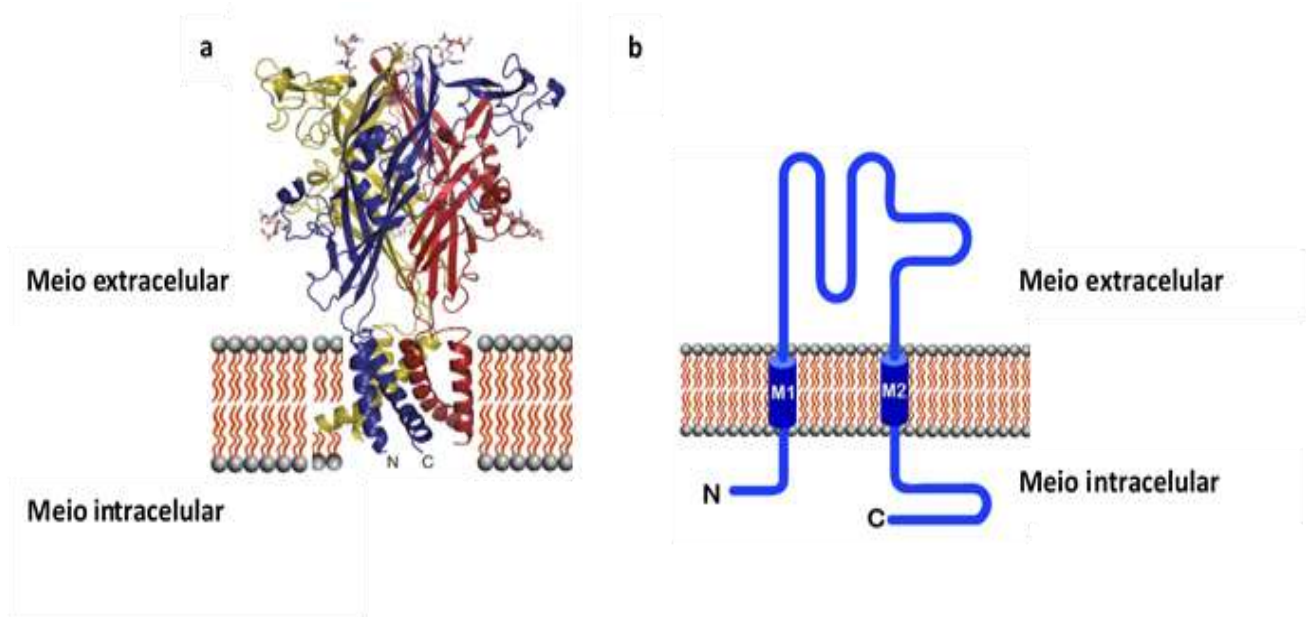


Figura 4 - Exemplo ilustrativo de topologia de monômero dos receptores P2X e estrutura cristalina do receptor P2X4. Em (a), a estrutura cristalina do receptor P2X4 em seu estado de repouso e na ausência de agonista. Propositalmente, a estrutura do formada pelo trímero está em destaque em detrimento da membrana plasmática. Em (b), observa-se topologia geral de uma subunidade de um receptor P2X, porções amino- e carboxi-terminal intracelulares, enquanto há 2 segmentos transmembranares (M1 e M2) e uma grande alça extracelular, a qual é responsável pela interação com o agonista. Figuras adaptadas de (65,84).

Os receptores ionotrópicos P2X diferem entre si sobretudo em três pontos importantes que estão resumidos na tabela 3. Em primeiro lugar, de acordo com a afinidade de cada subtipo de P2X ao agonista endógeno, ATP, a faixa de concentração para a ativação vai desde submicromolar até submilimolar; em segundo lugar, o processo de dessensibilização após o contato e a ativação dos mesmos, com destaque para o P2X7R, o qual não sofre esse processo. De acordo com a figura 6, os registros de correntes iônicas (configuração *whole-cell* (figura 5)) mostram as diferentes respostas dos receptores P2X tanto a exposições curtas, quanto a exposições de maior duração ao ATP. Através da configuração *whole-cell* é possível estudar a corrente resultante de todos os canais iônicos presentes na membrana plasmática ativados por determinado agonista, como mostra a figura 5; Em terceiro lugar, o tamanho da calda carboxi-terminal, a qual é relacionada como

uma plataforma de sinalização e ponto chave da formação do poro não seletivo discutido mais à frente (figura 8). Além disso, cátions divalentes, como cálcio, magnésio e zinco demonstram diferentes tipos de modulação alostérica de acordo com o subtipo de receptor P2X em estudo, como também com a concentração extracelular desses íons (85).

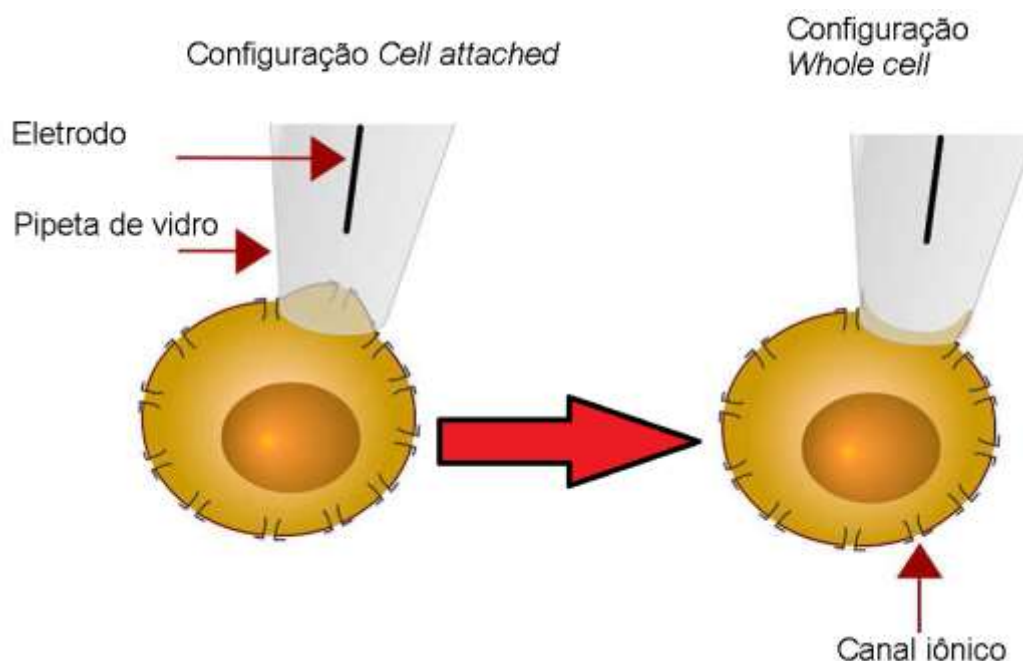


Figura 5 - Exemplo ilustrativo de diferentes modalidades de patch clamp. Ao tocar superficialmente a membrana plasmática de uma célula é possível obter um selamento entre o pedaço de membrana (*patch*) e pipeta de vidro. Esse selamento promove uma resistência elétrica da ordem de Giga Ohms, permitindo registros fidedignos dos canais iônicos presente no *patch*. Após a formação do selamento ôhmico, é possível causar ruptura no *patch* inserido na pipeta de vidro, o que realiza a configuração *wholecell*. Figura adaptada de (86)

Por outro lado, a afinidade ao agonista e a permeabilidade a íons variam quando são formadas estruturas heteroméricas desses receptores. Até o presente momento, somente o P2X7R apresenta-se como o único canal não formador desse tipo de arranjo, embora há evidências que apontam o contrário (87,88). Por outro lado, P2X6 é incapaz de

formar canal iônico funcional homotrímérico. Entre os heterotrímeros até agora vistos estão: P2X1/2, P2X1/3, P2X1/5, P2X1/6, P2X2/3, P2X2/5, P2X3/5, P2X4/5, P2X4/6 e P2X5/6 (89).

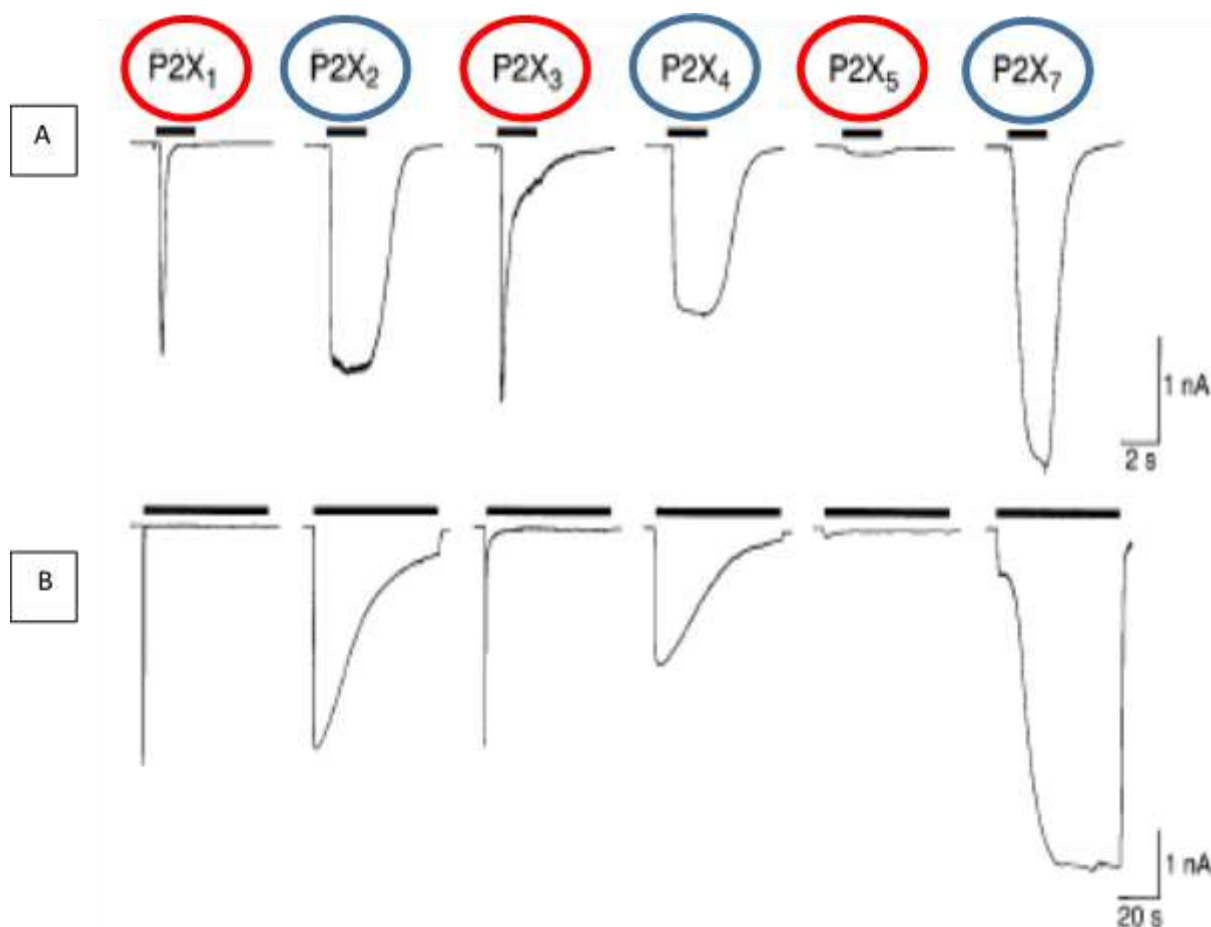


Figura 6 - Registro de correntes iônicas dos receptores P2X (homoméricos) a partir de sua ativação por ATP extracelular em células HEK transfectadas. Os perfis de corrente iônica demonstram o comportamento de atividade desses receptores diante de uma exposição curta (A), como em exposição prologada (B). Em destaque, os receptores circundados pela cor vermelha são os rapidamente dessensibilizados, enquanto que na cor azul, os lentamente dessensibilizados. Figura adaptada de (90)

A partir da clonagem do primeiro membro (P2X1) em 1994, os estudos envolvendo receptores P2X foram intensificados, principalmente com o desenvolvimento de novos fármacos e com as descobertas em relação aos diversos eventos celulares que estão envolvidos. A tabela 4 relaciona os principais agonistas utilizados em caracterizações

farmacológica desses receptores e a figura 7, por sua vez, mostra as estruturas dessas moléculas.

Tabela 4 - Principais agonistas usados nos estudos farmacológicos dos receptores P2X

P2X	PRINCIPAIS AGONISTAS (EC ₅₀ EM μM)	Principais
P2X1	ATP (0,1-1)=2-metil-tio-ATP (0,1-1)≥αβ-meATP (1-3)>BzATP(3-30)	
P2X2	ATP (1-30)=2-metil-tio-A	
P2X3	2-metil-tio-AT	
P2X4	ATP (10)=2-metil-tio-ATP	
P2X5	ATP (10)=2-metil-tio-ATP (10)>>αβ-meATP (>300)≥BzATP(1000)	
P2X7	BzATP(3)>2-metil-tio-ATP (10) >> αβ-meATP (10)	

s agonistas usados nos estudos farmacológicos dos receptores P2X. Entre parênteses se encontram os valores de EC₅₀ dos agonistas utilizados nos estudo farmacológicos e funcionais dos receptores P2X. Tabela adaptada de (91)

Figura 7 - Estrutura molecular dos principais agonistas utilizados no estudo farmacológico dos receptores P2X.

Os receptores P2X estão expressos praticamente em todos os tecidos do organismo e estão envolvidos em diversos fenômenos como processos de morte celular (92,93), dor (94) e inflamação (95), agregação plaquetária (96,97), dentre outros. Nesse sentido, há evidências de sua participação no desenvolvimento de neoplasias (98), doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson e esclerose) (99–101), assim como em doenças inflamatórias crônicas como o diabetes (102), a artrite reumatoide (103–105) e doença de Crohn (106). Além disso, um ponto em comum entre esses fenômenos é a liberação de ATP para o meio extracelular que pode levar à ativação purinérgica. Em danos na

membrana plasmática e processos inflamatórios há um aumento da liberação ATP ao meio extracelular. Ainda, há evidências de que uma vez liberado em pequenas quantidades, o ATP participe da manutenção de certos tipos de câncer (107). No entanto, em concentrações elevadas, o ATP foi capaz de promover a morte celular tanto por apoptose (108) quanto por necrose (109).

3. Receptor P2X7

Certamente, o mais emblemático dentre todos os ionotrópicos purinérgicos, esse receptor tem sido estudado extensivamente, sobretudo nas áreas de dor e inflamação e morte celular. Clonado em 1996, anteriormente reconhecido como P2Z, demonstra um série de fatores que o destacam dos demais (80). Em primeiro lugar, o tamanho da porção do carboxi-terminal é maior que os demais receptores P2X, como mostrado na figura 8, e está relacionado como um dos responsáveis pelas sinalizações envolvidas pelo P2X7R, inclusive na formação do poro não seletivo (110,111). Em segundo lugar, farmacologicamente, ele possui uma menor sensibilidade ao agonista endógeno, ATP extracelular, em relação aos outros P2X (112,113). Além disso, dentre os outros receptores, ele exibe maior sensibilidade ao agonista 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil) adenosina-5'-triphosphate (BzATP) em torno de 10 a 30 vezes mais em relação ao ATP. Esse dado corrobora com diversos trabalhos que apontam sua participação em processos inflamatórios e de morte celular que elevem rapidamente a concentração de ATP para o meio extracelular. Em terceiro lugar, como mostra a figura 6, sua ativação persiste enquanto há a presença de agonista. O receptor revela-se um canal iônico cujo processo de dessensibilização ocorre de forma mais lentamente que os demais. Esse fato ocorre tanto sob repetidas aplicações de um mesmo agonista quanto sob um única aplicação intermitente. Por fim, ele exibe a formação do poro não seletivo, o qual permite a permeabilização da membrana plasmática e permite a passagem de solutos de peso molecular de até 900 Da, o que será discutido adiante (81,114,115).

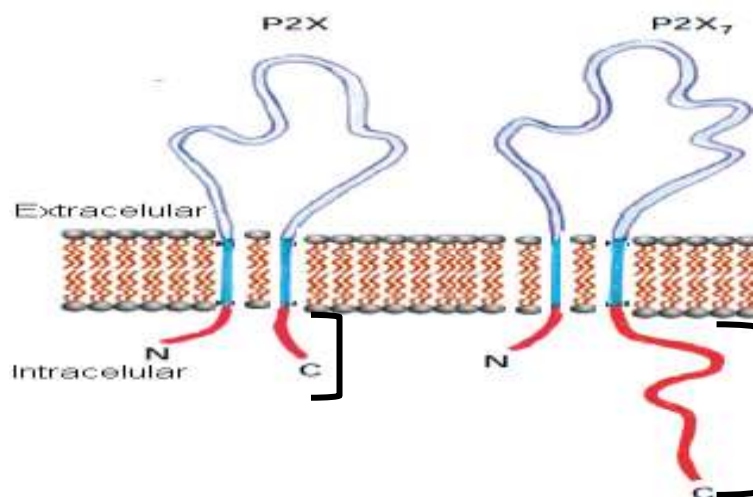


Figura 8 - Comparação entre as topologias dos receptores P2X e P2X7. Em destaque, apresentam-se a diferença de tamanho entre as caudas C-terminais. A cauda C-terminal do P2X7R possui 240 aminoácidos enquanto os outros dois receptores com maiores caudas (P2X2 e P2X4) possuem 118 e 28 aminoácidos, respectivamente (80,116).

Canal iônico formado pelo receptor P2X7

O receptor P2X7 (P2X7R) apresenta alta seletividade à espécie iônica da molécula do ATP (ATP^{4-}). Como mencionado anteriormente, apresenta menor sensibilidade pelo agonista em relação aos demais receptores P2X, necessitando de maiores concentrações do mesmo para ativá-lo. Além disso, o P2X7R apresenta-se como um canal de baixa condutância iônica, em torno de 10 pS, permitindo a entrada de cátions mono e divalentes de baixo peso molecular, como sódio e cálcio, e a saída de potássio para o meio extracelular. Sua atividade pode ser modulada negativamente pela presença de cátions divalentes extracelulares (81,117,118), tais como cálcio, magnésio e cobre. Tal inibição alostérica promovida por esses cátions é reversível e possivelmente acontece pela formação de complexos entre os cátions e a moléculas de ATP^{4-} (118,119). Essa relação de inibição por cátions obedece a seguinte ordem decrescente em relação ao poder inibitório: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+} = \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} \gg \gg \text{Sr}^{2+}$, como mostrado na tabela 5 (117). Além disso, não somente cátions, mas ânions também são capazes de modular a atividade do P2X7R, resumidamente mostrados na tabela 6. O íon iodeto mostrou-se capaz de inibir alguns eventos relacionados à ativação desse receptor, tais como correntes produzidas, a captação de cátions de maior peso molecular (formação

do poro não seletivo, discutido mais à frente) e a maturação e liberação da interleucina-1 β (IL-1 β) (120–122). Além disso, ânions orgânicos, como o neurotransmissor glutamato modulam positivamente o P2X7R (123).

Tabela 5 - Efeito inibitório de cátions extracelulares sobre o receptor P2X7

Cátions	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (μ M)	
	Oócitos de <i>Xenopus laevis</i>	Referência	Células HEK 293	Referência
Cálcio	-	-	3200, 4100	(117), (119)
Magnésio	418	(118)	470	(117)
Cobre	4,4	(118)	0,5	(117)
Zinco	78	(118)	11	(117)
Prótons	(pH 6,2) ↓80%	(118)	(pH 6,07) ↓50%	(117)

Valores obtidos em receptores P2X7 de rato transfectados em oócitos de *Xenopus laevis* e em células HEK. ↓ significa redução.

Tabela 6 - Efeito inibitório de ânions extracelulares sobre o receptor P2X7

Ânions	Efeito sobre o receptor P2X7	Referência
Iodeto	↓	(123)
Aspartato	↑	
Glutamato	↑	
Nitrato	↓	
Sulfato	↓	

Valores obtidos em receptores P2X7 (humano) transfectados em oócitos de *Xenopus laevis*. ↓ significa redução da atividade; ↑ significa aumento da atividade. O valor de IC₅₀=62mM para o ânion iodeto.

Funções e doenças relacionadas ao receptor P2X7

Principalmente expresso em células do sistema imune como macrófagos e tímócitos, o P2X7R participa de diversos fenômenos fisiológicos e patológicos, muitas vezes cruciais, como também, em doenças inflamatórias e no estímulo da dor. Sua ativação está relacionada a diversos mecanismos de sinalização celular, como produção de espécies reativas de oxigênio (18), formação do complexo inflamassoma (124), maturação e liberação da citocina pró-inflamatória (IL-1 β) (125–129). Neste último caso, faz-se necessária uma sensibilização primária com LPS à célula estudada, seguido portanto, da ativação por ATP. A Interleucina 1 β possui um papel central em processos pró-inflamatórios e inicia uma série de eventos e ativação de segundos mensageiros importantes. Como exemplo, a transdução de sinal que promove o recrutamento e ativação de MAPK e de NF- κ B, os quais estimulam um aumento da regulação de genes que participam de cascatas inflamatórias, como ciclooxigenase-2, IL-6, moléculas de adesão e quimiocinas (130,131). Além disso, foi descrito que o ânion cloreto em condições fisiológicas é capaz de reter a ativação de caspase-1 induzida pelo P2X7R, em conjunto com a secreção de IL-1 β (122,132).

Algumas variações genéticas do P2X7R podem ocorrer em seres humanos, promovendo susceptibilidade a infecções, como a tuberculose (133,134). Além disso, em modelos de leishmaniose, a atividade do P2X7R sofre alterações em macrófagos infectados, inclusive no que se refere à formação do poro não seletivo (135). Doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide (105,136–140) tem despertado bastante interesse no estudo e descobertas de novos antagonistas. Nessa enfermidade, há um quadro propício para a ativação desse do P2X7R, uma vez que existe uma elevada liberação de ATP para o ambiente extracelular, que leva à manutenção da liberação de citocinas pró-inflamatórias, o qual é inibido pelo antagonista ATP oxidado (104,105,141). Alguns fármacos desenvolvidos já se encontram em fases avançadas de testes clínicos, principalmente para doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e doença de Crohn (142). Em doenças que acometem o sistema nervoso central, como a esclerose múltipla, pacientes apresentam elevação da expressão do receptor em micróglia da região da espinha dorsal. Além disso, animais depletados do gene que expressa o P2X7R apresentaram uma redução do quadro de encefalomielite (um modelo experimental de

esclerose múltipla) (143,144). Também, há trabalhos que descrevem as relações entre o P2X7R e a depressão (145–150). Neles, há evidências de que polimorfismos que alteram a porção C-terminal desse receptor estariam relacionados com o desencadeamento da doença. Uma hipótese em aberto é a participação do P2X7R nas sinapses promovidas pelo neurotransmissor excitatório glutamato, uma vez o receptor favorece a liberação de vesículas contendo glutamato para meio extracelular. Quanto à sua participação no câncer, ainda é um assunto controverso. Certos grupos defendem que a ativação do P2X7R promoveria a morte celular, porém outros defendem que ele induziria manutenção do câncer, como no melanoma e no neuroblastoma (151–154). Em estudos que abordam a relação entre hipóxia e câncer, foi observado que, *in vitro*, sua expressão é aumentada ao longo do tempo em linhagens de câncer de mama, como também o poder de invasividade, ou seja o alcance de tecidos mais profundos, na ausência ou presença de agonista (155). Esse dado vai ao encontro de algumas informações presentes na literatura, já que há evidências de que células cancerosas crescem em meio com privação de glicose, em baixos níveis de soro (156). Além disso, o P2X7R seria um dos responsáveis pela regulação de nutrientes e enzimas importante na via glicolítica (157), embora, sob hipóxia, a ativação do P2X7R foi capaz de promover a morte celular de oligodendrócitos (158) e de células neuronais da retina, através da ativação de caspase-3 levando à morte celular semelhante à apoptose (159).

4. Poro Associado ao Receptor P2X7

O mais destacado fenômeno associado ao P2X7R é a formação de um poro não seletivo na membrana plasmática e os seus mecanismos de abertura (160). Em 1979, Cockcroft e Gomperts publicaram um trabalho no qual a aplicação de ATP extracelular promovia alteração da permeabilidade da membrana plasmática de mastócitos de ratos (161). Como o ATP é agonista geral dos receptores P2X, era necessário descobrir qual canal estaria envolvido na alteração da permeabilidade da membrana plasmática. Então, em 1993, a equipe de Dubyak publicou um trabalho mostrando que a expressão heteróloga do receptor “P2Z” (como antes o P2X7R era denominado) em oócitos de *Xenopus* estava envolvida na permeabilização membranar, com a formação de poros nessa região celular (162). O ensaio mais comum para o estudo do poro associado ao P2X7R é avaliação da passagem de íons de elevado peso molecular (em relação a íons pequenos, como sódio e cálcio), especialmente compostos fluorescentes (163,164). Por esse motivo, a captação de corantes fluorescentes tem sido amplamente explorada para a descoberta e desenvolvimento de fármacos seletivos e para a detecção de polimorfismos do P2X7R na população (165). Mesmo assim, há evidências de que o tipo celular estudado influa nos mecanismos que levam à permeabilidade transitória da membrana plasmática (166,167). Esse é um dos motivos pelos quais diversos resultados na literatura que sugerem que a partir da ativação do P2X7R, uma outra proteína seria recrutada para participar da formação do poro não seletivo, como abordado adiante. Atualmente, os grupos de pesquisa duas principais hipóteses para elucidar essa questão. Em relação ao mecanismo de abertura do poro, a primeira proposta seria que o P2X7R, quando ativado, gradualmente se dilataria (mudança de permeabilidade intrínseca) aumentando a permeabilidade da membrana e alterando sua seletividade iônica, permitindo assim, a passagem dessas moléculas com maior peso molecular (90), com tamanho até de 1,4 nm (168). Neste trabalho, Browne e colaboradores demonstraram que mutantes do P2X7R que possuem alterações na sequência primária dos aminoácidos que compõe a luz do canal iônico possuíam a passagem do corante fluorescente brometo de etídeo diminuída. Recentemente, foi avaliado o envolvimento da cauda carboxi-terminal e do segmento o segundo transmembrana (TM2) do P2X7R para a formação do poro não seletivo. Esse trabalho confirmou a importância da cauda carboxi-terminal na inserção do receptor na membrana plasmática e, conseqüentemente, na captação de corante, que já se conhecia desde a clonagem do P2X7R em 1996 (80). Além disso, resultados publicados pelo nosso

grupo pontuaram a importância do TM2 na formação do canal e, possivelmente, do poro associado (169,170). Uma modificação no TM2 alterou a capacidade do P2X7R promover a captação de corantes maiores (etídeo e propídeo), enquanto que a captação de corantes menores, como DAPI, permaneceu inalterada (171), corroborando, dessa forma, com a hipótese da dilatação do P2X7R.

