

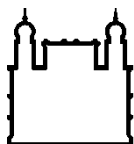
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE
SUBTIPO 1 SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOENDÓCRINO
ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE GLICOCORTICOIDES

LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA

Rio de Janeiro
Abril de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA

Papel do receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 sobre células do sistema imunoendócrino envolvidas na produção de glicocorticoides

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

Orientador (es): Prof. Dr. VINÍCIUS DE FRIAS CARVALHO
Prof. Dr. ROBSON XAVIER FARIA

RIO DE JANEIRO

Abril de 2018

GOMES BRAGA FERREIRA, LEONARDO .

PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE SUBTIPO 1 SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOENDÓCRINO ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE GLICOCORTICOIDES / LEONARDO GOMES BRAGA FERREIRA. - Rio de janeiro, 2018.

120 f.; il.

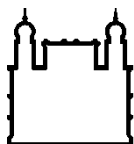
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: VINÍCIUS DE FRIAS CARVALHO .

Co-orientador: ROBSON XAVIER FARIA.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Esteroidogênese. 2. TRPV1. 3. P2X7. 4. Macrófago. 5. Adrenais. 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*

PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE SUBTIPO 1 SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOENDÓCRINO ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE GLICOCORTICOIDES

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. VINÍCIUS DE FRIAS CARVALHO
Prof. Dr. ROBSON XAVIER FARIA**

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carmen Penido Monteiro - *Presidente* (Fiocruz)

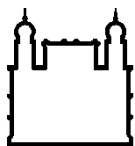
Prof. Dr. Ricardo Augusto de Melo Reis (UFRJ)

Prof. Dr. Wilson da Costa Santos (UFF)

Prof. Dr. Andrea Henriques Pons (Fiocruz)

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

Rio de Janeiro, 27 de Abril de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

AGRADECIMENTOS

Eis, o término de um ciclo de 10 anos, porque até aqui nos ajudou o Senhor. Primeiramente, dedico ao Grande Arquiteto Do Universo que sábia e poderosamente projetou toda a realidade, que se nos faz misteriosa. Ele nos impulsiona a descobertas infindáveis sob a Sua assinatura.

Agradeço à minha esposa, Solange, por ser a coluna inabalável e inesgotável na minha vida e por jamais me permitir fraquejar nestes anos. Agradeço às minhas filhas, Carol e Letícia, pois são preciosas dádivas que me foram dadas.

Agradeço a todos os pais, todos os quatro, e aos meus avós, Eurides e Pedro (*In Memoriam*) por todo o esforço ao longo da minha formação.

Agradeço à minha comunidade de fé, Primeira Igreja Batista de Copacabana, por me cobrirem em oração.

Agradeço aos meus orientadores de fato e àqueles que foram adotados por mim: Dr Robson Faria, Dr Vinícius Carvalho, Dr Luiz Anastácio Alves, Dr Ricardo Reis, Dr Marco Aurélio Martins, Dra Carmen Penido, Dra Andrea Henriques, Dumith Chequer e Dr Milton Ozório.

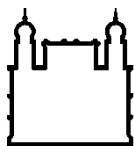
Agradeço a todos colaboradores que tive o prazer de conhecer e cooperar. Quero destacar a fundamental parceria estabelecida ao longo dos anos com Hércules Freitas, orientando do Dr Ricardo Reis do Laboratório de Neuroquímica (UFRJ) e Thadeu Costa, orientando da Dra Carmen Penido do Laboratório de Farmacologia Aplicada (Fiocruz).

Finalmente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular por auxiliar seus alunos com indubitável qualidade e excelência.

Agradeço às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) por serem financiadoras cruciais durante a minha trajetória.

“Post tenebras lux”.

Livro de Jó 17:12



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

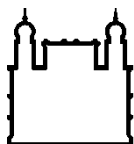
Fundação Oswaldo Cruz

PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE SUBTIPO 1 SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOENDÓCRINO ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE GLICOCORTICÓIDES

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Leonardo Gomes Braga Ferreira

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um complexo circuito de interação entre os componentes do sistema neuroimunoendócrino. Em vista da forte influência de vários estímulos, como o ciclo da claro e escuro, as endotoxinas e a fome, a adaptação dos organismos depende da atividade desse eixo, promovendo e mantendo níveis circulantes de glicocorticóides. Pela produção do hormônio adrenocorticotrófico hipofisário (ACTH), difundido através da circulação sanguínea, as glândulas adrenais promovem uma cascata de sinalização, que envolve segundos mensageiros, canais iônicos e outras estruturas, levando à esteroidogênese. Em paralelo, citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (circuito imuno-endócrino) também são capazes de induzir a produção de glicocorticóides, embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos. Neste contexto, os macrófagos poderiam participar da esteroidogênese por sua resposta a estressores, como o LPS e a hiperglicemia, que levam à produção de citocinas pró-esteroidogênicas. Uma vez que a ativação do receptor vanilóide transitório subtipo 1 (TRPV1), que é expresso neste tipo de célula, induz a produção de citocinas pró-esteroidogênicas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do TRPV1 neste contexto. Observamos que a expressão de TRPV1 é positiva em macrófagos e células de adrenais produtoras de glicocorticóides. Em seguida, avaliamos se TRPV1 seria funcional nesses tipos de células através de testes eletrofisiológicos e intracelulares de mobilização de cálcio e abertura de poro TRPV1 na membrana plasmática. Nestes ensaios, foi possível observar que o TRPV1 é funcional nestes tipos celulares e participa na liberação de IL-1 β induzida pelo receptor P2X7 em macrófagos. Em seguida, avaliou-se a participação de TRPV1 na produção de citocinas pró-esteroidogênicas *in vitro* e *in vivo*. Observamos que a combinação de LPS e produção induzida por ATP de TNF- α e IL-1 β *in vitro* por macrófagos foi inibida pela capsaicina, um agonista de TRPV1. No entanto, a própria capsaicina foi capaz de induzir a liberação de IL-6 e IL-10 por macrófagos *in vitro* por um mecanismo dependente da TRPV1. Por outro lado, a produção de corticosterona induzida por LPS foi inibida na proporção do aumento de doses de capsaicina nas células adrenais. A ativação do TRPV1 inibiu a hipertrofia característica das glândulas adrenais contra estímulos pró-esteroidogênicos. Finalmente, a ativação de TRPV1 aumentou a produção induzida por LPS de citocinas pró-esteroidogênicas TNF- α na cavidade peritoneal de camundongos. Portanto, Esses achados sugerem que a capsaicina inibe a produção de corticosterona induzida pelo LPS, atuando diretamente nas células adrenais produtoras de glicocorticóides, em um mecanismo provavelmente associado à indução de influxo de cálcio nessas células. Todos os procedimentos utilizados neste estudo estão de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética sobre Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, Licenças LW-23/11 e LW-33/12.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROLE OF THE TRANSIENT POTENTIAL RECEPTOR VANILLOID SUBTYPE 1 ON IMMUNOENDOCRINE SYSTEM CELLS INVOLVED IN THE PRODUCTION OF GLYCOCORTICOIDS

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Leonardo Gomes Braga Ferreira

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is a complex circuit of interaction between the components of the neuroimmunoendocrine system. In view of the strong influence of various stimuli, such as the dark-light cycle, endotoxins and hunger, the adaptation of organisms depends on the activity of this axis, promoting and maintaining circulating levels of glucocorticoids. From the pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH), diffusing through the bloodstream, the adrenal glands promote a signaling cascade, which involves the second messengers, ion channels and other structures, leading to steroidogenesis. In parallel, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 (immuno-endocrine circuit) are also capable to induce the production of glucocorticoids, although the mechanisms are not fully understood. In this context, macrophages could participate in steroidogenesis by their response to stressors, such as LPS and hyperglycemia, which lead to the production of pro-steroidogenic cytokines. Since the activation of the transient vanilloid receptor subtype-1 (TRPV1), which is expressed in this cell type, induces the production of pro-steroidogenic cytokines, the objective of this work was to evaluate the participation of TRPV1 in this context. We observed that the expression of TRPV1 is positive in macrophages and adrenocortical glucocorticoid-producing cells. Next, we evaluated if TRPV1 would be functional in these cells types through electrophysiological and intracellular calcium mobilization tests and opening of TRPV1 pore in the plasma membrane. In these assays, it was possible to observe that TRPV1 is functional in these cell types and participates in the release of IL-1 β induced by the P2X7 receptor in macrophages. Then, the participation of TRPV1 in the production of pro-steroidogenic cytokines *in vitro* and *in vivo* was evaluated. We noted that the combination of LPS and ATP-induced production of TNF- α and IL-1 β *in vitro* by macrophages was inhibited by capsaicin, an agonist of TRPV1. However, capsaicin itself was able to induce the release of IL-6 and IL-10 by macrophages *in vitro* by a mechanism dependent of TRPV1. On the other hand, the production of LPS-induced corticosterone was inhibited in proportion to the increase of doses of capsaicin in adrenal cells. In addition, the activation of TRPV1 inhibited the characteristic hypertrophy of the adrenal glands against pro-steroidogenic stimuli. Finally, the activation of TRPV1 inhibited the LPS-induced production of pro-steroidogenic cytokines IL-1 β and TNF- α in peritoneal cavity of mice. Therefore, the results obtained reveal an anti-steroidogenic potential of TRPV1 activation that would be important in contexts, such as metabolic syndromes as Cushing syndrome and Diabetes. All procedures used in this study are in accordance with the guidelines of the Ethical Committee on the Use of Laboratory Animals of the Oswaldo Cruz Foundation, Licenses LW-23/11 and LW-33/12.

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal | 16 |
| 1.1.1 | Adrenais..... | 18 |
| 1.2 | Macrófagos | 20 |
| 1.3 | Receptores de potencial transitório (TRPs)..... | 23 |
| 1.3.1 | Receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) | 25 |
| 1.3.2 | TRPV1 e Poros membranares..... | 28 |
| 2 | HIPÓTESE | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 36 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 36 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 36 |
| 4 | METODOLOGIA | 37 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Células da adrenal e macrófagos peritoneais expressam TRPV1 | 46 |
| 5.2 | Macrófagos expressam TRPV1 funcional | 49 |
| 5.3 | TRPV1 abre um poro membranares após ativação em macrófagos peritoneais de camundongos..... | 52 |
| 5.4 | Interação entre TRPV1 e P2X7..... | 62 |
| 5.5 | Células de adrenais expressam TRPV1 funcional..... | 72 |
| 5.6 | Ativação do TRPV1 inibe a esteroidogênese <i>in vitro</i> | 76 |
| 5.7 | Ativação do TRPV1 inibe a esteroidogênese <i>in vivo</i> | 77 |
| 6 | DISCUSSÃO | 81 |
| 7 | CONCLUSÃO | 91 |
| 8 | BIBLIOGRAFIA | 92 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Imagem representativa do Sistema Neuro-imunoendócrino | 17 |
| Figura 2 - Esquema das zonas medular e cortical em um corte da adrenal. | 18 |
| Figura 3 - Superfamília dos canais iônicos TRP encontrados em mamíferos. ... | 24 |
| Figura 4 - Esquema representativo da estrutura do TRPV1 e suas diferentes formas de ativação..... | 27 |
| Figura 5 - Esquema representativo de hipótese deste trabalho. | 35 |
| Figura 6 - Células adrenais murinas expressam TRPV1..... | 47 |
| Figura 7 - Macrófagos F4/80 ⁺ expressam TRPV1. | 48 |
| Figura 8 – Correntes induzidas a partir da ativação do TRPV1 em macrófagos em glia de Müller. | 50 |
| Figura 9 – Ativação do TRPV1 aumenta os níveis de cálcio intracelular em macrófagos..... | 51 |
| Figura 10 – TRPV1 promove a captação de brometo de etídeo em macrófagos F4/80 ⁺ | 54 |
| Figura 11 – Captação de Yopro1 em macrófagos F4/80 ⁺ é inibida pelo antagonista Ru-2. | 56 |
| Figura 12 - TRPV1 não induz a captação do corante fluorescente aniônico, a Fluoresceína em macrófagos peritoneais de camundongos. | 58 |
| Figura 13 – Captação de corante induzida pelo TRPV1 não leva à lise celular. | 59 |
| Figura 14 – Captação de corante induzida pelo TRPV1 não reduz a viabilidade celular..... | 59 |
| Figura 15 - Captação de corante induzida pelo TRPV1 não depende da participação de hemicanais, mas pode estar associada ao P2X7R..... | 61 |
| Figura 16 – Inibição cruzada entre antagonistas do TRPV1 na resposta iônica induzido pelo ATP em macrófagos..... | 63 |
| Figura 17 - Inibição cruzada entre antagonistas do P2X7R na corrente iônica induzida pela capsaicina em macrófagos peritoneais..... | 65 |
| Figura 18 - Antagonistas do TRPV1 inibem a ativação do P2X7R em macrófagos..... | 67 |
| Figura 19 – Antagonistas TRPV1 inibem poro do P2X7R em macrófagos peritoneais de camundongos..... | 68 |
| Figura 20 –TRPV1 inibe a liberação de IL-1 β e TNF- α em macrófagos. | 70 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 21 – Ativação TRPV1 em macrófagos induz a liberação de citocinas IL-6 e IL-10..... | 71 |
| Figura 22 - Ensaio de viabilidade baseado em resazurina na linha celular Y1.. | 72 |
| Figura 23 – Capsaicina, LPS e ACTH promovem aumento de Ca²⁺ intracelular em células Y1..... | 75 |
| Figura 24 - Capsaicina inibe a produção de corticosterona induzida por LPS <i>in vitro</i>. | 76 |
| Figura 25 - Capsaicina inibe a produção de corticosterona induzida por LPS em camundongos <i>Swiss webster</i>. | 77 |
| Figura 26 - Capsaicina inibe a hipertrofia das glândulas adrenais induzida por LPS em camundongos <i>Swiss webster</i>. | 78 |
| Figura 27 - Capsaicina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias..... | 79 |
| Figura 28 - Esquema representativo da hipótese atual..... | 90 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Resumo das características e propriedades biofísicas das principais proteínas de membrana estudadas | 30 |
|---|-----------|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ex

(GABA) Ácido gama-aminobutírico

(Ala) Alanina

(BBG) Brilliant Blue G

(Cap) Capsaicina

(SDS) Dodecilssulfato de sódio

(PAGE) Eletroforese em gel de poliacrilamida

(TGF- β) Fator de crescimento tumoral

(Gly) Glicina

(HPA) Hipotálamo-hipófise-adrenal

(CRH) Hormônio liberador de corticotrofina

(ACTH) Hormônio adrenocorticotrófico

(IFN) Interferon- γ

(LPS) Lipopolissacarídeo

(CALHM) Modulador de homeostático de cálcio 1

(NMDG⁺) n-metil d-glucamina

(Poros [Ca²⁺]) Poros induzido por aumento intracelular de [Ca²⁺]

(PFA) Paraformaldeído

(RIA) Radioimunoensaio

(TRP) Receptores de potencial transitório

(TRPV1) Receptor de potencial transitório vaniloide 1

(PBS) Salina tampão fosfato

(SFB) Soro fetal bovino

(VDAC mp) VDAC encontrado na membrana Plasmática

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um complexo circuito de interação entre os componentes dos sistemas nervoso, imune e endócrino (Figura 1). Praticamente todos os organismos vivem sob a forte influência dos ciclos claro-escuro criados pela rotação terrestre. Os organismos sentem essas mudanças externas regulares e sincronizam suas atividades físicas, como comportamento, ingestão alimentar, metabolismo energético, sono, atividade reprodutiva e função imune, a fim de aumentar suas chances de sobrevivência (1).

Este sistema regulador tem conexões de saída para vários órgãos e tecidos, que retransmitem informações a partir de um estímulo, como ocorre durante o ritmo circadiano (2). Vale ressaltar que este relógio biológico é altamente conservado em mamíferos, centralmente controlado pelos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos e influenciado pelos ciclos de dia e noite (3). Em adição ao controle central hipotalâmico, evidências apontam a participação de “relógios” periféricos regulados pelos chamados genes *clock* na síntese dos glicocorticoides, como é o caso do ritmo circadiano encontrado nas adrenais (4).

A regulação do eixo HPA se dá através de ajustes finos entre as cadeias sintéticas de hormônios e seus precursores (5). Nesses ajustes finos, os glicocorticoides recém-sintetizados inibem seus precursores à medida que os mesmos se ligam aos seus receptores encontrados no hipotálamo e na hipófise. Acontece, dessa forma, uma programação negativamente retroalimentadora, conhecida como *feedback* negativo (6). Embora a ativação do eixo HPA seja conhecida principalmente ao nível hormonal, ela pode ser modulada por produtos do sistema imune, como citocinas (7). Dessa forma, o eixo HPA é uma via essencial à convergência de múltiplos sinais endógenos e exógenos importantes para a manutenção fisiológica do organismo.

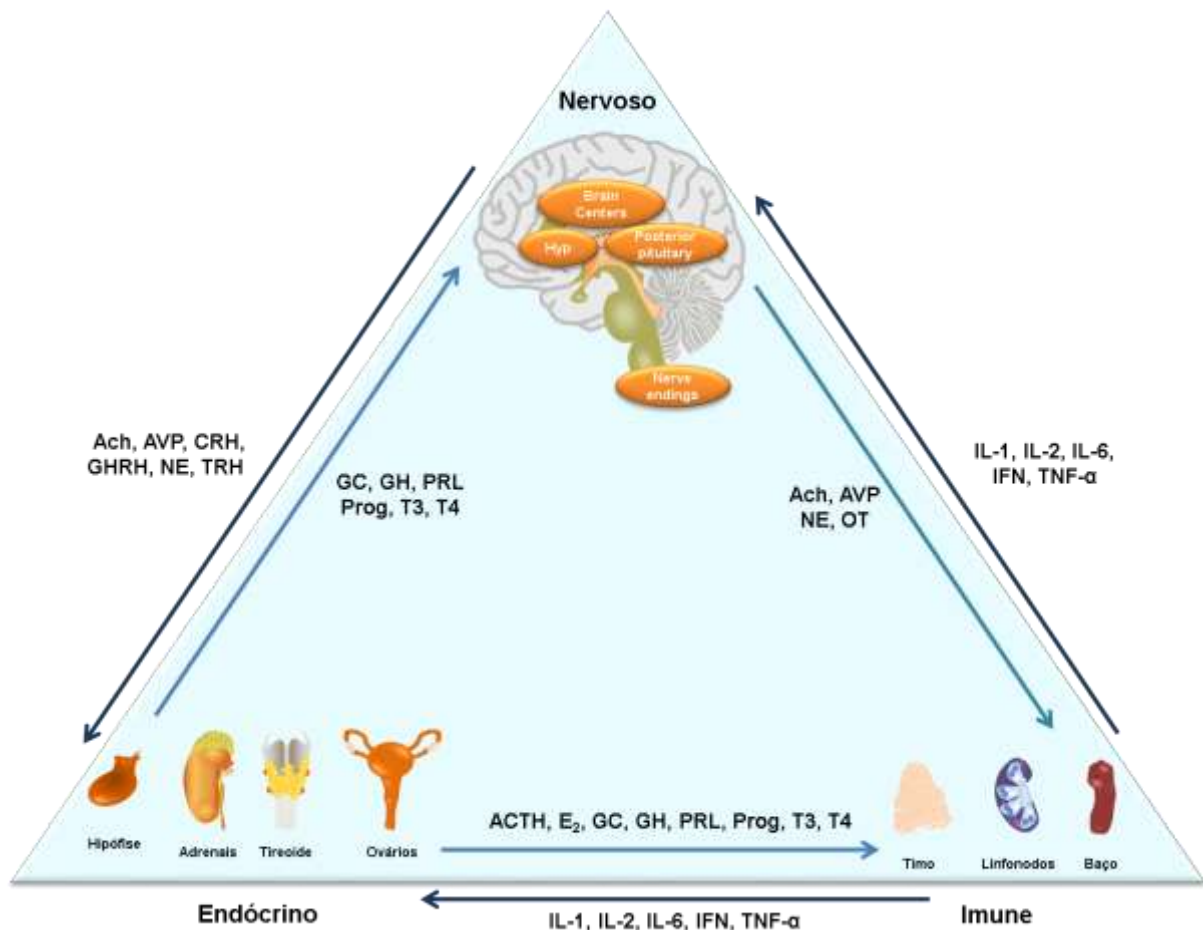


Figura 1 – Imagem representativa do Sistema Neuro-imunoendócrino

Adaptado de Adriana Ribeiro silva, Cassiano Gonçalves Albuquerque e Vinícius de Frias Carvalho, 2018 (não publicado)

Glicocorticoides atuam na regulação do metabolismo animal, possuem importante participação sobre o sistema imunológico e também sobre o comportamento (8–10). Eles são os principais hormônios relacionados à resposta adaptativa ao estresse. Estrutura-se um complexo controle homeostático que permite, por exemplo, que o organismo se prepare sob o ponto de vista energético e cardiovascular diante de uma situação de necessidade física (11).