Entretanto, fortes evidências ao longo anos sugerem a participação de outros componentes, tais como proteínas e segundos mensageiros, no processo de formação do poro associado ao P2X7R. Além disso, a evolução desse fenômeno seria dependente tanto do tipo celular e como do tipo de estímulo dado. Existem evidências de que o P2X7R teria dois estágios distintos (I e II) de permeabilidade após a exposição ao agonista. Esses dois estágios estão ilustrados na figura 9. O primeiro estágio seria responsável pela passagem de cátions de menor peso molecular, como N-Metil-D-glucamina (NMDG⁺) (82). Nesse estágio, o canal iônico per si promoveria a passagem de NMDG⁺. Por sua vez, o estudo o segundo estágio de permeabilidade dinâmica do P2X7 vem se destacando pelos resultados (sendo alguns conflitantes entre si) até momento. Neste caso, alguns dados mostram que em células HEK (embrionárias renais humanas) transfectadas com P2X7 (P2X7-hek), a permeabilidade ao NMDG⁺ é sujeita a alterações das concentrações de sódio extracelulares, assim como na existência de alterações na conformação da porção carboxi-terminal, já que alterações na sequência de aminoácidos dessa região podem levar à inabilidade de formação de poro. Jiang e colaboradores mostraram, em 2005, que íons sódio exerceram um controle alostérico negativo sobre a permeabilidade ao NMDG⁺. Contudo, a permeabilidade a cátions maiores, como o corante fluorescente iodeto de 4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazolilideno)metil]-1-[3-(trimetilamônio)propil] (YOPRO-1), não sofreu alterações, mesmo quando houve deleção de um segmento rico em cisteína. De modo interessante, sob essa condição, a permeabilidade ao NMDG⁺ foi abolida (172). Outra evidência que aponta a participação de outra proteína na captação de corante de elevado peso molecular é que esse processo não é exclusivo ou dependente do P2X7R. O composto extraído de dinoflagelados, maitotoxina, é capaz de promover a abertura de um poro com características semelhantes ao do P2X7R em fibroblastos. Contudo, a maitotoxina se mostrou incapaz de promover a captação de NMDG⁺, somente de cátion de maiores pesos moleculares, como o brometo etídeo (173–175). Outro ponto intrigante é o fato de que do composto inibidor da enzima calmodulina calmidazolium, em ensaios de permeabilização inibiu a corrente iônica provocada pela ativação do P2X7R, porém não

alterou a captação de corante, demonstrando que esse bloqueio discerniu entre canal iônico e a “estrutura formadora do poro” (117). Em contrapartida, a colchicina, composto que reconhecidamente é capaz de alterar a conformação do citoesqueleto, de forma inversa aos efeitos do calmidazolium, manteve o canal iônico formado pelo P2X7R funcional, enquanto a captação de corante foi inibida (135,176). Além disso, tipo celular tem se revelado um ponto importante para diferentes comportamentos do P2X7R (177,178). Esses trabalhos demonstram que diferentes tipos celulares respondem de modo diferente aos estímulos e quanto à seletividade iônica na captação de corante. Além disso, uma forte evidência a favor dessa segunda proposta (um proteína distinta ser o poro do P2X7R) é o fato de que não há até o momento um registro de corrente unitária (*cell attached*) que mostra a propriedade intrínseca do P2X7R em se dilatar em oócitos de *Xenopus*. Embora, nessa configuração (*cell attached*), os registros de corrente iônica da formação de um poro em células que expressam endogenamente o P2X7R estão em torno de 420 pS: 2BH4 (linhagem epitelial tímica), macrófagos peritoneais e J774 (linhagem macrofágica) (83,163). Dessa forma, corroborando com as evidências de que particularidades intercelulares influenciam no processo de abertura do poro associado ao P2X7R. Vale a pena ressaltar que através da configuração *cell attached* são estudados os canais iônicos presentes nas regiões confinadas pela pipeta de vidro. Porém, os dois trabalhos, em que se utilizam 2BH4, macrófagos peritoneais e J774, mostram que foi possível observar a formação de poro em toda a membrana plasmática. O que nesse caso, em paralelo com outros pontos apontados a seguir, convergem entre si a teoria de que haveria a participação de outras proteínas no processos de alteração de permeabilidade promovida através da ativação do P2X7R (172). Além disso, existe a possibilidade de uma rede de segundos mensageiros sustentando o recrutamento de outros fatores para a dilatação de uma estrutura. Nesse caso, ambigualmente, as duas propostas para o poro associado ao P2X7R poderiam usufruir desses mensageiros intracelulares.

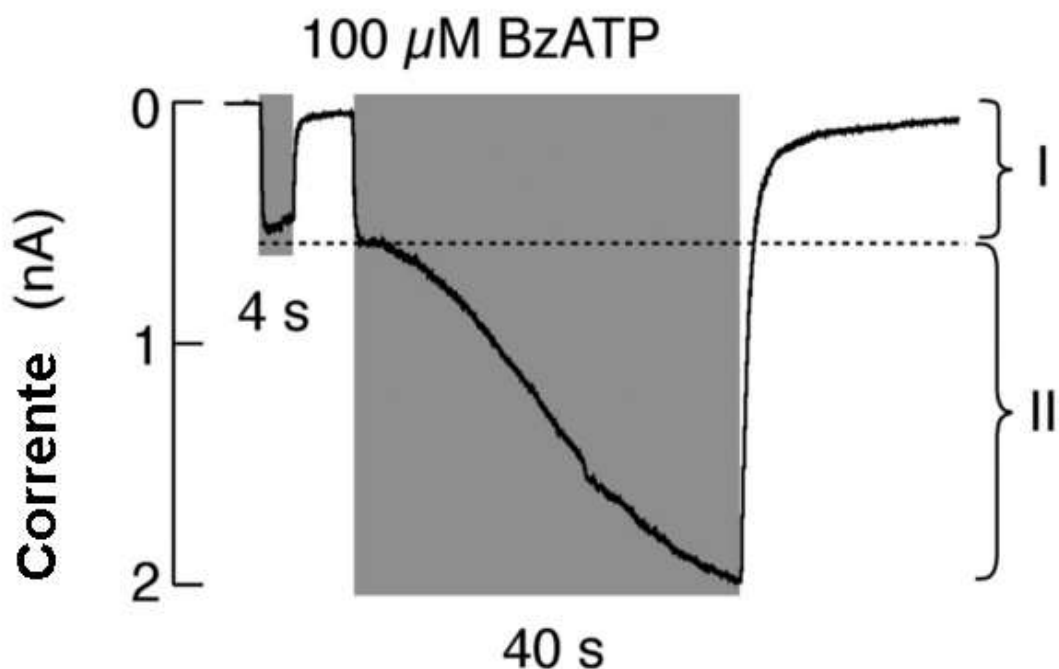


Figura 9 - Duas fases de ativação do P2X7R. A figura destaca duas fases distintas de ativação do P2X7R, caracterizadas como: Fase I - rápida (curta duração) e Fase II - lenta (longa duração). Adaptado de (179).

Portanto, a ativação do P2X7R levaria a uma rede de comunicação que poderia promover a ativação e o recrutamento de segundos mensageiros, como o cálcio intracelular e, por fim, a ativação de uma proteína distinta que seria a responsável pela abertura do poro (83,86,163,177,180,181). Assim, há evidências de que proteínas cinases ativadas por p38 (MAPK - proteínas cinases ativadas por mitógenos) participem da abertura do poro associado ao P2X7R. Uma vez bloqueada a ativação dessas proteínas, a abertura do poro foi inibida, embora tanto o influxo de cálcio quanto a liberação de IL-1 β se mantiveram funcionais. Por outro lado, inibidores de caspases foram capazes de inibir tanto a formação do poro como a liberação de IL-1 β . Nesse último caso, reafirmando a participação do P2X7R no processo e arranjo do complexo inflamassoma, o qual leva à maturação e à liberação dessa citocina (163,182). Um outro ponto importante é o possível papel de íons cálcio no processo de formação do poro. Uma vez ativado, o P2X7R é permeável a íons mono e divalentes, como cálcio. Existem fortes evidências sobre isso,

embora seja um ponto de discórdia entre trabalhos que estudam esse caso. Contudo, a depleção de íons cálcio intracelular inibiu a formação do poro associado ao P2X7R (163). Mesmo assim, nosso grupo descreveu a formação de um poro com características semelhantes ao do P2X7R através do uso do ionóforo de cálcio ionomicina. Esse poro mostrou condutância iônica em torno de 420 pS semelhantemente ao encontrado anteriormente. Além disso, o poro associado à ionomicina mostrou-se capaz de permitir a passagem de corantes catiônicos como aniônicos em taxas muito próximas (83,163,176). Ainda, Cankurtaran-Sayar e colaboradores mostraram que a passagem de *lucifer yellow* (corante aniônico) é dependente de cálcio intracelular em hek-P2X7R. Contudo, eles também demonstraram captação de corante independentemente do cálcio intracelular, mas nesse caso, utilizando-se de células diferentes, hek-P2X7R e RAW (linhagem macrófaga) (178). Interessantemente, a seletividade iônica ou o recrutamento de diferentes poros parecem ser modulados por parasitos. Em 2011, observou-se que células infectadas por *Leishmania amazonensis* sofriam modulação em seus poros ativados pelo P2X7R. Como consequência, além da expressão desse receptor se tornar aumentada, a permeabilização de moléculas grandes (por volta de 900 Da) tornou-se seletivamente aniônica, em detrimento da captação cátion seletiva. Uma vez que o poro associado ao P2X7 é aberto em condições iônicas fisiológicas, há uma discussão em aberto sobre a relevância desse fenômeno (135,179). A figura 10 ilustra os principais pontos em questão sobre o poro associado ao P2X7R.

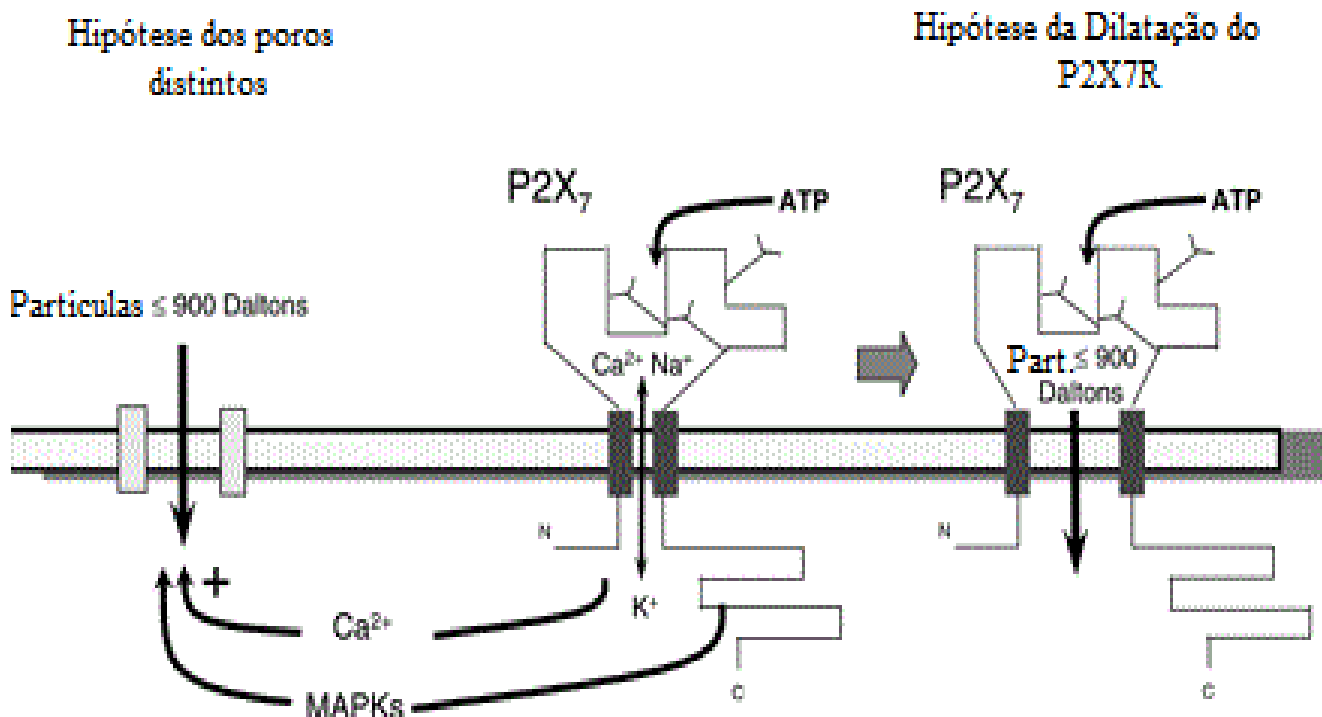


Figura 10 - Teoria dos poros e sinalização intracelular. As duas hipóteses para a formação do poro associado ao P2X7R, como descrita na figura 2. Nesta figura, são mostradas algumas das sinalizações envolvidas na hipótese que ressalta a participação da necessidade de segundos mensageiros, como o cálcio intracelular e MAP cinases. Adaptado de (183), sobre o trabalho de Faria e colaboradores em 2005 (163).

Mesmo que a participação de segundos mensageiros no processo de formação do poro do P2X7R seja um ponto controverso, alguns grupos afirmam que o hemicanal panexina-1 seria responsável pela captação de moléculas maiores e efetora na permeabilidade transitória da membrana plasmática após ativação do P2X7R (125,184). Nesses trabalhos, esses autores utilizaram células hek-P2X7 e a linhagem macrófágica J774 e relataram que antagonistas gerais de hemicanais e RNA interferência para panexina-1 inibiram a captação do corante fluorescente YOPRO-1 promovida pela ativação do P2X7R. De modo interessante, apesar de ambos os trabalhos mostrarem a inibição da captação de corante, eles divergem quanto à inibição de corrente iônica e os dois estágios distintos de permeabilidade iônica I e II. Entretanto, diversos trabalhos mostram evidências

conflitantes a essa hipótese. Destacamos o trabalho de Yan e colaboradores em 2008, no qual demonstra a abertura do poro associado ao P2X7R ocorre em condições iônicas fisiológicas e que este, mesmo em células hek-P2X7, não é inibido por bloqueadores de panexina-1 (179). Além disso, em 2009, um estudo da caracterização farmacológica da panexina-1 em mamíferos apontou que a inibição da panexina-1 não afeta as correntes macroscópicas produzidas pela ativação do P2X7R. Nesse trabalho, um dado curioso chama atenção e vai de encontro à argumentação de que a panexina-1 seria o poro associado ao P2X7R. Os autores demonstraram que compostos purínicos, em especial os nucleotídeos trifosfatados como ATP, GTP e UTP, diminuiram a ativação da panexina-1. Vale ressaltar que o efeito da molécula de ATP foi estatisticamente semelhante ao antagonista da panexina-1 utilizado, inibindo reversivelmente o hemicanal e com um IC₅₀ de 750µM, dentro da faixa de ativação do P2X7R (185). Recentemente, em 2013, nosso grupo publicou um artigo, que demonstrou que macrófagos peritoneais de camundongos somente expressam panexina-1 quando ativados. Em tratamentos farmacológicos, com a utilização de bloqueadores de hemicanais formadores de junções comunicante e panexina-1, não foi evidente a inibição das correntes iônicas provocadas pelo P2X7R, bem como na captação de corante. Além disso, o silenciamento da panexina-1 nesse tipo celular não inibiu o poro associado ao P2X7R (186).

Se por um lado a abordagem referente à panexina-1 mostra-se controversa, existe um crescente número de número de compostos, condições iônicas e proteínas capazes de promover permeabilidade transitória à membrana plasmática. Nesse grupo, encontram-se estruturas formadoras de poros com seletividades iônicas distintas, tanto cátion, ânions ou não seletivas. Um desses, TRPV1, é um dos temas centrais deste trabalho será discutido a seguir. Alguns exemplos são mostrados na tabela 7.

Tabela 7 - Exemplos de agentes formadores de poro.

<i>Agentes formadores de poros</i>	<i>Referência</i>
<i>TRPA1</i>	(187,188)
<i>pl-VDAC</i>	(189)
<i>lonomicina</i>	(176)
<i>Maitotoxina</i>	(190)
<i>P2X2</i>	(115)
<i>Panexina-1</i>	(191)
<i>TRPV4</i>	(192)

5. Receptores de Potencial Transitório (TRP)

Os receptores de potencial transitório (do inglês *Transient receptor potential* - TRP) constituem uma grande família de canais iônicos capazes de “monitorar” as condições extracelulares. O primeiro trabalho sobre esses receptores foi um estudo do aparelho visual de mutantes da espécie *Drosophila melanogaster*. Diferentemente de animais selvagens que são capazes de manter a despolarização de neurônios fotossensíveis a um estímulo luminoso, os mutantes TRP apresentam apenas despolarização transitória. Tal característica contribuiu para o nome dessa família de receptores (193).

Todos os receptores TRP possuem 6 segmentos transmembranares e um alça formadora do poro do canal iônico entre o quinto e o sexto segmentos, como mostra a figura 11 (194). Tanto as porções carboxi- e amino-terminais localizam-se intracelularmente cujas sequências variam entre as famílias, onde se localizam diversos domínios responsáveis por interações interprotéicas e proteínas e ligantes. Uma característica em comum entre os TRPs é a sua cation-seletividade, sobretudo aos íons cálcio e magnésio. No caso do primeiro, os TRP são capazes de promover a elevação dos níveis de íons cálcio intracelulares por duas vias: liberação de íons cálcio de estoques intracelulares via receptor de inositol-1,4,5 trifosfato (IP3), após estimulação de fosfolipase C (PLC) e através da abertura dos canais iônicos por eles formados (195). Outra característica desta superfamília é gama de possibilidades de modulação e/ou ativação através de: ativação por receptores acoplados a proteína G; ligantes extra- e intracelulares tais como prótons, íons cálcio e magnésio, componentes de membrana plasmática, como fosfatidilinositol difosfato; diferentes faixas de temperatura e estresse mecânico (196).

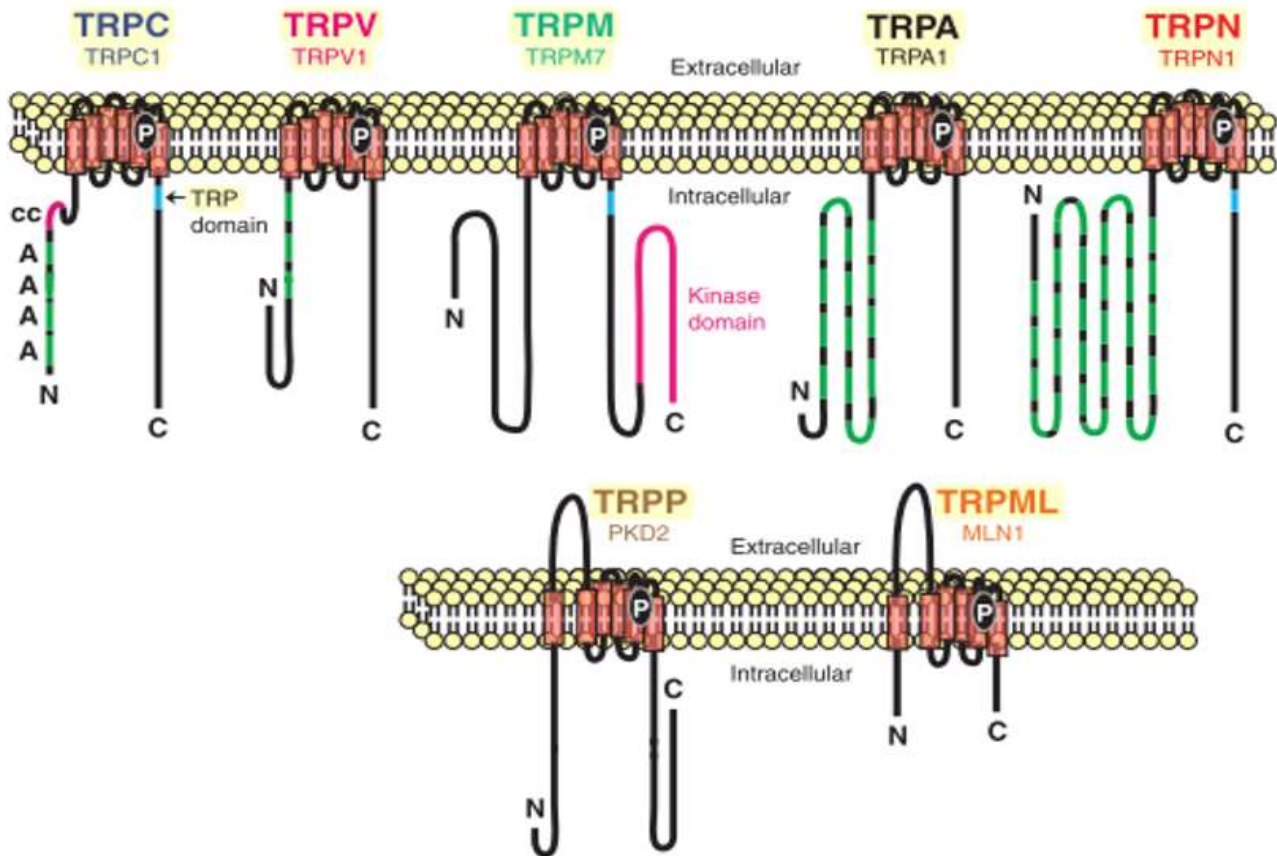


Figura 11 - Família dos receptor de potencial transitório (TRP). As sete subfamílias TRP contêm as porções amino- e carboxi-terminal intracelulares e segmentos de repetições de anquirina (A – verde) na porção amino-terminal. Alguns possuem um segmento conservado chamado domínio TRP. Figura extraída de Montel (197)

A superfamília TRP é constituída de 6 subfamílias e são expressos em diversos tipos celulares do organismo. Exercem funções importantes, tais como o estímulo da dor, desenvolvimento e maturação de células sexuais, desenvolvimento tímico etc. Além disso, os chamados termo-TRP, mostrados na figura 12, exercem influência no controle da temperatura corporal. Esses receptores são ativados diretamente por diferentes faixas de temperatura e entre eles destaca-se o TRPV1, centro do nosso estudo neste trabalho.

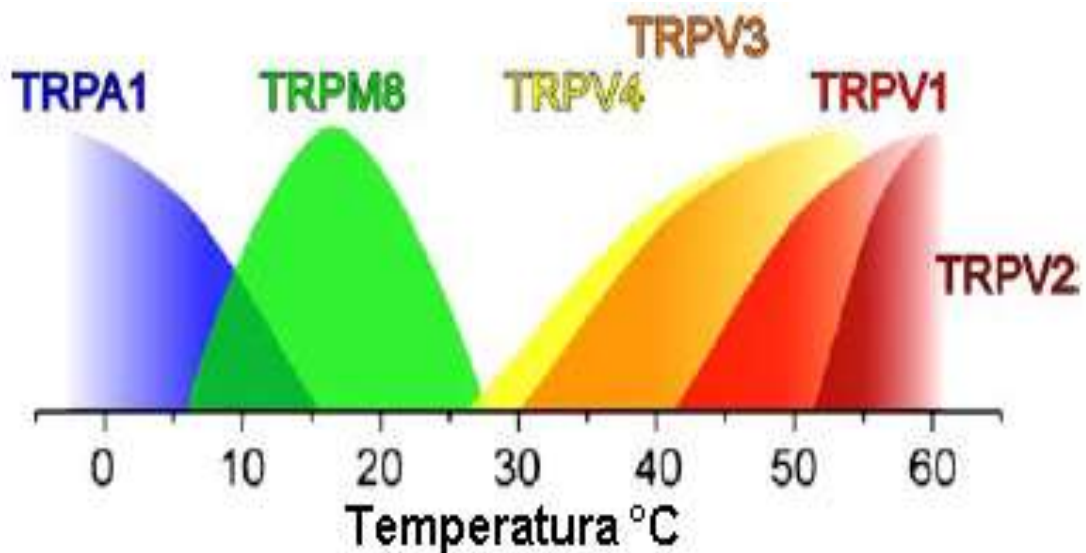


Figura 12 - TRP Termorreceptores. Ao menos 6 TRP são capazes de se ativar diretamente em diferentes faixas de temperatura. O TRPV1 ativa-se entre 42 e 47°C. Os outros receptores são: *Transient receptor potential ankirin subtype 1* (TRPA1), *Transient receptor potential melastatin subtype 8* e *Transient receptor potential vanilloid subtype 2-4*. Adaptado de (198).

Receptor de Potencial Transitório Vaniloide subtipo 1 (TRPV1)

O TRPV1 é um canal iônico catiônico não seletivo a cátions monovalentes, mas que apresenta uma certa seletividade aos íons cálcio dependendo da via de ativação, seguindo a ordem decrescente de afinidade a seguir: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Sob ativação da capsaicina, composto pungente encontrado em pimentas vermelha do gênero *Capsicum*, este receptor apresenta uma relação de permeabilidade entre íons cálcio e sódio de 10:1(199). Nesse contexto, em experimentos de eletrofisiologia, o TRPV1 demonstrou condutâncias iônicas de 53 pS a 62 pS em baixas e altas concentrações de íons sódio, respectivamente. Por outro lado, paradoxalmente, a condutância iônica na presença de íons cálcio decresceu a 15 pS, embora a preferência de cálcio em relação ao íon sódio é em torno 10 vezes maior (199,200).

Clonado em 1997, sua estrutura foi revelada por criomicroscopia eletrônica e demonstra certa semelhança conformacional aos canais iônicos dependentes de voltagem (199,201). O TRPV1, cujo peso estimado é de 95 kDa, é um canal iônico homotetrâmico onde cada subunidade é formada por 6 segmentos transmembranares e as porções C e N-terminais são intracelulares, como mostrado na figura 13. Entre o quinto e sexto segmentos transmembranares, encontra-se uma alça polipeptídica, onde provavelmente se exerça o filtro de seletividade iônica desse receptor (199,202,203). Como outros TRP, o TRPV1 possui três domínios de repetição de anquirina em final do segmento N-terminal. Essa região possui diversos sítios de interação a agonistas e moduladores, exercendo influência na sensibilidade do canal iônico. No segmento N-terminal, por exemplo, encontra-se o sítio em comum de interação com ATP e com a enzima calmodulina, conforme descrito nos resultados de cristalografia da região de repetições de anquirina (204). Esses dois componentes exibem duas modalidades distintas de dessensibilização: aguda e taquifilaxia. A primeira ocorre quando o receptor é exposto ao agonista por um curto período de tempo, já a segunda, ocorre após sucessivas exposições a uma mesma concentração de agonista, como mostrado na figura 14 (205). Além disso, a taquifilaxia é inibida ou retardada quando moléculas de ATP intracelulares se ligam ao mesmo sítio de interação à calmodulina, a qual, por sua vez, seria necessária para a dessensibilização (204). Fisiologicamente, esses perfis de dessensibilização poderiam contribuir para a percepção à nocicepção de nervos sensoriais, uma vez que o TRPV1 é fortemente expresso nesses tipos celulares. Provavelmente, esses dados obtidos auxiliam a explicar porque a capsaicina que ativa o TRPV1 promovendo a dor e, paradoxalmente, efeitos analgésicos também (206). Por conseguinte, formulações com a capsaicina já se encontram aprovadas para uso clínico, como para neuralgia posterpética (207). Como mencionado anteriormente, a molécula de ATP previne o eventos de taquifilaxia. Considerando que os relatos de que, após a ativação do TRPV1, a hidrólise do fosfatidilinositol difosfato (PIP2) contribua para a dessensibilização, há evidências de que o ATP também seja necessário para uma nova síntese do PIP2, contribuindo para a ressensibilização do receptor (208). O TRPV1 atua como uma plataforma de múltiplos estímulos. Uma característica peculiar desse receptor é extensa gama de ativadores, químicos e físicos, capazes de alterar sua função (209), como temperaturas ambientais

elevadas, abrangendo uma faixa de 42 à 47°C e acidose extracelular (pH<6,0) (199). Como mencionado anteriormente, a capsaicina faz parte dos compostos vaniloides capazes de ativá-los. Outra forma de ativação é a partir da ativação de receptores acoplados à proteína G, por meio de da ativação da fosfolipase C que eleva à hidrolise do PIP2, gerando IP3 e DAG (diacil glicerol). Nesse sentido, trabalhos já demonstraram participação do receptor purinérgico acoplado a proteína G, P2Y2R, com o TRPV1. Este trabalhos demonstram que a ativação do P2Y2R foi capaz de potencializar a ativação e promover a ressensibilização do TRPV1 em neurônios (210–212). As figuras 15 e 16 mostram alguns agonistas e antagonistas do TRPV1.

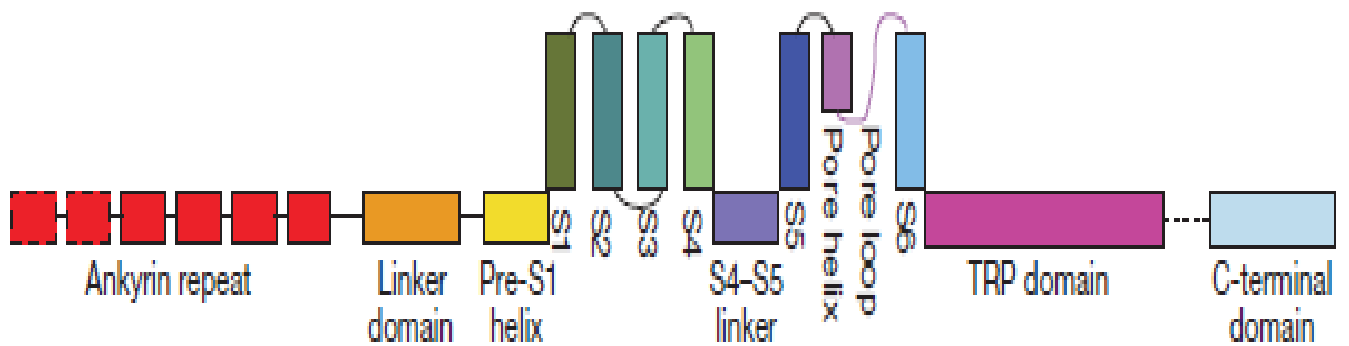


Figura 13 - Topologia de um subunidade do TRPV1. Estrutura apresenta 6 domínios transmembranares (S1-S6) e o domínio TRP, conservado entre os membros da família TRP, segmentos repetidos de anquirina (201)

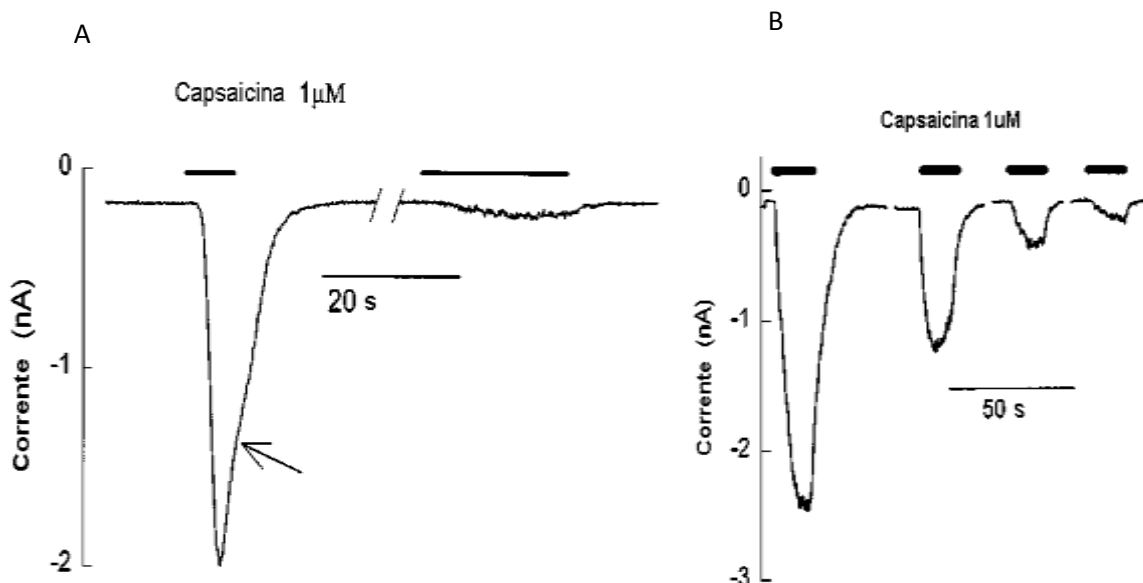


Figura 14 - Formas de dessensibilização do TRPV1. Em (A) observa-se a dessensibilização aguda, ou de curta duração. Note que a seta indica que, mesmo durante a exposição ao agonista, o receptor deixa de responder ao estímulo. Em (B), sucessivas exposições ao agonista em uma mesma concentração reduzem a resposta do receptor a esses estímulos gradativamente. Adaptado de (205).

O TRPV1 é expresso, principalmente, em neurônios (213,214), porém há crescente número de novos trabalhos que mostram sua expressão em células não neuronais, como células epiteliais (215), em fibroblastos (216) e timócitos (217) conforme mostra a tabela 8. Ele tem participação no controle da regulação do tônus vascular (218) e no crescimento do folículo capilar (219). O TRPV1 participa do processo inflamatório causado por temperaturas elevadas (220,221), como também no estímulo da tosse e no contexto de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (222–224). Alguns trabalhos exibem a possibilidade cardioprotetora do TRPV1 (225), assim como a participação na hipermotilidade intestinal, na sepse (226) e na pancreatite (227,228). Além disso, o TRPV1 apresenta importante participação em certos tipos de câncer, como o câncer de bexiga (229), tumorigênese de células epiteliais (230), carcinoma de próstata humano (231) e hepatocarcinoma (232).

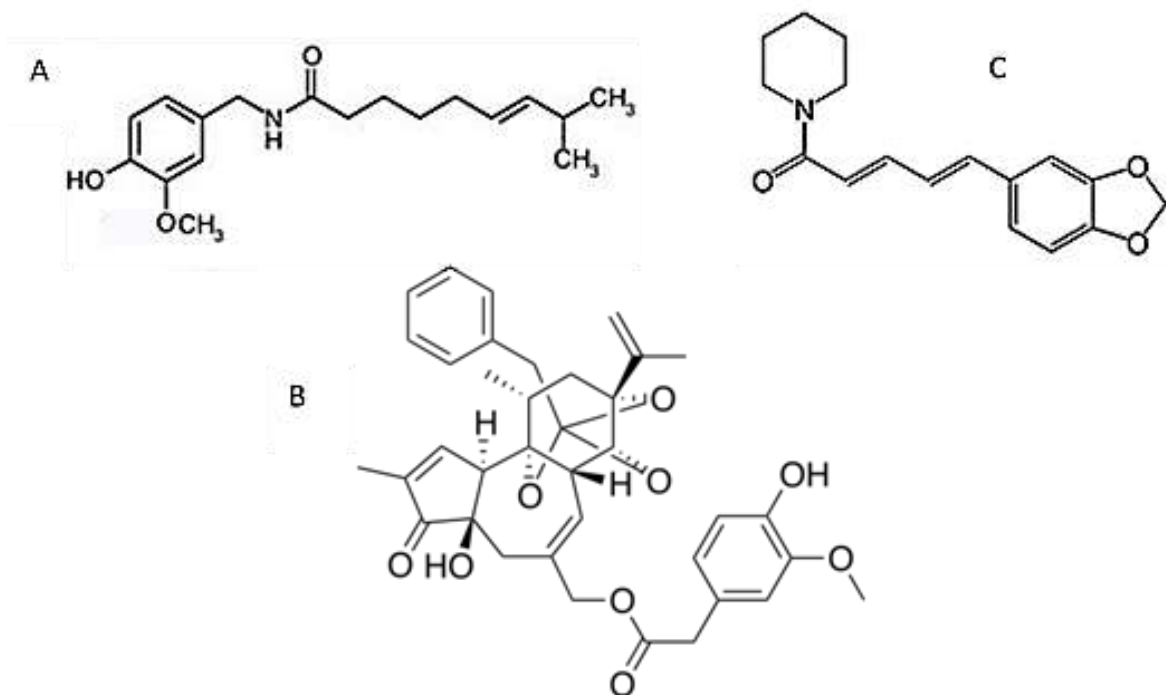


Figura 15 - Principais agonistas utilizados para o estudo do TRPV1. (A) capsaicina, (B) resiniferatoxina e (C) piperina.

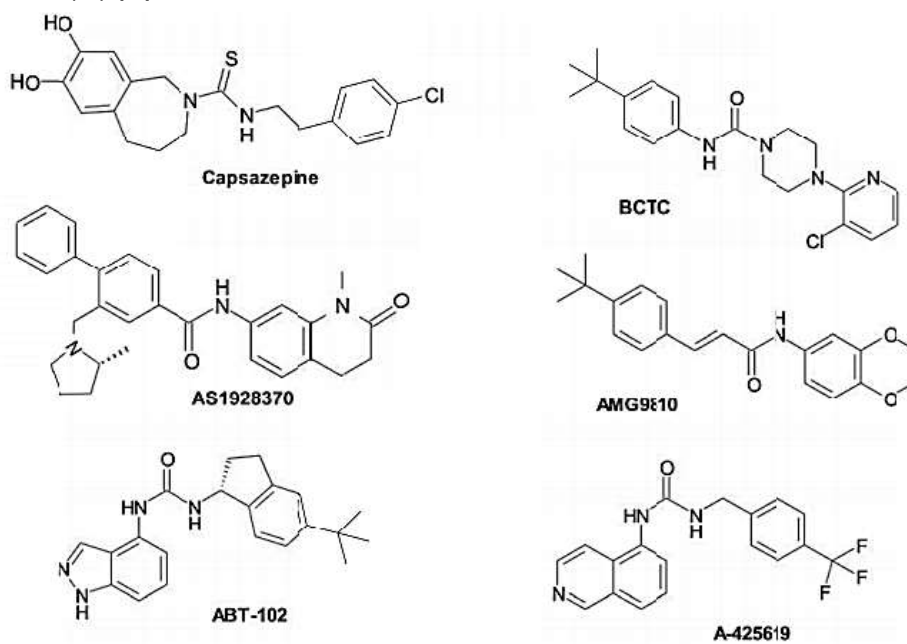


Figura 16- Exemplos de alguns antagonistas do TRPV1 (233).

Tabela 8 - Exemplos de células e/ou tecidos que expressam o TRPV1

<i>Tipo celular</i>	Referências
<i>Gânglio da raiz dorsal</i>	(234)
<i>Mesencéfalo</i>	(234)
<i>Cortex</i>	(234)
<i>Adipócitos</i>	(235)
<i>Uretra</i>	(236)
<i>Sinoviócitos</i>	(237)
<i>Células mononucleadas</i>	(238)
<i>Células β</i>	(239)
<i>Células epiteliais</i>	(215)
<i>Fibroblastos</i>	(216)
<i>Timócitos</i>	(217)

6. Poro associado ao TRPV1

O TRPV1 faz parte do grupo dos canais iônicos envolvidos na formação de um poro na membrana plasmática que promovem a permeabilização de moléculas de elevado peso molecular. Uma vez ativado pela capsaicina, o TRPV1 forma um poro na membrana plasmática (240). Embora não esteja definido até o momento valores de condutância iônica, durante a formação do poro associado ao TRPV1, a proporção entre os íons NMDG⁺ e sódio que o permeiam esse poro é quintuplicada.

Um ponto interessante na primeira descrição do poro do TRPV1, em 2008, foi a exclusão de hemicanais no processo de formação desse poro, embora ainda são poucas as informações sobre essa estrutura (240). Alguns pontos a seguir mostram que possivelmente, neste caso, esse fenômeno ocorra através da dilatação do canal iônico do TRPV1. Recentemente, o diâmetro inicial do poro do canal iônico avaliado através de criomicroscopia eletrônica (201). A passagem de cátions do cátion orgânico NMDG⁺ foi dependente da concentração e do tempo de exposição ao agonista. As estimativas do tamanho da luz canal iônico, pela utilização de diferentes cátions de maiores pesos, revelam que o diâmetro inicial do poro, 10 Å, aumenta para 12,3 Å. A permeabilidade a grande cátions orgânicos, na ordem de 900 Da, é inversamente proporcional ao tamanho dos mesmos, como se houvesse um aumento gradual do tamanho do poro (240).

Contudo, a captação de moléculas de maiores pesos através do TRPV1 é estudada há mais de 10 anos. Certos compostos derivados de poliaminas, como a espermina, são capazes de sensibilizar neurônios sensoriais e aumentar a atividade do TRPV1. Nessa linha, usando o TRPV1, compostos derivados de estirila, comumente utilizados em marcações de vesículas sinápticas, e o antibiótico gentamicina foram capazes de permear a membrana plasmática (241–243). Uma outra modalidade de ativação do TRPV1, a acidez extracelular, também foi capaz de aumentar a captação de moléculas maiores, até 1000 Da. Quando ativado, o TRPV1 permite a passagem de prótons, induzindo a acidificação intracelular e aumenta a passagem de NMDG⁺. Essa condição, inclusive, favoreceu a entrada de anestésicos impermeáveis que foram capazes de bloquear canais de sódio em neurônios sensoriais. Esses resultados formaram a base para o emprego do poro do TRPV1 como ferramenta terapêutica, como exemplificado na figura 17 (244–246). Diferentemente da ativação por capsaicina e por acidez extracelular, temperaturas a partir

de 43°C não foram capazes de formar um poro na membrana plasmática, mas somente o canal iônico de baixa condutância (246).

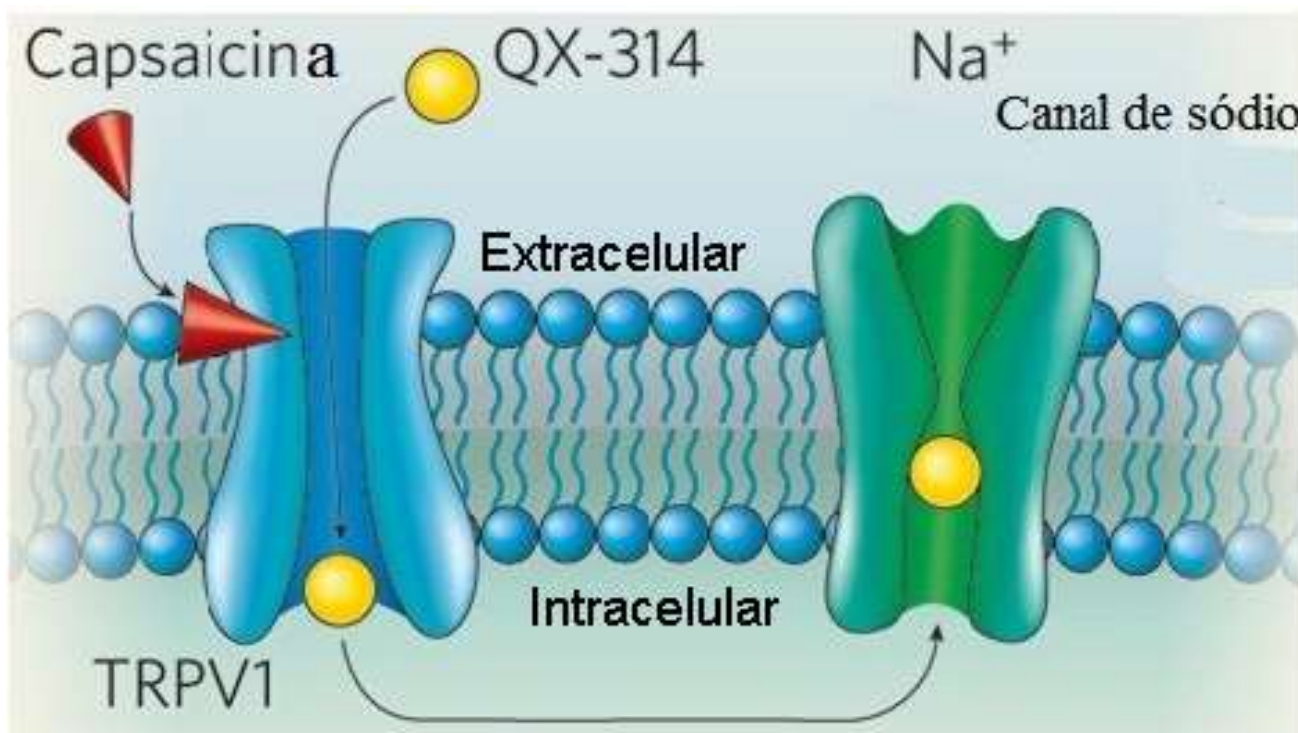


Figura 17 - Exemplo de uso de poro membranar como ferramenta terapêutica. A abertura do poro ativado pela capsaicina torna-se permeável a fármacos hidrofílicos, como o análogo da lidocaína, hidrofílico e impermeável à membrana, QX-314. Adaptado de (247).

7. Possível interação entre os receptores P2X7 e TRPV1

Através das evidências biofísicas e funcionais compartilhadas, seria possível a existência interações entre esses canais iônicos e os poros associados (ou formados) pelos receptores P2X7 e TRPV1, uma vez que ambos receptores encontram-se expressos em tecidos comuns. Particularmente, esses dois receptores se comunicam em cenário neuroglial, uma vez que ambos são expressos em neurônios e células gliais, como astrócitos e micróglia. Assim, é possível que durante processos inflamatórios, nos quais há morte celular e acidificação do meio extracelular, eles estejam sensibilizados e comuniquem entre si. Células em processos apoptóticos e necróticos liberam ATP e outros conteúdos intracelulares, que por sua vez levam a ativação e/ou sensibilização (potenciação) dos dois receptores. Além disso, a participação desses receptores foi demonstrada claramente na evolução de alguns processos inflamatórios, como a cronificação da pancreatite aguda. O receptor P2X7R é expresso no pâncreas e está envolvido com a evolução do diabetes, enquanto o TRPV1 é expresso nos neurônios que inervam esse órgão, sendo descrito que a inibição do TRPV1 interrompe o processo de cronificação da pancreatite (102,248–251). Por outro lado, no âmbito do câncer, como no caso do melanoma, há evidências de que ambos receptores exerçam funções importantes na manutenção da doença. Nesse contexto, há trabalhos que mostram claramente que o bloqueio do P2X7, pelo antagonista ATP oxidado, diminuiu o tamanho do tumor. Paralelamente, o TRPV1 promove a liberação de ATP em ambiente extracelulares ácido, o que poderia favorecer a ativação do P2X7R (153,252–254). Ainda assim, há informações controversas quanto à ação da capsaicina, uma vez que em animais depletados de TRPV1, ela foi capaz de aumentar a invasividade de câncer de uretra. Por outro lado, a capsaicina inibiu migração de células de melanoma (255,256). Outra evidência sobre uma possível relação entre esses poros são as regiões em que o TRPV1 e o P2X7R estão presentes. O P2X7R encontra-se localizado tanto em regiões *rafts*, como em não-*rafts* (257). Além disso, a inserção do P2X7R em microdomínios *rafts* é dependente da formação correta do segmento carboxi-terminal, como também, de modificações palmitoilações pós-traducionais (258). *Lipid rafts* são regiões presentes na membrana plasmática ricas em colesterol, cuja função ainda permanece em aberto com relação à formação de poros na membrana plasmática. Porém, sabe-se que executa importantes

sinalizações intracelulares, agindo como uma plataforma de sinalização. Contudo, foi demonstrado que o P2X7R localizado em regiões não-*rafts* (pobres em colesterol) funciona como um canal catiônico permeável a pequenos cátions, enquanto o P2X7R localizado em regiões *rafts* poderia ser relacionada à possibilidade de abertura do poro. Por sua vez, em células que sofrem tratamento para depleção de colesterol se verificou que o funcionamento do TRPV1 é dependente das regiões de *rafts*. Nessas células, as captações de NMDG⁺ e YOPRO-1 (630 Da) através do TRPV1, seja pela ativação por acidez extracelular, seja pela ativação por capsaicina, foram comprometidas em 50% e 70% respectivamente, embora a ativação por temperaturas elevadas não sofreu alteração (259).

Nesse contexto, estudamos se há interação entre o poro formado pelo TRPV1 e o processo de formação do poro associado ao P2X7R, uma vez que ambos participam de eventos em comum.

8. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar se os canais iônicos e a abertura dos poros ativados pela capsaicina e pelo receptor P2X7 correspondem ao mesmo poro em macrófagos peritoneais de camundongos.

Objetivos Específicos

- 1 - Investigar as propriedades biofísicas e farmacológicas do poro ativado pela capsaicina em macrófagos peritoneais.
- 2 - Investigar se o poro ativado pela capsaicina leva à morte celular.
- 3 - Avaliar a participação de outras proteínas formadoras de poros na formação do poro ativado pela capsaicina via TRPV1.
- 4 - Investigar a expressão do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos.

9. Material e Métodos

1. Culturas de células:

Neste projeto, foram utilizados macrófagos extraídos da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss webster* de 4-6 semanas. Após o lavado peritoneal com tampão fosfato, as células passaram por um processo de pré-adesão por 45 minutos para a purificação da amostra em placas de 96 poços em DMEM + 10% de SFB (para ensaios de permeabilização) ou em lamínulas de vidro para ensaios de eletrofisiologia e ensaios de influxo de cálcio. Após 3 lavagens com DMEM, as células permaneceram por 48 horas em DMEM + 10% SFB a 37°C e 5% CO₂. Também foi realizada cultura de Glia de Müller extraída de pinto para os experimento de permeabilização em microscopia de fluorescência. As células de glia de Müller de retina obtidas de retina de pinto (E9) foram dissociadas com tripsina e plaqueada em placa de 60 mm com 10 mL de DMEM + 10% soro fetal bovino (SFB). Após uma semana, foi adicionado ácido ascórbico 4 mM, ficando em contato com as células por 6 horas para matar todos os neurônios. Após lavagens com DMEM, as culturas de glia foram obtidas. Essas culturas permaneceram em estufa, a 37°C e 5% CO₂, por 3 semanas, com trocas de meio a cada 3 dias antes de serem utilizadas. Foi utilizada a linhagem GL261, astrocitoma murino, que foi cultivada em DMEM + 10% de SFB, o qual foi trocado a cada 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As células foram cultivadas em placas de 96 poços para ensaios de permeabilização ou em lamínulas de vidro para ensaios de cálcio. Este projeto está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de ética do uso de animais sob a licença L-0041/08.

2. Medidas eletrofisiológicas:

Realizamos a técnica de patch clamp que consiste em registrar correntes iônicas em condições de alto selamento elétrico entre a membrana da célula e o eletródio utilizado para realizar os registros de corrente iônica. De forma simplificada, uma micropipeta, contendo o eletródio, preenchida com solução salina toca a superfície celular e, posteriormente, é aplicada sucção ou pressão negativa. Em condições apropriadas pode surgir um selamento gigaômico (GΩ) a partir do qual é possível registrar

correntes de canais unitários ou correntes macroscópicas de baixa condutância. Esta configuração é denominada de *cell attached*. As pipetas utilizadas para o experimento na configuração *cell attached* são preparadas de capilares de borossilicato com filamento 1,2mm (World Precision Instruments, Inc; New Haven, EUA), utilizando um puxador de pipetas (Microelectrode Puller, Narishe Group, NY, U.S.A.). As células foram acondicionadas, em temperatura ambiente, em placas de petri de 35mm e incubadas com soluções salinas para realização das medidas eletrofisiológicas. As soluções salinas do banho e da pipeta podem apresentar diferentes composições dependendo do protocolo. A salina extracelular controle (em mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂ e 10 HEPES, em pH7.4 (solução extracelular com Ca²⁺); a composição da salina intracelular (em mM): 150 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina-1-il] etanossulfônico (HEPES), 0,1 ácido etileno glicol tetra-ácetico (EGTA), em pH 7.4. Os equipamentos eletrônicos compreendem um amplificador eletrônico (Axopatch-1D Axon Instruments, Inc; San Mateo; EUA) que é controlado pelo programa WinWCP, que realiza os protocolos de pulso e armazena as medidas do amplificador. O amplificador é ligado ao computador através de uma interface AD/DA Digidata 1320 (Axon Instruments, Palo Alto, CA, EUA) que digitaliza os registros numa frequência de 50KHz. Os compostos foram aplicados sobre a superfície celular através de sistema de perfusão e suas concentrações variaram de nanomolar até milimolar de acordo com o protocolo usado.

3. Avaliação da formação de poros através das técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência:

As células foram incubadas com brometo de etídeo por 5 minutos anteriormente à adição de ATP ou capsaicina, na presença ou não de diferentes bloqueadores em salina, em mM: 130 NaCl, 3 KCl, 0,6 MgCl₂, 1,2 NaHCO₃, 10 glicose, em pH 7,4. As leituras acontecem após 30 minutos de tratamento. Logo após, as células foram avaliadas por citometria de fluxo (BD FACS Calibur) (10⁶ células / mL), microfluorimetria em placas pretas de fundo transparentes ($\lambda_{\text{excitação}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 585 nm) (2x10⁵ células por poço), analisada através do Spectramax M5 (Molecular Devices) e por microscopia de fluorescência quanto à permeabilização ao corante

(2×10^5 células por poço), através de microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000, Tóquio, Japão).

4. Medida da liberação de lactato de-hidrogenase (LDH):

Macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços transparentes, submetidos aos tratamentos diversos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1500RPM por 5min para a coleta do sobrenadante de cada poço contendo um tratamento. O sobrenadante extraído dos poços dos tratamentos é adicionado ao substrato e alumínio férrico presente no kit de detecção de LDH (Doles). Após atingir a temperatura de 37°C, foi adicionado NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) à mistura feita anteriormente. À 37°C, após 5 minutos, foi adicionada a solução de parada para posterior leitura feita em um leitor da placa ($\lambda=510$ nm). Analisada através do Spectramax M5 (Molecular Devices).

5. Medida da liberação de citocinas:

Macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços transparentes, submetidos aos tratamentos diversos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1500RPM por 5min para a coleta do sobrenadante de cada poço contendo um tratamento, que foi congelado até o dia do experimento. O protocolo foi seguido de acordo com o fabricante (BD *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit*). As leituras foram realizadas por citometria de fluxo (BD FACS Calibur).

6. Imunocitoquímica em macrófagos peritoneais:

Após o lavado peritoneal de camundongo e período de pré-adesão em lamínulas de vidro, as células foram cultivadas em DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%). A placa foi deixada em repouso em estufa por 24h. Após esse período, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS para remoção de do meio. As células foram fixadas em 4% paraformaldeído (PFA) por 10 minutos. Novamente, foram feitas 3 lavagens com PBS. Cada lamínula foi incubada com albumina de soro bovino (BSA) a 3% em diluição com Triton X 0,05% por 30 minutos. Após essa etapa, Foram incubados os anticorpos primários em PBS + Triton X 0,25% por 24 horas. Os anticorpos primários

utilizados nessa etapa foram: anticorpo policlonal, feito em coelho contra camundongo, anti-TRPV1 (Santa Cruz -R-130) 1:100, o anticorpo policlonal, feito em coelho contra camundongo anti-P2X7R (Alomone - #APR-004) 1:100, anticorpo anti-camundongo anti-IBA1 conjugado com Alexa 594 1:100 (Molecular Probes) e anticorpo anti-camundongo anti-tubulina conjugado com Alexa 594 1:100 (Molecular Probes), de acordo com as condições. Vinte e quatro horas depois, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes com PBS + Triton X 0,025% por 5 minutos. Então, foram incubados os anticorpos secundários diluídos em PBS + Triton X 0,25% por 2 horas. Os anticorpos secundários utilizados são: IgG anti-coelho marcada com Alexa 488 (Molecular Probes). Em seguida, cada lâmina foi lavada por 3 vezes com PBS +Triton X 0,25% por 5 minutos previamente à adição do corante nuclear diaminobenzidina (DAPI) nas lamínulas por 2 minutos. Cada lamínula, em seguida, foi lavada por 2 vezes com PBS + Triton 0,25% por 5 minutos. Cada lamínula foi montada em propilgalato para evitar a extinção da fluorescência.

7. Imageamento de cálcio individual:

As variações de cálcio intracelular foram avaliadas individualmente em células obtidas da cavidade peritoneal de camundongos conforme descrito anteriormente. Este protocolo é uma variação do protocolo de (72) conforme descrito em De Melo Reis e colaboradores (73). Após o lavado peritoneal, as células passaram por um processo de pré-adesão sobre lamínulas de vidro dentro de placas de 24 poços para que houvesse uma purificação da amostra. Após três lavagens com PBS, foi adicionado aos poços meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%). A placa foi deixada em repouso em estufa por 48h, a 37°C e 5% CO₂. As células foram carregadas com 5 µM de Fura-2/AM (Molecular Probes), 0,1% de BSA, 0,02% de ácido plurônico F-127(Molecular Probes) e 1mM de probenecida (Sigma-Aldrich) em solução de Krebs (132mM NaCl, 4mM KCl, 1,4mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 6mM glicose, 10mM HEPES, pH 7,4) e deixadas em estufa com 5%CO₂ e 95% de ar atmosférico a 37°C. Após 40 minutos de incubação, cada lamínula foi lavada com a solução Krebs e montada em uma câmara RC-20 em plataforma PH3 (Warner Instruments, Hamden, CT) em um microscópio de fluorescência invertido (Axiovert 200; Carl Zeiss). As células ficaram continuamente em contato com a solução de Krebs e estimulas de acordo com as

condições mostradas na figura 6. As variações de cálcio intracelular foram quantificadas pela razão de fluorescência emitida a 510 nm com excitação alternada (750 ms) em 340 nm e 380 nm, usando um aparato Lambda DG4 (Sutter Instrument, Novato, CA, EUA) e um filtro passa-banda de 510 nm antes da aquisição de fluorescência com uma objetiva 40X e uma câmera digital CoolSNAP (Roper Scientific, Trenton, NJ, EUA). Os valores adquiridos foram processados através do software MetaFluor (Universal Imaging Corp, West Chester, PA, EUA) Os valores para a razão de Fura-2 foram calculados em *cut-off* de 10% do aumento do nível de cálcio intracelular após o estímulo.

8. Análise de dados:

Todos os dados de microscopia de fluorescência foram analisados utilizando o ImageJ 1.46a (NIH) e foram expressos como da média aritmética \pm DP (desvio padrão) da observação de fluorescência. Antes de iniciarmos os testes de inferência estatística, verificamos se a amostra apresentava distribuição normal para isso utilizamos o teste de D' Agostino e Pearson. O teste utilizado foi ANOVA e pós-teste utilizado foi Tukey. Os gráficos e testes foram feitos com programa Graph Pad PRISM 5 (San Diego, California, USA). O valor de significância adotado foi alfa de 5 % ($P < 0,05$). Em casos de uma distribuição não normal, usou-se teste de Kruskal-Wallis seguindo do pós-teste de Dunns.