A via de produção dos hormônios glicocorticoides obedece a uma sinalização orquestrada que é disparada no hipotálamo. Após um determinado estímulo, há a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) naquela região, o qual atua sobre o funcionamento da hipófise (glândula pituitária). Nessa glândula, o CRH mobiliza especialmente as células corticotróficas localizadas na região anterior dessa glândula. Em seguida, essas células produzem e secretam o hormônio

adrenocorticotrófico (ACTH), o qual atuará em diversos tecidos, em especial, na glândula adrenal (10).

1.1.1 Adrenais

O desenvolvimento das glândulas adrenais envolve dois tecidos embrionários: a crista neural e o mesoderma intermediário. Em humanos, seu aparecimento normalmente ocorre a partir do vigésimo oitavo dia após a concepção (12). Após o processo de diferenciação, a glândula adrenal apresenta-se diferenciada em duas regiões, a cortical e a medular.

A região cortical é subdividida em três zonas: glomerulosa, fasciculada e reticular, como mostra a Figura 2. Essas zonas são criticamente diferenciadas quanto aos tipos celulares presentes em cada área e quanto às moléculas sinalizadoras produzidas pelas mesmas (13).

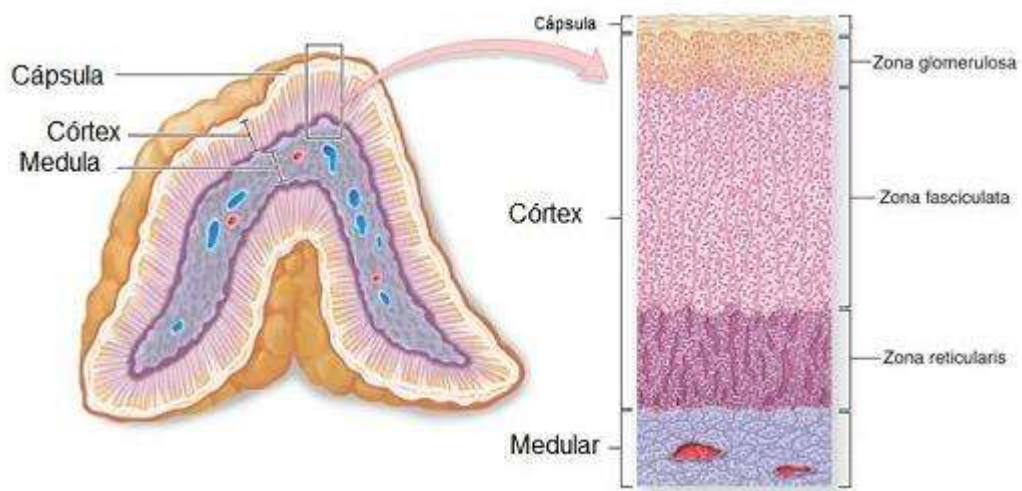


Figura 2 - Esquema das zonas medular e cortical em um corte da adrenal.

Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/glandula-suprarenal/>, acessado em 06 de Março de 2018.

A partir da cápsula em direção à medula, há a zona glomerulosa, que contém células especializadas na produção de aldosterona, o mais importante hormônio mineralocorticoide, responsável pelo equilíbrio osmótico do organismo. A zona reticulada é uma região anterior à medula e posterior à zona fasciculada e, é responsável pela produção de hormônios andrógenos, como a testosterona. A região medular, por sua vez, é originária da crista neural. Essa região é caracterizada pela presença, dentre outras, das células cromafins. Essas células apresentam uma extensa quantidade de grânulos, grandes núcleos e aparato de Golgi bem desenvolvido. As células cromafins são as principais produtoras de adrenalina no organismo.

A zona fasciculada, por sua vez, constitui a maior parte do córtex adrenal. As células presentes nessa região são grandes, organizadas em feixes, os quais levam o nome de fascículos. A zona fasciculada é a região intermediária da região cortical e responsável pela produção de hormônios glicocorticoides, como a corticosterona e o cortisol, principais moléculas glicocorticoides encontradas em murinos e humanos, respectivamente.

Em relação às células produtoras de glicocorticoides da zona fasciculada, há uma produção basal desses hormônios, porém podem ser estimulados a partir da secreção de ACTH produzida na hipófise, após um estímulo estressor, por exemplo. O ACTH se liga ao seu receptor MC2R, um tipo de receptor acoplado à proteína G presente na membrana plasmática. Subsequente à sua ativação, há um incremento dos níveis intracelulares de cAMP, com consequente ativação da proteína cinase A (PKA), o que leva a um aumento do influxo de cálcio intracelular que acarreta a liberação dos glicocorticoides por estas células (14). A mobilização desse segundo mensageiro é importante para a ativação de enzimas esteroideogênicas, incluindo a 11 β -hidroxi-esteróide desidrogenase tipo 1 (11- β HSD-1) e a proteína esteroideogênica reguladora aguda (StAR) (15).

A zona fasciculada também apresenta outros tipos celulares que, aparentemente, não estariam envolvidos na esteroideogênese. Ela contempla células do sistema imunológico, como os macrófagos, embora sua população seja rara (16,17). Contudo, não há trabalhos que abordem de forma contundente qualquer relação entre os macrófagos residentes nas adrenais quanto à produção de glicocorticoides. De forma geral, os artigos que relataram qualquer tipo de

informação sobre macrófagos em adrenais se limitaram às relações morfológicas e fenotípicas.

Como mencionado, estímulos estressores influenciam a ativação da via imunoendócrina do eixo HPA, sejam eles de origem viral (18,19), bacteriana ou parasitária (20). Diante de quadros assim, há uma intensa participação de células do sistema imune, que por sua vez liberam moléculas sinalizadoras que se difundem através da circulação. Como exemplos estão as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6. Estas podem levar a um aumento na liberação de glicocorticoides tanto por ação central quanto por atuarem diretamente nas adrenais (21).

1.2 Macrófagos

Os macrófagos são células multifuncionais encontradas em uma vasta quantidade de tecidos. Principalmente relacionadas ao seu papel na resposta imune desde que foram descritos pela primeira vez por Metchnikoff no final do século XIX (22). A sua origem ainda é controversa. Atualmente, se encontra a partir dos monócitos, como um subconjunto de glóbulos brancos circulantes capazes de se diferenciar em uma variedade de macrófagos e células dendríticas nos tecidos (23).

É preciso ressaltar que a multifuncionalidade dos macrófagos se deve à pluralidade fenotípica. Desde o início dos anos de 1990, sabe-se que a interleucina IL-4 induz mudanças no comportamento dessas células, diferentemente do que ocorre quando são ativados por interferon- γ (IFN) e lipopolissacarídeo (LPS) (24). Esses diferentes comportamentos são explicados devido às alterações na expressão genética.

Desde então, houve a preocupação de se classificar os macrófagos quanto à sua polarização. Nesse aspecto, Mills e colegas propuseram Macrófagos M1 e Macrófagos M2 (25). Os macrófagos de fenótipo M1 são classicamente conhecidos por suas funções pró-inflamatórias, alta atividade fagocítica e produção de citocinas com características pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α . Por outro lado, os macrófagos ativados alternativamente, os de fenótipo M2, que mantêm a capacidade fagocítica, estão envolvidos com ativação de IL-4 e o fator de crescimento tumoral (TGF- β). Embora essa classificação tenha obtido certo êxito, inclusive com a adição

de novas sub-terminações (M2a, M2b, M2c e M2d), a multiplicidade macrófagica a transcende (26,27).

Recentemente, alguns tipos celulares relacionados aos macrófagos foram estudados por sua expressão do TCR e CD169. O TCR é um receptor classicamente encontrado em células T. Por sua vez, o CD169 é um marcador geralmente encontrado na medula óssea, linfonodos e baço, dentre outros (28). Assim, é extrapolada a importância dos macrófagos, uma vez que a subpopulação de macrófagos CD169⁺ estaria envolvida na tolerância imune e na apresentação de antígenos (29). Além disso, os macrófagos TCRαβ⁺ são também encontrados em microambientes tumorais, o que gera importantes perguntas acerca do desenvolvimento tumoral (30).

Essas multiplicidades observadas em macrófagos poderiam estar envolvidas na regulação do eixo HPA. Em uma escala reducionista, quando há referências aos macrófagos M1, poderia se esperar que a ativação desse subtipo estivesse envolvida na estimulação do eixo HPA devido à sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias com capacidade pró-esteroidogênica, como IL-1β e TNF-α.

De fato, a relação com sistema imune se deve à sua intensa atividade fagocítica. Atualmente, tal característica é muito estudada levando-se em conta não somente a defesa do hospedeiro contra infecções, mas também como uma função de resolução. Nesse sentido, destacam-se a remoção de células apoptóticas e remodelação da matriz extracelular.

Contudo, os macrófagos se destacam cada vez mais ao exercer um papel muito mais geral, como no metabolismo sistêmico, na adaptação ao frio e desenvolvimento do tecido (31,32). Vale ressaltar que a função e o desenvolvimento adequados de alguns tecidos e órgãos, tais como o cérebro, os ovários e os ossos, são criticamente dependentes de macrófagos residentes nos mesmos (31,32). Além disso, macrófagos residentes nos tecidos também são capazes de “detectar” danos teciduais e orquestrar respostas para reparo desses tecidos (33). Quanto a esse aspecto resolutivo e reparador dos macrófagos, é possível citar alguns trabalhos em diferentes áreas, como aterosclerose (34), osteoporose (35), obesidade e diabetes tipo 2 (36,37), fibrose (38) e câncer (39).

Portanto, essas “novas” funções macrofágicas os transformaram de “especialistas” defensores antimicrobianos em um tipo de célula (ou grupos de células) multifacetada crucial no desenvolvimento de tecidos e homeostase em organismos complexos. Um caso a ser estudado seria o papel de macrófagos residentes na região cortical em adrenais, acima citado. Os macrófagos presentes nas glândulas adrenais em humanos foram descritos em 1994 (16). Embora as informações acerca desse tipo celular nas adrenais sejam parcas, elas exibiram um fenótipo CD11c⁺ e KiM8⁺. Ao nível ultra-estrutural, os macrófagos foram encontrados próximos à parede endotelial, assim como também se encontraram em contato direto com células corticais e cromafins (16). Nesse sentido, seria razoável esperar que as células macrofágicas potencialmente influíssem no metabolismo hormonal em ambos os níveis local e sistêmico, embora o primeiro careça de mais evidências.

É preciso ressaltar que os macrófagos são células com maquinaria celular capaz de produzir e liberar citocinas com características pró-inflamatórias/pró-esteroidogênicas. Algumas citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) liberadas por macrófagos ao ambiente extracelular se destacaram anteriormente por apresentarem atividade pró-esteroidogênica. Elas poderiam alcançar as células corticais tanto sistemicamente, quanto de forma parácrina. Além disso, é preciso citar que os macrófagos apresentam canais iônicos cuja ativação leva a diversos fenômenos celulares. Uma vez ativadas diante de um estímulo estressor, por exemplo, tais proteínas alteram os níveis de cátions importantes para a síntese de citocinas e de outras moléculas de sinalização, como sódio, potássio e cálcio intracelular.

1.3 Receptores de potencial transitório (TRPs)

As proteínas integrais conhecidas como canais iônicos são encontradas em membranas e respondem rapidamente a determinados estímulos, sejam extras ou intracelulares. Dentre os diferentes tipos de canais iônicos, destacamos aqueles ativados por ligantes.

Canais iônicos ativados por ligantes possuem alta seletividade aos seus ligantes, sejam ativadores ou inibidores, por exemplo. Uma vez formada a interação entre o ligante e seu sítio de ligação, há a formação de um complexo ligante-canal iônico. Nessa configuração, há uma mudança conformacional na estrutura do canal iônico que leva a um aumento da probabilidade de exposição da luz do canal e possibilita a passagem de íons (40). Como consequências, é possível observar diversas respostas celulares, tais como: as alterações osmóticas (41), a mobilização e a ativação de mensageiros intracelulares (42) e o início de um programa de morte celular (43–46).

Os receptores de potencial transitório (do inglês: *Transient Receptor Potential*, TRP) formam uma extensa família de canais iônicos capazes de serem ativados por diversas formas (Figura 3). A subfamília TRPC compreende sete membros e podem ser subdivididos em 3 subgrupos baseados em homologia e similaridades funcionais: TRPC1 / C4 / C5, TRPC3 / C6 / C7 e TRPC2 (pseudogene em humanos). TRPC1 forma canais heteroméricos com TRPC4 e TRPC5, mas se ele é funcional como homômero não é claro (47,48). A subfamília TRPV possui seis membros que podem ser amplamente divididos em canais catiônicos de baixa seletividade, como TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4, e canais que apresentam alta seletividade a Ca^{2+} , como TRPV5 e TRPV6. A subfamília TRPM contém oito membros que podem ser agrupados em 4 subgrupos: TRPM1 / M3, TRPM2, TRPM4 / M5, TRPM6 / M7 e TRPM8. O TRPM1 parece formar um canal intracelular (49) [10]. A subfamília TRPML possui três membros, TRPML1-ML3, e está principalmente expressa em compartimentos intracelulares (50). A subfamília TRPP compreende três membros, TRPP1, TRPP2 e TRPP3 (51). Os TRPPs não possuem vasto estudo sobre funcionalidade. Finalmente, o TRPA1 é o único membro da subfamília TRPA em mamíferos.

Destacam-se dentre essas formas as moléculas ligantes, a acidez extracelular e temperatura ambiental. O trabalho seminal acerca dos TRPs foi um estudo do aparelho visual de mutantes da espécie *Drosophila melanogaster*. Diferentemente ao encontrado em animais selvagens, os mutantes *trp* não são capazes de manter a despolarização de neurônios fotossensíveis a um estímulo luminoso e resulta numa despolarização transitória. Esse fenômeno contribuiu para a identificação dessa família de receptores (52).

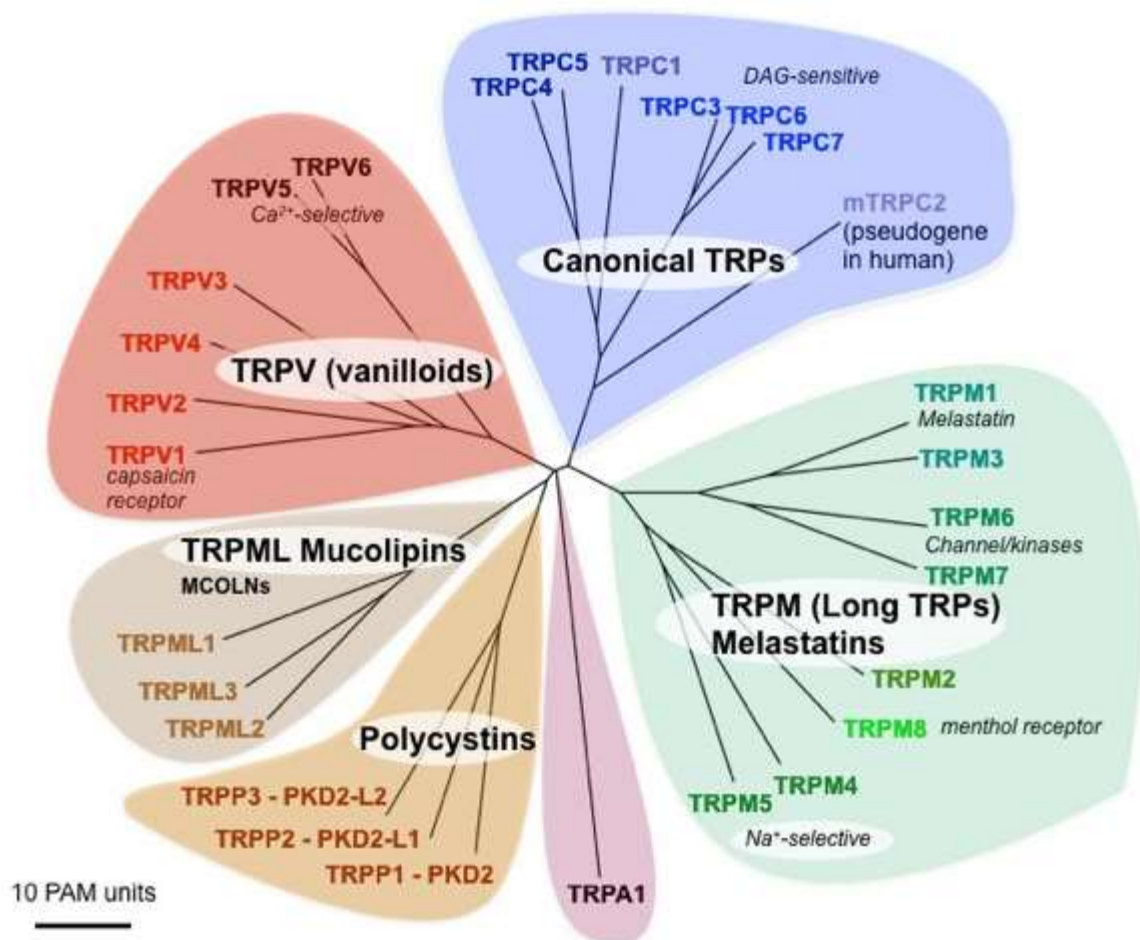


Figura 3 - Superfamília dos canais iônicos TRP encontrados em mamíferos.

Árvore genealógica dos canais iônicos TRP em mamíferos. Os comprimentos das ramificações em mutações aceitas de ponto (PAM, o número médio de substituições por 100 resíduos) mostram a distância evolutiva. Modificado de (52).

Todos os receptores TRP possuem 6 segmentos transmembranares e um alça formadora do poro do canal iônico entre o quinto e o sexto segmentos (53). As porções amino- e -carboxi terminal estão presentes na porção intracelular e contém diferentes domínios, que interagem com proteínas e ligantes. Uma característica em comum entre os TRPs é a sua cátion-seletividade. Eles são permeáveis a cátions mono e divalentes, como sódio, cálcio e magnésio.

É preciso ressaltar que a ativação dos TRPs promove o aumento dos níveis intracelulares de íons cálcio de origem tanto intra quanto extracelular. A origem intracelular se dá após a liberação de íons cálcio de estoques presentes no interior das células via receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), após estimulação de fosfolipase C (PLC). Por sua vez, o aumento dos níveis intracelulares de íons cálcio de origem extracelular ocorre através da abertura desses canais iônicos encontrados na membrana plasmática (54).

Outra característica desta superfamília são as diferentes 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 e alguns derivados do ácido araquidônico; diferentes faixas de temperatura; ferormônios; estresse mecânico (55). Por essas características peculiares e importantes fenômenos celulares, os TRPs atuam como “janelas celulares” (53–55).

1.3.1 Receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1)

Entre os receptores de potencial transitório da superfamília dos TRPs, destaca-se o receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), que foi caracterizado em 1997 (56). Esse receptor está envolvido em diversos fenômenos celulares, tais como: a nocicepção e a termorregulação do organismo (56).

O TRPV1 foi caracterizado inicialmente em estudos com células do tecido nervoso (56,57), como gânglio da raiz dorsal, o que o levou a ser considerado como uma proteína exclusiva do sistema nervoso. Contudo, um número crescente de trabalhos tem demonstrado a expressão do TRPV1 em células não neuronais (58–60), como células epiteliais (61), fibroblastos (62) e timócitos (63).