10. Resultados

Estudo funcional e farmacológico do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos

Através de ensaios de *patch clamp* na configuração *whole cell*, foram obtidos registros de corrente iônica após exposição ao agonista específico do TRPV1, a capsaicina. Para tal, foi utilizada a Glia de Müller de pinto, um tipo celular que reconhecidamente expressa esse receptor, para avaliar o perfil de ativação do TRPV1 após contato com o agonista. Conforme demonstrado na figura 13 presente na introdução, o TRPV1 sofre dessensibilização a partir de estímulos sucessivos com capsaicina. A figura 18 mostra os registros de correntes iônicas através de ensaios de *patch clamp* em glia de Müller e em macrófagos peritoneais de camundongos. Os macrófagos revelaram a formação de correntes iônicas, em torno de 60pA/pF, semelhantemente àquelas encontradas na literatura, assim como as encontradas na glia de Müller. O processo de dessensibilização foi semelhante em ambas as células estudadas, apresentando uma redução da amplitude das correntes iônicas em torno de 80%. Em seguida, a caracterização farmacológica se seguiu com a utilização de antagonistas do TRPV1, capsazepina e *ruthenium red*, para se verificar possível redução de corrente após exposição ao agonista. A figura 19 mostra a redução nas correntes iônicas promovida pelo pré-tratamento com os antagonistas nos dois tipos celulares de modo semelhante. A redução com os antagonistas usuais do TRPV1, em torno de 60%, mostra que esse receptor é funcional em macrófagos peritoneais e responde à ação de antagonistas de modo similar aos dados descritos na literatura (205).

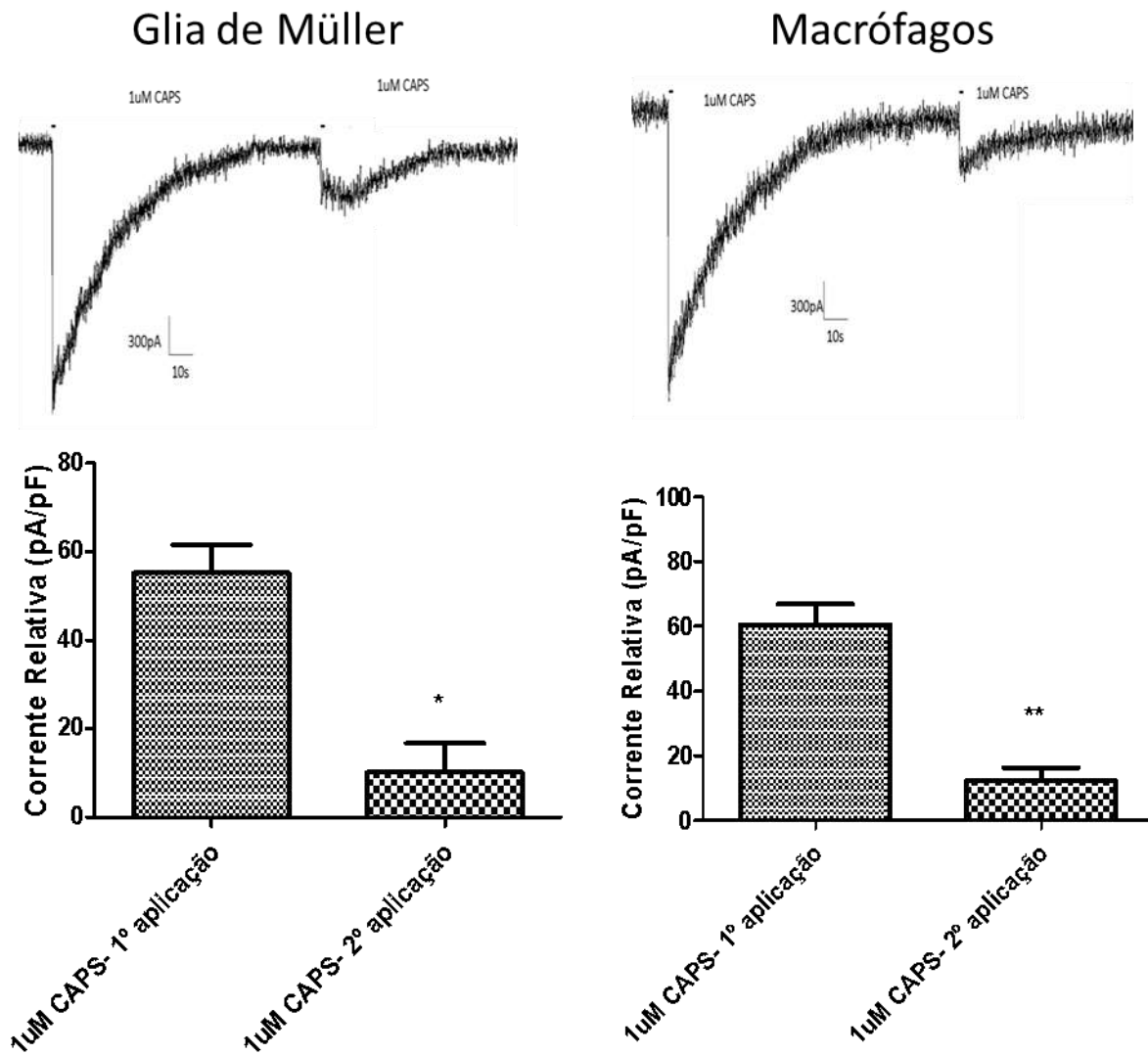


Figura 18 – Capsaicina ativa o TRPV1 promovendo corrente iônica em macrófagos peritoneais de camundongos e Glia de Müller de pinto. À esquerda, mostra-se o registro obtido a partir da exposição à capsaicina em glia de Müller e a dessensibilização após a segunda aplicação do agonista. Semelhantemente, à direita, encontram-se os registros de corrente após a exposição ao agonista e sua dessensibilização à segunda aplicação da capsaicina. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados a 37°C. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 2-3 experimentos feitos em diferentes dias. Teste t * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Glia de Müller

Macrófago

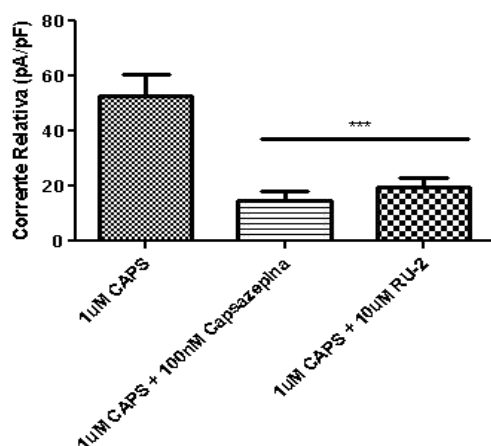
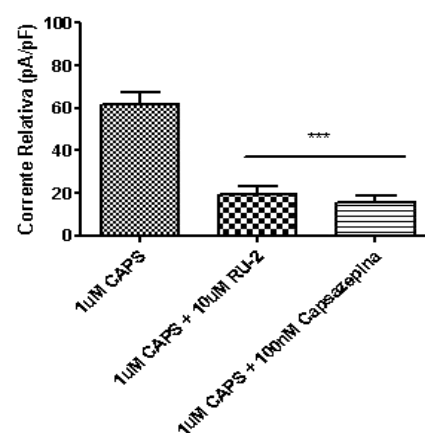
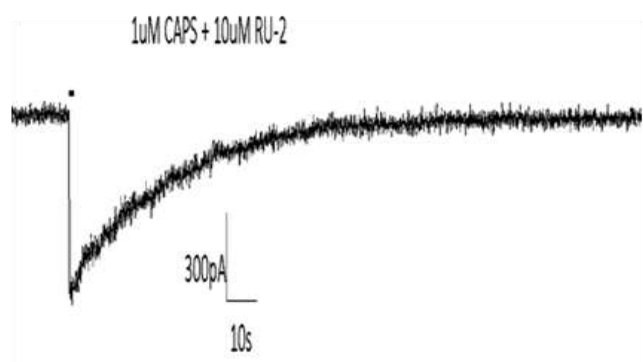
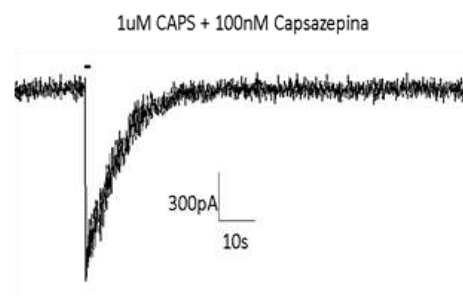
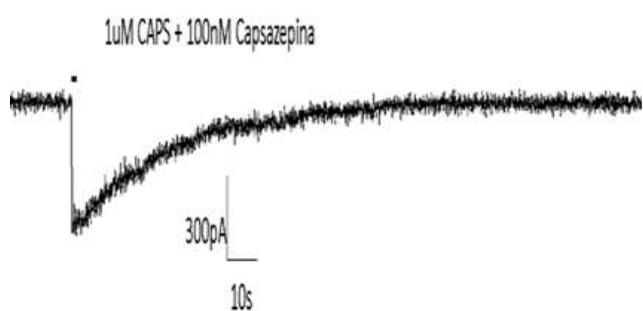


Figura 19- Ativação do TRPV1 em macrófagos é inibida por antagonistas. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em macrófagos peritoneais de camundongo e glia de Müller de pinto à 37°C. À esquerda, mostra-se o registro obtido a partir da exposição à capsaicina em glia de Müller após pré-incubação com os antagonistas capsazepina e *ruthenium red*. À direita, encontram-se os registros de corrente após a exposição ao agonista após pré-incubação com os antagonistas em macrófagos. O potencial de *holding* foi +60 mV. Os valores dos gráficos representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós teste Tukey *** $p < 0,001$.

A análise da concentração de cálcio intracelular é uma outra forma de avaliar a funcionalidade de um canal iônico. A caracterização funcional do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos se prosseguiu através da avaliação da alteração dos níveis desse íon após ativação desse receptor. A análise da funcionalidade do TRPV1 em macrófagos se fez através do monitoramento individual do nível de cálcio intracelular após sua ativação. Cabe ressaltar que o TRPV1 é permeável a cátions, sobretudo aos íons cálcio, e paralelamente, promove a alterações nos estoques intracelulares de cálcio. Assim, a figura 20 mostra o perfil dos níveis de cálcio em macrófagos peritoneais diante do estímulo com a capsaicina induziu uma rápida e transitória elevação dos níveis de cálcio intracelular, seguida de dessensibilização durante a segunda exposição ao agonista 5 minutos após a primeira aplicação. Como demonstrado na tabela 9, a distribuição dos macrófagos peritoneais quanto à responsividade ao tratamento com capsaicina não foi uniforme. Como as células não responderam da mesma forma, elas foram discriminadas quanto à sua responsividade à capsaicina. Um montante em torno de 19% das células não respondeu acima de 50% do níveis basais de cálcio, embora 81,28% das células analisadas, responderam acima daquele percentual. Vale ressaltar que há um ligeiro retorno da sensibilização após um período de 10 minutos, como mostram as figuras 20C e 20D. Além disso, foi verificado um perfil semelhante quando outro agonista do TRPV1, a resiniferatoxina (RTX). Como é mostrado na figura 21, a RTX foi capaz de desempenhar aumento de cálcio intracelular em macrófagos peritoneais de camundongos. A tabela 10 mostra a distribuição dos macrófagos peritoneais quanto à responsividade ao tratamento com capsaicina. Contudo, após a segunda exposição a esse agonista, a magnitude da dessensibilização foi menor em relação à capsaicina.

Uma vez confirmada a atividade do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos através das abordagens de eletrofisiologia e ensaios de cálcio, decidimos avaliar a capacidade do TRPV1 em formar poros na membrana plasmática de macrófagos peritoneais de camundongos.

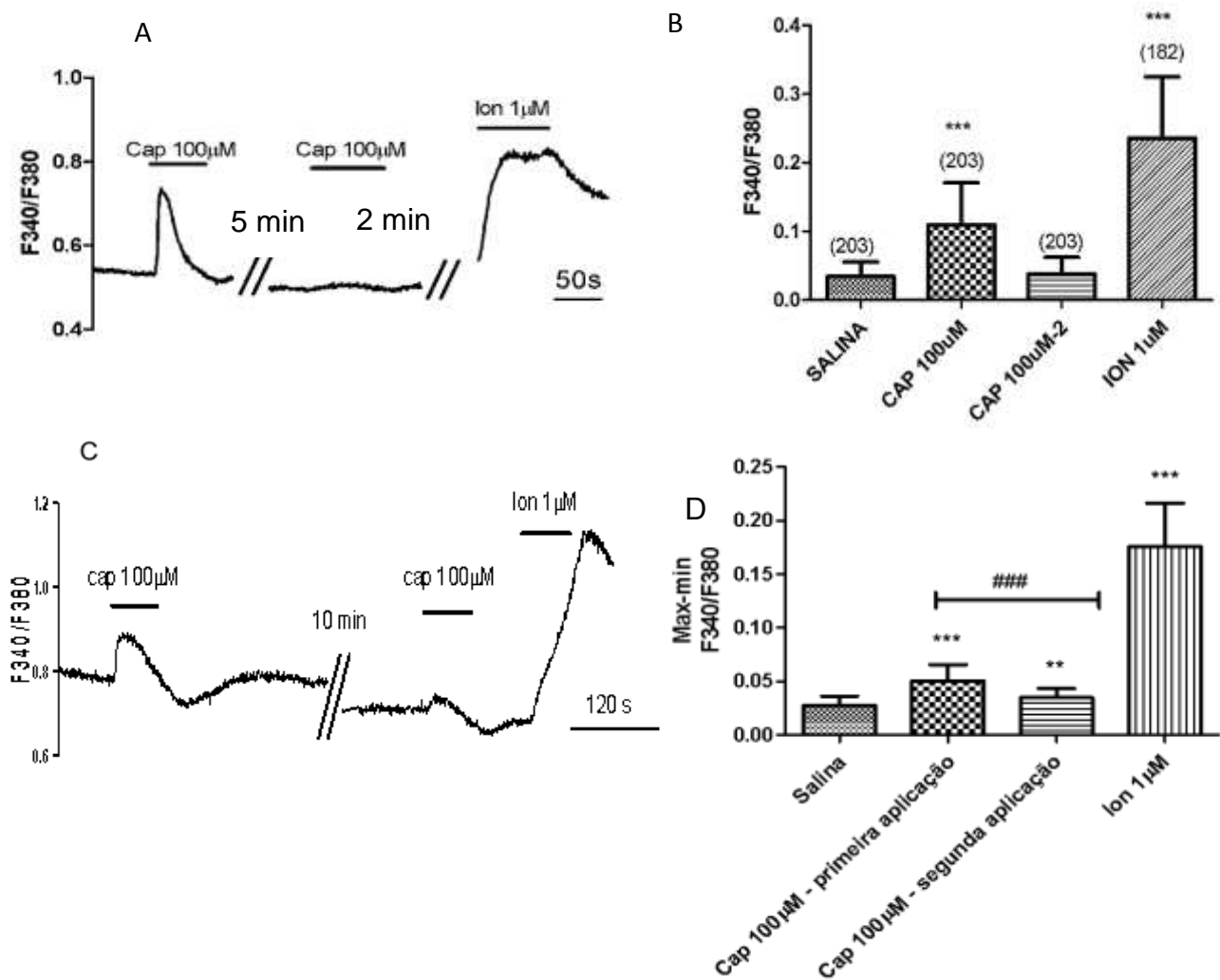


Figura 20 - TRPV1 promove aumento da concentração de cálcio intracelular. Retorno da sensibilização do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) Registro característico do aumento de cálcio intracelular após exposição à capsacina e dessensibilização a uma segunda exposição após 5 minutos. (B) Amplitudes do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. Ionomicina (Ion) usada como controle positivo. Teste de Kruskal-Wallis $P < 0,0001$, pós-teste de Dunns, *** $P < 0,0001$ em relação à solução salina. Experimentos feitos em triplicata em 3 experimentos independentes. (C) Retorno da sensibilização. (D) Amplitudes do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. Teste de Kruskal-Wallis $P < 0,0001$, pós-teste de Dunns, *** $p < 0,0001$ em relação à solução salina, ### $p < 0,0001$ para diferenças entre a primeira e segunda aplicações de capsacina. Resultados obtidos de 2 experimentos independentes.

Tabela 9 - Responsividade dos macrófagos peritoneais ao tratamento com capsaicina em macrófagos peritoneais de camundongos

<i>Valores em relação à salina</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>Até 10%</i>	20	9,85
<i>Menor que 50%</i>	18	8,87
<i>Acima de 50%</i>	165	81,28
<u>TOTAL</u>	<u>203</u>	<u>100</u>

Tabela discrimina macrófagos peritoneais de camundongos quanto a sua responsividade ao primeiro tratamento com capsaicina encontrado na figura 20. Células não responsivas não atingiram valores acima de 10% nos níveis basais (salina). Células pouco responsivas atingiram valores entre 10% e 50% dos níveis basais (salina). Células muito responsivas atingiram valores acima de 50% dos níveis basais (salina).

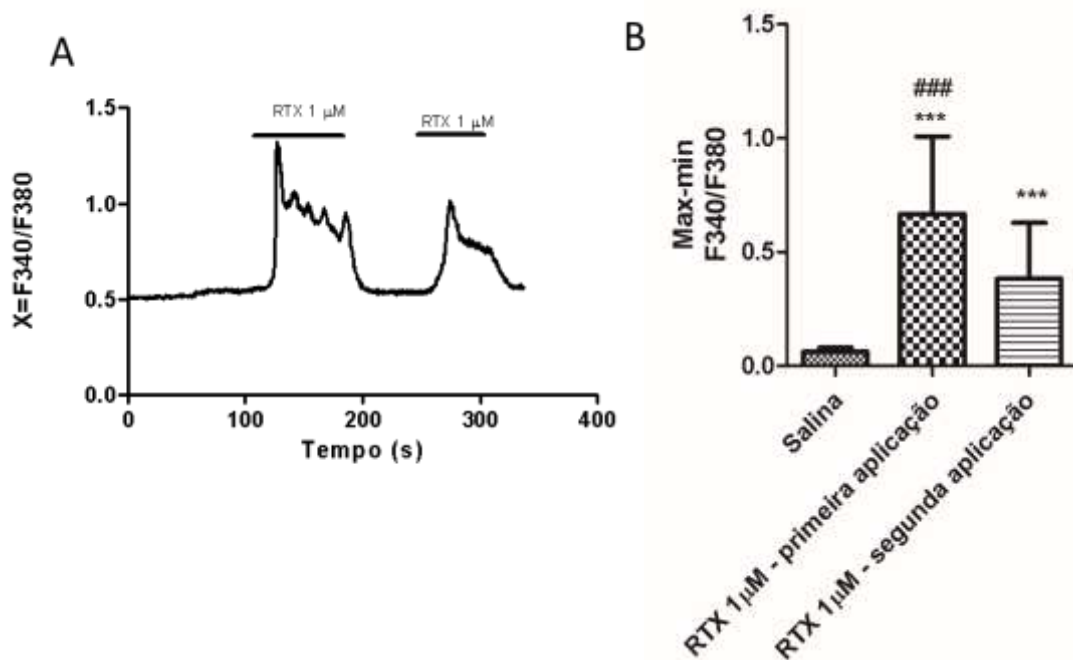


Figura 21 - Resiniferatoxina (RTX) promove aumento de dos níveis de cálcio intracelular via TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) registro característico do aumento de cálcio intracelular após exposição à RTX e dessensibilização a uma segunda exposição, em torno de 43%. (B) Efeito do aumento de cálcio intracelular após os tratamentos. ANOVA $P < 0.0001$, pós-teste de Tukey, *** $P < 0.0001$, ### $P < 0,0001$ em relação à segunda exposição à RTX. Experimentos feitos em triplicata.

Tabela 10 - Responsividade dos macrófagos peritoneais ao tratamento com resiniferatoxina em macrófagos peritoneais de camundongos

<i>Valores em relação à salina</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>Até 10%</i>	2	6,06
<i>Acima de 50%</i>	31	93,94
	33	100

Tabela discrimina células quanto a sua responsividade ao primeiro tratamento com RTX, encontrado na figura 21. Células não responsivas não atingiram valores acima de 10% nos níveis basais (salina). Células pouco responsivas atingiram valores entre 10% e 50% dos níveis basais (salina). Células muito responsivas atingiram valores acima de 50% dos níveis basais (salina).

A ativação do TRPV1 promove a abertura de um poro em macrófagos peritoneais de camundongos

A propriedade do TRPV1 em permitir a entrada de moléculas de peso molecular em torno de 900 Da foi recentemente demonstrada por Chung e colaboradores em 2008 (240). Dessa forma, as informações acerca do poro do TRPV1 até agora descritas são escassas devido ao número reduzido de artigos científicos. Assim sendo, após a avaliação funcional do canal iônico aberto pelo TRPV1 em macrófagos peritoneais, uma vez que o objetivo é verificar a possível interação entre os poros associados pelos receptores P2X7R e TRPV1, é necessário verificar se este é capaz de formar nesse tipo celular. Nesse sentido, esse fenômeno será apresentado a seguir através das técnicas de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e microfluorimetria em leitor de placa. Como mostram imagens representativas na figura 22, após exposição à capsaicina, macrófagos foram permeabilizados permitindo a passagem do corante catiônico brometo de etídeo (394,29 Da) ao interior celular.

Para quantificar esse fenômeno, foi utilizada a citometria de fluxo, uma vez que essa técnica permite quantificação mais precisa em relação à microscopia. Para os ensaios de citometria, as células foram utilizadas logo após a sua extração da cavidade peritoneal de camundongos e para isso, foram realizadas duas abordagens para avaliar as características dos macrófagos. Em um primeiro momento, a suspensão de células extraídas da cavidade peritoneal de camundongos (chamadas de *pool*) foram analisadas. Ajustando a região que compreende os macrófagos peritoneais presente no lavado, a capsaicina promoveu e chegou ao valor de EC_{50} de 42,78 μ M. Contudo, há outras células provenientes da cavidade peritoneal presentes no *pool* analisado, como linfócitos B (260). Assim, a fim de saber o percentual de macrófagos dessa região analisada, foi feita uma marcação específica para esse tipo celular com o anticorpo F4/80. Nesse sentido, macrófagos peritoneais representam cerca de 30% do *pool* de células extraídas da cavidade peritoneal e 80% das células contidas na região avaliada são macrófagos. Dessa forma, após a exposição à capsaicina, os macrófagos F4/80⁺ mostraram a captação do

corante, apresentando EC_{50} de 51,06 μ M. Assim, as evidências de que o poro formado do TRPV1 em macrófagos após exposição à capsaicina se tornam mais claras, embora se faça necessário avaliar um outro modelo que expresse endogenamente o TRPV1 e forme poro. Além disso, outra forma utilizada para avaliar a formação do poro do TRPV1 foi a microfluorimetria. Nesse ensaio, observou-se um comportamento semelhante ao encontrado na citometria de fluxo, com valores de EC_{50} 65,43 μ M, como mostrado na figura 22E. Por sua vez, o antagonista do TRPV1, *ruthenium red*, foi capaz de inibir a captação de corante de corante após exposição à capsaicina, de forma concentração dependente, a exposição à concentração de 100 μ M sofreu redução de 78,49%, como mostra a figura 23.

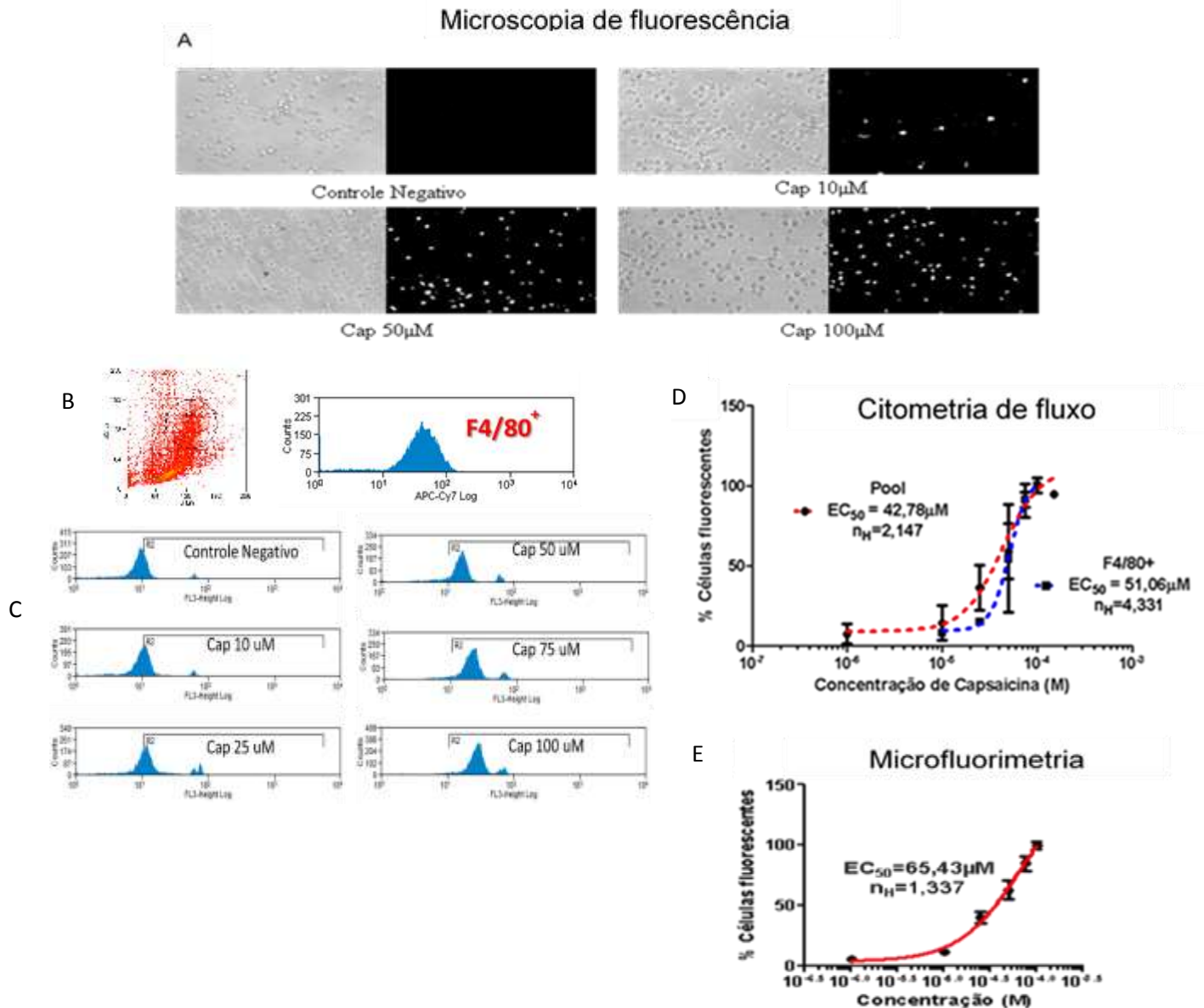


Figura 22- TRPV1 promove captação de brometo de etídeo ao interior celular de macrófagos. Captação foi proporcional ao aumento do agonista. (A) Fotos representativas de macrófagos promovendo a captação de brometo de etídeo. (B) Região de macrófagos F4/80⁺ analisada referente à curva em azul em (D). (C) Histogramas representativos referentes à curva em vermelho em (D). (D) Valores obtidos partir da citometria fluxo (BD FACS Calibur). Em vermelho, encontram-se as curvas dos valores de captação provenientes da região característica de macrófagos, ao passo que, em azul, está a curva de valores obtidos de células F4/80⁺. Valores de EC₅₀ de 42,78 µM e de 51,06 µM para o *pool* e células F4/80⁺. Experimentos feitos em triplicata em 2-3 dias distintos. (E) Curva concentração-resposta obtida a partir de microfluorimetria (EC₅₀=65,43µM). Experimentos feitos em triplicata em 3 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.

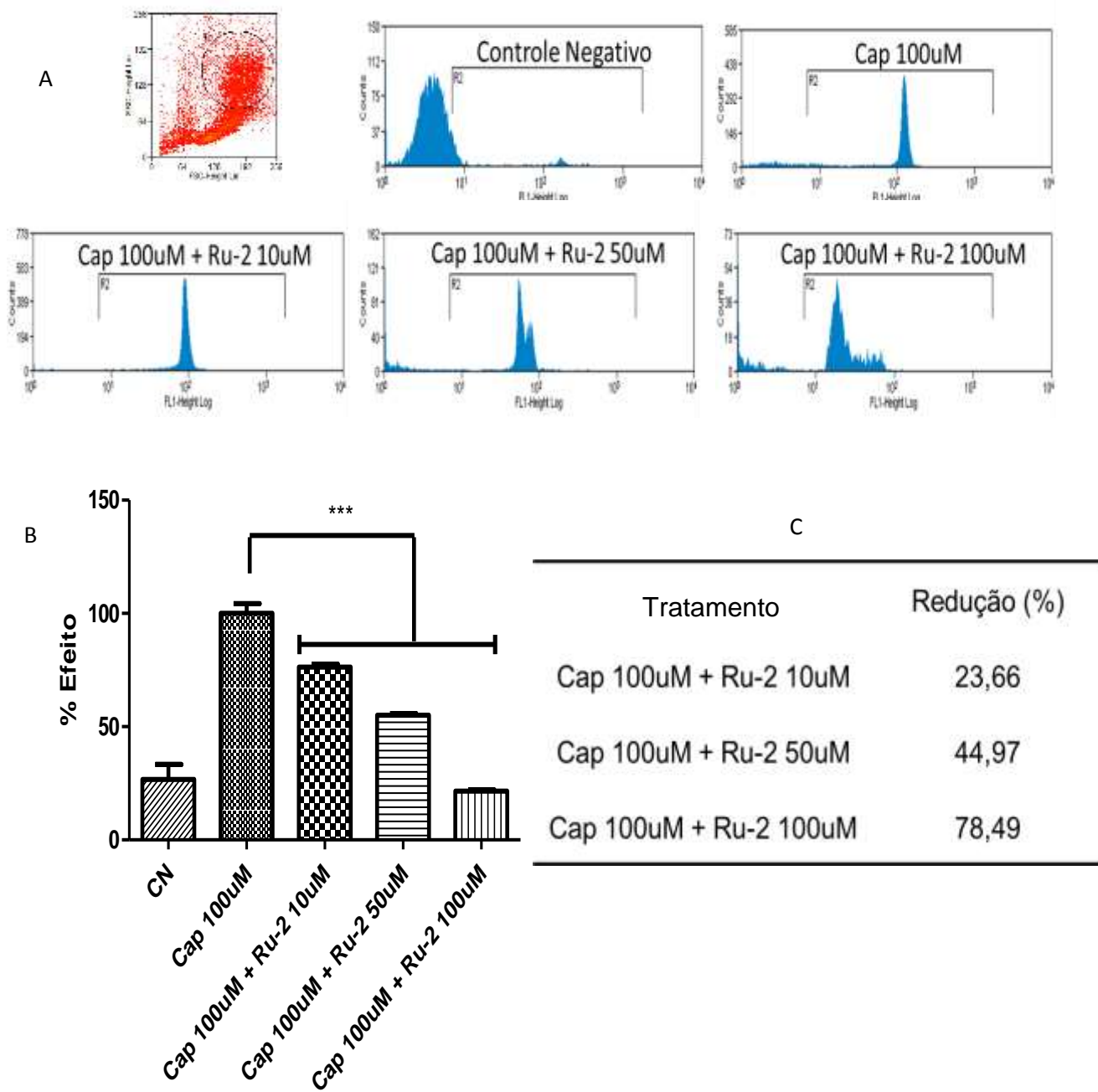


Figura 23 - *Ruthenium red* inibe captação de corante após exposição à capsaicina em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) Histogramas representativos da captação de corante após o tratamento com capsaicina em relação à região de macrófagos analisada em destaque. (B) O antagonista do TRPV1 inibiu a captação de YOPRO-1 (629 Da) induzida pela capsaicina a 100uM. Ru-2 100uM promoveu em torno de 78% de redução na captação. (C) Tabela resume os resultados apresentados através dos experimentos em citometria. Experimentos feitos em citometria de fluxo (BD FACS Calibur), em triplicata em 3 dias distintos. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey (***) $p < 0,0001$.

A linhagem GL 261 (astrocitoma) e glia de Müller (figura 33, discutida à frente) são tipos celulares que expressam endogenamente o TRPV1 e P2X7. Elas foram utilizadas como controle positivo da avaliação da formação do poro de ambos TRPV1 e P2X7R em macrófagos murinos. De acordo com a figura 24, o TRPV1 foi capaz de promover a captação de brometo de etídeo em GL 261, exibindo um valor de EC_{50} de 20,67 μ M de ativação pela capsacina. É possível que esse valor mais baixo encontrado no glioma derivado de astrócitos, pois é uma célula que reconhecidamente expressa fortemente o TRPV1, uma vez que faz parte do sistema nervoso. Quanto às fotos provenientes da microscopia, é possível observar uma maior quantidade de células astrocitoma por campo, o que favorece uma interpretação de maior captação de corante. Portanto, a formação de um poro após a ativação do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos foi demonstrada, a qual segue uma tendência de concentração dependente, assim como encontrado nos outros tipo celulares utilizados como controle.

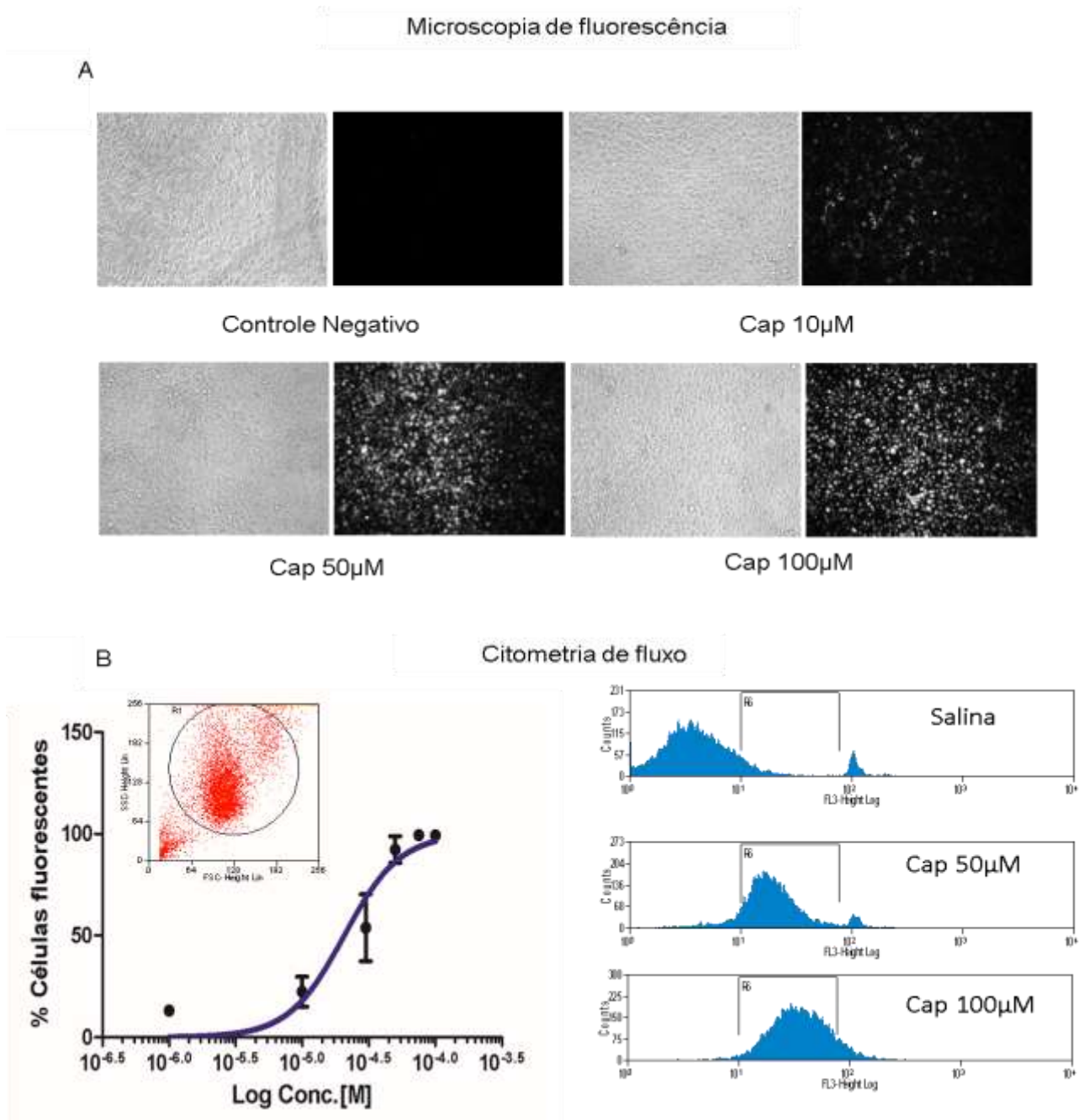


Figura 24- TRPV1 promove captação de brometo de etídeo ao interior celular de astrocitoma GL 261. Captação foi proporcional ao aumento do agonista. (A) Fotos representativas de GL 261 promovendo a captação de brometo de etídeo. (B) Valores obtidos partir da citometria fluxo (BD FACS Calibur). Valor de EC_{50} de 20,67 μ M em relação à região destacada no *dot plot*. À direita, histogramas representativos da captação de corante. Experimentos feitos em triplicata em 3 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.

Captação de corante por TRPV1 é cátion seletiva em macrófagos peritoneais de camundongos

Contudo, a avaliação da seletividade por cargas das moléculas que passariam pelo poro do TRPV1 se fez necessária. Este é um ponto muito importante no estudo do poro associado ao receptor P2X7, a seletividade de cargas das moléculas que por ele permeiam. Diversos trabalhos divergem quanto à “não seletividade” do poro do P2X7R, dependendo do tipo celular, não haveria preferência quanto à passagem de ânions ou cátions. Já no caso do poro do TRPV1 em macrófagos, demonstramos pela primeira vez a caracterização funcional e farmacológica do TRPV1 nesse tipo celular. Por isso, foi necessário avaliar se o poro do TRPV1 em macrófagos apresentaria seletividade iônica ou não. Os ensaios apresentados nesse trabalho mostram evidências que vão ao encontro dos dados já disponíveis na literatura: o poro do TRPV1 é seletivamente catiônico. Mesmo assim, o corante aniônico fluoresceína, cujo peso é de 332 Da, comparável ao brometo de etídeo em peso, foi utilizado para avaliar se ele seria permeável ao TRPV1. É importante ressaltar que não há na literatura dados que mostrem o uso de corantes aniônicos para o estudo do poro do TRPV1. Conforme a figura 25, o poro ativado pelo TRPV1 não promoveu a captação de fluoresceína ao interior da célula, mesmo em concentrações de 100 μ M de capsaicina, corroborando com os dados na literatura quanto à seletividade iônica do poro do TRPV1. Mesmo assim, isso não inviabiliza uma possível correlação entre os poro estudos, uma vez que o poro associado ao P2X7R mostra-se não seletivo, catiônico ou aniônico. Ou seja, há uma clara dependência quanto ao tipo celular, o tamanho do corante e sua carga, as condições iônicas e a dependência ou não de segundos mensageiros, como o cálcio intracelular.

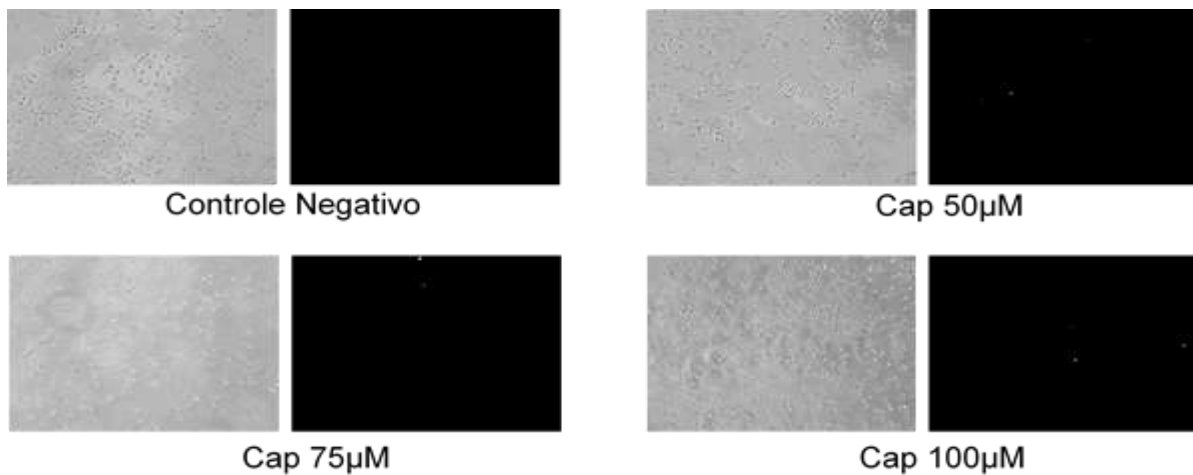


Figura 25- TRPV1 não promove captação de fluoresceína ao interior celular de macrófagos peritoneais de camundongos. A ativação do TRPV1 via capsaicina não foi eficaz para a captação do corante aniônico fluoresceína. Experimentos feitos em triplicata em 2 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.

Inibição cruzada entre os receptores P2X7 e TRPV1

Por conseguinte, os próximos passos tomados foram buscar respostas ao objetivo central dessa dissertação: possível correlação entre os poros associados aos receptores P2X7R e TRPV1. Para tal, foi avaliada a influência dos antagonistas do TRPV1 sobre o poro associado ao P2X7R e vice-versa em glia de Müller e em macrófagos peritoneais de camundongos, um dos modelos clássicos para o estudo desse fenômeno. Ao considerar o poro associado ao receptor P2X7, uma molécula distinta do canal iônico formado por esse receptor, foram realizados ensaios que os avaliem separadamente. Nesse sentido, para se estudar o canal iônico foram utilizados os ensaios de cálcio e a eletrofisiologia. A eletrofisiologia é o mais importante método para se avaliar a funcionalidade e os parâmetros biofísicos de um canal iônico. Conforme a figura 26, os antagonistas do TRPV1, *ruthenium red* (Ru-2) e capsazepina foram capazes de inibir as corrente produzidas por ATP em glia de Müller de pinto, como mostrado, semelhantemente, na figura 27.

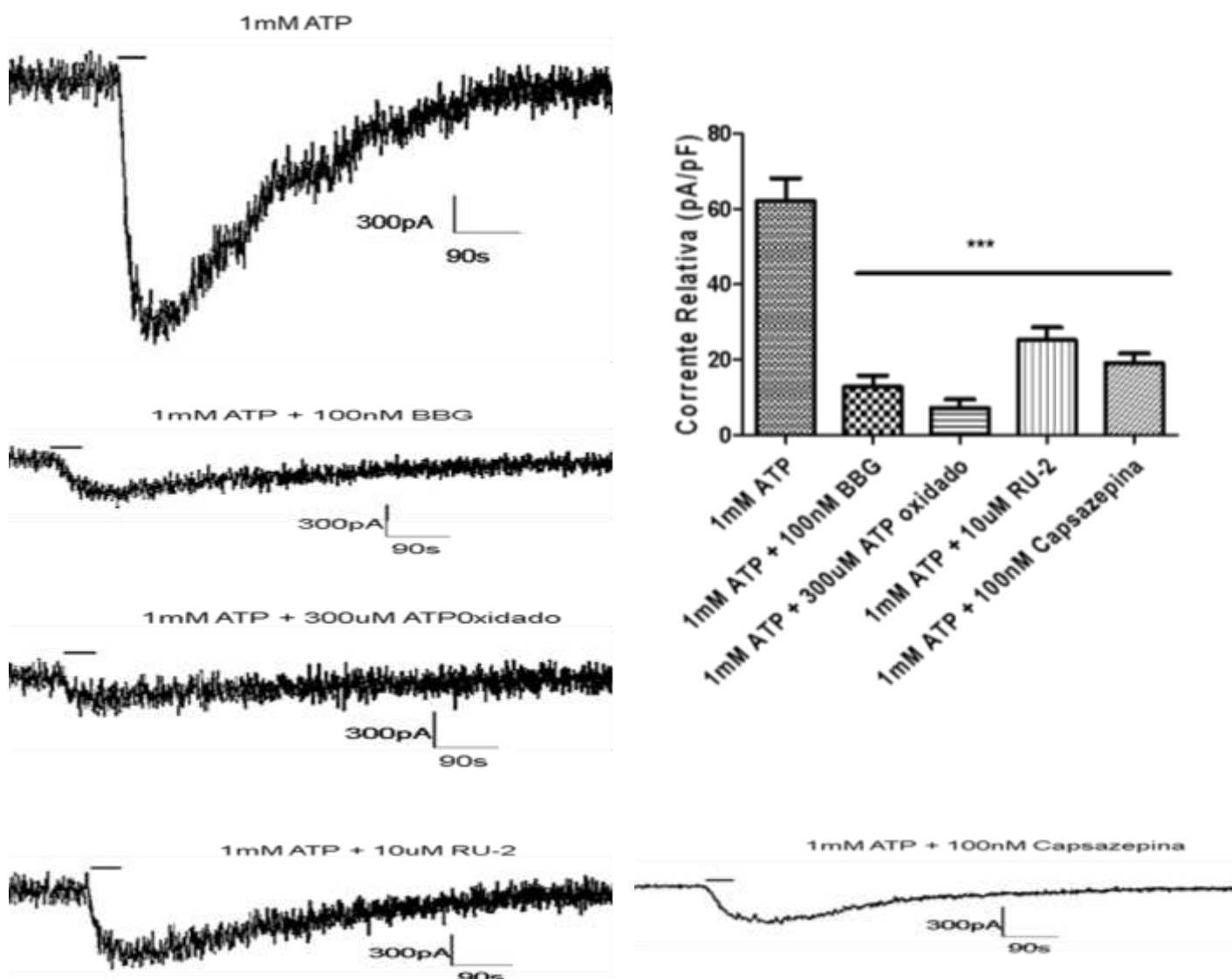


Figura 26 - Inibição cruzada entre o P2X7R e antagonistas do TRPV1 em glia de Müller. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. À esquerda, encontram-se os registros de corrente provocados por ATP na presença ou ausência de antagonistas. Os antagonistas do P2X7R, BBG (100 nM) e ATP oxidado (300 μ M) inibiram a amplitude de corrente promovida pelo ATP. Os dois antagonistas do TRPV1, Ru-2 (10 μ M) e capsazepina (100 nM), inibiram as correntes induzidas pelo ATP. À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$.

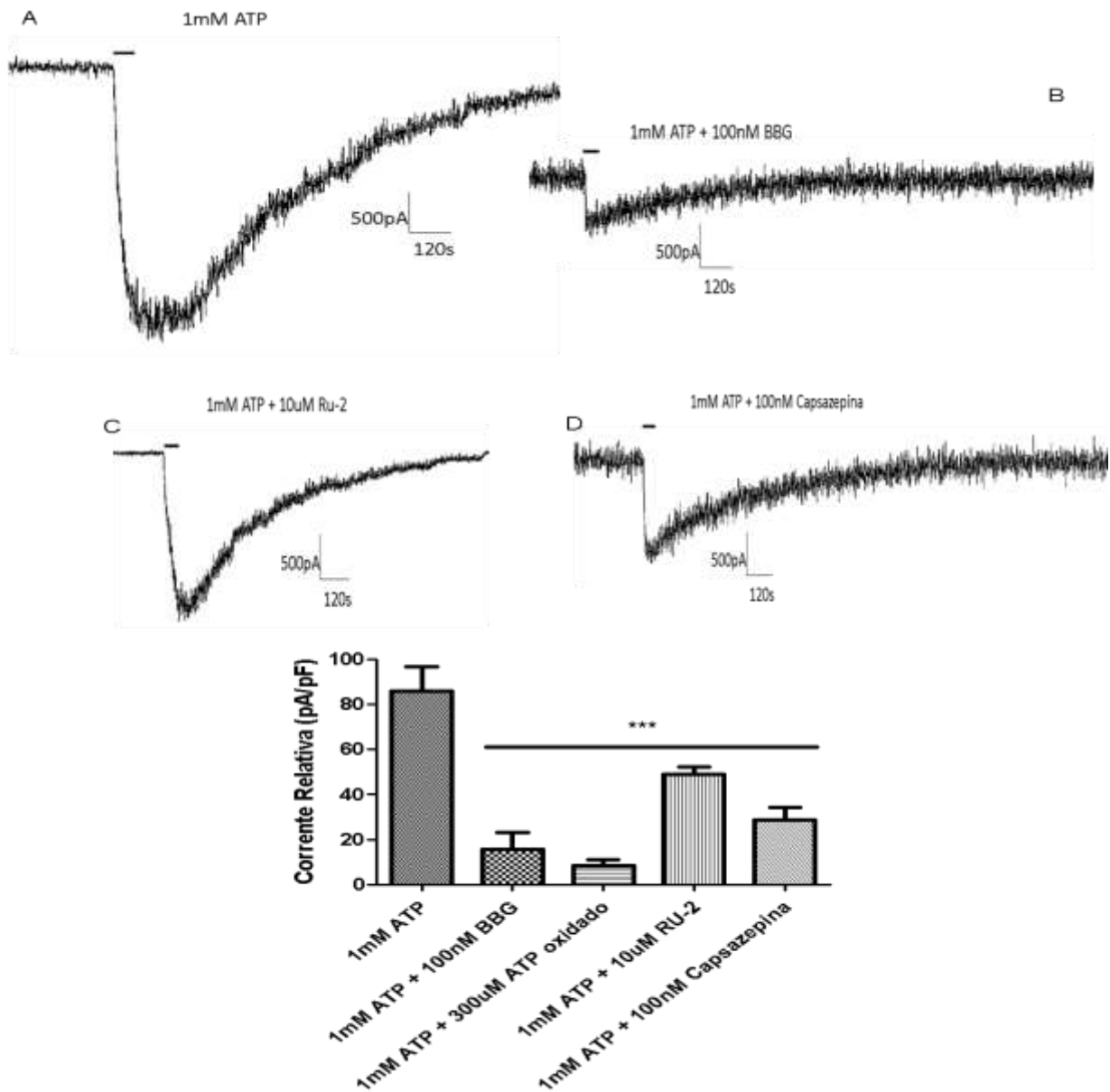


Figura 27 - Inibição cruzada entre P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. (A) Corrente induzida pelo ATP 1mM que foi inibida pelo (B) antagonista do P2X7R, BBG, e pelos antagonistas do TRPV1, (C) Ru-2 e (D) capsazepina. Abaixo, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$.

Em contrapartida, registros de eletrofisiologia mostram que antagonistas do P2X7R também se mostraram eficazes em inibir as correntes iônicas promovidas em glia de Müller (figura 28) e macrófagos peritoneais (figura 29).

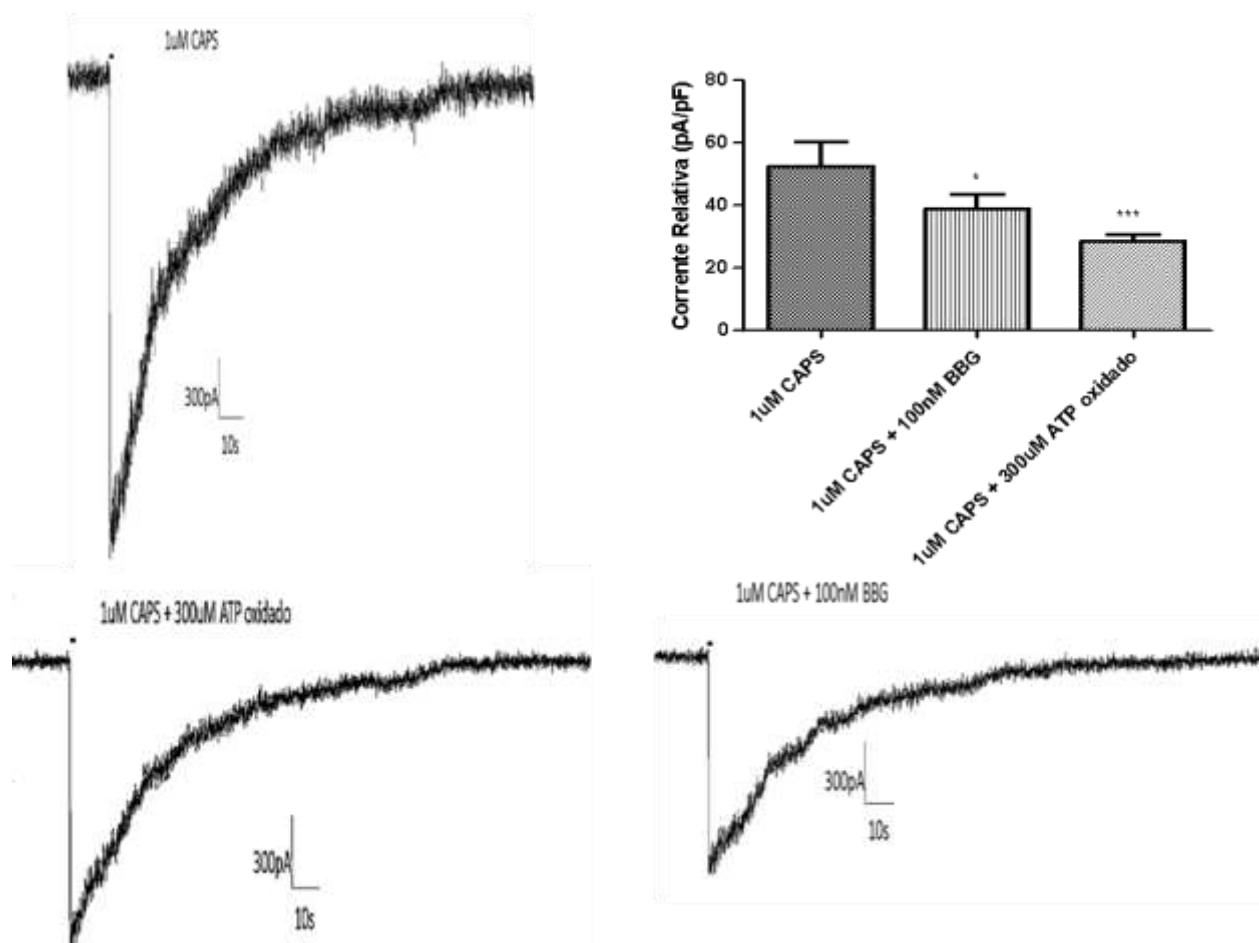


Figura 28 - Inibição cruzada entre os antagonistas do P2X7R e TRPV1 em glia de Müller. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. Corrente induzida por capsaicina (CAPS) que foi inibida pelos antagonistas do P2X7R, BBG (100nM) e ATP oxidado (300 uM). À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0001$).

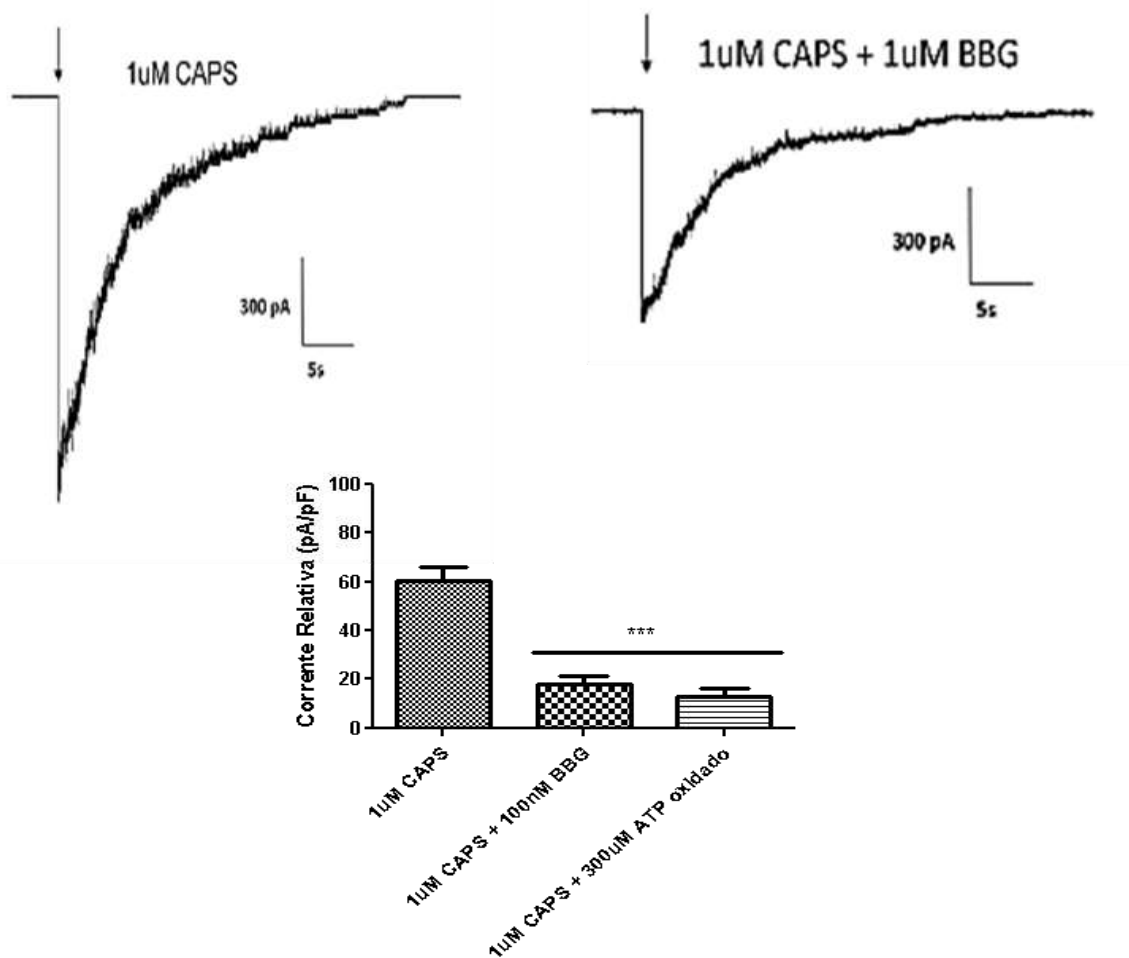


Figura 29 - Inibição cruzada entre os antagonistas do P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais. Os experimentos na configuração *whole cell* foram realizados em glia de Müller de camundongo a 37°C. Corrente induzida por capsaicina que foi inibida pelos antagonistas do P2X7R, BBG (100 nM) e ATP oxidado (300 uM). À direita, mostra-se o gráfico de barras com os valores de corrente relativa de inibição cruzada. O potencial de *holding* foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média \pm desvio padrão de 2-3 experimentos independentes. ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$.