Semelhantemente ao que fora observado em outros TRPs, ele pode ser ativado por múltiplos estímulos, sejam físicos ou químicos. Podemos citar sua ativação por temperaturas elevadas (42-45°C) (64), acidez extracelular (pH<6,5) (65) e compostos endovanilóides (alguns endocanabinoides), alguns derivados do ácido araquidônico como anandamida e N-araquidonoil-dopamina, e exovaniloides, incluindo a capsaicina.

Em adição, seu funcionamento é modulado por mediadores inflamatórios, como a bradicinina e o ATP, o que o torna um agregador polimodal de múltiplos estímulos (66,67). Essa característica impulsiona um grande esforço na busca de novos fármacos, inclusive alguns em fase clínica (68–70).

O TRPV1 é um canal iônico (catiônico) não seletivo, ou seja, há uma preferência entre cátions monovalentes e divalentes. Contudo, a seletividade iônica aos íons cálcio depende da via de ativação e segue esta ordem decrescente de afinidade: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Uma vez ativado pela 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 (71). Nesse contexto, os resultados encontrados em experimentos em *patch clamp* demonstraram 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 seja 10 vezes maior (71,72).

A estrutura do TRPV1 foi revelada por criomicroscopia eletrônica a qual demonstra semelhança conformacional com os canais iônicos dependentes de voltagem (71,73). A massa molecular estimada é 95 kDa e esse canal iônico se apresenta como homotetramérico, cujas subunidades são formadas por 6 segmentos transmembranares. Além disso, suas porções C e N-terminais são intracelulares, como os demais TRPs. Ressaltam-se os quinto e sexto segmentos transmembranares, pois nessa porção encontra-se uma alça polipeptídica, e provavelmente o seu filtro de seletividade iônica (71,74,75). De modo geral, os TRPs conservam domínios de repetição de anquirina ao final do segmento. O TRPV1, por sua vez, apresenta três domínios de repetição de anquirina.

Esse fato é de grande importância à sua característica agregação polimodal de múltiplos estímulos (Figura 4). Na porção intracelular há diversos sítios de

interação a agonistas e moduladores, os quais influenciam a sensibilidade desse canal iônico. No segmento N-terminal, há o sítio de interação com moléculas de ATP. Interessantemente, esse sítio é compartilhado entre o ATP e a enzima calmodulina, conforme descrito nos resultados de cristalografia da região de repetições de anquirina (76). Esses dois componentes promovem ou atuam nas duas modalidades distintas de dessensibilização apresentada pelo TRPV1 aguda e taquifilaxia (76,77).

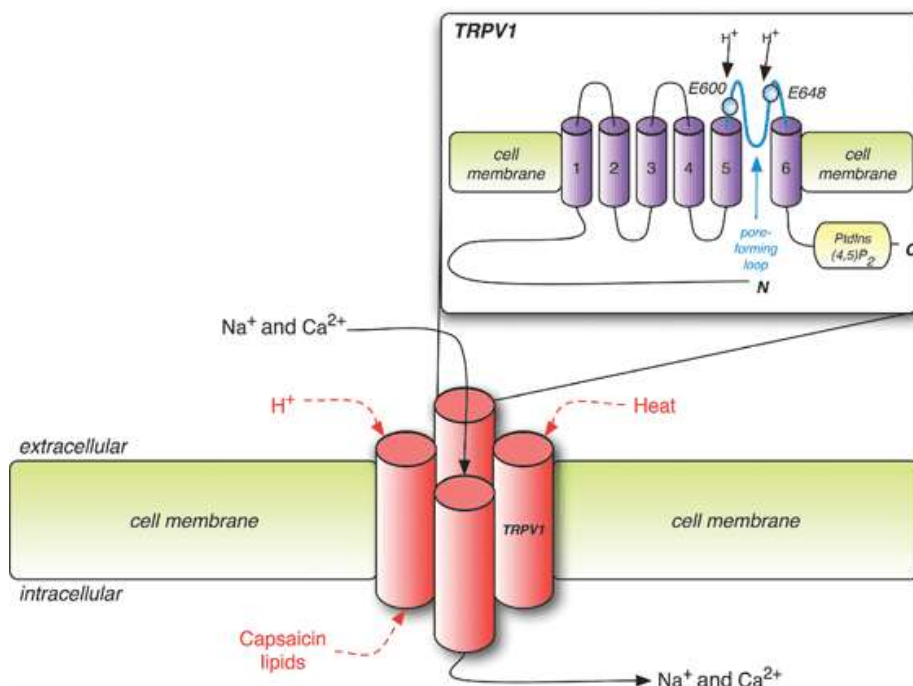


Figura 4 - Esquema representativo da estrutura do TRPV1 e suas diferentes formas de ativação.
(78).

Fisiologicamente, os perfis de dessensibilização exibidos pelo TRPV1 poderiam contribuir para a percepção à nocicepção de nervos sensoriais, uma vez que ele é fortemente expresso nesses tipos celulares. Logo, as informações obtidas acerca dos perfis de dessensibilização do TRPV1 podem explicar porque a capsaicina, ao ativar o TRPV1, resulta em dor primeiramente, seguida de seus

efeitos analgésicos (79). Por conseguinte, formulações com a capsaicina se encontram aprovadas para uso clínico, incluindo a neuralgia pós-herpética (80).

Como mencionado anteriormente, a molécula de ATP previne os eventos de taquifilaxia. Dessa forma, após a ativação do TRPV1, a hidrólise do fosfatidilinositol difosfato contribui para a dessensibilização. Há evidências de que o ATP também seja necessário para uma nova síntese do PIP2, o que contribui para a ressensibilização do receptor (81).

Em adição, o TRPV1 atua como uma plataforma de múltiplos estímulos. Vale ressaltar que outra forma de ativação se dá a partir da ativação de receptores acoplados à proteína G. Essa última via ativa a fosfolipase C, leva à hidrólise do PIP2 e gera IP3 e DAG (diacil glicerol). Por esse aspecto, alguns trabalhos demonstraram que o receptor purinérgico acoplado a proteína G, P2Y2R, ativou o TRPV1 por via intracelular, provavelmente por segundos mensageiros. Esses trabalhos demonstram que a ativação do P2Y2R foi capaz de potencializar a ativação e promover a ressensibilização do TRPV1 em neurônios (82–84).

1.3.2 TRPV1 e Poros membranares

O TRPV1 faz parte do grupo dos canais iônicos envolvidos na formação de um poro na membrana plasmática que promove a permeabilização de moléculas de elevado peso molecular (Tabela 1). É possível observar na tabela 1 que os poro transitórios formados apresentam similaridades quanto à condutância unitária, diâmetro do poro e, principalmente, no *cut off* apresentados. Uma vez ativado pela capsaicina, o TRPV1 forma um poro (canal iônico de alta condutância) na membrana plasmática (85). Embora não esteja definida até o momento uma estimativa de sua condutância iônica, durante a formação do poro associado ao TRPV1, a proporção entre os íons n-metil d-glucamina (NMDG⁺) e sódio que 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 sejam poucas as informações sobre essa estrutura formadora de poros (85). Contudo, os pontos a seguir mostram que provavelmente esse fenômeno ocorra através da dilatação do canal iônico do TRPV1.

Inicialmente, o diâmetro inicial do poro do canal iônico do TRPV1 foi avaliado através de criomicroscopia eletrônica, na qual constatou-se as variações do tamanho do diâmetro da luz do canal após sua ativação (73). A passagem do cátion orgânico NMDG⁺ foi dependente tanto da concentração quanto do tempo de exposição ao agonista. Além disso, as estimativas estruturais da luz do canal iônico, pela utilização de diferentes cátions de maiores pesos, revelam uma alteração dinâmica dessa passagem. Há um aumento do diâmetro inicial do poro, de 10 Å para 12,3 Å, ou seja, um aumento de 23%. A permeabilidade a grandes cátions orgânicos, na ordem de 900 Da, mostrou-se inversamente proporcional ao tamanho dos mesmos. Diante dessas características, calcula-se que tal fenômeno se desenvolve através de um aumento gradual do tamanho do poro de TRPV1 (85).

Tabela 1 - Resumo das características e propriedades biofísicas das principais proteínas de membrana estudadas

| Poros | Condutância unitária (pS) | Agonistas | Antagonistas | Cut off (Da) | Tamanho do poro (Å) |
|------------------------------|----------------------------|---|---|--------------|---------------------|
| Maxi-ânion | ~400 | ΔV_m ; $\Delta [NaCl]$; tamoxifeno | Iberiotoxina; ácido ocadáico; 17beta-oestradiol; AMPc; $GdCl_3$ | ~1000 | 30 |
| Poros Oncolítico/ citolítico | N.D. | Maitotoxina, ionomicina | Gly; Ala; bloq.gerais de Ca^{2+} calmidazolium | 900 | N.D. |
| TRPV1 | N.D. | Cap, RTX, $t(^{\circ}C) > 42^{\circ}C$; $pH < 6.0$ | AMG9810, Caz, Ru-2 | 900 | 19 |
| TRPA1 | N.D. | Isotiocianato de alila | Ru-2; HC300031 | 900 | 16 |
| Hemicanais | ~90 (Cx32); ~220 (Cx43) | $\downarrow [Ca^{2+}]_i$, $+V_m$; | $\uparrow [Ca^{2+}]_i$; carbenoxolona; heptanol; octanol | 1000 | 10-15 |
| Pannexina-1 | 500 | ΔV_m | Carbenoxolona; ácido flufenâmico | 1000 | 17-21 |
| CALHM | 24 | ΔV_m ; $[Ca^{2+}]_o$ | Gd^{3+} ; Ru-2; Zn^{2+} ; 2APB | 1000 | 14 |
| Maxi K+ (BKCa) | 200–400 | ΔV_m ; $\uparrow [Ca^{2+}]_i$; NS-1619 | Tetraetilamônio; iberiotoxina | N.D. | N.D. |
| VDAC mp | 400 | ΔV_m | Ácido ocadaico | 1000 | 25-30 |
| Poros $[Ca^{2+}]$ | 400 | ATP; ionóforos de cálcio | Calmodulina; antagonistas de PLC e MAPK (p38) | 900 | N.D. |
| P2X7 | 400 | ATP; BzATP; NAD; LL-37 | ATP oxidado; KN-62; BBG; A438079 | 1000 | 8-40 |

Legenda: Ala = alanina; Gly = glicina; Poros $[Ca^{2+}]$ = Poros induzidos por aumento intracelular de $[Ca^{2+}]$; Modulador de homeostático de cálcio 1 = CALHM; VDAC mp = VDAC (membrana Plasmática), BBG= Brilliant Blue G. Tabela adaptada de (86)

Ao longo dos últimos 10 anos, verificamos interessantes registros sobre as potencialidades do poro de TRPV1. Compostos derivados de poliaminas, como a espermina, são capazes de sensibilizar neurônios sensoriais e aumentar a atividade do TRPV1. Paralelamente, através da abertura do TRPV1, compostos derivados de estirila, comumente utilizados em marcações de vesículas sinápticas, e o antibiótico gentamicina foram capazes de permear a membrana plasmática (87–89). A acidez extracelular, também foi capaz de aumentar a captação de moléculas maiores, até 1000 Da. Vale ressaltar que a ativação do TRPV1 permite a passagem de prótons, que acidifica o meio intracelular e otimiza a passagem de NMDG⁺. Além disso, sob essa condição, houve favorecimento à entrada de anestésicos impermeáveis ao interior celular. Uma vez que são capazes de bloquear canais de sódio em neurônios sensoriais, tais resultados ratificariam o emprego do poro do TRPV1 como ferramenta terapêutica (90–92).

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 (92). É preciso ressaltar que o TRPV1 não é o único representante dos TRPs capaz de formar poros membranares (93).

Acerca de estudos sobre a interação entre o poro TRPV1 e outros poros na literatura, em concordância aos trabalhos anteriormente apresentados, descartamos a participação de hemicanais no poro TRPV1. Contudo, existem algumas evidências que sugerem que os poros TRPV1 e P2X7 de alguma forma se comunicam. Através das evidências biofísicas e funcionais compartilhadas, seria plausível a existência de interações entre esses canais iônicos e os poros associados (ou formados) pelos receptores P2X7 e TRPV1, embora não haja evidências até o momento de uma interação física. Vale ressaltar que para tal estudo de formação dos poros, a principal metodologia usada foi a captação de corantes hidrofílicos ao ambiente intracelular (94). Primeiramente, ambos receptores encontram-se expressos em tecidos comuns, como cenário neuroglial, uma vez que ambos são expressos em neurônios e células gliais, como astrócitos e micróglia (95). Assim, é possível que durante processos inflamatórios, nos quais há morte celular e acidificação do meio extracelular, eles estejam sensibilizados e comuniquem-se entre si.

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* (96). 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 (97). Vale ressaltar que *Lipid rafts* são regiões ricas em colesterol presentes na membrana plasmática, cuja função ainda permanece em aberto quanto à formação de poros na membrana plasmática. Contudo, sabe-se que elas executam importantes sinalizações intracelulares, como plataformas de sinalização. Em 2013, pesquisadores revelaram que o P2X7R em regiões não-*rafts* (pobres em colesterol) funcionariam como um canal catiônico permeável a pequenos cátions. Por outro lado, localizando-se em regiões *rafts*, ele seria capaz de formar o poro.

Em se tratando de TRPV1, células tratadas para tornarem-se pobres em colesterol, embora apresentem TRPV1, são incapazes de formar poros seja nas captações de NMDG⁺, seja de YOPRO-1 (630 Da). Interessantemente, a ativação do TRPV1 por vias diferentes, como acidez extracelular e capsaicina, foi comprometida em 50% e 70% respectivamente, embora a ativação por temperaturas elevadas não sofresse alteração (98).

É preciso ressaltar que o P2X7R participa de importantes fenômenos fisiológicos e patológicos. Ele é expresso em células do sistema imune como macrófagos e timócitos. Sua ativação leva à produção de espécies reativas de oxigênio (99). Além disso, a ativação do poro P2X7 está relacionada aos efeitos protetores antioxidantes do circuito neurônio-gliial da retina, através de mudanças nos níveis de cálcio na faixa milimolar e regulação da liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) (100).

O P2X7R também está relacionado à formação do complexo inflamassoma (101), maturação e liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β (102–106). Para isso, faz-se necessária uma sensibilização primária com LPS à célula estudada, seguido, portanto, da ativação por ATP. A IL-1 β possui um papel central em processos pró-inflamatórios e, inicia uma série de eventos e ativação de vias de ativação intracelular importantes. Um exemplo é 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 (107,108). Nesse sentido, existe um potencial modulador da ativação do P2X7R sobre a esteroidogênese, uma vez que este proporciona citocinas pró-esteroidogênicas. Vale ressaltar que o sistema purinérgico se faz importante nesse processo. A expressão de diferentes tipos de receptores purinérgicos e vias de liberação de ATP ao meio extracelular também foram descritas.

Uma vez que a ativação dos receptores purinérgicos mobiliza e aumenta as concentrações de cálcio intracelular e de citocinas importantes à esteroidogênese (109,110), é importante frisar algumas informações em comum entre P2X7R e TRPV1. Ambos são canais iônicos permeáveis a íons cálcio, estão relacionados à liberação de citocinas importantes na esteroidogênese e são coexpressos em muitos locais, tais como região cortical das adrenais (111,112), macrófagos (113,114) e hipotálamo (115,116). Portanto, existe a possibilidade de comunicação entre ambos receptores e essa comunicação refletir em alterações na esteroidogênese.

2 HIPÓTESE

As informações até então descritas demonstram a possibilidade de uma rede de comunicação entre o TRPV1 e o P2X7R no sistema imunoendócrino. Isso se aplicaria uma vez que a ativação de ambos receptores leva à produção de citocinas pró-esteroidogênicas. Além disso, a expressão do TRPV1 foi observada na região cortical de adrenais de coelhos (112), assim como a do P2X7R nas de ratos (111). Diante dessas informações, é importante estudar como a ativação do TRPV1 influi positivamente sobre a esteroidogênese induzida por endotoxina, tanto local quanto sistemicamente. Uma vez descrita a expressão do TRPV1 na região cortical, a ativação desse canal iônico levaria a um aumento de cálcio intracelular, o que pode contribuir para a esteroidogênese. Por outro lado, a inter-relação entre P2X7R e TRPV1 poderia influenciar na liberação de outras substâncias pró-esteroidogênicas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Portanto, nossa hipótese central sugere que a ativação do TRPV1 teria relevância pró-esteroidogênica e, conseqüentemente, pró-resolutiva durante um processo inflamatório, conforme o esquema abaixo (Figura 5).

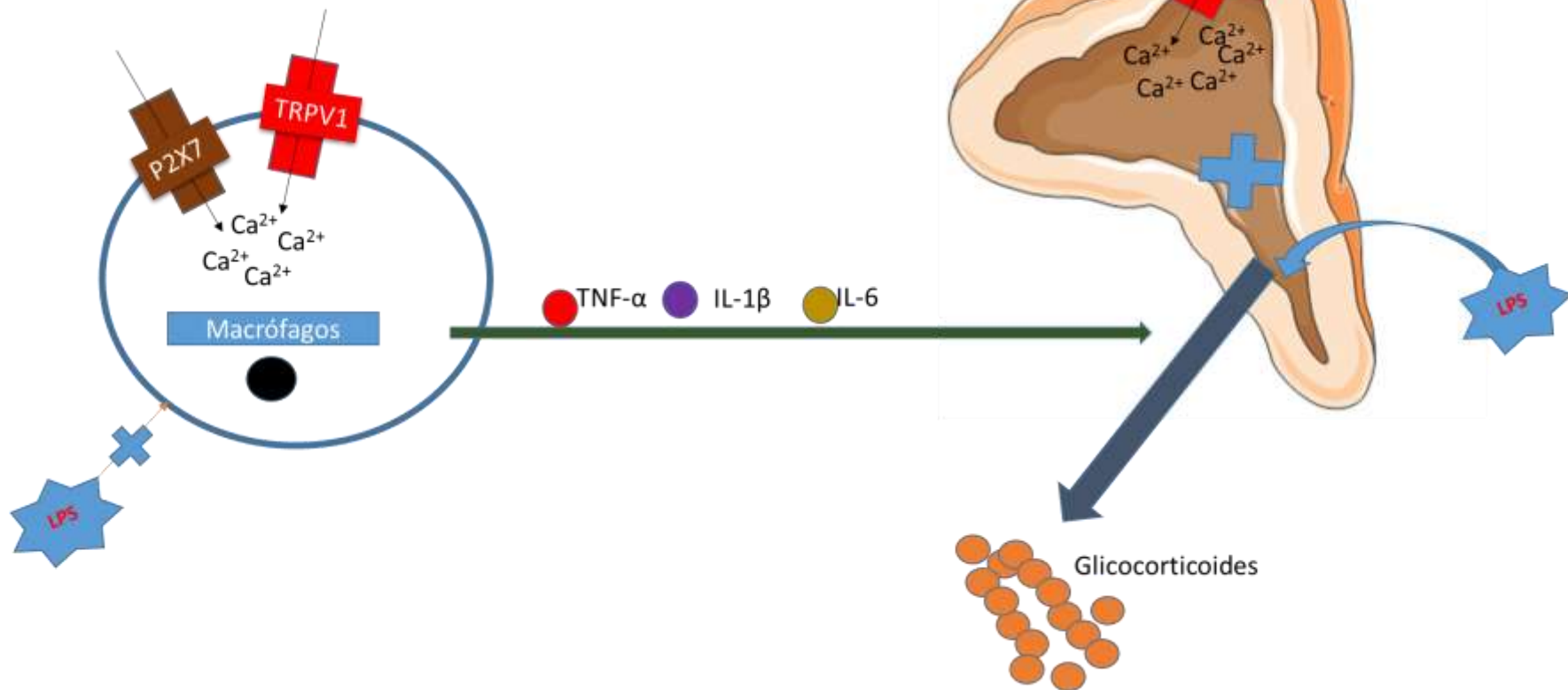


Figura 5 - Esquema representativo de hipótese deste trabalho.