Por outro lado, uma vez que o canal do P2X7R é permeável a íons cálcio, em ensaios para avaliar os níveis intracelulares desse cátion, verificou-se que o *ruthenium red* inibiu do aumento de íons cálcio promovido pelo ATP. Dessa forma, seguindo à etapa de análise dos níveis de cálcio intracelular, foi possível observar comportamentos semelhantes ao padrão apresentado pela técnica de *patch clamp*. O Imageamento de cálcio permite avaliar individualmente o aumento das concentrações desse íon no interior da célula em campo escolhido para análise em microscópio. Nesse sentido, é possível observar inibição parcial da elevação do cálcio intracelular após exposição a 2mM de ATP em células pré-tratadas por 2 minutos com o antagonista do TRPV1, RU-2 (figura 30 A). Além disso, uma vez que essa concentração ATP foi capaz de ativar todos os receptores ionotrópicos purinérgicos presentes em macrófagos, o BzATP foi utilizado devido à sua maior afinidade pelo P2X7R em relação aos outros. Este composto é comumente utilizado com intuito de verificar a participação do P2X7R em detrimento dos outros receptores. Dessa forma, em pré-tratamentos de 10 minutos com Ru-2 foi capaz de inibir completamente o aumento de cálcio intracelular em exposição ao BzATP. O composto capsazepina é o protótipo de antagonista do TRPV1. Sua estrutura se deriva da estrutura molecular da capsaicina, liga-se ao mesmo sítio de ligação da capsaicina e exibe comportamento antagonista competitivo em relação aos tratamentos com capsaicina. Portanto, foi uma surpresa verificar que o Ru-2 também bloqueou o estímulo à elevação do cálcio intracelular ao expor os macrófagos ao BzATP como podemos verificar na figura 30 D e 30 E.

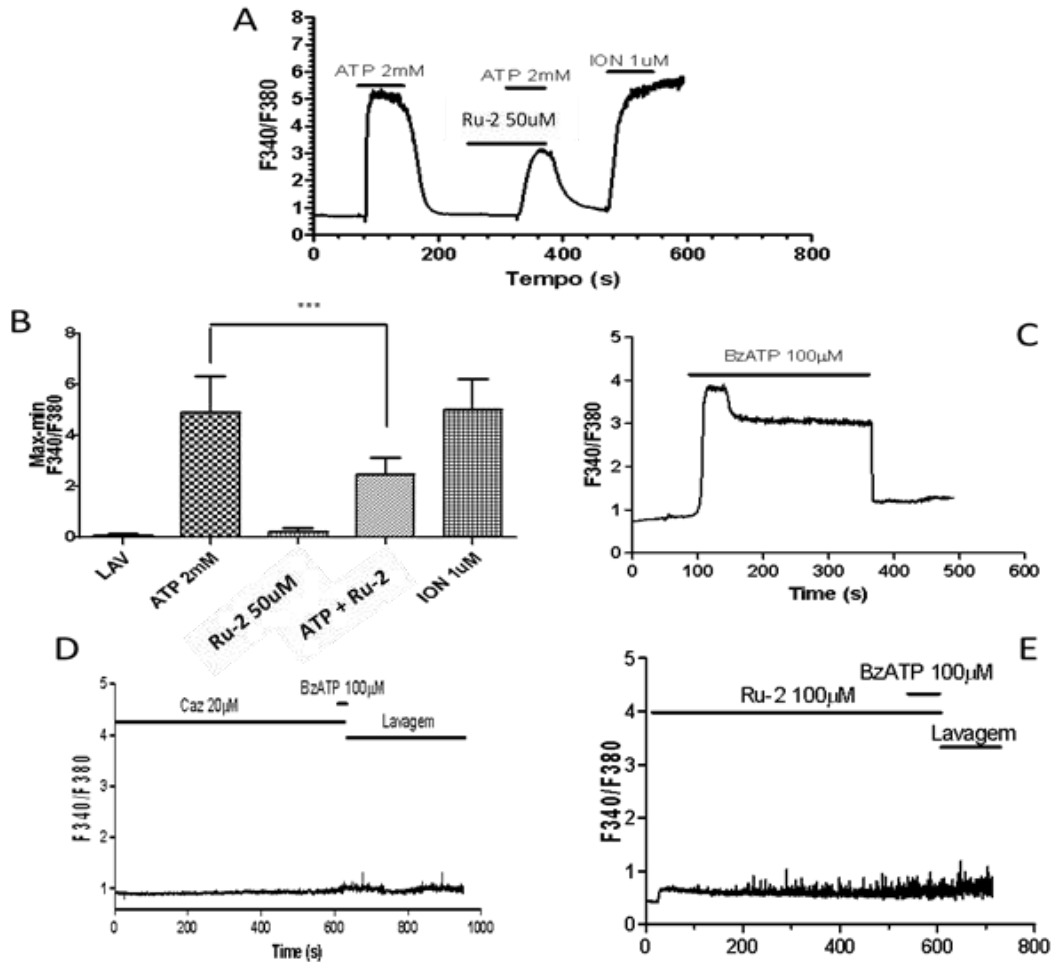


Figura 30 - Inibição cruzada entre o P2X7R e antagonistas do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Imageamento de cálcio mostra em (A) o registro representativo do campo analisado ao microscópio. Após exposição ao ATP, os macrófagos foram incubados com Ru-2, que foi suficiente para inibir os efeitos de uma nova exposição ao ATP. (B) Gráfico em barra representa a amplitude do sinal (ponto máximo subtraído de ponto mínimo) do gráfico (A). N=63 células totais em 3 experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis $P < 0,0001$, pós-teste de Dunns, *** $P < 0,0001$ em relação ao tratamento com ATP. (C) Tratamento com agonista seletivo do P2X7R BzATP (N=20 células em 1 dia de experimento), que foi inibido tanto pelo antagonista competitivo do TRPV1 capsazepina (D). N=29 células em 1 dia de experimento, como pelo Ru-2. N=23 células em 1 dia de experimento.

Permeabilização em macrófagos – Inibição cruzada

Nossos resultados mostraram que existe inibição cruzada entre os antagonistas do TRPV1 e o canal iônico formado pelo P2X7R, e vice-versa. Logo, restou avaliar se os poros formados por esses dois receptores também sofreriam esse tipo de inibição cruzada. Assim, os antagonistas do TRPV1, Ru-2 e capsazepina, inibiram a captação de corante em macrófagos após ativação por ATP, como mostra a figura 31.

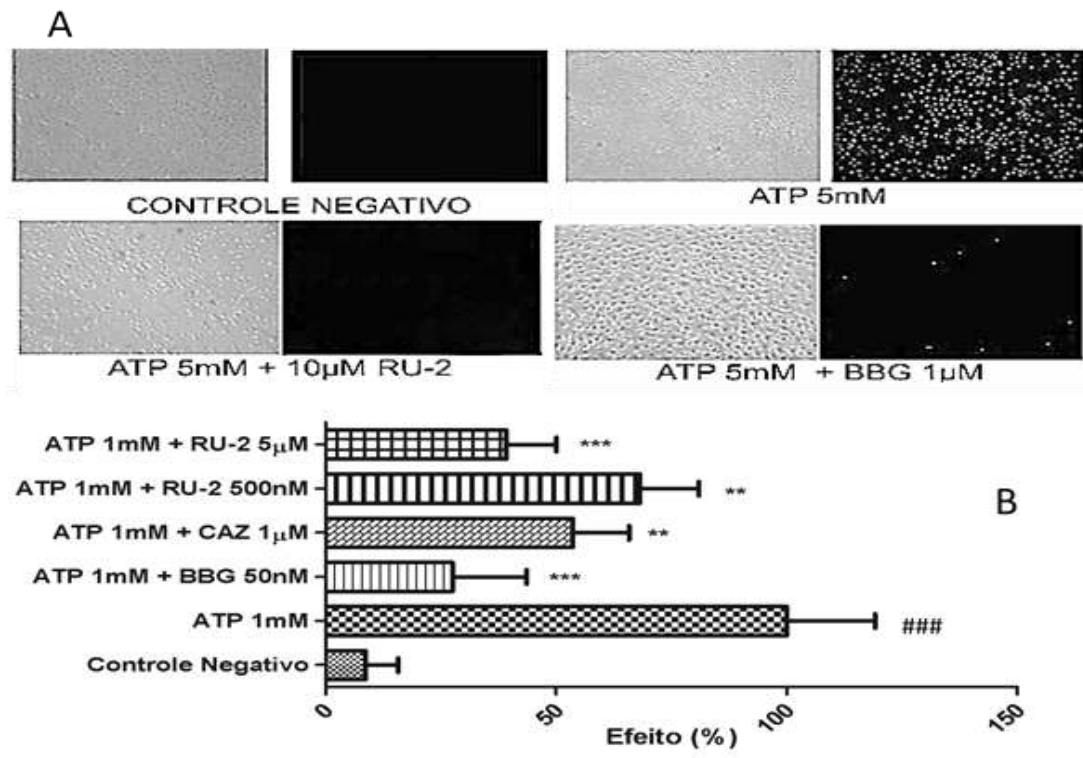


Figura 31- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação dos P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. (A) *Ruthenium red* (RU-2) foi capaz de promover a inibição do poro associado ao receptor P2X7 após ativação com adenosina trifosfato (ATP) 5mM. (B) Gráfico de barras mostra a inibição do poro associado ao receptor P2X7 em células pré-tratadas por capsazepina (CAZ) e RU-2. N=4 experimentos em dias distintos. ANOVA $P < 0,05$, pós-teste ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,0001$) em relação com tratamento m ATP 1mM e ### ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo.

Por outro lado, o poro do TRPV1 em macrófagos peritoneais foi inibido pelo antagonista do P2X7R, BBG, como mostra a figura 32. Além disso, a participação de hemicanais panexina-1 e conexinas na formação dos poros do TRPV1 e P2X7R foi descartada em macrófagos peritoneais de camundongos, através de tratamentos com RNA de interferência para panexina-1 e do uso dos bloqueadores probenecida e carbenoxolona. Como visto na figura 32, esses compostos não foram capazes de inibir a formação do poro do TRPV1. Além disso, já foi mostrado recentemente que bloqueadores de hemicanais formadores de poros não afetaram as correntes e a captação induzida pelo P2X7R (186).

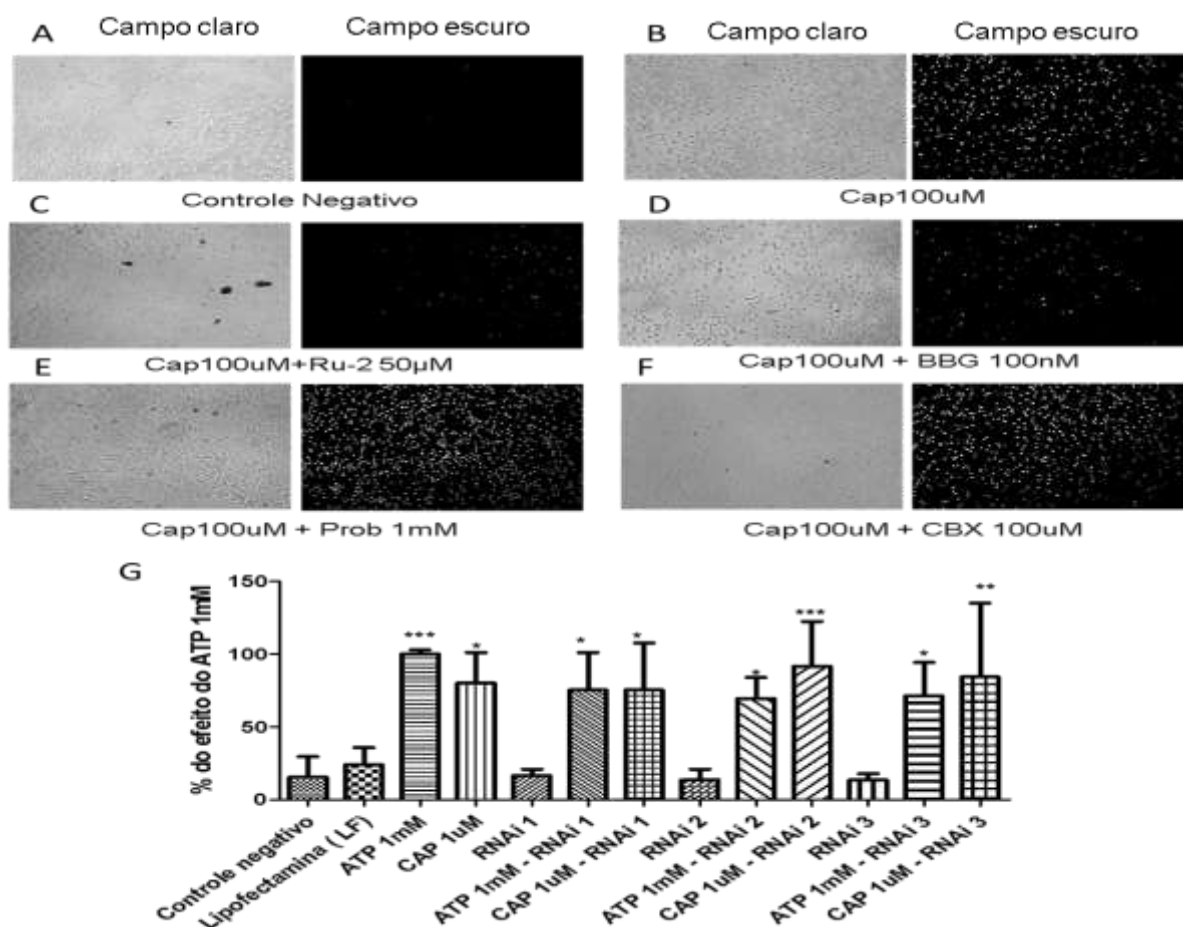


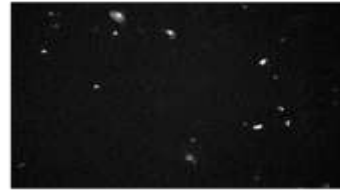
Figura 32- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Sem a participação de Hemicanais formadores de poros. Tratamentos com BBG reduziu a formação do poro associado ao receptor TRPV1, enquanto os bloqueadores gerais de hemicanais não. Tratamento com RNA de interferência para panexina-1 não inibiu a formação dos poros do TRPV1 e P2X7. Experimentos realizados em triplicata e em 3 dias independentes. ANOVA $P < 0,05$, pós-teste tukey * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,0001$) em relação controle negativo.

Mesmo assim, fez-se necessário a utilização de um controle positivo para a captação de corante com o objetivo de verificar se os resultados encontrados em macrófagos seriam observado também. Dessa forma, culturas com células de Müller, que reconhecidamente expressam os dois receptores foram utilizadas como mostra a figura 33. Nesse caso, a captação de corante foi observada que após exposição ao ATP e à capsaicina, foi inibida em tratamentos com os antagonistas utilizados. Ou seja, não somente em macrófagos, mas em culturas de glia de Müller mostraram que os receptores estudados participam de mecanismos em comum na formação de um poro na membrana plasmática.

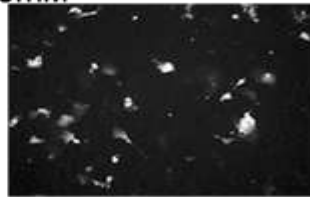
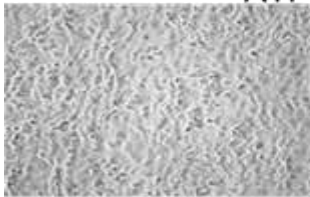
Campo claro

Campo escuro

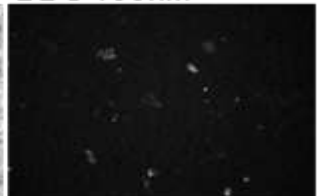
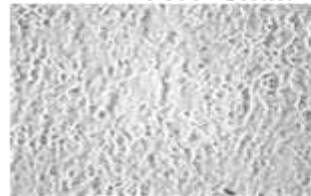
Controle Negativo



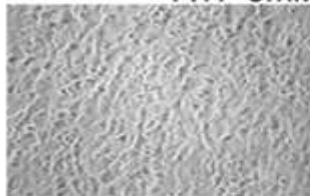
ATP 5mM



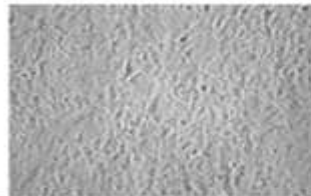
ATP 5mM + BBG 100nM



ATP 5mM + Ru-210µM



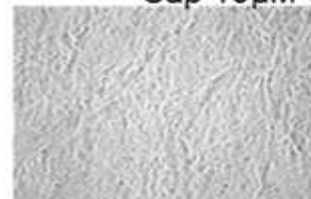
ATP 5mM + CPZ 10µM



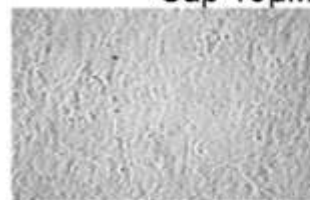
Cap 10µM



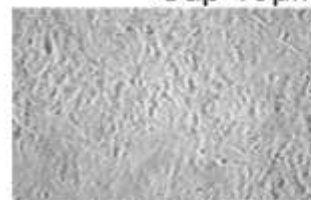
Cap 10µM + CPZ 10µM



Cap 10µM + Ru-210µM



Cap 10µM + BBG 100nM



Permeabilização em glia – inibição cruzada

Figura 33- Inibição cruzada entre os poros formados a partir da ativação dos receptores P2X7R e TRPV1. Tratamentos com *ruthenium red* e capsazepina reduziram a formação do poro associado ao receptor P2X7R. BBG inibiu a captação de corante após tratamento com capsaicina. Antagonistas do TRPV1: RR (*ruthenium red*), CPZ (capsazepina). Antagonista do P2X7R: BBG (*brilliant blue G*). Experimentos realizados em triplicata e em 3 dias independentes. Imagens obtidas em microscópio invertido Nikon (Eclipse TS2000) em objetiva de 20X.

Avaliação citolítica do poro aberto pelo TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos

Alguns trabalhos mostram que o poro associado ao receptor P2X7 poderia desencadear um programa de morte celular, por a apoptose. Há evidências de que esse poro também leva a célula à morte celular semelhante à necrose, chamando-o de poro citolítico. Além disso, os corantes fluorescentes utilizados no estudo de formação de poro são utilizados para avaliar danos à membrana plasmática como em casos de necrose. Através da verificação dos níveis de lactato de-hidrogenase, é possível avaliar se a marcação ocorrida pela captação de brometo de etídeo em macrófagos após a exposição à capsaicina é decorrente de lesões na membrana plasmática, indicando uma baixa viabilidade celular. Assim, a figura 36 mostra que o tratamento usual utilizado para a abertura do TRPV1 não citolítico mesmo em exposições prolongadas à capsaicina. Portanto, as marcações obtidas através dos corantes utilizados ao longo do trabalho não são provenientes de morte celular necrótica, ou seja, por ruptura de membrana plasmática.

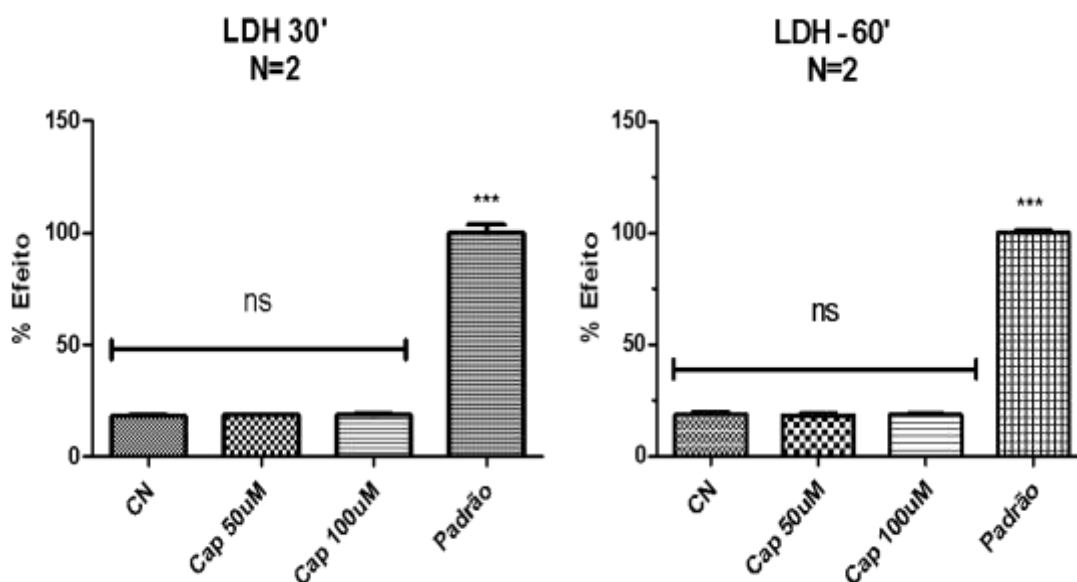


Figura 34 - Poro do TRPV1 não promove ruptura da membrana plasmática em macrófagos peritoneais de camundongos. Sob as mesmas condições de tratamento para abertura de poro, as células foram expostas à capsaicina (Cap) por 30 e 60 minutos. Experimentos realizados em duplicata e em 2 dias independentes ANOVA $p < 0,05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0,0001$ em relação ao padrão do fabricante e o controle negativo (CN), “ns” (não significativo).

Liberação de citocinas após ativação do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos

Alguns trabalhos presentes na literatura apontam a relação entre a ativação do TRPV1 e a liberação de citocinas importantes como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) em células epiteliais (261–263). Como mostrado na figura 35, o resultado apresentado está de acordo com a literatura e mostra a liberação de tanto citocinas relacionadas a eventos pró-inflamatórios (IL-6 e TNF- α) quanto anti-inflamatórios (IL-10). Os resultados apresentados também mostram que há uma tendência à liberação de TNF- α , assim como é possível observar uma tendência de inibição promovida pelo ATP oxidado (antagonista irreversível do P2X7R) ao tratamento com capsaicina. Portanto, nossos resultados apontam que o TRPV1 são capazes de promover a liberação de citocinas em macrófagos peritoneais, sendo esta liberação, também, passível de antagonismo cruzado com os antagonistas do P2X7R.

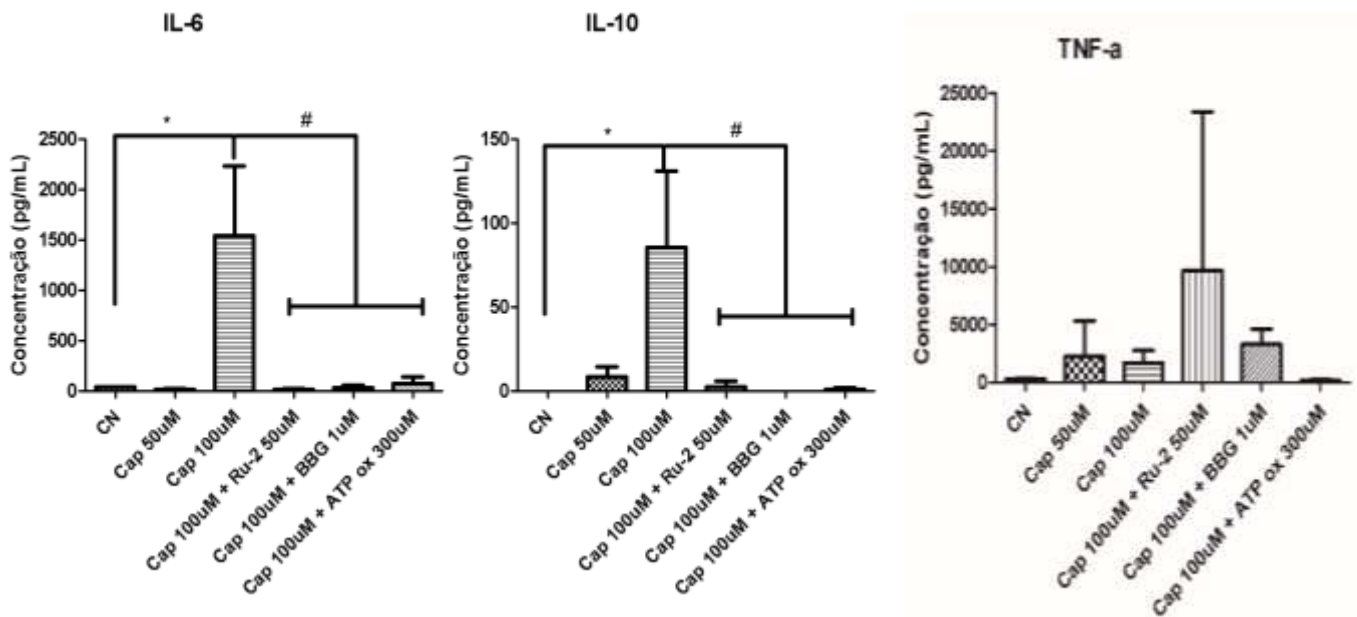


Figura 35 - A ativação de TRPV1 em macrófagos induz a liberação de citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos. Macrófagos tratados com capsaicina (cap) (100 μ M) por 24 horas promove a liberação das citocinas IL-6 e IL-10. A liberação dessas citocinas foram inibidas pelo antagonista do TRPV1. O BBG e ATP oxidado (ATP ox), antagonistas do P2X7 também inibiram a liberação dessas citocinas através do TRPV1. CN- controle negativo. ANOVA $p=0,0083$, pós-teste de Tukey * ($p<0,05$) em relação ao controle negativo, # ($p<0,05$) em relação ao tratamento com capsaicina, em experimentos de 2 dias independentes realizados com kit CBA (BD) por citometria.

Expressão do receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 em macrófagos peritoneais de camundongos

Os resultados apresentados até o momento mostram evidências farmacológicas da presença do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. A expressão do TRPV1 em macrófagos murinos foi descrita por Zhao em 2013 (264). No entanto, os macrófagos analisados nesse trabalho foram encontrados em lesões ateroscleróticas sob condições pró-inflamatórias e não eram macrófagos peritoneais. Finalmente, diante dos resultados apresentados nesse trabalho foi necessário avaliar se esse tipo celular expressa o receptor.

A fim de avaliar a presença da TRPV1 nesse tipo celular, foram feitas duas marcações específicas para macrófagos, utilizando-se os anticorpos F4/80 e IBA-1 (anticorpos específicos para macrófagos) (265). Nesse sentido, a figura 36 mostra a expressão do TRPV1 (em verde) em macrófagos peritoneais, os quais estão marcados em vermelho através da utilização do anticorpo específico para macrófagos, IBA-1 (265). Além disso, ao marcar microtúbulos em vermelho, foi possível verificar a uma sobreposição entre as marcações do TRPV1 e tubulina. Seguindo para a figura 36C, foi repetido o ensaio anterior, utilizando-se desta vez, o marcados usual de macrófagos F4/80. Nessa etapa, semelhantemente à figura 36A, foi revelada a presença do TRPV1 em macrófagos.

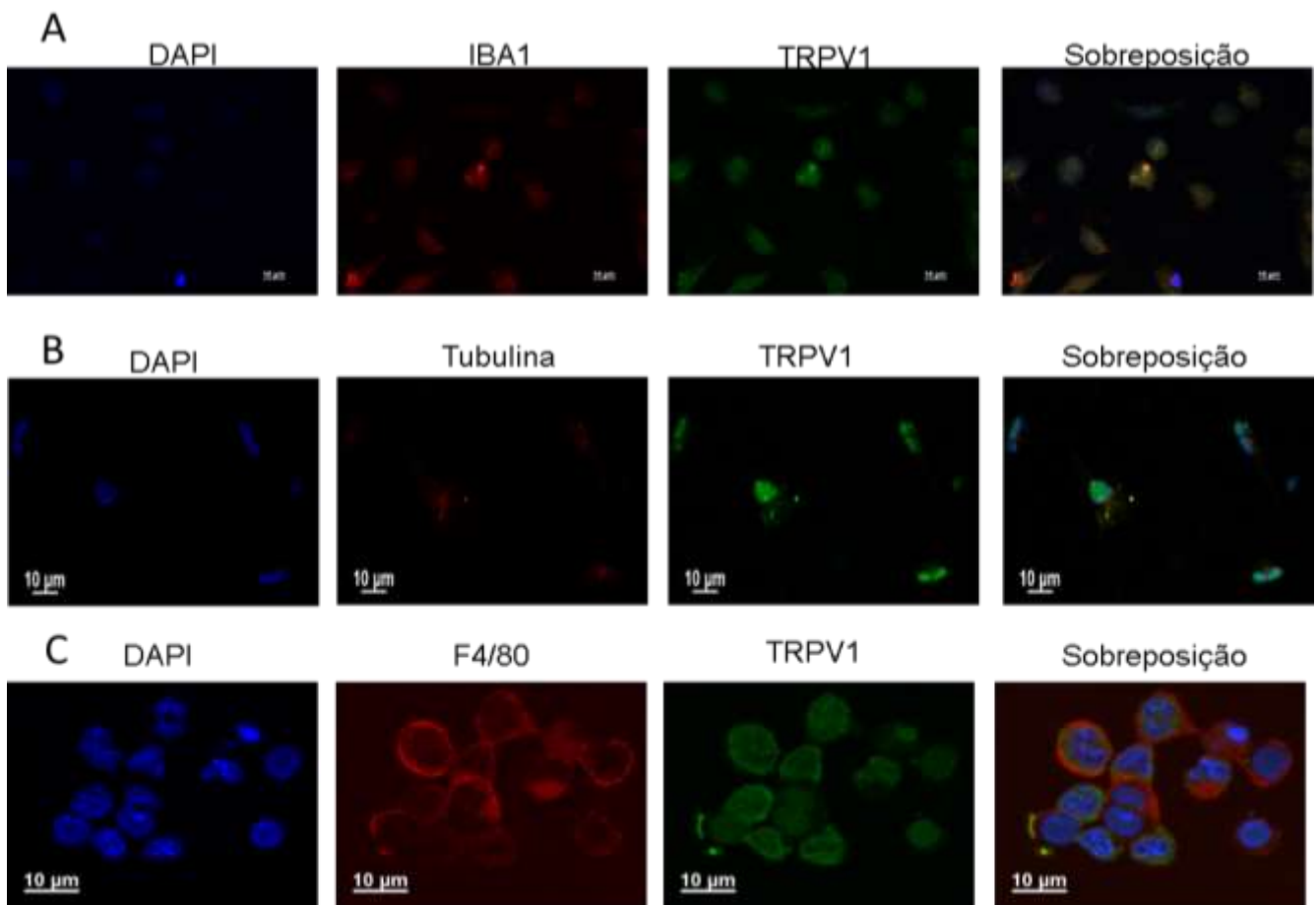


Figura 36 - Macrófagos peritoneais de camundongos expressam o Receptor de Potencial Transitório Vaniloide subtipo 1. (A) Macrófagos estão marcados com o marcador específico para o tipo celular, IBA-1 (em vermelho). TRPV1 marcado em verde e núcleo corado com DAPI (em azul). (B) Sobreposição de tubulina (em vermelho) e TRPV1 (em verde). (C) Macrófagos estão marcados com o marcador específico para o tipo celular, F4/80 (vermelho). TRPV1 (em verde) e núcleo corado com DAPI (azul). Esses experimentos realizados em dois dias distintos.

11. Discussão

Proteínas formadoras de poros são encontradas tanto em organismos invertebrados quanto em vertebrados. Algumas delas possuem propriedades biofísicas (83,175,266) e funções similares, tais como o perfil de corrente, seletividade e *cut-off* (266–268). Dentre elas, destaca-se o P2X7R por sua capacidade de formar poros na membrana plasmática, e este pode ser ativado fisiologicamente ou em condições adversas pela adenosina 5'-trifosfato extracelular (ATP), apresentando características distintas das demais quanto ao seu mecanismo de ativação. Uma vez ativado, ele altera a permeabilidade membranar a solutos de elevado peso molecular (até 900 Da) carregados ionicamente ou não (83,175,266).

Entretanto, há uma discussão vigente sobre a identidade do poro associado ao P2X7R e se esse poro depende ou não de mensageiros intracelulares, como cálcio e MAP cinases (83,86,163,177,180,181). Existem evidências que apontam que a formação desse poro se dá pela própria dilatação desse receptor, embora fortes indícios recentemente têm favorecido a teoria de que haja uma proteína distinta que promova a abertura do poro do P2X7R.

Partindo desse último ponto, outras proteínas formadoras de poros na membrana plasmática descritas na literatura poderiam participar da abertura do poro do P2X7R. Certamente, desse grupo de proteínas estudadas, aquela que mais se destaca pela concentração de estudos sobre esses aspectos é o hemicanal panexina-1 (125,184). Alguns grupos afirmam categoricamente, de acordo com os seus resultados, que essa proteína seria o poro do P2X7R (125,184). Entretanto, essa afirmação não seria verdade em todos os modelos celulares, inclusive naqueles testados, uma vez que uma gama de artigos têm mostrado irreprodutibilidade dos resultados apresentados por eles. Como mencionado anteriormente, Yan e colaboradores demonstraram que a abertura do poro associado ao P2X7R em condições fisiológicas não foi inibido por bloqueadores de panexina-1 (179). Mas, o que tem se mostrado é que o tipo e o estado de ativação celulares podem ser preponderante para a formação do poro do P2X7R. Assim, iniciamos uma série de experimentos a fim trazer um pouco mais de luz à teoria de que esse poro seria uma proteína distinta do P2X7. Através das publicação do artigo intitulado: " *Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor?* (186)", tivemos como objetivo avaliar a possibilidade

de a proteína formadora de hemicanal panexina-1 teria algum papel na formação do poro ou no canal iônico formados pelo P2X7R em macrófagos peritoneais. Mostramos que os registros eletrofisiológicos de corrente iônica provocados pelo receptor P2X7 não sofreram redução aos tratamentos com diferentes bloqueadores de junções comunicantes e hemicanais. Esse resultado corrobora com diversos trabalhos apontados até então desenvolvidos que mostram farmacologicamente que proteínas formadoras de hemicanais não influenciam o canal iônico formado pelo P2X7R (163,179,186). Além disso, tanto por microscopia, quanto por citometria de fluxo, os antagonistas de hemicanais formadores de poro não foram capazes inibir a captação de iodeto de propídeo através dos poros formados pelo P2X7R, ou seja a formação do poro. Mesmo assim, alguns autores que defendem a panexina-1 como o poro associado ao receptor P2X7R mostram a expressão da panexina-1 em células macrófaga, como a linhagem J774 (125,184). Confirmamos essa evidência através dos resultados de RT-PCR, porém curiosamente, apesar de a linhagem J774 apresentar a expressão de panexina-1, o nosso modelo principal utilizado neste estudo, macrófagos peritoneais de camundongos, não se observa a expressão do hemicanal (186). Contudo, macrófagos peritoneais tratados por lipopolissacarídeo (LPS) passaram a expressá-la, que foi silenciada quando sob tratamento com RNA de interferência (RNAi). Mesmo assim, nossos resultado nesse artigo mostraram que os macrófagos peritoneais de camundongos não sofreram diminuição significativa na captação de corante após a ação do agonista seletivo do P2X7R, BzATP. Semelhantemente, não observamos redução de captação de corante utilizando-se antagonistas seletivos para panexina-1, como mostra a probenecida. Nesta dissertação, mostramos que não somente a probenecida, como também a carbenoxolona não apresentaram qualquer influência na formação do poro do P2X7 (figura 34). Além disso, a figura 32 também mostra que o silenciamento da panexina-1 não inibiu a formação do poro do P2X7R. Portanto, concordando com diversos trabalhos presentes na literatura (163,179,186), isso significa que em macrófagos peritoneais, o modelo utilizado nesta dissertação, a panexina-1 não apresenta influências à formação do poro do P2X7R.

Ao excluir a participação da panexina-1 em nosso modelo, o passo tomado foi avaliar se outras estruturas formadoras de poros descritas na literatura que poderiam ser ou participar da formação do poro do P2X7R. Vale a pena mencionar que há moléculas,

como a ionomicina, um ionóforo de cálcio (163) e a maitotoxina, uma toxina marinha (175), são capazes de promover a abertura de poros com características semelhantes ao do P2X7R na membrana plasmática, no entanto as estruturas ativadas por elas são desconhecidas até o momento.

Dessa forma, na presente dissertação avaliamos se o receptor de potencial transitório vaniloide subtipo-1 (TRPV1) poderia participar do processo de formação do poro do P2X7R. Recentemente, o canal iônico TRPV1 apresentou capacidade de formar um poro na membrana plasmática e permitir a passagem de moléculas de semelhante peso molecular que o poro associado ao P2X7R. A ativação do canal iônico se dá através da exposição ao composto pungente encontrado em pimentas vermelhas do gênero *Capsicum sp.*, a capsaicina, assim como a resiniferatoxina, encontrada em cactos do gênero *Euphorbia sp.*, a elevação da acidez extracelular (pH < 6,0) e temperaturas de 42 a 47°C. Por sua vez, a formação do poro somente foi mostrada a partir da exposição à capsaicina, à resiniferatoxina e à acidez extracelular, dependendo da magnitude e tempo de exposição.

O presente trabalho possuiu duas etapas: caracterização do TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos e a avaliação da relação entre os canais iônicos e poros formados pelo TRPV1 e pelo P2X7R nesse tipo celular. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a expressão e atividade do TRPV1 em macrófagos peritoneais (figura 36), que é um dos principais modelos utilizados para o estudo da formação do poro associado ao P2X7R. Uma vez averiguada a expressão do TRPV1 em macrófagos, em seguida, realizamos uma série de ensaios para a avaliar o funcionamento do canal iônico e a formação do poro do TRPV1. Em primeiro lugar, a realização da caracterização funcional do canal iônico formado pelo TRPV1 se mostrou em conformidade com as características apresentadas na literatura. Utilizamos para tal fim, culturas primárias de glia de Müller que reconhecidamente expressa TRPV1 e P2X7. Os processos de dessensibilização do canal iônico, tanto o processo agudo quanto a taquifilaxia foram mostrado em nossos resultados. Observamos nos resultados de eletrofisiologia que o TRPV1 se torna menos responsivo a uma segunda exposição à capsaicina, apresentando uma queda na amplitude de corrente em torno de 60% em comparação com a primeira exposição (figura 18). Esse resultado é bastante semelhante ao apresentado pelos registros da glia de Müller, tanto pela amplitude

da corrente desenvolvida nos tipos celulares após exposição à capsaicina, quanto ao próprio formato da dessas correntes iônicas. Além disso, os tratamentos farmacológicos se mostraram eficazes quanto à inibição do TRPV1 em ambos os tipos celulares. Ainda assim, a ativação e funcionalidade do TRPV1 em macrófagos peritoneais foram avaliadas em ensaios de avaliação das concentrações de cálcio intracelulares diante de um estímulo dado. O tipo de abordagem escolhido, o imageamento individual, é uma abordagem que nos permite analisar cada tipo celular presente no campo de visualização do microscópio. Dessa forma, os resultados apresentados na figura 20 corroboram com os dados da eletrofisiologia quanto a sua funcionalidade e são bastante ilustrativos quanto aos processos de dessensibilização do TRPV1. Conforme a literatura, mesmo diante do estímulo, o TRPV1 sofre desativação (figuras 20 A e 20 C) e mostra um ligeiro início de ressensibilização após um período de 10 minutos (figura 20 C). É importante salientar que a ativação do TRPV1 em macrófagos foi heterogênea, ou seja, nem todas as células analisadas responderam de forma semelhante, embora a tabela 9 mostre que mais de 80% das células analisadas obtiveram valores acima de 50% em aos níveis basais (solução salina). Semelhantemente aos efeitos provocados pela ativação por capsaicina, a resiferatoxina (RTX), análogo mais potente, também foi capaz de ativar o TRPV1 em macrófagos, apresentando inclusive um processo semelhante de dessensibilização ao do tratamento com capsaicina (269). É importante notar que, conforme se vê na figura 21, essa dessensibilização não foi tão drástica quanto àquela apresentada pela capsaicina. Provavelmente, isso se deve aos seguintes aspectos: a RTX possui maior potência em relação à capsaicina, embora esses agonistas se liguem a sítios diferentes no receptor; há informações na literatura que mostram uma baixa ou não dessensibilização do TRPV1 à exposição à RTX (270). Ao final da caracterização funcional do canal iônico do TRPV1, restava saber se esse receptor também seria capaz de formar um poro com características semelhantes àquelas já mostrada na literatura desde a sua caracterização. Esse passo, em especial, foi de muita importância para alcançar os objetivos central do projeto desenvolvido neste curso: avaliar uma possível correlação entre os poros formados pelo P2X7R e TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. Nesse sentido, o principal ensaio utilizado para esse fim é a avaliação da captação de corantes fluorescente impermeáveis à membrana plasmática. Dessa forma, de modo geral, com exceção

rupturas na membrana plasmática, fato já excluído pelos resultados apresentados na figura 34 através de ensaios bioquímicos para detecção da presença da enzima lactato desidrogenase, esses corantes impermeáveis poderiam atravessar a membrana através do poro formado. Assim, através de três abordagens distintas: microscopia de fluorescência, microfluorimetria e citometria de fluxo, esse trabalho mostrou que a ativação do TRPV1 promove a abertura de um poro que permite a passagem de corantes de maiores pesos moleculares, como o brometo de etídeo e o YOPRO-1 (figuras 22 e 23, respectivamente). Dessa vez, os modelos que serviu para controle positivo de formação do poro foram a linhagem de astrocitoma GL 261 (figura 24) e a cultura primária de glia de Müller (figura 33). Ressalta-se a importância do uso das três abordagens que usamos em conjunto, uma vez que enquanto à microscopia observa-se o fenômeno e à microfluorimetria confere-se agilidade às análises, através da citometria de fluxo foi possível confirmar que a formação do poro se procedeu, de fato, em macrófagos peritoneais de camundongos. O lavado de células da região peritoneal contém diversos tipos celulares que poderiam interferir nas análises após o estímulo. Entretanto, para o cultivo de cultura de macrófagos em placas que foram usadas na microfluorimetria e microscopia, não resta dúvida alguma que o procedimento de um período de pré-incubação usado comumente em diversos trabalhos no mundo enriquece a pureza da células analisadas. Contudo, para a citometria de fluxo, as células utilizadas para os ensaios foram recém extraídas da cavidade peritoneal, não sendo possível realizar a pré-adesão nesse caso. Devido ao seu poder de refino às análises, a citometria permite através dos parâmetros de tamanho e complexidade celular discriminar morfológicamente diversos tipos celulares presentes no lavado peritoneal. Dessa forma, abordamos a formação do poro do TRPV1 duas formas: discriminando morfológicamente e imunoespecificamente os macrófagos no lavado através da marcação com o anticorpo amplamente utilizado, F4/80. Como resultado, verificaram-se certas diferenças quanto aos valores de EC_{50} , contudo possivelmente isso se deve a três principais motivos: 1- diferenças de sensibilidade de cada metodologia; 2- pequeno percentual de contaminação da amostra heterogênea discriminada morfológicamente e, 3- diferenças no grau de ativação (polarização) dos macrófagos nas diferente técnicas utilizadas. Mesmo assim, a abertura do poro do TRPV1 ocorreu apesar dessas diferenças mencionadas. Adicionando-se a isso, antagonistas do TRPV1 foram capazes de inibir a

formação do seu poro de forma concentração dependente, como mostra a figura 22. Ainda assim, já que os passos seguintes foram averiguar a possível correlação entre os TRPV1 e P2X7R, restava avaliar se esse poro formado pelo TRPV1 revela diferenças de afinidade para cargas iônica distintas, uma vez que recentes evidências na literatura contestam a “não-seletividade” iônica do poro (178). Dessa forma, a figura 25 mostra que a abertura do poro do TRPV1 não promoveu a captação do corante aniônico fluoresceína (332 Da). A escolha desse corante se deve pelo fato de que ele possui um peso molecular mais próximo ao do brometo etídeo (394,29 Da), o corante catiônico mais utilizado nesse trabalho. Esse resultado não invalida a possibilidade de participação do TRPV1 no processo de formação do poro do P2X7R, já que diversos estudos apontam que os fatores “tipo celular” e estímulo dado podem modular a formação desse poro (160,163,177,178). Além disso, uma teoria emergente que englobaria as outras duas teorias descritas anteriormente: 1-dilatação intrínseca do canal; 2- dilatação de proteína distinta, tem sido relevante: “Teoria dos múltiplos poros” (179–181, Alves et al, 2014 - em construção). Nessa corrente, resumidamente, o fenômeno do poro observado seria a resultante de diferentes poro formados após um dado estímulo, com participação ou não de segundos mensageiros, o que poderia explicar as diferenças entre os modelos e as condições experimentais encontradas na literatura.

Portanto, o passo final deste trabalho foi avaliar a possível correlação entre os poros formados pelo TRPV1 e P2X7. Utilizamos a glia de Müller, pois essa cultura expressa os dois receptores e, de acordo com a figura 26, as correntes iônicas provocadas pelo ATP foram inibidas pelos antagonistas do TRPV1, *ruthenium red* e capsazepina. Por sua vez, os dados apresentados em macrófagos também revelaram semelhantes comportamentos em relação à glia de Müller. As correntes iônica provocadas pelo ATP foram inibidas pelos antagonistas do TRPV1. Vale ressaltar que os mecanismo de ação desses antagonistas são distintos (271). Apesar de ainda inconclusivo, os mecanismos de ação do Ru-2 descritos são: bloquear a luz do canal iônico e inibir certas proteínas cinases, como PKC (272–274). Se nesse sentido, poderia se propor uma inespecificidade do fenômeno mostrado pelo Ru-2, uma vez que a capsazepina é um antagonista competitivo em relação à capsaicina, ou seja, elas competem pelo mesmo sítio de ligação na estrutura do TRPV1. Logo, é importante salientar os nossos achados até então, levantam uma nova proposta de

comunicação entre esses receptores. Certamente que a concentração de ATP utilizada nos ensaios de eletrofisiologia é capaz de promover a abertura do poro do P2X7R e a configuração utilizada (*whole-cell*) não aborda o canal iônico especificamente, mas a resultante da corrente de todos os canais iônicos presentes na membrana plasmática após um dado estímulo. Portanto, é possível se pensar que a inibição promovida por esses compostos à ativação do P2X7R ocorra através da formação do poro. No entanto, como mostram as figuras 28 e 29, a inibição cruzada também ocorreu entre os antagonistas do P2X7 sobre a ativação do TRPV1, tanto na glia de Müller quanto em macrófagos. Pelos mesmos motivos abordados anteriormente, não é possível afirmar que esse efeito inibitório ocorra sobre o canal ou somente sobre o poro do TRPV1. Contudo, até o momento, as evidências apontam que não haveria um outro canal iônico formador de poro envolvido no processo de abertura do poro do TRPV1, como hemicanais que foram descartados pelos resultados apresentados na figuras 32. Outro fato interessante, é que o ATP oxidado é um antagonista irreversível do P2X7R e não há informações até o momento de que esse composto aja sobre o TRPV1, ou seja, leva-se a crer que a ativação do TRPV1 via capsaicina pode estar envolvida na formação do poro do P2X7R. Paralelamente, através dos ensaios de avaliação das concentrações de cálcio intracelular, essa inibição cruzada ocorreu tanto pela ação do Ru-2 como por ação da capsazepina. Contudo, o ATP extracelular não é específico para o P2X7R, podendo ativar os outros receptores P2X. Logo, pela utilização do agonista seletivo e mais potente para o P2X7R, BzATP, os antagonistas do TRPV1 também foram capazes de promover a inibição do P2X7. Até os presentes resultados, leva-se a crer que esses receptores podem se comunicar. Portanto, os resultados dos ensaios de formação dos poros do TRPV1 e P2X7 em macrófago peritoneais de camundongos mostraram similaridades aos encontrado na glia de Müller (figura 33), controle positivo utilizado. A figura 31 mostrou a inibição do poro do P2X7R pelos antagonistas do TRPV1 enquanto que o antagonista do P2X7R, BBG, também inibiu substancialmente a formação do poro do TRPV1. Esses resultados concordam com os resultados encontrados na outras metodologias utilizadas (eletrofisiologia e ensaios de cálcio) para o estudo dos canais iônicos formados pelo P2X7R e TRPV1, mostrando dessa forma que esses canais e/ou seus poros associados participem de mecanismos em comum. Mesmo assim, não é possível até o momento afirmar que o poro do TRPV1 é o

poro do P2X7R em macrófagos peritoneais de camundongos, mas, diante dos nossos resultados, que eles participem de eventos em comum, inclusive na liberação de citocinas. O P2X7R tem sua participação bastante estudada em processos inflamatórios importantes, como a artrite reumatoide, possivelmente devido ao grande acúmulo de ATP no meio extracelular que seria capaz de ativar o poro do P2X7R (104,140). Através da ativação do P2X7R, como anteriormente mencionado, citocinas pró-inflamatórias são maturadas e liberadas ao meio extracelular agravando o estado inflamatório e, possivelmente, danos teciduais. Até o momento, há diversos ensaios clínicos com antagonistas do P2X7R, inclusive para a artrite reumatoide, porém nenhum deles mostrou que a inibição do P2X7R foi melhor que do que os tratamentos convencionais (138). Por sua vez, assim como o P2X7, em especial na artrite reumatoide, o TRPV1 também promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, por exemplo), porém, de modo interessante, o TRPV1 também induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, por exemplo), o que pode também explicar porque a capsaicina possui efeitos ambíguos, tanto indução de dor, como efeitos analgésicos. A figura 35 mostra que após a ativação por capsaicina, o TRPV1 promove a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias. A liberação da citocina pró-inflamatória IL-6 foi proeminente em relação à liberação de TNF- α , sendo também inibida pelos seus antagonistas como também pelo antagonista irreversível do P2X7R, ATP oxidado. A liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 também foi revelada e bloqueada nos mesmos padrões apresentados pela IL-6. Dessa forma, esses dados reforçam ainda mais que os TRPV1 e P2X7R participem de sinalizações em comum, que podem ser explorada em eventos inflamatórios crônicos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias após a ativação do P2X7R, por sua vez, também tem sido avaliada, embora o para a participação do P2X7 seja dependente de uma prévia sensibilização a LPS (130,144,275–278).

Concluindo, nossos resultados mostram que macrófagos peritoneais de camundongos expressam TRPV1, que por sua vez, é funcional e capaz de promover a abertura de um poro na membrana plasmática com características similares às aquelas encontradas pelo P2X7R. Os poros do P2X7R e TRPV1 participam de eventos em comum e sofrem inibição cruzada entre os seus antagonistas. Além disso, como descrito em outros tipos celulares, o TRPV1 promove a liberação de citocinas para o meio extracelular e que

pode ser inibido pelos antagonistas do P2X7R. Além disso, a correlação entre esses dois poros torna-os um novo alvo farmacológico e terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias e dor. Portanto, os poros estudados nesse trabalho poderiam servir como uma ferramenta terapêutica que permite a entrada de fármacos hidrofílicos ao interior celular. Além disso, os resultados obtidos mostram que o TRPV1 se torna uma alternativa de inibição e/ou modulação das funções do P2X7R, tanto no nível do canal iônico como no nível de poro, abrindo, dessa forma uma janela de opções para tratamentos de doenças crônicas em o P2X7R esteja envolvido. Além disso, estão em processo de conclusão pelo nosso grupo os ensaios para detecção de ATP após a ativação do TRPV1. Esses resultados poderão indicar possíveis ações do TRPV1 em macrófagos durante o processo inflamatório e na dor, que possam revelar uma rede de comunicação entre os receptores purinérgicos e o TRPV1.

12. Perspectivas

A partir do momento que, em ambos os modelos, a inibição cruzada entre os antagonistas desses dois receptores foi examinada e vista, inevitavelmente uma questão surgiu sobre uma mesma identidade entre essas duas estruturas. No entanto, nem todos os tipos celulares que expressam TRPV1 expressam P2X7R, como é o exemplo de neurônios presentes em fibras C (199,279). Além disso, como observado em macrófagos infectados por parasitos, o poro associado ao receptor P2X7R é modulado quanto a sua seletividade iônica. Nesse sentido, é possível o poro aberto pelo TRPV1 seja modulado nesses casos também. Nesse contexto, o entendimento desse fenômeno poderia viabilizá-lo como uma ferramenta terapêutica para aperfeiçoar o acesso de fármacos hidrofílicos de até 900Da ao espaço intracelular (244). Um caso interessante com esse intuito é o estudo do TRPV1 como um acesso seletivo de análogos hidrofílicos de lidocaína, como o QX-314. Esses compostos hidrofílicos são incapazes de ultrapassar a membrana plasmática, porém, ao ser ativado, o TRPV1 permite a passassem desses compostos, permitindo sua ação anestésica (244).

13. Conclusões

- 1 - Macrófagos peritoneais formam um poro ativado por capsaicina com propriedades biofísicas semelhantes ao poro do P2X7R.
- 2 - A capsaicina promove a formação de poro catiônico na membrana plasmática, de acordo com os dados da literatura (*cut-off* 629 Da).
- 3 - Proteínas formadoras de hemicanais não participam do processo de formação do poros da capsaicina e do P2X7R em macrófagos peritoneais de camundongos.
- 4 - Os poros associados ao P2X7R e à capsaicina estão relacionados, apontando para uma nova rede de sinalização entre essas duas estruturas.
- 5 - Abertura do poro formado após exposição à capsaicina não leva à morte celular através da ruptura da membrana plasmática.
- 6 - Ativação pela capsaicina leva à liberação da citocina pró-inflamatórias IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos murinos.
- 7 – Macrófagos peritoneais de camundongos expressam TRPV1.