Macrófagos peritoneais ativados por LPS produzem TNF- α , IL-1 β e IL-6 que induzem células da adrenal a produzir glicocorticoides. A ativação dos canais iônicos P2X7 e TRPV1 favoreceriam esse processo tanto nos macrófagos quanto nas células de adrenal. Neste sentido, os íons Ca²⁺ exerceriam papel fundamental na produção de glicocorticoides, uma vez que já foram vistos anteriormente como participantes na esteroidogênese. Paralelamente, a esteroidogênese induzida por LPS nas adrenais diretamente também seria favorecida com a ativação do TRPV1 na região cortical da glândula adrenal. Nessa etapa, o aumento de cálcio intracelular favoreceria a esteroidogênese, devido à importância desse cátion durante o processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a participação do TRPV1 na ativação de células imunes e endócrinas envolvidas na esteroidogênese.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar o perfil de expressão do TRPV1 na glândula adrenal, macrófagos e células imortalizadas da adrenal que produzem glicocorticoides;
- 2- Caracterizar farmacológica e biofísicamente o canal/poro de alta condutância ativado pela capsaicina via ativação do receptor TRPV1 em macrófagos;
- 3- Avaliar a participação de outras proteínas formadoras de poros na formação do poro ativado pela capsaicina via TRPV1 em macrófagos;
- 4- Investigar farmacológica e funcionalmente a participação do TRPV1 sobre a produção de glicocorticoides em linhagens de células adrenais murinas;
- 5- Avaliar a participação do TRPV1 na produção de glicocorticoides e citocinas após administração de LPS intraperitoneal em camundongos.

4 METODOLOGIA

4.1. Cultura de células

4.1.1. **Linhagem celular Y1 (adrenal):** As culturas foram utilizadas até a 20^a passagem em meio de cultura DMEM F12K com soro de cavalo (15%) e soro fetal bovino (2,5%). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as garrafas de cultura foram passadas após a cultura atingir 90% de confluência. As passagens foram feitas através de dissociação enzimática com solução de tripsina/EDTA, de acordo com as recomendações da ATCC.

4.1.2. **Culturas de macrófagos peritoneais:** As culturas foram feitas a partir de lavado peritoneal de camundongos *Swiss webster* machos. A cultura foi purificada após uma etapa de pré-adesão e cultivada em meio de cultura DMEM com soro fetal bovino (10%). Previamente aos ensaios com macrófagos, o meio foi trocado por DMEM sem adição de soro.

4.1.3. **Cultura de Glia de Müller:** As culturas foram obtidas de pinto para os experimentos de permeabilização em microscopia de fluorescência. As células de glia de Müller de retina obtidas 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.

4.2. **Imunocitoquímica:** As células Y1 e os macrófagos peritoneais foram cultivados em lamínulas de vidro em meio apropriado. A placa foi deixada em repouso em estufa por 24h. Após esse período, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS para remoção 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 foram: anticorpo policlonal, produzido em coelho contra camundongo, anti-TRPV1 (Santa Cruz -R-130) 1:100 e anti-F4/80 anticorpo produzido em burro contra camundongo. 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 foram: IgG anti-coelho marcada com Alexa 488 (Molecular Probes, Oregon, USA) e IgG anti-burro conjugado com Alexa 594 1:100 (Molecular Probes, Oregon, USA), de acordo com as instruções do fabricante. 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.

4.3. **Western Blot:** As culturas de células de adrenal foram lavadas duas vezes em salina tampão fosfato (PBS), homogeneizada na presença de inibidores de protease e submetidos a dodecilssulfato de sódio (SDS) - eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas de forma breve com Vermelho de Ponceau, lavadas com um tampão apropriado e pré-incubado com 5% de caseína e 1% de albumina de soro bovino (BSA) durante 2 horas (temperatura ambiente) em um agitador. As membranas foram lavadas com tampão Tris contendo Tween 20 e incubadas com o anticorpo primário policlonal, produzido em coelho contra camundongo, anti-TRPV1 (Santa Cruz -R-130) 1:100 e anti-GAPDH (anticorpo primário policlonal, produzido em coelho contra camundongo) a 4 °C durante a noite sob agitação. Anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Sigma) foram utilizados para revelar a banda de proteína correspondendo a cada um dos pesos moleculares esperados da proteína de interesse, utilizando-se do ECL-plus (Pharmacia-Amersham, UK).

4.4. **Imuno-histoquímica:** As glândulas adrenais foram imediatamente dissecadas após perfusão de camundongos com solução salina estéril a 0,9%. As adrenais foram rapidamente removidas dos camundongos e limpas da gordura

circundante. Logo após a dissecação, as glândulas foram fixadas em Milloning e incorporadas em parafina. Seções de parafina de 3 µm de glândulas adrenais foram desparafinadas com xileno, reidratadas por uma série de lavagens de etanol graduadas e fervidas em tampão citrato de sódio (10 mM, pH 6,0) à temperatura de 95 °C durante 15 minutos, com o intuito de realizar a recuperação de antígenos. As seções de tecido foram incubadas com 3% de H₂O₂ em metanol durante 20 minutos para bloquear as peroxidases endógenas. Para evitar a ligação não específica, as seções foram então incubadas durante 3 horas com uma solução contendo 2,5% de albumina de soro bovino (BSA), 8% de soro bovino fetal (FBS) e 1% de leite não dissolvido em solução salina tamponada com Tris enriquecida com 0,1% Tween 20 (TBST). Após o bloqueio, as seções foram incubadas com anticorpo policlonal, produzido em coelho contra camundongo, anti-TRPV1 (Santa Cruz -R-130) 1:100 ou anti-GAPDH (abcam– ab9485) 1:10000) diluídos em TBST com 1% de BSA durante a noite a 4 °C. Em seguida, a ligação do anticorpo primário foi detectada após a incubação de seções com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-coelho IgG HRP, R & D System, Minneapolis, MN, EUA) durante 2,5 h, seguido de uma exposição de 20 minutos a o substrato HRP 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). As seções foram lavadas com TBST entre todas as etapas e fracamente contrastadas com hematoxilina para identificação fácil das estruturas teciduais. Finalmente, as seções de tecido foram montadas em meio aquoso e imagens digitalizadas através de microscópio scanner (Pannoramic SCAN150, 3D Histech, Budapeste, Hungria) utilizando uma lente objetiva de 20x. As imagens obtidas da zona fasciculada do córtex adrenal foram analisadas com o software Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics).

4.5. Imageamento de cálcio: As variações de cálcio foram avaliadas individualmente em macrófagos peritoneais de camundongos e células Y1. Este protocolo é uma variação do protocolo de Agasse e colaboradores (72) conforme descrito em De Melo Reis e colaboradores (73). Tanto macrófagos peritoneais quanto células Y1 foram adicionadas em placas de 24 poços. Após 70% de confluência, foram realizadas três lavagens com PBS, foi adicionado aos poços meio de cultura apropriado. A placa foi deixada em repouso em estufa por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As células foram carregadas com 5 µM de Fura-2/AM (Molecular

Probes, Oregon, USA), 0,1% de BSA, 0,02% de ácido plurônico F-127(Molecular Probes, Oregon, USA) e 1 mM de probenecida (Sigma-Aldrich) em solução de Krebs (132 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,4 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 6 mM glicose, 10 mM HEPES, pH 7,4). Elas foram 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. 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. Foi usado 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.

4.6. **Eletrofisiologia:** 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 resumida, 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*. Após esse estágio, uma nova sucção foi realizada, a fim de se romper apenas a região inscrita à micropipeta de vidro. Esse novo estágio se chama *whole cell*. Todas as correntes obtidas e dispostas neste trabalho são provenientes de configuração *whole cell*. As pipetas utilizadas para o experimento na configuração *cell attached* são preparadas de capilares de borossilicato com filamento 1,2 mm (World Precision Instruments, Inc; New Haven, EUA), utilizando um puxador de pipetas (Microelectrode Puller, Narishe Group, NY, U.S.A.). As células foram

aconditionadas, em temperatura ambiente, em placas de petri de 35 mm 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 nas células através de um sistema de perfusão e suas concentrações variaram de nanomolar até milimolar de acordo com o protocolo usado (95).

4.7. Análise da participação de proteínas formadoras de poros durante a abertura do poro associado ao TRPV1 em macrófagos: Realizamos pré-tratamentos com antagonistas de outras proteínas formadoras de poros em concentrações crescentes (1 nM-100 µM) na presença de macrófagos peritoneais murinos por 10 minutos. Após esses períodos, as células foram estimuladas por 30 minutos com capsaicina em meio a um corante impermeável (menores que 900 Da) à membrana plasmática. Os corantes utilizados para essa finalidade foram: brometo de etídeo (2,5 µM), YOPRO-1 (1 µM) e fluoresceína (10 µM). Em seguida, visualizamos as células com o seu conteúdo intracelular fluorescente em um microscópio de fluorescência invertido. A quantificação da captação de corante foi realizada ao submeter as células tratadas à citometria de fluxo.

4.7.1. Avaliação da formação de poros em citometria de fluxo: As células foram coletadas da cavidade peritoneal e foram incubadas com brometo de etídeo (ou Yopro1, quando necessário) por 5 minutos anteriormente à adição de ATP ou capsaicina, na presença ou não de diferentes bloqueadores em salina. A composição de 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) (10^6 células / mL). Os comprimentos ondas utilizados na excitação e emissão foram, respectivamente: $\lambda_{\text{excitação}}$ 488 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$ 585 nm (brometo de etídeo) e $\lambda_{\text{emissão}}$ 509 nm (Yopro-1).

4.8. Participação do TRPV1 na esteroidogênese por células Y1 *in vitro*:

Células Y1 (5×10^5 células) foram incubadas com capsaicina (1-25 μM) e/ou LPS (10 μM) *in vitro* por (24h). Após incubação, o sobrenadante da cultura foi utilizado para quantificação de corticosterona por RIA, seguindo as diretrizes do fabricante (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA). Brevemente, este é um ensaio competitivo entre o hormônio apresentado na amostra e o hormônio marcado com radioisótopo (I^{125}) para se ligar a um anticorpo específico. Por isso, um aumento na quantidade de hormônio na amostra conduz a uma diminuição correspondente na fração do hormônio marcado ligado ao anticorpo. A quantificação da radioatividade foi realizada utilizando um contador gama (ICN Isomedic 4/600 HE, ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, EUA), e a quantidade de corticosterona em amostras foi calculada por interpolação a uma curva padrão realizada em paralelo.

4.8.1. Participação do TRPV1 na ativação do eixo imunoendócrino *in vivo*:

Camundongos *Swiss-webster* foram estimulados com capsaicina (0.02–2 mg/kg, i.p.) e 2 horas depois o sangue foi recolhido para quantificação de corticosterona por RIA no plasma. Os animais foram eutanasiados em uma câmara de CO_2 e o sangue foi imediatamente coletado da aorta abdominal com solução salina heparinizada (400 U/mL). O plasma foi obtido após centrifugação da amostra durante 10 min a 1000x g e armazenado a -20°C até a utilização. Os níveis plasmáticos de corticosterona foram detectados por radioimunoensaio (RIA), seguindo as diretrizes do fabricante (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA).

4.9. Produção de citocinas *in vitro*:

4.9.1. **Macrófagos peritoneais de camundongos:** Dois ensaios distintos envolvendo macrófagos foram realizados.

4.9.1.1. Células (5×10^5 células) foram plaqueadas em placas de 96 poços transparentes, submetidos aos tratamentos diversos. As células não primadas com LPS foram tratadas com capsaicina (100 μM) por 24 horas, na presença ou ausência de antagonistas. Em seguida, a placa foi centrifugada a 500x g 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 citocinas dosadas foram IL-6, TNF- α e IL-10 e as leituras foram realizadas por citometria de fluxo (BD FACS Calibur).

4.9.1.2. Dessa vez, os macrófagos (5×10^5 células) foram primados de acordo com Le Feuvre RA e colegas (117). Rapidamente, as células foram primadas com LPS 100 ng/mL por 2 horas. Após esse período, as células foram tratadas com ATP 1mM e antagonistas quando necessário. Os kits de ensaio de imunoabsorção enzimática comercial (ELISA) foram utilizados para a medição de citocinas presentes nos sobrenadantes (38). Resumidamente, os sobrenadantes resultantes foram isolados após centrifugação (10000x g, 15 minutos, 4 °C). As amostras foram quantificadas por ELISA, usando kits comercialmente disponíveis (IL-1 β , TNF- α , DuoSet, R&D Systems, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.10. **Detecção de citocinas *in vivo*:** Sobrenadante de lavado peritoneal dos camundongos tratados com diferentes concentrações de capsaicina e estimulados com LPS (100 ng/can, i.p.) foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de IL-1- β e TNF- α por ELISA. Os kits de ensaio de imunoabsorção enzimática comercial (ELISA) foram utilizados para a medição citocinas presentes nos sobrenadantes sem células (38). Resumidamente, os sobrenadantes resultantes foram isolados após centrifugação (10000x g, 15 min, 4 °C). As amostras foram quantificadas por ELISA

usando kits comercialmente disponíveis (IL-1 β , TNF- α , DuoSet, R&D Systems, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.11. RNA de Interferência: O ensaio de captação de corante utilizando RNAi foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (*Invitrogen set of 3 RNAi for pannexin-1*). Rapidamente, os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com 2 μ g / 3 mL da solução de trabalho de RNA de interferência para pannexin-1. Em seguida, as células foram tratadas com 4 μ L / 1 mL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em meio isento de soro (Opti-MEM). Após 16 horas, os reagentes de transfecção foram removidos e substituídos por meio DMEM com 10% SFB; 24 horas mais tarde, foram realizados os experimentos. A avaliação da eficácia da transfecção foi avaliada em procedimentos descritos por Vianna e colaboradores (118)

4.12. Medida da liberação de lactato de-hidrogenase (LDH): Macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços transparentes, submetidos aos tratamentos diversos após 24 horas em cultura. Em seguida, a placa foi centrifugada a 250x g por 5 min para a coleta do sobrenadante de cada poço contendo um tratamento. O sobrenadante extraído dos poços dos tratamentos foi adicionado ao substrato alumén férrico presente no kit de detecção de LDH (Doles, Goiás, Brasil). Após atingir a temperatura de 37°C, foi adicionado NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) à mistura feita anteriormente. À 37°C, após 5 min, foi adicionada a solução de parada para posterior leitura feita em um leitor de placa ($\lambda=510$ nm) e os dados analisados através do software Spectramax M5 (Molecular Devices, San Jose, California, USA) States).

4.13. Análise da redução da Resazurina: A análise da redução da Resazurina foi realizada de acordo com o trabalho apresentado por Riss e colegas (119). Macrófagos peritoneais e células Y1 foram plaqueados em placas de 96 poços transparentes, submetidos aos tratamentos diversos, após 24 horas em cultura. Uma solução de trabalho de resazurina (0,03 mg/mL) foi adicionada a cada poço. A incubação levou 4 horas a 37 °C. Ao final desse período, as análises de

fluorescência foram realizadas usando um conjunto de filtro de emissão de excitação de 560 nm / 590 nm através do Spectramax M5 (Molecular Devices).

4.14. Análises estatísticas: Todos os dados de microscopia de fluorescência foram analisados utilizando o ImageJ 1.46a (NIH). 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 GraphPad PRISM 5 (San Diego, California, USA). O valor de significância adotado foi alfa menor do que 5 % ($P < 0,05$). Em casos de uma distribuição não normal, usou-se teste de Kruskal-Wallis seguindo do pós-teste de Dunns. Quando solicitado, utilizou-se o Teste- t, no qual o valor de significância adotado foi alfa menor do que 5 % ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Células da adrenal e macrófagos peritoneais expressam TRPV1

Primeiramente, realizamos ensaios de imuno-histoquímica em cortes das adrenais de camundongos para avaliar a distribuição do TRPV1 na zona fasciculada. De fato, constatamos uma distribuição difusa de células positivas para o TRPV1 (Figura 6A). Paralelamente, a linhagem murina Y1 (oriunda da zona fasciculada) foi submetida aos ensaios de *western blot* e imunofluorescência, através dos quais se confirmou a marcação positiva para TRPV1 (Figura 6). É necessário ressaltar que a marcação difusa apresentada na imunofluorescência está de acordo com o encontrado na literatura. O peso molecular detectado no ensaio de *western blot*, em torno de 100 kDa, o que confirma a presença de TRPV1 em células de adrenais. De forma semelhante, realizamos experimentos para confirmar a expressão de TRPV1 em macrófagos peritoneais, ampliando os dados existentes na literatura, que já demonstraram sua presença em outras populações de macrófagos (120–122). Desse modo, observamos, através de ensaios de imunofluorescência, que macrófagos peritoneais também expressam TRPV1 (Figura 7). É possível observar sobreposição entre as marcações positivas para F4/80 e TRPV1. Vale ressaltar que o padrão de expressão do TRPV1 encontrado foi predominantemente intracelular, fato semelhante aos outros trabalhos já descritos na literatura (123,124).

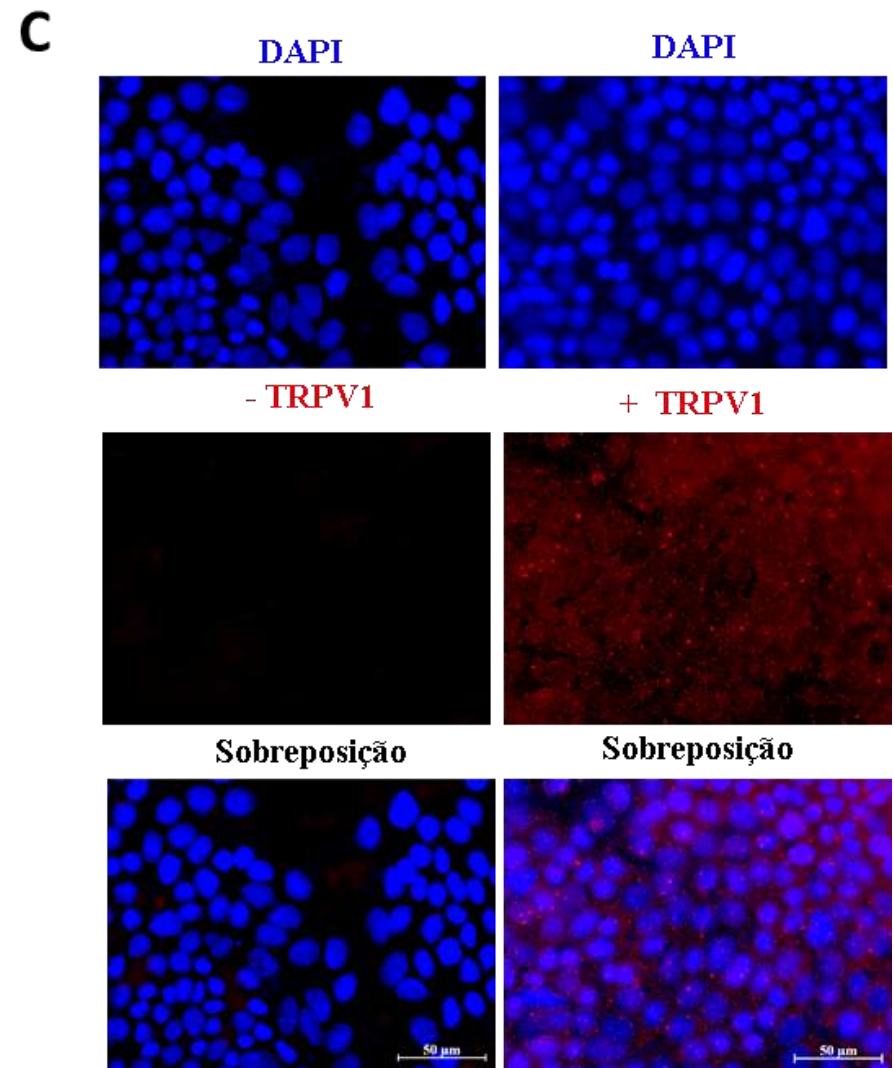
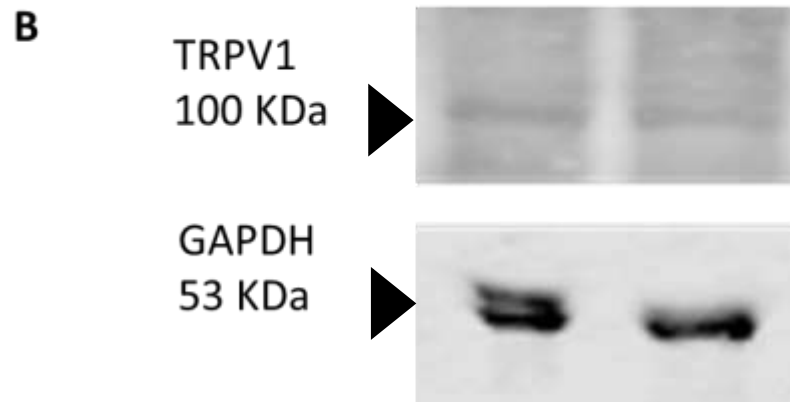
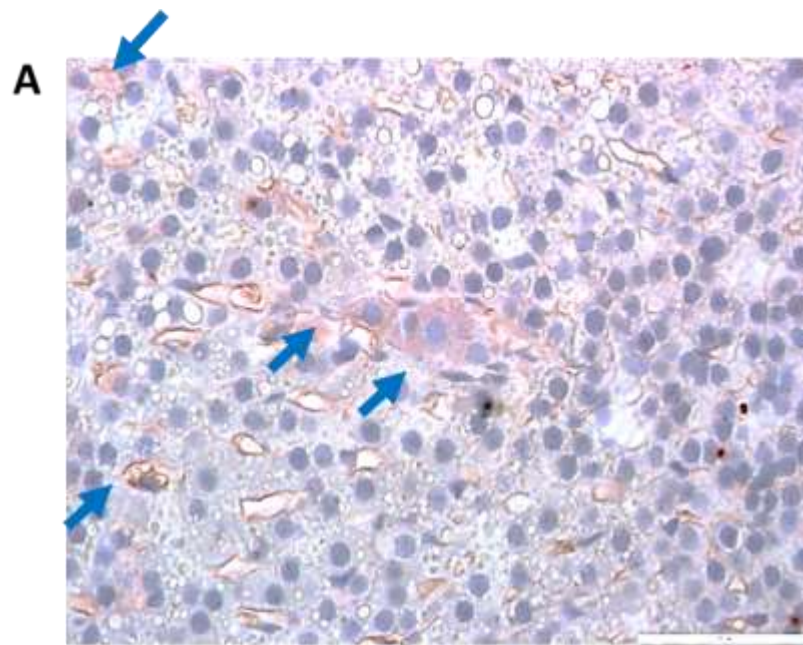


Figura 6 - Células adrenais murinas expressam TRPV1.

(A) imagem representativa da zona fasciculada mostra (seta azul) a presença de células positivas para TRPV1. (B) Figura representativa de Western Blot em linhagem Y1 mostra a presença de TRPV1 (100 kDa) (C) Figura representativa de imunofluorescência em Y1. TRPV1 em vermelho, DAPI em azul.

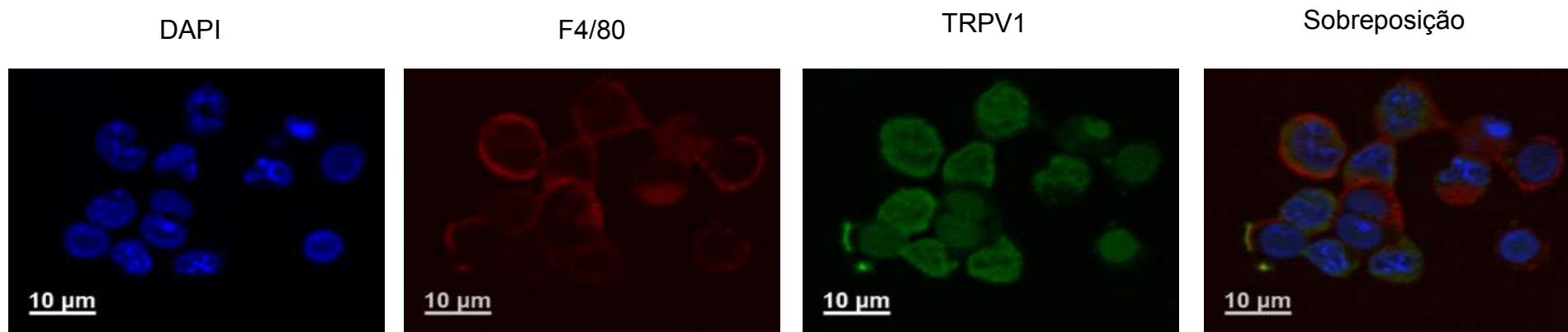


Figura 7 - Macrófagos F4/80⁺ expressam TRPV1.

Macrófagos extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 30 minutos, eles foram marcados com F4/80 (predominantemente membranar - vermelho), TRPV1 (predominantemente intracelular - verde) e o núcleo marcado com DAPI (blue). Esses experimentos foram realizados em 3 dias distintos.

5.2 Macrófagos expressam TRPV1 funcional

Em seguida, avaliamos a ativação do TRPV1 em macrófagos através da técnica de *patch clamp*, na configuração *whole cell* (Figura 6). Os estudos de atividade do TRPV1 em células não neuronais e em modelos não heterólogos ainda são escassos. Dessa forma, optamos por utilizar as células da Glia de Müller, que reconhecidamente expressam o TRPV1 funcional (125), como um parâmetro para comparação com macrófagos peritoneais. Observou-se a geração de correntes iônicas de entrada muito semelhantes entre ambos os modelos após estímulo com capsaicina (Figura 8 A e 8 B). Além disso, também foi possível observar que a partir de um segundo estímulo de capsaicina, o receptor tornou-se insensível, em ambos os tipos celulares. Tal comportamento é um resultado esperado pelo mecanismo de dessensibilização do TRPV1 apresentado na literatura (71). Os antagonistas do TRPV1, capsazepina e *ruthenium red* (Ru-2), inibiram as correntes induzidas pela capsaicina em macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 8 C), e mostra que o efeito da capsaicina em gerar corrente iônica de fato depende do TRPV1.

Ao continuar a caracterização funcional do TRPV1, avaliamos os aumentos dos níveis de Ca^{2+} intracelular em ensaios de mobilização de cálcio intracelular após a ativação do TRPV1. Assim, a Figura 9 mostra que macrófagos peritoneais diante do estímulo com a capsaicina apresentaram 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 é possível observar na Figura 9B, o segundo estímulo à capsaicina não foi capaz de promover aumento dos níveis de Ca^{2+} no ambiente intracelular. Esse padrão observado foi semelhante ao encontrado na literatura (79).

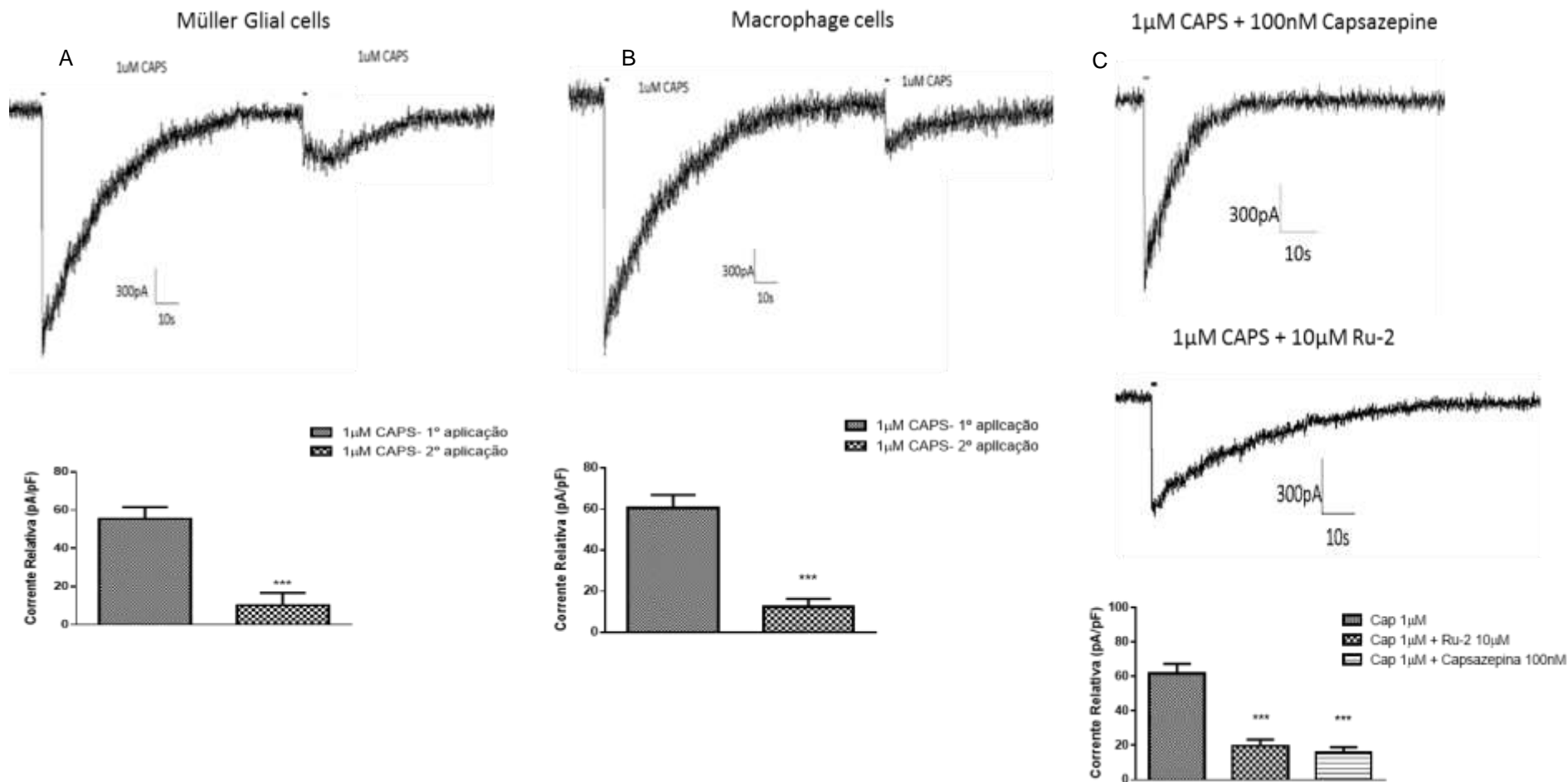


Figura 8 – Correntes induzidas a partir da ativação do TRPV1 em macrófagos em glia de Müller.

O potencial de holding foi de +60 mV, sob a configuração *whole cell* a 37°C. A primeira estimulação com capsaicina induziu corrente de influxo similar nos dois tipos celulares. Ambas as células exibiram dessensibilização das correntes iônicas após o segundo estímulo (A e B). Os gráficos representam a média ± desvio padrão de 2-3 experimentos em dias distintos, test-t * P <0.05, ** p <0.01. As correntes apresentadas em macrófagos foram inibidas pelos antagonistas do TRPV1, capsazepina e Ru-2 (C) Os gráficos representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos em 3 dias distintos, ANOVA p <0.05, *** p <0.001 pós-teste de Tukey

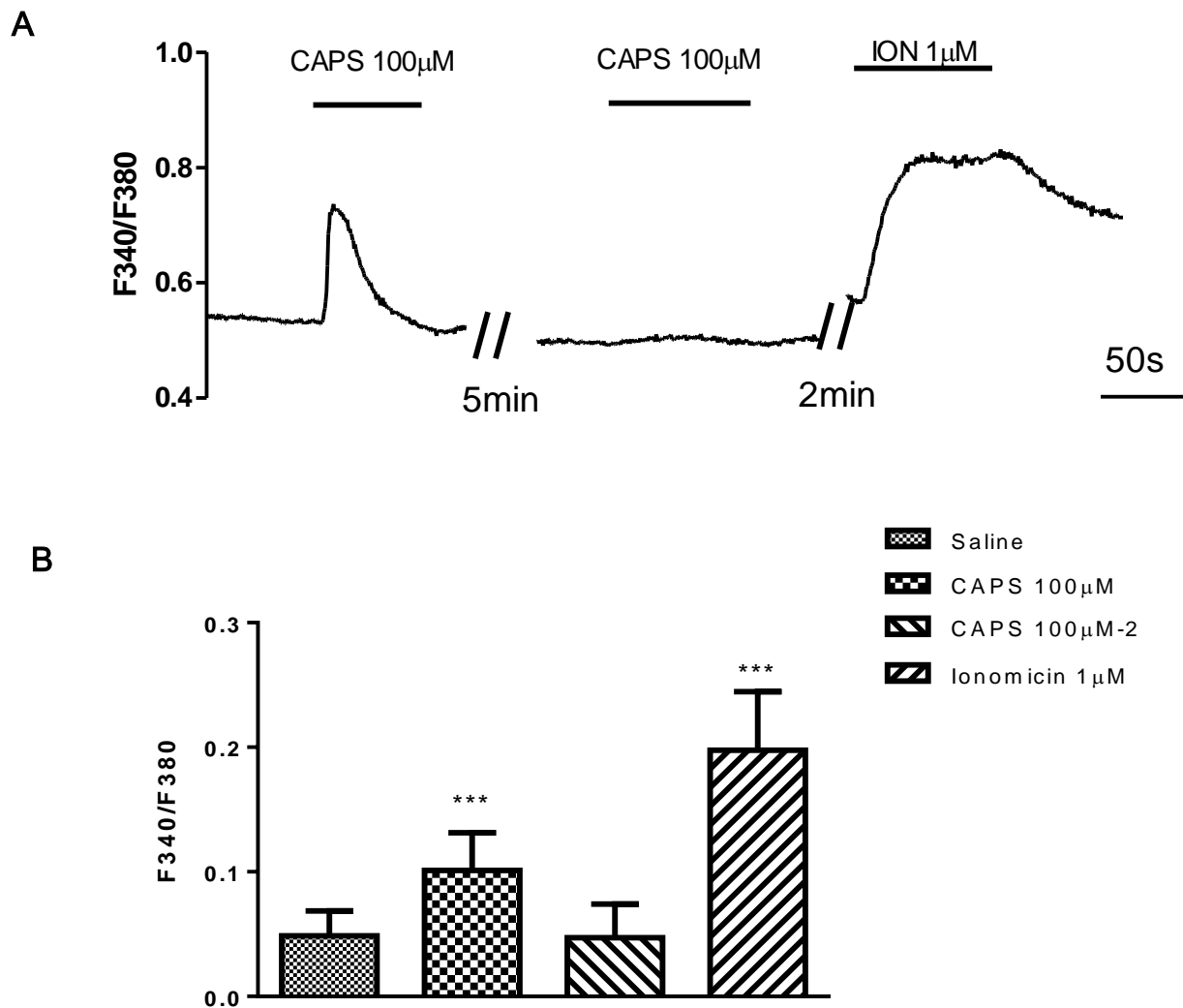


Figura 9 – Ativação do TRPV1 aumenta os níveis de cálcio intracelular em macrófagos.

Macrófagos extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura em lamínulas de vidro estéreis imersas em meio de cultura em placas de cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. (A) Capsaicina (cap) aumenta o nível de Ca^{2+} comparado a linha basal. Em um segundo estímulo, há dessensibilização dessa resposta. Por último, representamos a elevação de Ca^{2+} observada após estímulo com o ionóforo, ionomicina. (B) Gráfico mostra a quantificação da amplitude do registro de Ca^{2+} intracelular após o tratamento com capsaicina. Ionomicina (ion) foi usada como controle positivo. Teste de Kruskal- Wallis $P < 0.0001$, pós-teste de Dunns, *** $p < 0.0001$ comparado à salina. Os experimentos foram feitos em triplicata e 3 dias distintos.

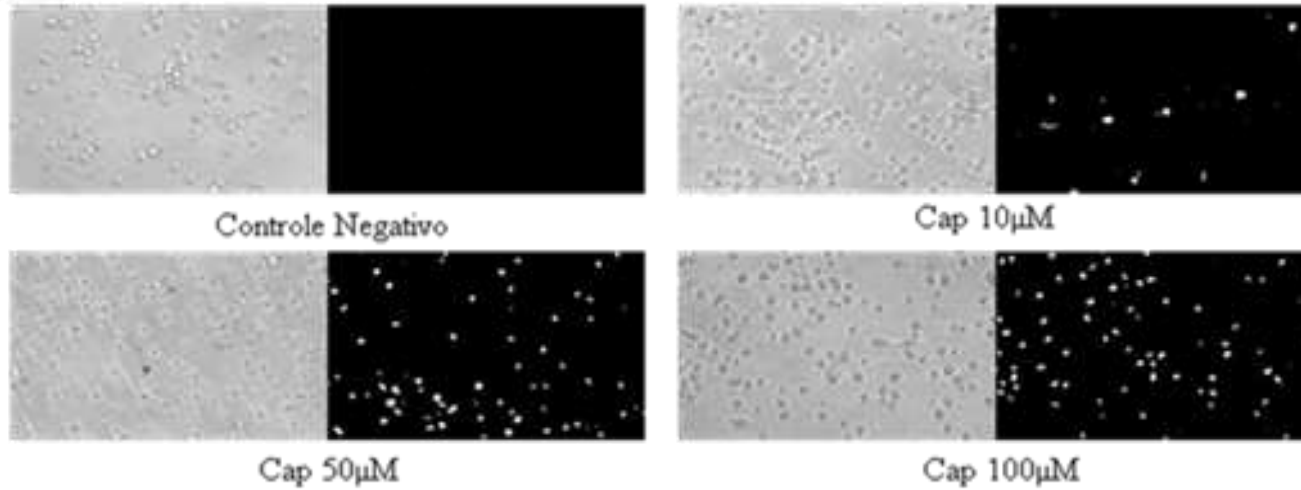
5.3 TRPV1 abre um poro membranar após ativação em macrófagos peritoneais de camundongos

Os resultados de microscopia de fluorescência mostram que os estímulos com capsaicina (10-100 μM) promoveram a captação de brometo de etídeo (394 Da), de maneira aparentemente concentração-dependente, em macrófagos peritoneais (Figura 10A). Em seguida, foi necessário refinar tal procedimento tanto ao nível quantitativo quanto ao nível de identificação da população celular observada. Dessa forma, marcamos os macrófagos com antígeno F4/80 e realizamos a leitura em citometria de fluxo. No ensaio em citometria de fluxo (Figura 10B e 10C) obtivemos o valor de EC_{50} para a captação de corante induzida por capsaicina de 54,66 μM em células peritoneais F4/80⁺.

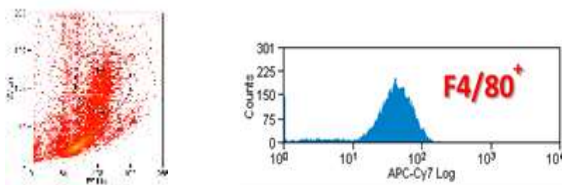
Nesse contexto, a captação de corante, neste caso Yopro-1 (629 Da) induzida pela capsaicina foi sensível ao antagonista geral do TRPV1, *ruthenium red* (Figura 11). Em seguida, buscamos caracterizar se a formação desse poro teria alguma seletividade quanto à carga do permeante, como observado para o seu canal iônico de baixa condutância, que é preferencialmente catiônico (56).