14. Referências Bibliográficas

1. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Nov 25
2. Fowler M a, Montell C. *Drosophila TRP channels and animal behavior*. Life Sci [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Mar 19.
3. Damann N, Voets T, Nilius B. TRPs in our senses. *Curr Biol* [Internet]. 2008 Sep 23.
4. Burnstock G, SATCHELL DG, SMYTHE A. A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1972 Oct 19
5. Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2004 Feb
6. Matzinger P. The evolution of the danger theory. 2012;8(4):311–7.
7. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* [Internet]. 2002 Apr 12
8. Rorive G, Kleinzeller A. The effect of ATP and Ca²⁺ on the cell volume in isolated kidney tubules. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1972 Jul 3
9. Jones BM. A unifying hypothesis of cell adhesion. *Nature* [Internet]. 1966 Oct 22
10. Chang KJ, Cuatrecasas P. Adenosine triphosphate-dependent inhibition of insulin-stimulated glucose transport in fat cells. Possible role of membrane phosphorylation. *J Biol Chem* [Internet]. 1974 May 25
11. Rozengurt E, Heppel LA. A Specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1975 Dec 15

12. Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2005 Jul
13. Voets T, Nilius B. TRPs make sense. *J Membr Biol* [Internet]. 2003 Mar 1
14. Eric Kandel, James Schwartz TJ. *PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE*. 4 edition. McGraw-Hill Medical; 2000.
15. Wang Y, Roman R, Lidofsky SD, Fitz JG. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Oct 15;93(21):12020–5.
16. Tsao H-K, Chiu P-H, Sun SH. PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jan
17. Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota S a, Gui X, Roberts J a, MacDonald J a, et al. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Apr
18. Bartlett R, Yerbury JJ, Sluyter R. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 Jan;2013:271813.
19. Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, Degawa M. P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J Immunol* [Internet]. 2006 Sep 1
20. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2002 Mar 1
21. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* [Internet]. 1976 Aug

22. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* [Internet]. 1929 Dec 25
23. Su C, Bevan JA, Burnstock G. [3H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* [Internet]. 1971 Jul 23
24. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe a. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1970 Dec;40(4):668–88.
25. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membr Recept drugs Horm a Multidiscip approach*. Raven Press; 1978;107–18.
26. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1998 Sep [cited 2013 Nov 18];50(3):413–92.
27. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* [Internet]. 1990 Jul [cited 2014 Jan 18];70(3):761–845.
28. Martín ED, Fernández M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, et al. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* [Internet]. 2007 Jan 1
29. Görlach A. Control of adenosine transport by hypoxia. *Circ Res* [Internet]. 2005 Jul 8
30. Nikodijević O, Sarges R, Daly JW, Jacobson KA. Behavioral effects of A1- and A2-selective adenosine agonists and antagonists: evidence for synergism and antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1991 Oct
31. Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2006 Jun

32. Lustig KD, Shiao a K, Brake a J, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Jun 1;90(11):5113–7.
33. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson a N, Smart TG, King BF, et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* [Internet]. 1993 Jun 14;324(2):219–25.
34. Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Mar 3
35. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1999 Nov [cited 2013 Nov 27];128(6):1199–206.
36. Charlton SJ, Brown C a, Weisman G a, Turner JT, Erb L, Boarder MR. Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1996 Dec;119(7):1301–3.
37. Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1994 Jul
38. Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1998 Dec
39. Boeynaems J-M, Wilkin F, Marteau F, Duhant X, Savi P, Suarez Gonzalez N, et al. P2Y receptors: New subtypes, new functions. *Drug Dev Res* [Internet]. 2003 May 23

40. Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, et al. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2003 Jul
41. Malmsjö M, Adner M, Harden TK, Pendergast W, Edvinsson L, Erlinge D. The stable pyrimidines UDPbetaS and UTPgammaS discriminate between the P2 receptors that mediate vascular contraction and relaxation of the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2000 Sep;131(1):51–6.
42. Abbracchio MP, Boeynaems J-M, Barnard E a, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2003 Feb;24(2):52–5.
43. Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, et al. An RGD sequence in the P2Y₍₂₎ receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol* [Internet]. 2001 Apr 30;153(3):491–501.
44. Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, et al. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2001 Oct 31
45. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1996 Aug
46. Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y₄ nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1998 Jun

47. Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1996 Dec 19;317(2-3):383–9.
48. Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takawa Y. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Nov 3 [cited 2014 Jan 19];270(44):26152–8.
49. Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1996 May 15;222(2):303–8.
50. Robaye B, Boeynaems JM, Communi D. Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1997 Jun 25;329(2-3):231–6. A
51. Communi D. Cloning of a Human Purinergic P2Y Receptor Coupled to Phospholipase C and Adenylyl Cyclase. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Dec 19
52. Communi D, Suarez-Huerta N, Dussossoy D, Savi P, Boeynaems JM. Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y11 and SSF1 genes. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 May 11
53. Savi P, Herbert J-M. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2005 Apr
54. Ohlmann P, Laugwitz KL, Nürnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave JP, et al. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J* [Internet]. 1995 Dec 15;312 Pt 3:775–9.
55. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Palmer K, Qiao X, Fan X, et al. P2Y(13): identification and characterization of a novel G α hi-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2002 May;301(2):705–13.

56. Chambers JK. A G Protein-coupled Receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Apr 6
57. Harden TK. P2Y14 receptor. *AfCS-Nature Mol Pages* [Internet]. 2004 Apr 7 [cited 2014 Jan 19];
58. Moore DJ, Murdock PR, Watson JM, Faull RLM, Waldvogel HJ, Szekeres PG, et al. GPR105, a novel Gi/o-coupled UDP-glucose receptor expressed on brain glia and peripheral immune cells, is regulated by immunologic challenge: possible role in neuroimmune function. *Mol Brain Res* [Internet]. 2003 Oct
59. Stojilkovic SS, Yan Z, Obsil T, Zemkova H. Structural insights into the function of P2X4: an ATP-gated cation channel of neuroendocrine cells. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2010 Nov
60. Browne LE. Structure of P2X receptors. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* [Internet]. 2012 Jan 19
61. Egan T, Cox J, Voigt M. Molecular Structure of P2X Receptors. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2004 Apr 1
62. Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Mar 18
63. Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Sato C. Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2005 Nov 25
64. Young MT, Fisher J a, Fountain SJ, Ford RC, North RA, Khakh BS. Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Sep 19

65. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jul 30
66. Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 1992 Mar;13(3):87–90.
67. Yan Z, Khadra A, Li S, Tomic M, Sherman A, Stojilkovic SS. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *J Neurosci* [Internet]. 2010 Oct 20
68. Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, et al. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* [Internet]. 1996 Apr 15;16(8):2495–507.
69. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* [Internet]. 1994 Oct 6
70. Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, et al. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* [Internet]. 1996 Dec 1;497 (Pt 2:413–22.
71. Haines WR, Torres GE, Voigt MM, Egan TM. Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1999 Oct;56(4):720–7.
72. Wareham K, Vial C, Wykes RCE, Bradding P, Seward EP. Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2009 Aug

73. Ding S, Sachs F. Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J Gen Physiol* [Internet]. 1999 May;113(5):695–720.
74. Ding S, Sachs F. Ion permeation and block of P2X₂ purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol* [Internet]. 1999 Dec 1
75. Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, et al. Molecular and functional characterization of human P2X₂ receptors. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1999 Dec;56(6):1171–81.
76. Garcia-guzman M, Stuhmer W. Molecular characterization and pharmacological properties of the human. 1997;59–66.
77. Evans RJ. Single channel properties of ATP-gated cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neurosci Lett* [Internet]. 1996 Jul 19
78. Vincent P. Cationic channels sensitive to extracellular ATP in rat lacrimal cells. *J Physiol* [Internet]. 1992 Apr
79. Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA. Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2003 Aug
80. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science* [Internet]. 1996 May 3
81. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Feb 28
82. Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F. Kinetics of P2X₇ receptor-operated single channels currents. *Biophys J* [Internet]. Elsevier; 2007 Apr 1

83. Coutinho-Silva R, Persechini PM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol* [Internet]. 1997 Dec
84. Nasiripourdori A, Taly V, Grutter T, Taly A. From toxins targeting ligand gated ion channels to therapeutic molecules. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 Jan 20];3(3):260–93.
85. Coddou C, Stojilkovic SS, Huidobro-Toro JP. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci* [Internet]. 2011 Jan
86. Faria RX, Ferreira LG., Alves L. The Mystery of P2X7 Ionotropic Receptor: From a Small Conductance Channel to a Large Conductance Channel. *cdn.intechopen.com* [Internet]. 2010
87. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2007 Dec
88. Dubyak GR. Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2007 Dec
89. Saul A, Hausmann R, Kless A, Nicke A. Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013 Jan
90. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* [Internet]. 2002 Oct [cited 2013 Nov 18];82(4):1013–67.
91. Kügelgen I Von, Bonn D-. Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. 2008;(3):59–61.
92. Burnstock G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. *Keio J Med* [Internet]. 2013
93. Urban D, Härtel F V, Gadiraju K, Gündüz D, Aslam M, Piper HM, et al. Extracellular ATP attenuates ischemia-induced caspase-3 cleavage in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Aug 24

94. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* [Internet]. 1995 Oct 5
95. Jacob F, Pérez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* [Internet]. 2013 Oct
96. Savi P, Bornia J, Salel V, Delfaud M, Herbert JM. Characterization of P2x1 purinoreceptors on rat platelets: effect of clopidogrel. *Br J Haematol* [Internet]. 1997 Sep
97. MacKenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Feb 9
98. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal* [Internet]. 2013 Jun 25
99. Takenouchi T, Sekiyama K, Sekigawa A, Fujita M, Waragai M, Sugama S, et al. P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2010 Apr
100. Marcellino D, Suárez-Boomgaard D, Sánchez-Reina MD, Aguirre J a, Yoshitake T, Yoshitake S, et al. On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J Neural Transm* [Internet]. 2010 Jul
101. Morales I, Dopico JG, Sabate M, Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M. Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2007 May
102. Pacheco PAF, Ferreira LGBLG., Alves LA, Faria RX, Gomes L, Anastácio P, et al. Modulation of P2 receptors on pancreatic β -cells by agonists and antagonists: a

molecular target for type 2 diabetes treatment. *Curr Diabetes Rev* [Internet]. 2013 May

103. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel C a. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* [Internet]. 2000 Oct 15;165(8):4615–23.
104. Caporali F, Capecchi PL, Gamberucci A, Lazzerini PE, Pompella G, Natale M, et al. Human rheumatoid synoviocytes express functional P2X7 receptors. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2008 Aug
105. Al-Shukaili A, Al-Kaabi J, Hassan B. A comparative study of interleukin-1beta production and p2x7 expression after ATP stimulation by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis patients and normal healthy controls. *Inflammation* [Internet]. 2008 May
106. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Jan
107. Nandigama R, Padmasekar M, Wartenberg M, Sauer H. Feed forward cycle of hypotonic stress-induced ATP release, purinergic receptor activation, and growth stimulation of prostate cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Mar 3
108. Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto a C, Kanellopoulos JM, et al. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 May;276(5 Pt 1):C1139–47.
109. Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber a, Brüne B, et al. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol* [Internet]. 1998 Dec;275(6 Pt 2):F962–71.
110. Denlinger LC, Fisetta PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, et al. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-

- interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* [Internet]. 2001 Aug 15
111. Costa-Junior HM, Sarmiento Vieira F, Coutinho-Silva R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal* [Internet]. 2011 Mar
 112. North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2000 Jan
 113. Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* [Internet]. 2009 Jan
 114. Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano A, da Silva-Souza HA, Guimarães MZP, Persechini PM. ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Oct 1
 115. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Castro NG, Coutinho-Silva R, Guimaraes MZP, Marques da Silva C. Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2011 Jul
 116. Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, et al. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* [Internet]. 1998 Mar;5(3):191–9.
 117. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* [Internet]. 1997 Sep;36(9):1285–94.
 118. Acuña-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro JP. Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor. *J Neurochem* [Internet]. 2007 Apr

119. Yan Z, Khadra A, Sherman A, Stojilkovic SS. Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *J Gen Physiol* [Internet]. 2011 Oct
120. Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 1999 Feb
121. Kaiho H, Kimura J, Matsuoka I, Nakanishi H. Effects of anions on ATP-activated nonselective cation current in NG108-15 cells. *J Neurophysiol* [Internet]. 1997 May
122. Verhoef PA, Kertesy SB, Lundberg K, Kahlenberg JM, Dubyak GR, Kahlenberg M. Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1beta secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *J Immunol* [Internet]. 2005 Dec 1
123. Kubick C, Schmalzing G, Markwardt F. The effect of anions on the human P2X7 receptor. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Dec
124. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2007 Sep
125. Pelegrín P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* [Internet]. 2006 Nov 1
126. Chen G-M, Feng C-C, Ye Q-L, Tao J, Li R, Peng H, et al. Association of P2X7R gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Mutagenesis* [Internet]. 2013 May
127. Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2013 Mar 1
128. Colomar A, Marty V, Médina C, Combe C, Parnet P, Amédée T. Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Aug 15

129. Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1999 Aug
130. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* [Internet]. 2006 Apr 1
131. Sanz JM, Di Virgilio F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 β release from microglial cells. *J Immunol* [Internet]. 2000 May 1;164(9):4893–8.
132. Perregaux DG, Laliberte RE, Gabel CA. Human monocyte interleukin-1 β posttranslational processing. Evidence of a volume-regulated response. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Nov 22
133. Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, et al. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Mar 15
134. Sikora A, Liu J, Brosnan C, Buell G, Chessell I, Bloom BR. Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *J Immunol* [Internet]. 1999 Jul 15
135. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Rodrigues JC, Corte-Real S, Coutinho-Silva R, Persechini PM, et al. Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan
136. Gartland A, Skarratt KK, Hocking LJ, Parsons C, Stokes L, Jørgensen NR, et al. Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012 May

137. Baroja-Mazo A, Pelegrín P. Modulating P2X7 Receptor Signaling during Rheumatoid Arthritis: New Therapeutic Approaches for Bisphosphonates. *J Osteoporos* [Internet]. 2012 Jan
138. Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2012 Oct
139. Al-Shukaili A, Al-Kaabi J, Hassan B, Al-Araimi T, Al-Tobi M, Al-Kindi M, et al. P2X7 receptor gene polymorphism analysis in rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* [Internet]. 2011 Oct
140. Portales-Cervantes L, Niño-Moreno P, Doníz-Padilla L, Baranda-Candido L, García-Hernández M, Salgado-Bustamante M, et al. Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* [Internet]. 2010 Aug
141. Ryan LM, Rachow JW, McCarty DJ. Synovial fluid ATP: a potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate. *J Rheumatol* [Internet]. 1991 May
142. Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FWK. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2011 Jul;20(7):897–915.
143. Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, et al. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* [Internet]. 2006 Jan
144. Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, et al. P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2008 Jan

145. Skaper SD, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J* [Internet]. 2010 Feb
146. S B, C C, A RD, G F, K A, Sperlagh B, et al. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung* [Internet]. 2012 Dec
147. Bennett MR. Synaptic P2X7 receptor regenerative-loop hypothesis for depression. *Aust N Z J Psychiatry* [Internet]. 2007 Jul
148. Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagné B, Labbé M, et al. P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2006 Aug 15
149. Barden N, Harvey M, Gagné B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 2006 Jun 5
150. Basso AM, Bratcher N a, Harris RR, Jarvis MF, Decker MW, Rueter LE. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res* [Internet]. 2009 Mar 2
151. Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Jan 15
152. Adinolfi E. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* [Internet]. 2002 Jan 15
153. Hattori F, Ohshima Y, Seki S, Tsukimoto M, Sato M, Takenouchi T, et al. Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. *Eur J Pharmacol* [Internet]. Elsevier; 2012 Nov 15

154. Adinolfi E, Amoroso F, Giuliani AL. P2X7 Receptor Function in Bone-Related Cancer. *J Osteoporos* [Internet]. 2012 Jan
155. Tafani M, Schito L, Pellegrini L, Villanova L, Marfe G, Anwar T, et al. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011 Aug
156. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4
157. Amoroso F, Falzoni S, Adinolfi E, Ferrari D, Di Virgilio F. The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Jan
158. Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* [Internet]. 2010 Apr 15
159. Sugiyama T, Oku H, Shibata M, Fukuhara M, Yoshida H, Ikeda T. Involvement of P2X7 receptors in the hypoxia-induced death of rat retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2010 Jun
160. Pelegrín P. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2011 Jul
161. Cockcroft S, Gomperts BD. Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *J Physiol* [Internet]. 1979 Nov
162. Nuttle LC, El-Moatassim C, Dubyak GR. Expression of the pore-forming P2Z purinoreceptor in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)⁺ RNA from murine macrophages. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1993 Jul
163. Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2005 Feb

164. Nihei OK, Savino W, Alves LA. Procedures to characterize and study P2Z/P2X7 purinoceptor: flow cytometry as a promising practical, reliable tool. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2000 Jun
165. Denlinger LC, Angelini G, Schell K, Green DN, Guadarrama AG, Prabhu U, et al. Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production. J Immunol [Internet]. 2005 Apr 1
166. Klapperstück M, Büttner C, Böhm T, Schmalzing G, Markwardt F. Characteristics of P2X7 receptors from human B lymphocytes expressed in *Xenopus* oocytes. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2000 Aug 25;1467(2):444–56.
167. Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, Walsh J V. P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. FEBS Lett [Internet]. 1997 Jul 14;411(2-3):339–45.
168. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA. P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. J Neurosci [Internet]. 2013 Feb 20
169. Teixeira PCN, de Souza CAM, de Freitas MS, Foguel D, Caffarena ER, Alves LA. Predictions suggesting a participation of beta-sheet configuration in the M2 domain of the P2X(7) receptor: a novel conformation? Biophys J [Internet]. 2009 Feb
170. De Souza CAM, Teixeira PCN, Faria RX, Krylova O, Pohl P, Alves LA. A consensus segment in the M2 domain of the hP2X(7) receptor shows ion channel activity in planar lipid bilayers and in biological membranes. Biochim Biophys Acta [Internet]. Elsevier B.V.; 2012 Jan
171. Sun C, Heid ME, Keyel P a, Salter RD. The second transmembrane domain of P2X7 contributes to dilated pore formation. PLoS One [Internet]. 2013 Jan

172. Jiang L, Rassendren F, Mackenzie A, Zhang Y-H, Surprenant A, North RA. N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2005 Nov
173. Martínez-François JR, Morales-Tlalpan V, Vaca L. Characterization of the maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblasts. *J Physiol* [Internet]. 2002 Jan 1
174. Schilling WP, Sinkins WG, Estacion M. Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X(7)-like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 Oct;277(4 Pt 1):C755–65.
175. Schilling WP, Wasylyna T, Dubyak GR, Humphreys BD, Sinkins WG. Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 Oct;277(4 Pt 1):C766–76.
176. Faria RX, Reis RAM, Casabulho CM, Alberto AVP, de Farias FP, Henriques-Pons A, et al. Pharmacological properties of a pore induced by raising intracellular Ca²⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2009 Jul
177. Faria RX, Casabulho CM, Reis RAM, Alves LA. Large-conductance channel formation mediated by P2X7 receptor activation is regulated through distinct intracellular signaling pathways in peritoneal macrophages and 2BH4 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 2010 Jul
178. Cankurtaran-sayar S, Sayar K, Ugur M. P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2009 Dec
179. Yan Z, Li S, Liang Z, Tomić M, Stojilkovic SS. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol* [Internet]. 2008 Nov
180. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* [Internet]. 1999 Apr

181. Ferreira LG., Reis RA., Alves L., Faria RX. Intracellular Signaling Pathways Integrating the Pore Associated with P2X7R Receptor with Other Large Pores. In: (Ed.) PFSK, editor. Patch Clamp Technique [Internet]. InTech; 2012.
182. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2004 Mar
183. Liang L, Schwiebert EM. Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on “Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?”. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2005 Feb
184. Iglesias R, Locovei S, Roque a, Alberto a P, Dahl G, Spray DC, et al. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2008 Sep
185. Ma W, Hui H, Pelegrín P, Surprenant A, Pelegrin P. Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2009 Feb
186. Alberto a VP, Faria RX, Couto CGC, Ferreira LG., Souza C a M, Teixeira PCN, et al. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 2013 Sep
187. Banke TG, Chaplan SR, Wickenden AD. Dynamic changes in the TRPA1 selectivity filter lead to progressive but reversible pore dilation. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2010 Jun
188. Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, et al. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* [Internet]. 2006 Apr

189. Bahamonde MI, Valverde MA. Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria. *Pflugers Arch* [Internet]. 2003 Jun
190. Verhoef PA, Kertesy SB, Estacion M, Schilling WP, Dubyak GR. Maitotoxin induces biphasic interleukin-1beta secretion and membrane blebbing in murine macrophages. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2004 Oct
191. Lemaire I, Falzoni S, Zhang B, Pellegatti P, Di Virgilio F. The P2X7 receptor and Pannexin-1 are both required for the promotion of multinucleated macrophages by the inflammatory cytokine GM-CSF. *J Immunol* [Internet]. 2011 Oct 1
192. Lee J-H, Park C, Kim S-J, Kim H-J, Oh G-S, Shen A, et al. Different uptake of gentamicin through TRPV1 and TRPV4 channels determines cochlear hair cell vulnerability. *Exp Mol Med* [Internet]. 2013 Jan
193. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* [Internet]. 1969 Oct 18
194. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium* [Internet]. 2005
195. Montell C. An end in sight to a long TRP. *Neuron* [Internet]. 2001 Apr;30(1):3–5.
196. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2007 Jan
197. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* [Internet]. 2005 Feb 22
198. McKemy DD. Temperature sensing across species. *Pflugers Arch* [Internet]. 2007 Aug
199. Caterina MJ, Schumacher M a, Tominaga M, Rosen T a, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* [Internet]. 1997 Oct 23

200. Samways DSK, Egan TM. Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Arch* [Internet]. 2011 Nov
201. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Dec 4
202. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of TRP channels. [Internet]. *Annual review of physiology*. 2006
203. Moiseenkova-Bell VY, Stanciu L a, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 May 27;105(21):7451–5.
204. Lishko P V, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* [Internet]. 2007 Jun 21
205. Koplas P a, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* [Internet]. 1997 May 15;17(10):3525–37.
206. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* [Internet]. 2008 Feb
207. Jones VM, Moore KA, Peterson DM. Capsaicin 8% topical patch (Qutenza)--a review of the evidence. *J Pain Palliat Care Pharmacother* [Internet]. 2011 Jan
208. Liu B, Zhang C, Qin F. Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* [Internet]. 2005 May 11
209. Pingle SC, Matta J a, Ahern GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2007 Jan;(179):155–71.

210. Wang H, Wang DH, Galligan JJ. P2Y2 receptors mediate ATP-induced resensitization of TRPV1 expressed by kidney projecting sensory neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2010 Jun
211. Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, et al. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Jul 9;23(14):6058–62.
212. Lakshmi S, Joshi PG. Co-activation of P2Y2 receptor and TRPV channel by ATP: implications for ATP induced pain. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2005 Aug
213. Ji R-R, Samad TA, Jin S-X, Schmolz R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* [Internet]. 2002 Sep 26
214. Greffrath W, Binzen U, Schwarz ST, Saaler-Reinhardt S, Treede R-D. Co-expression of heat sensitive vanilloid receptor subtypes in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* [Internet]. 2003 Dec 2
215. Rehman R, Bhat YA, Panda L, Mabalirajan U. TRPV1 inhibition attenuates IL-13 mediated asthma features in mice by reducing airway epithelial injury. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2013 Mar
216. Yang Y, Yang H, Wang Z, Mergler S, Wolosin JM, Reinach PS. Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res* [Internet]. 2013 Feb
217. Farfariello V, Amantini C, Santoni G. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces autophagy in thymocytes through ROS-regulated AMPK and Atg4C pathways. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2012 Sep
218. Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, et al. Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res* [Internet]. 2004 Nov 12

219. Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol* [Internet]. 2005 Apr
220. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* [Internet]. 2000 May 11
221. García-Martínez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, et al. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Feb 19
222. Adcock JJ. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Apr
223. Karlsson JA. A role for capsaicin sensitive, tachykinin containing nerves in chronic coughing and sneezing but not in asthma: a hypothesis. *Thorax* [Internet]. 1993 Apr
224. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy* [Internet]. 2004 Nov
225. Strecker T, Messlinger K, Weyand M, Reeh PW. Role of different proton-sensitive channels in releasing calcitonin gene-related peptide from isolated hearts of mutant mice. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2005 Feb 1
226. Fernandes ES, Liang L, Smillie S-J, Kaiser F, Purcell R, Rivett DW, et al. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. *J Immunol* [Internet]. 2012 Jun 1
227. Akiba Y, Furukawa O, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Kaunitz JD. Sensory pathways and cyclooxygenase regulate mucus gel thickness in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2001 Mar

228. Holzer P. TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2004 Oct 1
229. Santoni G, Caprodossi S, Farfariello V, Liberati S, Gismondi A, Amantini C. Antioncogenic effects of transient receptor potential vanilloid 1 in the progression of transitional urothelial cancer of human bladder. *ISRN Urol* [Internet]. 2012 Jan
230. Li S, Bode AM, Zhu F, Liu K, Zhang J, Kim MO, et al. TRPV1-antagonist AMG9810 promotes mouse skin tumorigenesis through EGFR/Akt signaling. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011 May
231. Czifra G, Varga A, Nyeste K, Marincsák R, Tóth BI, Kovács I, et al. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2009 Apr
232. Miao X, Liu G, Xu X, Xie C, Sun F, Yang Y, et al. High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2008 Oct
233. Trevisani M, Gatti R. TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. 2013;108–18.
234. Tóth A, Boczán J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 2005 Apr 27
235. Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res* [Internet]. 2007 Apr 13
236. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Nov 6

237. Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2006 Sep
238. Saunders CI, Kunde D a, Crawford A, Geraghty DP. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* [Internet]. 2007 Feb
239. Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, et al. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Aug 13
240. Chung M-K, Güler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* [Internet]. 2008 May
241. Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Mar 31
242. Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, Standaert DG, Corwin JT, et al. Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J Neurosci* [Internet]. 2003 May 15;23(10):4054–65.
243. Myrdal SE, Steyger PS. TRPV1 regulators mediate gentamicin penetration of cultured kidney cells. *Hear Res* [Internet]. 2005 Jun
244. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 4
245. Puopolo M, Binshtok AM, Yao G-L, Oh SB, Woolf CJ, Bean BP. Permeation and block of TRPV1 channels by the cationic lidocaine derivative QX-314. *J Neurophysiol* [Internet]. 2013 Apr

246. Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schäfer M, Schultz G, Schaefer M. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Aug 13
247. McCleskey EW. Neuroscience: a local route to pain relief. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 4
248. Hoque R, Malik AF, Gorelick F, Mehal WZ. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas* [Internet]. 2012 Apr
249. Berberat PO, Giese T, Csizmadia E, Kaczmarek E, Baker C, Halaceli I, et al. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2007 Jan
250. Vigna SR, Shahid RA, Liddle RA. Ethanol contributes to neurogenic pancreatitis by activation of TRPV1. *FASEB J* [Internet]. 2013 Nov 12
251. Schwartz ES, La J-H, Scheff NN, Davis BM, Albers KM, Gebhart GF. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J Neurosci* [Internet]. 2013 Mar 27
252. Greig AVH, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MH a, et al. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2003 Aug;121(2):315–27.
253. Seki S. Anti-Angiogenic Effect of P2X7 Receptor Antagonist Oxidized ATP as a Mechanism of Anti-Tumor Growth. *Pharm Anal Acta* [Internet]. 2012
254. Adinolfi B, Romanini A, Vanni A, Martinotti E, Chicca A, Fogli S, et al. Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2013 Oct 15

255. Shin DH, Kim OH, Jun HS, Kang MK. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. *Exp Mol Med* [Internet]. 2008 Oct 31
256. Caprodossi S, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Santoni M, et al. Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011 May
257. Garcia-marcos M, Pérez-Andrés E, Tandel S, Fontanils U, Kumps A, Kabré E, et al. Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J Lipid Res* [Internet]. 2006 Apr
258. Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, Cuif MH, et al. Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* [Internet]. 2009 Mar
259. Jansson ET, Trkulja CL, Ahemaiti A, Millingen M, Jeffries GD, Jardemark K, et al. Effect of cholesterol depletion on the pore dilation of TRPV1. *Mol Pain* [Internet]. 2013 Jan;9:1.
260. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp* [Internet]. 2010 Jan
261. Wang Z, Yang Y, Yang H, Capó-Aponte JE, Tachado SD, Wolosin JM, et al. NF- κ B feedback control of JNK1 activation modulates TRPV1-induced increases in IL-6 and IL-8 release by human corneal epithelial cells. *Mol Vis* [Internet]. 2011 Jan
262. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2011 Jan
263. Wang Y, Wang DH. Role of the transient receptor potential vanilloid type 1 channel in renal inflammation induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2013 Jan 1

264. Zhao J-F, Ching L-C, Kou YR, Lin S-J, Wei J, Shyue S-K, et al. Activation of TRPV1 prevents OxLDL-induced lipid accumulation and TNF- α -induced inflammation in macrophages: role of liver X receptor α . *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 Jan;2013:925171.
265. Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2007 Jul
266. Bruzzone S, Verderio C, Schenk U, Fedele E, Zocchi E, Matteoli M, et al. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones. *J Neurochem* [Internet]. 2004 Apr
267. Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2005 Aug
268. De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, et al. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J* [Internet]. 2006 Jan 11
269. Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. A “cute” desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011 Jan 1;12(1):122–9.
270. Raisinghani M, Pabbidi RM, Premkumar LS. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *J Physiol* [Internet]. 2005 Sep 15
271. Maggi C a, Bevan S, Walpole CS, Rang HP, Giuliani S. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1993 Mar;108(3):801–5.
272. Yamada A, Ohya S, Hirano M, Watanabe M, Walsh MP, Imaizumi Y. Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contractility induced by ruthenium red. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 Mar

273. Sasaki T, Naka M, Nakamura F, Tanaka T. Ruthenium red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Oct 25
274. Bhave G, Hu H-J, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Oct 14;100(21):12480–5.
275. Zou J, Vetreano RP, Crews FT. ATP-P2X7 receptor signaling controls basal and TNF α -stimulated glial cell proliferation. *Glia* [Internet]. 2012 Apr
276. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Jan 5
277. Barberà-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F, Pelegrín P. P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *FASEB J* [Internet]. 2012 Jul
278. Hussen J, Düvel A, Koy M, Schuberth H-J. Inflammasome activation in bovine monocytes by extracellular ATP does not require the purinergic receptor P2X7. *Dev Comp Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Oct
279. Zhang X-F, Han P, Faltynek CR, Jarvis MF, Shieh C-C. Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Res* [Internet]. 2005 Aug 2