Microscopia de fluorescência

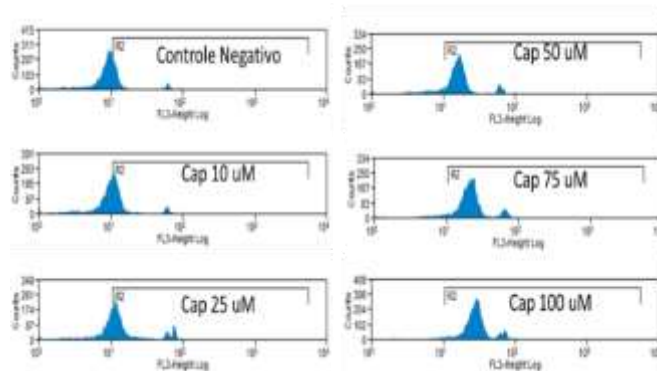
A



B



C



53

D

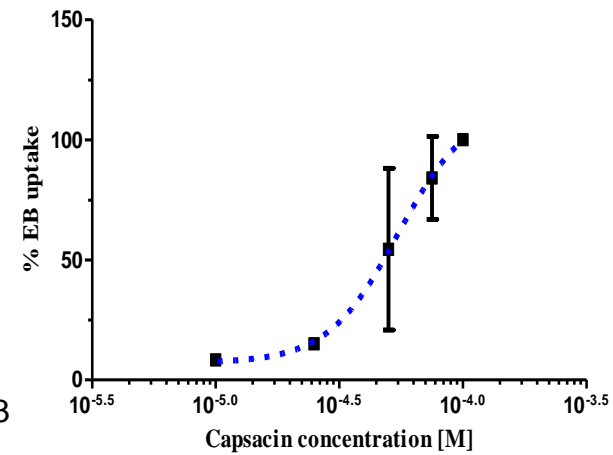
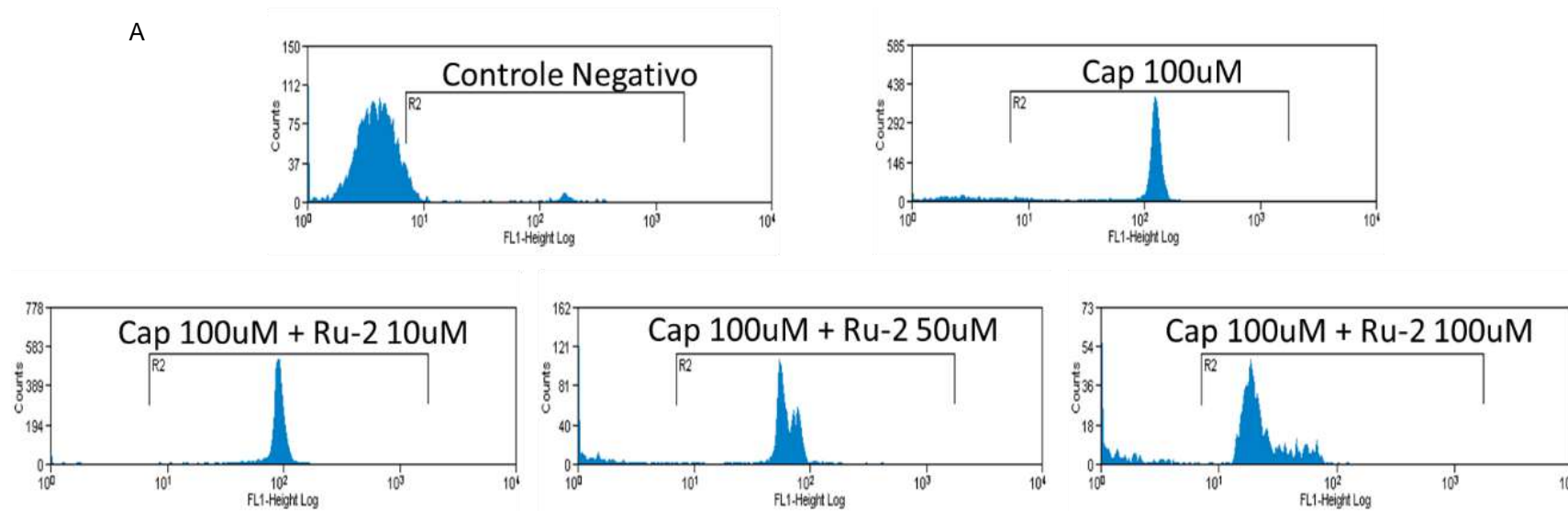


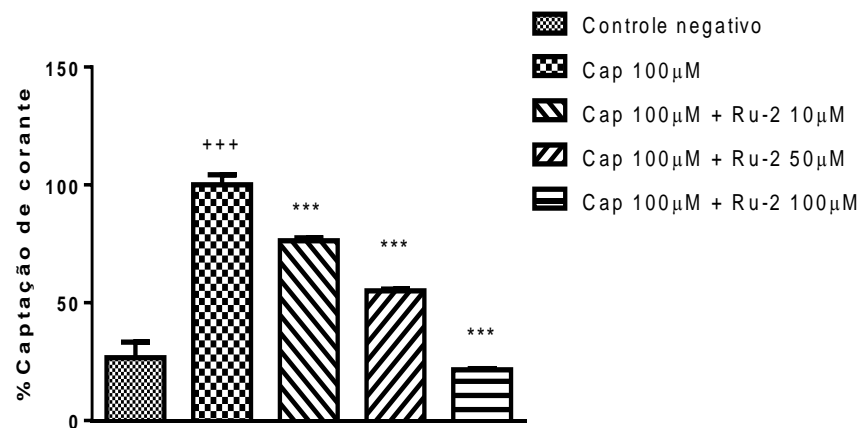
Figura 10 – TRPV1 promove a captação de brometo de etídeo em macrófagos F4/80⁺.

(A) Imagens representativas mostram captação de brometo de etídeo dependente de TRPV1 em macrófagos peritoneais de camundongos. As imagens obtidas em microscópio invertido (NIKON® Eclipse TS2000), aumento de 20X. Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. (B) Imagem representativa da seleção e marcação de macrófagos F4/80⁺ extraídos de lavado peritoneal. Os resultados obtidos em 3 dias distintos e em triplicata. (C) Imagem representativa dos histogramas de acordo com os tratamentos com diferentes concentrações de capsaicina. Os resultados obtidos em 3 dias distintos e em triplicata. (D) Gráfico mostra a quantificação da captação de corante através do tratamento com diferentes concentrações de capsaicina EC₅₀ = 54,66 µM. Os resultados obtidos em 3 dias distintos e em triplicata.

A



B



*** p < 0,001 comparado com Cap 100 µM
 +++ p < 0,05 comparado com Controle Negativo

Figura 11 – Captação de Yopro1 em macrófagos F4/80+ é inibida pelo antagonista Ru-2.

(A) Imagem representativa da seleção, marcação de macrófagos F4/80+ extraídos de lavado peritoneal e dos histogramas de acordo com os tratamentos com Ru-2. (B) Gráfico mostra a quantificação da inibição da captação de Yopro-1 através do tratamento com diferentes concentrações de Ru-2. ANOVA $p < 0.05$, Tukey's test (***) $p < 0.0001$.

Realizamos o mesmo protocolo de captação de corante, embora, nesse caso, optamos por um corante aniônico. A fluoresceína (332 Da) não foi capaz de permear pelo poro do TRPV1 (Figura 12), o que sugere a manutenção das características de seletividade iônica ainda que em uma conformação espacial com maior condutância iônica. É preciso ressaltar que os parâmetros morfológicos apresentados na microscopia e citometria de fluxo revelam que a marcação fluorescente se dá em células viáveis. Contudo, sabe-se que a capsaicina é capaz de levar a processos de morte celular (126). Assim, realizamos dois ensaios de viabilidade celular para confirmar que a captação do corante está ocorrendo por meio da abertura do TRPV1 e não da lesão na membrana. De acordo com as Figuras 13 e 14, os ensaios de detecção da lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular e de redução da resazurina confirmaram os fenômenos observados anteriormente.

Quanto à importância do primeiro ensaio, vale ressaltar que elevadas concentrações extracelulares dessa enzima intracelular indicam a ruptura da membrana plasmática. Entretanto, o estímulo com capsaicina nos mesmos períodos de tempo usados nos ensaios anteriores não promoveu a lise celular (Figura 13), ou seja, houve a formação de um poro na membrana plasmática a partir da ativação do TRPV1. Além disso, capacidade redutora das células não sofreu qualquer alteração, como mostra a Figura 14.

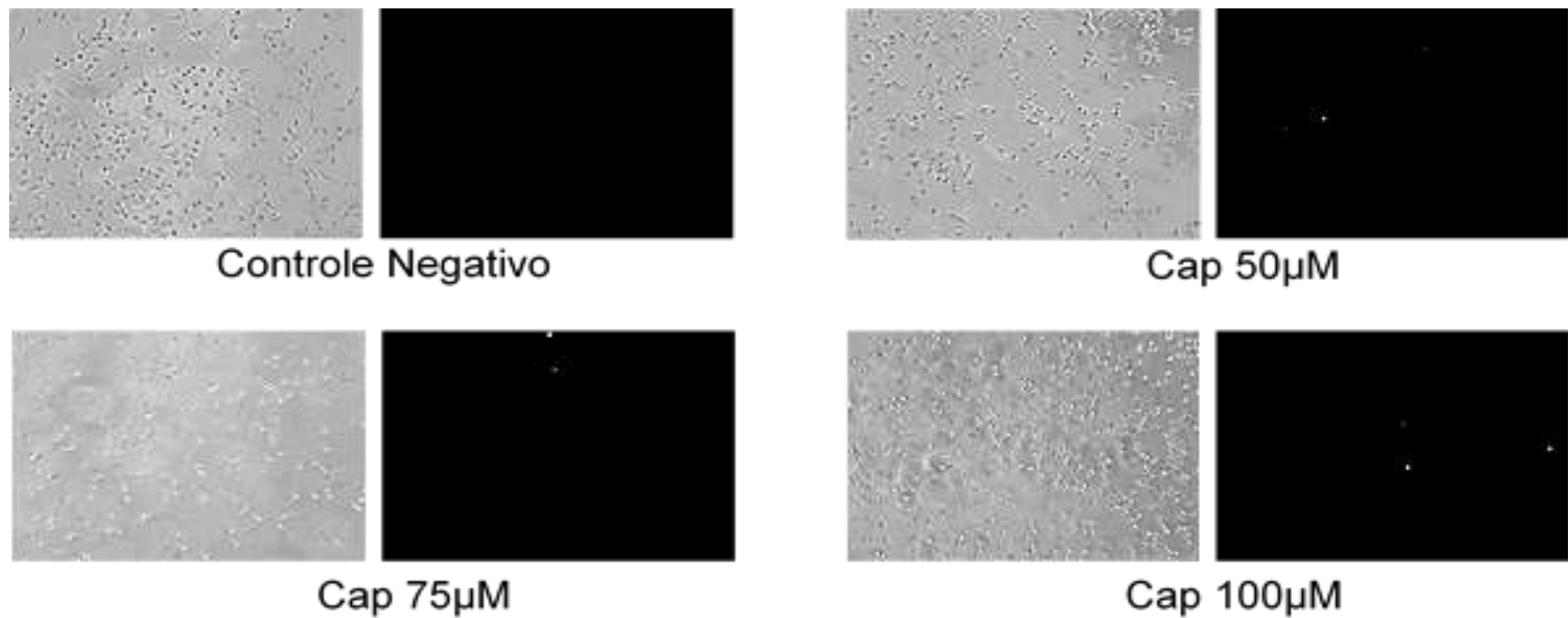


Figura 12 - TRPV1 não induz a captação do corante fluorescente aniônico, a Fluoresceína em macrófagos peritoneais de camundongos.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Experimentos realizados em triplicata e em 2 dias distintos. Imagens obtidas em microscópio invertido (NIKON® Eclipse TS2000), aumento de 20X.

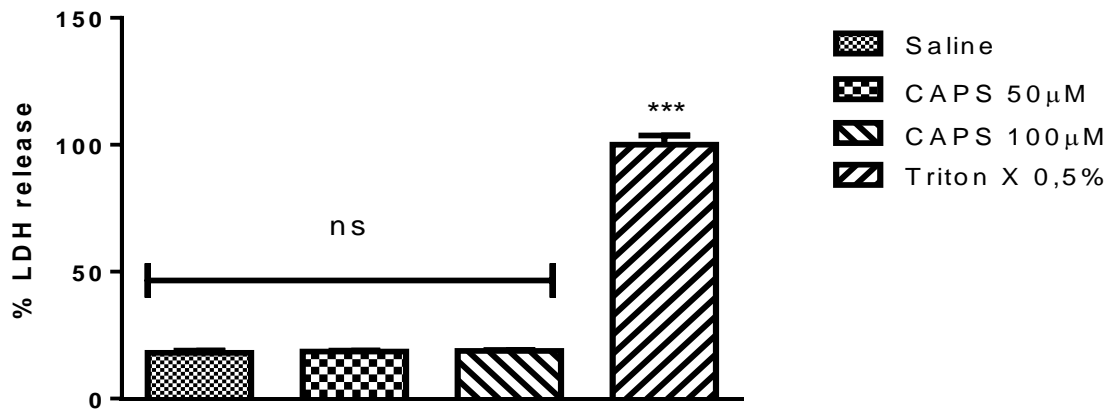


Figura 13 – Captação de corante induzida pelo TRPV1 não leva à lise celular.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, a células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Capsaicina não promove lise celular durante a abertura do poro transitório do TRPV1 durante 60 min. Experimentos em triplicata e em 3 dias distintos. ANOVA $p < 0.05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0.0001$ comparado ao controle negativo (salina).

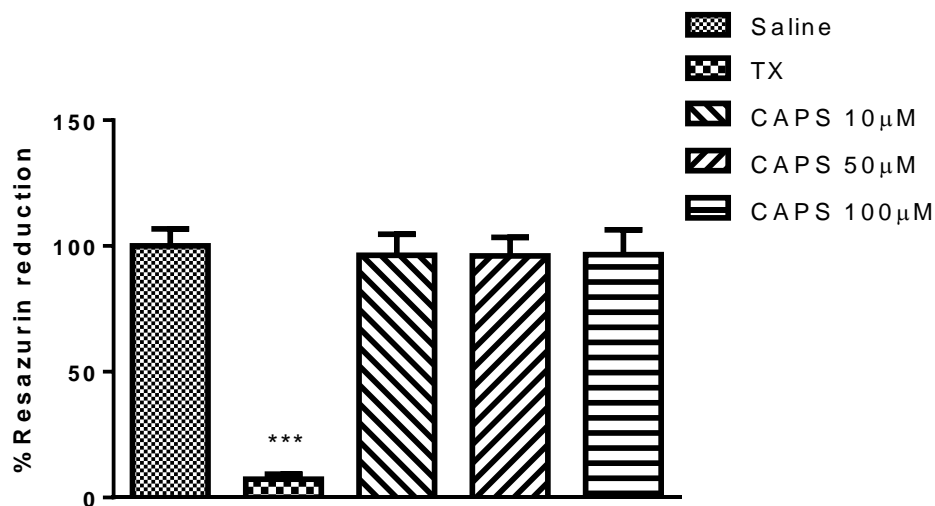


Figura 14 – Captação de corante induzida pelo TRPV1 não reduz a viabilidade celular.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, a células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Capsaicina não promove redução da viabilidade celular durante a abertura do poro transitório do TRPV1 durante 60 min. Experimentos em triplicata e em 3 dias distintos. ANOVA $p < 0.05$, pós-teste de Tukey *** $p < 0.0001$ comparado ao controle negativo (salina).

Um aspecto interessante na formação de poros na membrana plasmática é a pluralidade de proteínas capazes de formá-los (127–129), ainda que seus mecanismos de abertura não sejam completamente elucidados. Em macrófagos peritoneais, o principal poro estudado é o formado a partir da ativação do receptor purinérgico P2X7 (P2X7R). De acordo com a literatura, uma vez que a formação do poro do P2X7R poderia depender de outras proteínas subsequentemente ativadas, investigamos se o TRPV1 participaria do processo de formação do poro associado ao P2X7R. Vale ressaltar que, em trabalho prévio, excluimos a participação de conexinas e panexina-1, que são outras proteínas formadoras de poros, na formação do poro do receptor P2X7 (118). O primeiro passo foi confirmar os efeitos esperados nos tratamentos com capsaicina (ativação do poro TRPV1 e captação de brometo de etídeo, Figura 14B) e Ru-2 (inibição da abertura do poro, Figura 14C) em comparação ao controle negativo (Figura 14A). Utilizamos, em seguida, tanto antagonista de conexinas (carbenoxolona – CBX) e panexina-1 (probenecida) (Figuras 15 E e 15 F), assim como um conjunto de moléculas de RNA de interferência para panexina-1 e observamos que essas proteínas também não estão envolvidas na formação dos poros do TRPV1 (Figura 15G). Por outro lado, a Figura 15D mostra que o antagonista do P2X7R, o *brilliant blue G* (BBG), inibiu parcialmente a captação de corante induzida pela capsaicina. Esse resultado foi um ponto de partida para avaliar a possibilidade de algum tipo de relação entre P2X7R e TRPV1.

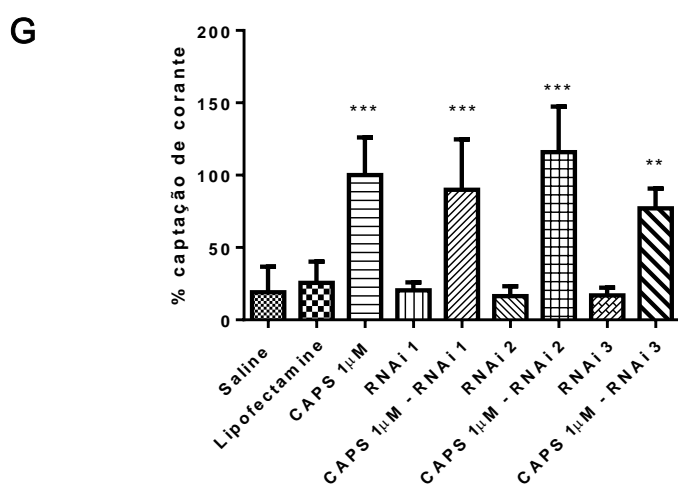
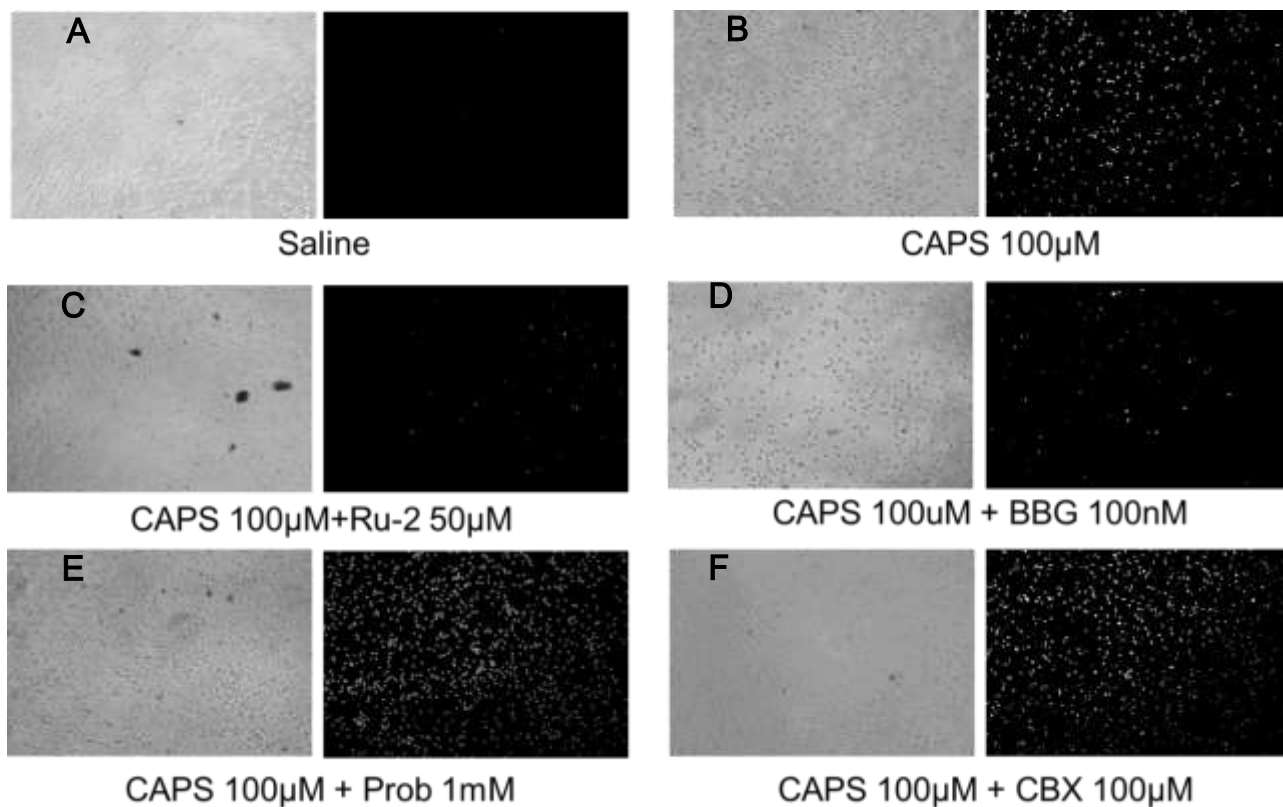


Figura 15 - Captação de corante induzida pelo TRPV1 não depende da participação de hemicanais, mas pode estar associada ao P2X7R.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. (A) Controle negativo. (B) 100 μM Capsaicina, (C) 100 μM Capsaicina + 50 μM Ru-2, (D) 100 μM Capsaicina + 100 nM BBG. (E e F) Antagonistas de hemicanais – probenecida (1 mM) e carbenoxolona (100 μM) na presença da capsaicina (100 μM). (G) RNAi para Panexina-1 não inibiu a captação de corante induzida pelo TRPV1. Experimentos em triplicata e 3 dias distintos. ANOVA $P < 0.05$, Tukey post-test * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.0001$) em relação ao controle negativo.

5.4 Interação entre TRPV1 e P2X7

Após confirmarmos a expressão e funcionalidade do TRPV1 em macrófagos, iniciamos a avaliação dos principais eventos relacionados ao P2X7R: perfil de corrente da ativação desse receptor, formação dos poros transitórios na membrana plasmática, mobilização de cálcio intracelular e liberação de IL-1 β a partir da ativação do P2X7R. Ressalta-se a importância de se avaliar a relação entre P2X7R e TRPV1, devido às citocinas liberadas após ativação dos mesmos. Uma delas é a liberação de IL-1 β em macrófagos, uma das principais citocinas com ação pró-esteroidogênica.

Logo, a primeira medida foi avaliar os perfis de correntes iônicas a partir da ativação do P2X7R. Como é possível observar na Figura 16A, corrente iônica da ativação do P2X7R está em torno de 80pA/pF. Vale ressaltar que esse parâmetro revela a relação entre a corrente de entrada a partir da ativação e a capacitância resultante das propriedades biofísicas da membrana plasmática. A seguir, houve as administrações dos antagonistas BBG e ATPox (ambos para o P2X7R) e Ru-2 e capsazepina (ambos para o TRPV1), seguidas da aplicação do ATP para ativar o P2X7R. Por sua vez, conforme mostram as Figuras 16B e 16E os efeitos antagonísticos do BBG e ATPox se confirmaram como esperado. Interessantemente, o Ru-2 e a capsazepina foram capazes de inibir as correntes de entrada, como mostram as Figuras 16C e 16D. Em adição, o gráfico de barras apresentado na Figura 16E apresenta a quantificação dos efeitos inibitórios dos antagonistas do TRPV1 sobre a ativação do P2X7R. Os antagonistas do TRPV1 inibiram em mais de 50% as respostas do ATP. Similarmente, os resultados encontrados na Figura 17 revelaram uma inibição de cerca de 60% das correntes iônicas induzidas pela ação da capsaicina sobre o TRPV1 em macrófagos.

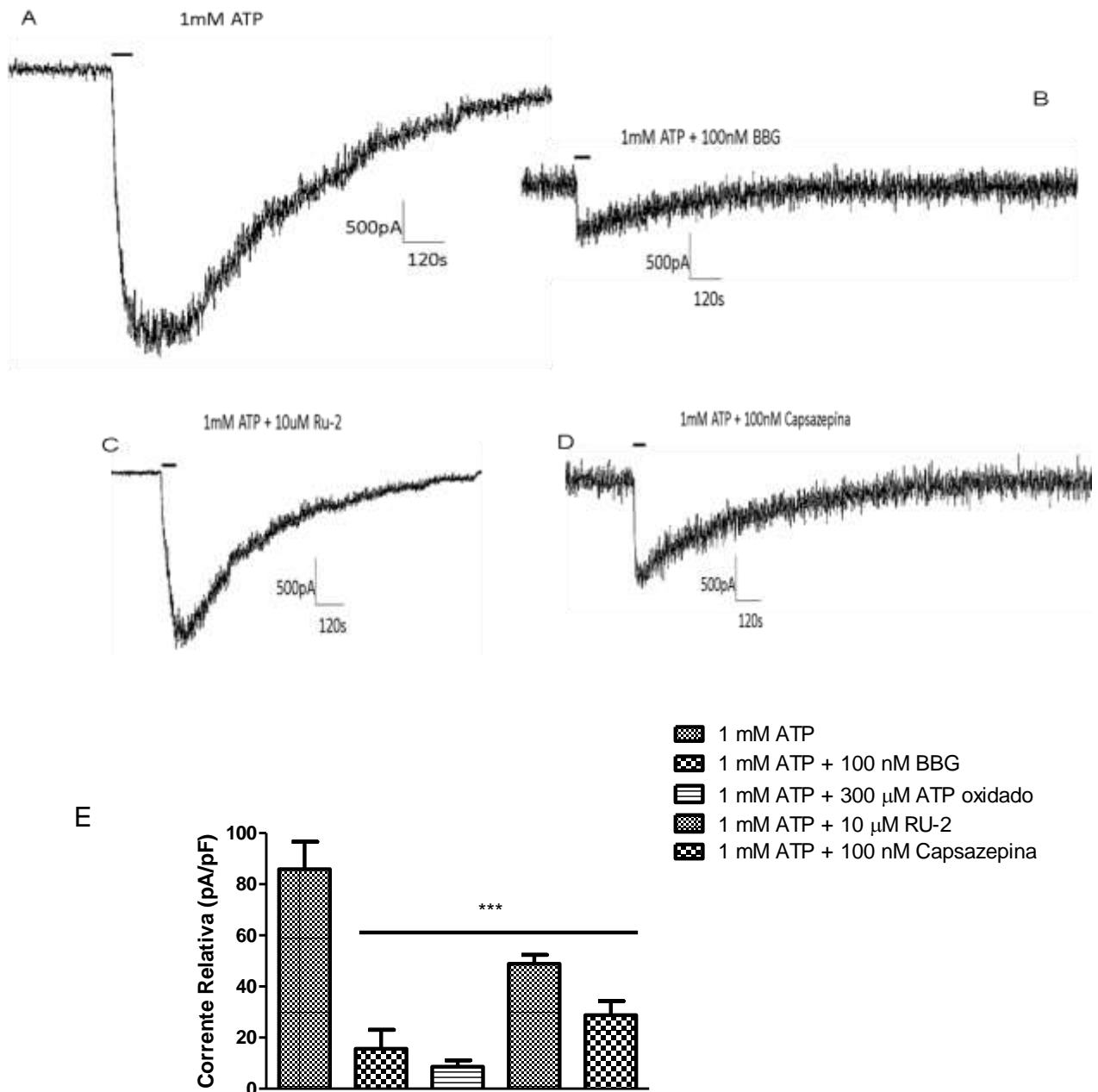
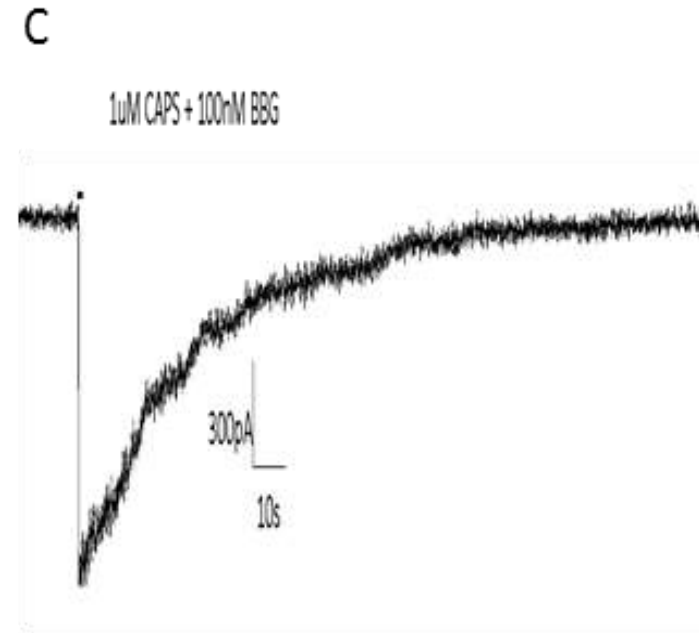
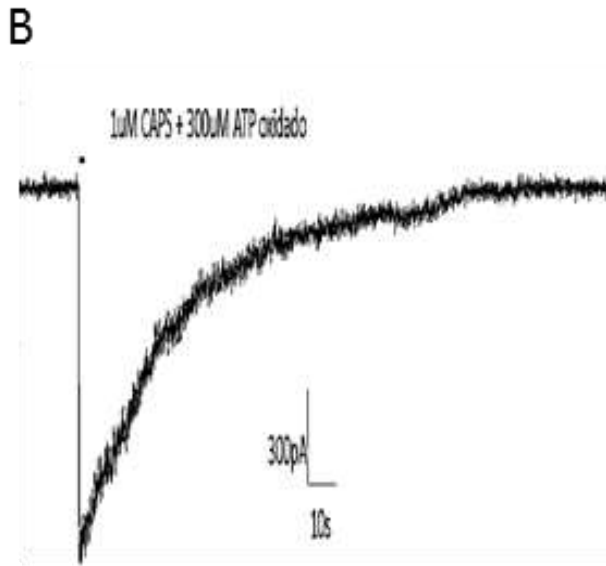
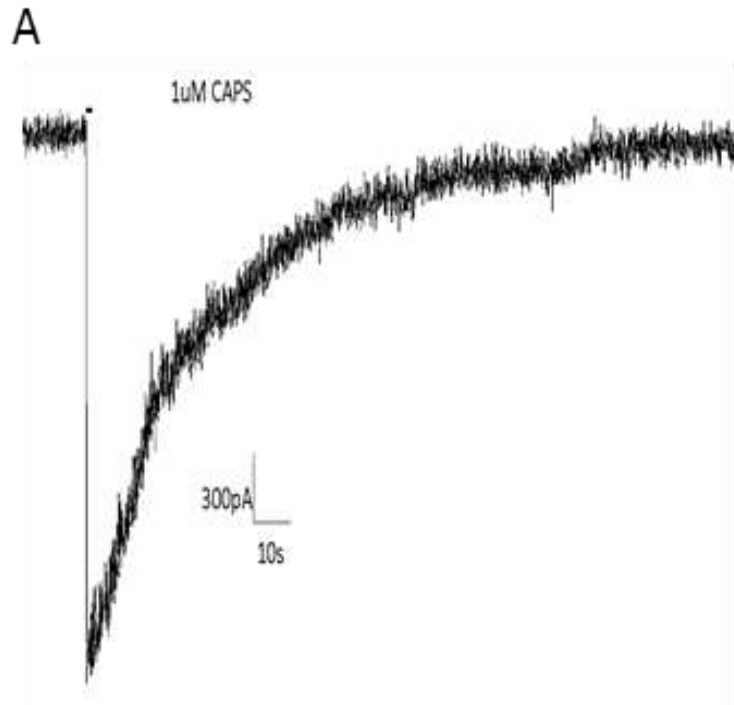



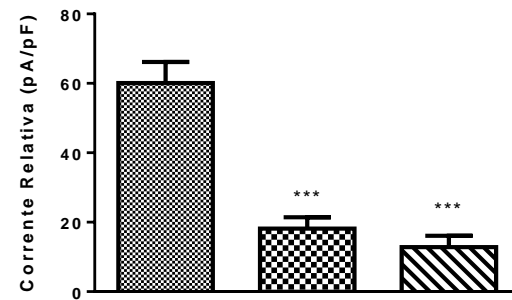


Figura 16 – Inibição cruzada entre antagonistas do TRPV1 na resposta iônica induzido pelo ATP em macrófagos.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura em lamínulas de vidro estéreis imersas em meio de cultura em placas de cultura. Após 48 horas, a células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Experimentos realizados em configuração *whole-cell*, à 37°C. (A) correntes induzidas por ATP foram inibidas por BBG 100 nM (B), 100 µM Ru-2 (C) e (D) 100 nM capsazepina. Abaixo, o gráfico de barras exibe os valores obtido de corrente após os tratamentos (E). O potencial de holding foi +60 mV. Os valores representam a média \pm SD de 3 ensaios independentes. ANOVA $P < 0,05$, Tukey pós-teste * ($P < 0,05$), *** ($P < 0,0001$).



 1 μ M CAP
 1 μ M CAP + 100nM BGG
 1 μ M CAP + 300 μ M ATP oxidado



64

Figura 17 - Inibição cruzada entre antagonistas do P2X7R na corrente iônica induzida pela capsaicina em macrófagos peritoneais.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura em lamínulas de vidro estéreis imersas em meio de cultura em placas de cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Os experimentos na configuração *whole-cell* foram realizados em à 37°C. As correntes induzidas por capsaicina (CAP) foram inibidas pelos antagonistas do P2X7R, (B) BBG (100 nM) e (C) ATP oxidado (300 µM), cujos valores estão quantificados no gráfico de barras abaixo. O potencial de holding foi + 60 mV. Os valores dos gráficos representam a média ± desvio padrão de 2-3 experiências independentes. ANOVA P <0,05, TUKEY Teste Post *** P <0,0001.

O segundo parâmetro avaliado foi a mobilização de íons cálcio intracelular após a ativação do P2X7R com o ATP e se esse fenômeno também seria influenciado pelo TRPV1. Os antagonistas TRPV1 inibiram a mobilização de cálcio intracelular após a ativação do P2X7R. A ativação do P2X7R foi inibida em torno de 50% pelo tratamento de 2 minutos com Ru-2 50 μ M (Figuras 18A e 18B). Como a molécula de ATP é agonista geral dos receptores purinérgicos, e muitos deles mobilizam os níveis de Ca^{2+} intracelular, optamos pelo uso do agonista seletivo do P2X7R, BzATP. Assim, como mostram as Figuras 18D e 18E, os antagonistas do TRPV1 (capsazepina e Ru-2) inibiram os efeitos da ativação do P2X7R por seu agonista seletivo. Portanto, os resultados encontrados confirmaram a relação entre P2X7R e TRPV1 nos ensaios de cálcio e *patch clamp*.

É preciso ressaltar que através de tais ensaios, foi possível avaliar o comportamento dos canais iônicos, mas não do comportamento dos poros transitórios estimulados pelos mesmos. Logo, os próximos ensaios avaliaram o comportamento da abertura dos poros transitórios do P2X7R e TRPV1. Nesses ensaios, utilizam-se corantes fluorescentes hidrofílicos de peso molecular de 900 Da. Eles são impermeáveis à membrana plasmática, exceto em caso de ruptura da mesma ou na abertura de um poro. Dessa forma, as células outrora não fluorescentes tornam-se fluorescentes após o estímulo com ATP. Conforme é possível observar na Figura 19, a indicação da formação do poro do P2X7R se dá a partir do aumento da fluorescência no interior celular. Como esperado, a adição do ATP promoveu a captação brometo de etídeo ao interior celular. De forma similar àquela ocorrida durante a avaliação dos canais iônicos, o pré-tratamento dos antagonistas do TRPV1, capsazepina e Ru-2, foi eficaz na inibição concentração-dependente da formação do poro do P2X7R.

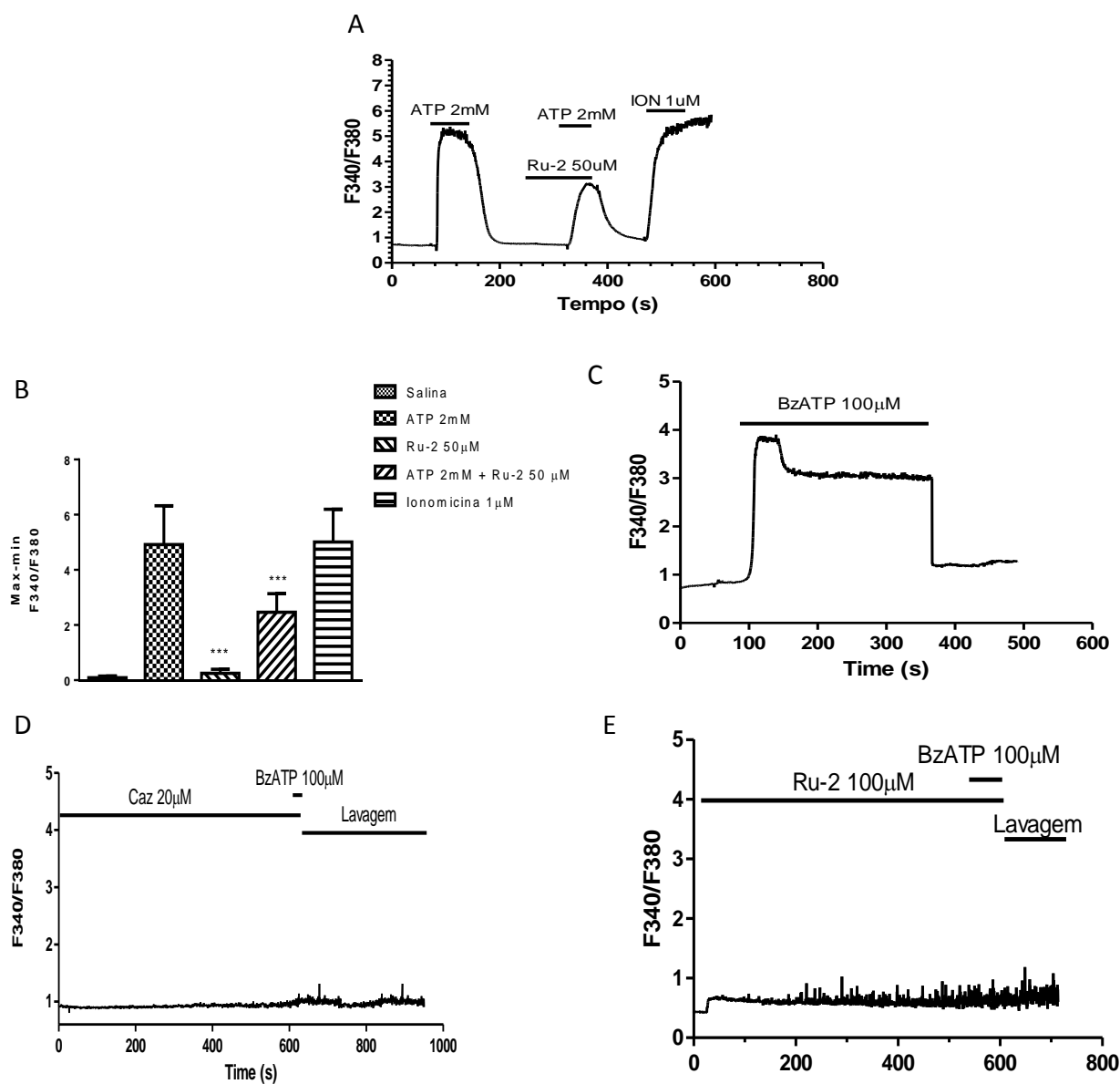


Figura 18 - Antagonistas do TRPV1 inibem a ativação do P2X7R em macrófagos.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura em lamínulas de vidro estéreis imersas em meio de cultura em placas de cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. (A e B) Ru-2 inibiu a elevação de cálcio intracelular induzido por ATP. O gráfico de barras representa a amplitude do sinal. N=63 células em 3 experimentos independentes. Kruskal-wallis $p < 0,0001$, Dunns pós-teste, *** $p < 0,0001$ comparativamente ao tratamento com ATP. (c) Tratamento com agonista seletivo BZATP do P2X7R (n=20 células) foi inibido pelos antagonistas do TRPV1 capsazepina (20 μ M) (d) e Ru-2 (100 μ M) (e). N = 23-29 células.

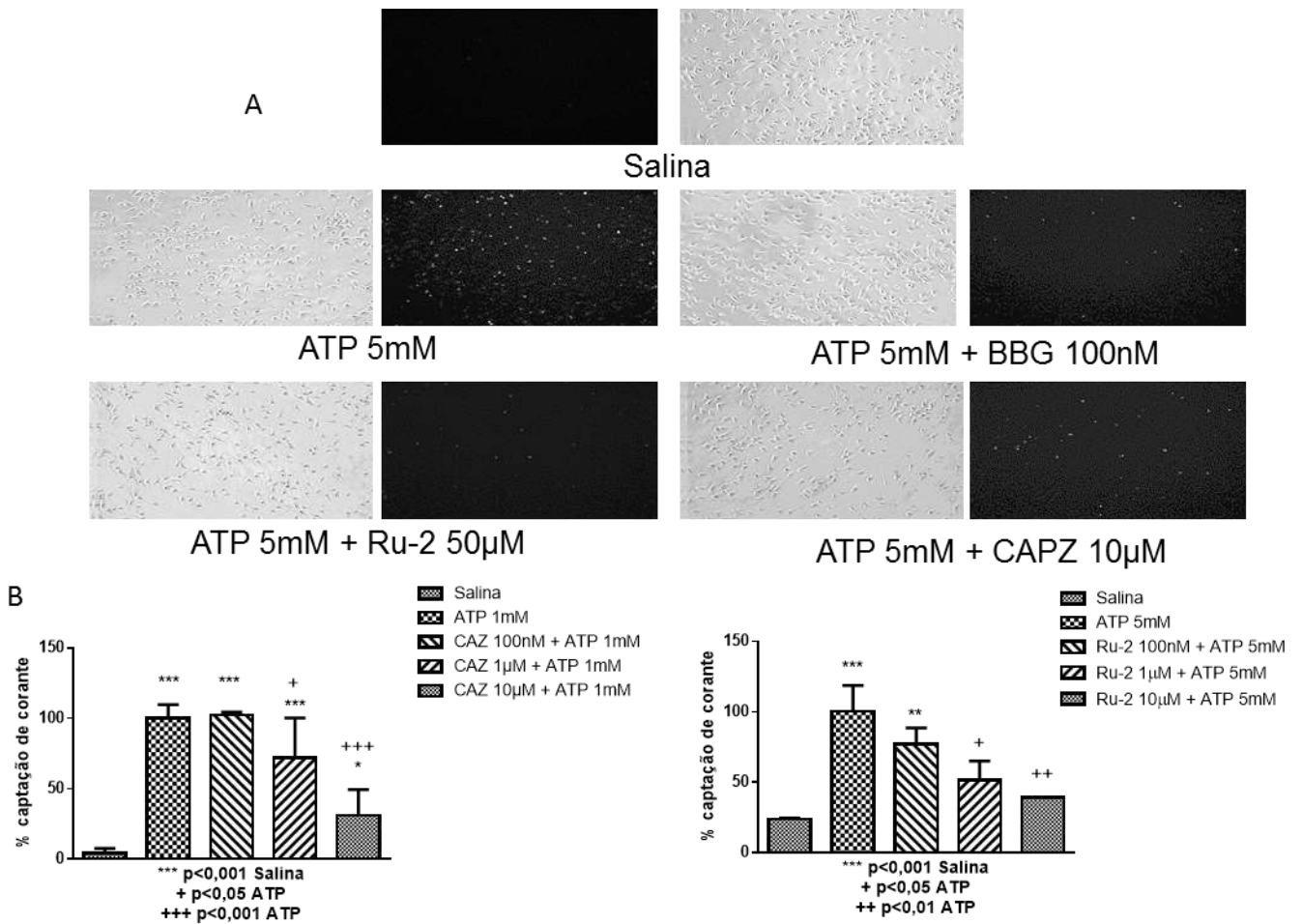


Figura 19 – Antagonistas TRPV1 inibem poro do P2X7R em macrófagos peritoneais de camundongos.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, a células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. (A) Figuras representativas da inibição da captação de brometo de etídeo pelos antagonistas TRPV1, capsazepina e Ru-2. (B) O gráfico de barras quantifica a captação de corante induzida pelo ATP e o efeitos após pré-tratamento com capsazepina (CAZ). (C) O gráfico de barras quantifica a captação de corante induzida pelo ATP e os efeitos após pré-tratamento com Ru-2. N=4 experimentos em diferentes dias. ANOVA p<0,05, *** pós-teste de Tukey (p<0,001) em relação à salina, + (p<0,05) e +++ (p<0,001) em comparação ao tratamento 1 mM ATP.

Diante desses indícios de que o TRPV1 interage com o P2X7R, tanto na abertura do seu canal iônico quanto na abertura de seu poro (Figura 19), restava saber se o TRPV1 também modula a liberação de IL-1 β . Dessa forma, a Figura 20 confirma a participação do TRPV1 no processo de liberação de IL-1 β . Como a Figura mostra o Ru-2 foi capaz de inibir a liberação de citocinas induzida pelo ATP via ativação do P2X7R. Vale ressaltar que a utilização do AMG9810 foi de vital importância, uma vez que ele é um dos principais antagonistas disponíveis no mercado para a caracterização do TRPV1. A utilização do A438079 foi de grande importância devido à sua seletividade ao P2X7R de acordo com os seus estudos de desenvolvimento. Esses compostos inibiram por sua vez a liberação de IL-1 β induzida pelo P2X7R em macrófagos peritoneais. Paralelamente, verificamos que o TRPV1 está relacionado à liberação de TNF- α (Figura 20B), após tratamento com ATP.

Finalmente, diante dos resultados obtidos acima, investigamos se a própria ativação do TRPV1 promoveria a produção de citocinas em macrófagos peritoneais. Nesse caso, os macrófagos peritoneais de camundongos não sofreram ativação por LPS. Dessa forma, verificamos que o tratamento com capsaicina em macrófagos promoveu a liberação das citocinas IL-6 e IL-10 (Figura 21A e 21B), ao passo que ocorreu inibição farmacológica cruzada. Como é possível observar nessas Figuras, os antagonistas do P2X7R, o BBG e o ATPox, foram capazes de inibir a produção de IL-6 e IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos após ativação do TRPV1 com a capsaicina. E, como esperado, o antagonista do TRPV1, Ru-2 também reduziu a resposta da capsaicina.

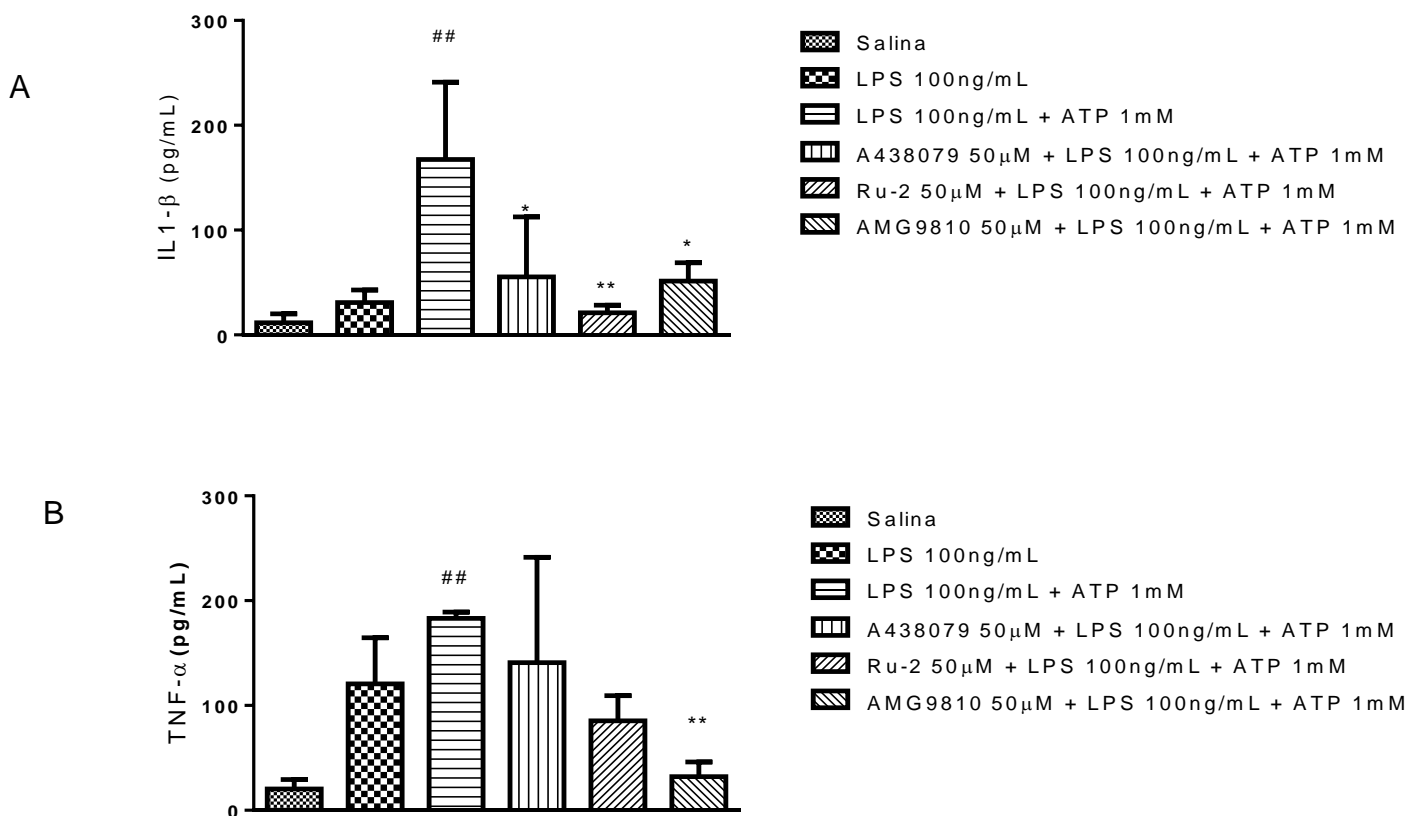


Figura 20 –TRPV1 inibe a liberação de IL-1 β e TNF- α em macrófagos.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, a células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. As células foram receberam o pré-tratamento com os antagonistas 1 horas antes de serem primadas por LPS 100ng/mL. O ATP foi adicionado às células após 3 horas do tratamento com LPS. Após 24 horas as leituras foram feitas a partir da coleta dos sobre nadantes. Os antagonistas do TRPV1 utilizados foram o Ru-2 e AMG9810. Já o antagonista do P2X7R utilizado foi o A438079. ANOVA, Tukey pós-teste * (P <0,05) em relação ao tratamento com LPS+ATP, ## (P <0,001), N=3.

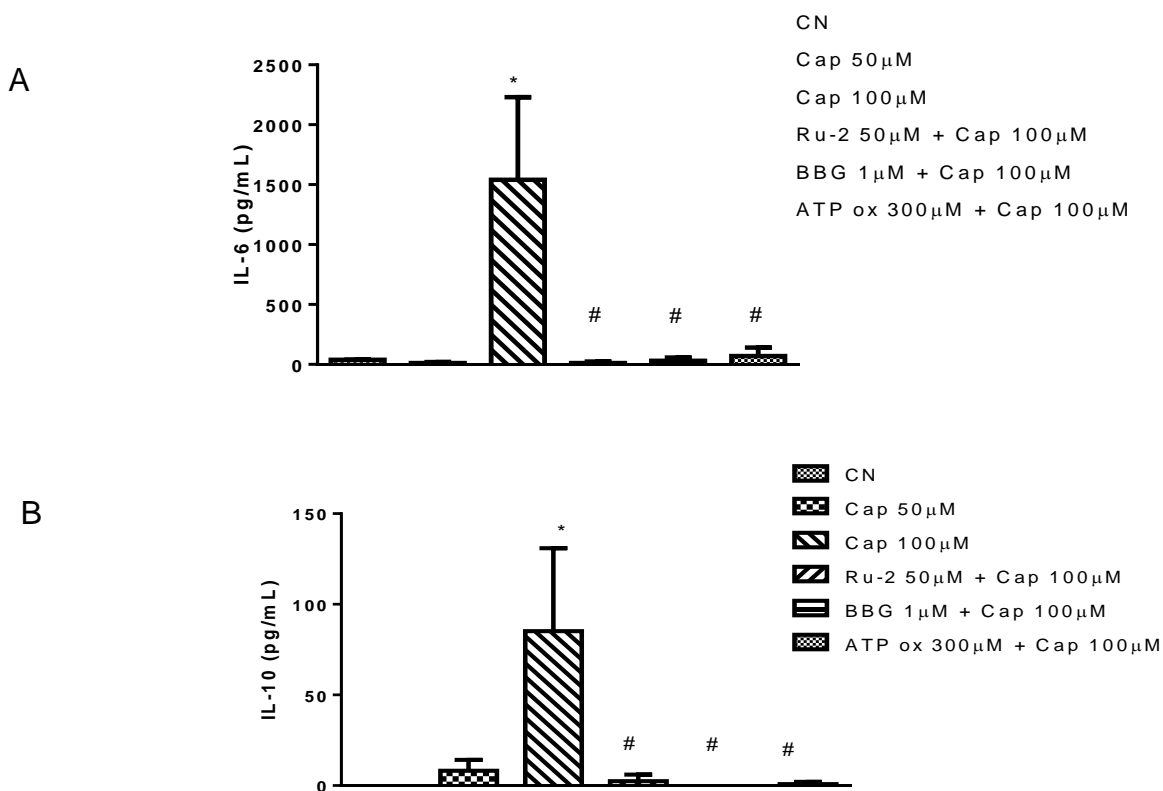


Figura 21 – Ativação TRPV1 em macrófagos induz a liberação de citocinas IL-6 e IL-10.

Os macrófagos foram extraídos da cavidade peritoneal e sofreram uma etapa de purificação da cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Macrófagos tratados com capsaicina (Cap) (100 μ M) durante 24 horas promovem a liberação de IL-6 (A) e IL-10 (B). Como esperado, o antagonista do TRPV1, o Ru-2 inibiu a liberação de IL-6 e IL-10. Demonstrando a inibição cruzada com o P2X7R, os antagonistas BBG e ATPox também inibiram a liberação de citocinas induzida pelo TRPV1. CN controle negativo. ANOVA $P = 0,0083$, Tukey pós-teste * ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo, # ($P < 0,05$) em comparação ao tratamento com capsaicina para 2 dias.

5.5 Células de adrenais expressam TRPV1 funcional

A série de resultados expostos acima demonstrou a ativação do TRPV1 em macrófagos e seu envolvimento no mecanismo de ativação do poro do P2X7R, incluindo no processo de liberação de citocinas. Nesta etapa, passamos a averiguar a funcionalidade do TRPV1 em células de adrenais. Inicialmente, utilizamos o ensaio de viabilidade através da redução da resazurina em resorufina, por um período de 24 horas para saber se a capsaicina poderia ser citotóxica para esta linhagem celular. Conforme mostra a Figura 22, não se verificou uma queda da ação redutora da célula. Logo, é possível constatar que a capsaicina (agonista TRPV1) não parece possuir ação citotóxica através da ativação do TRPV1 nessas células em nenhuma das concentrações utilizadas.

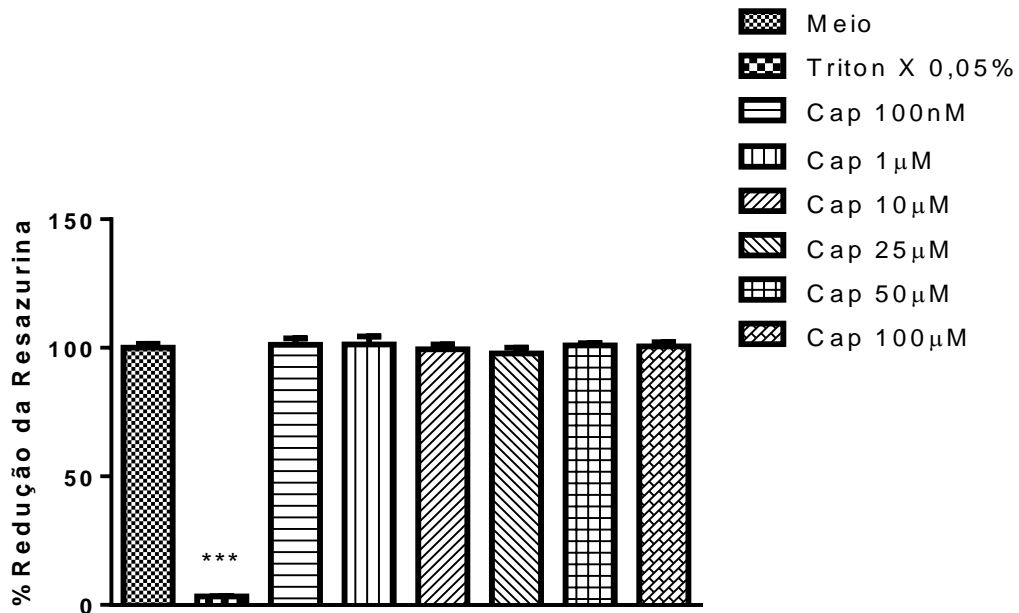


Figura 22 - Ensaio de viabilidade baseado em resazurina na linha celular Y1.

As células Y1 foram cultivadas em meio de cultura e acondicionada à 37°C em estufas de CO₂. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. O tratamento com capsaicina em um período de 24 horas não prejudica a viabilidade celular. Meio (controle negativo). ANOVA (P < 0,05) em relação ao controle negativo em comparação ao tratamento com capsaicina. Foi realizado pós-teste de Tukey (***) p < 0,05). Experimentos realizados em quadruplicatas e em 3 dias distintos.

A partir dessa informação, iniciaram-se os ensaios funcionais e farmacológicos do TRPV1 em células Y1. De acordo com a Figura 23, as respostas de mobilização do cálcio intracelular provenientes dos tratamentos com diferentes concentrações de capsaicina obedeceram a um padrão dose-dependente (Figura 23C). É importante notar que a concentração de 1 μM de capsaicina induziu a elevação dos níveis intracelulares de cálcio (Figura 23A), similarmente aos encontrados após tratamentos com ACTH 1 nM (agonista endógeno) (Figuras 23 D e 23E) ou LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 23F e 23G). Por outro lado, a concentração de 50 μM de capsaicina deflagrou um aumento sustentado dos níveis de Ca^{2+} intracelular em comparação ao observado com ACTH, formando um platô durante a aplicação do estímulo (Figura 23B). O nosso controle positivo, o ATP (1 mM) mobilizou o dobro da resposta de cálcio comparado a maior dose de capsaicina (50 μM) (compare os gráficos 23C com o 23H).

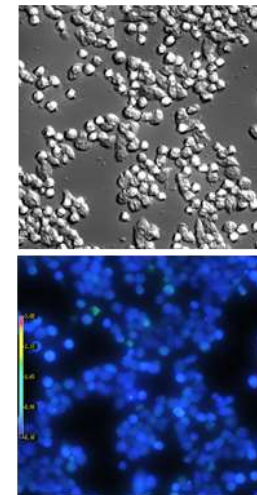
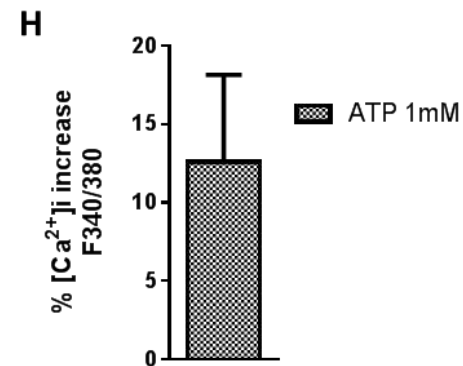
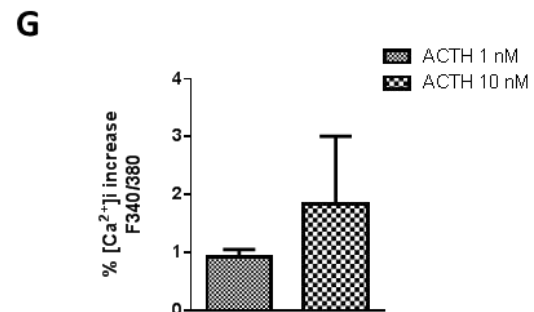
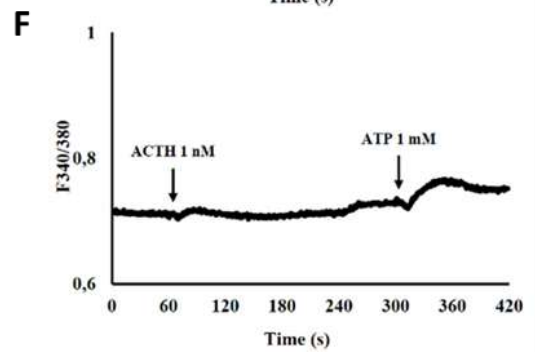
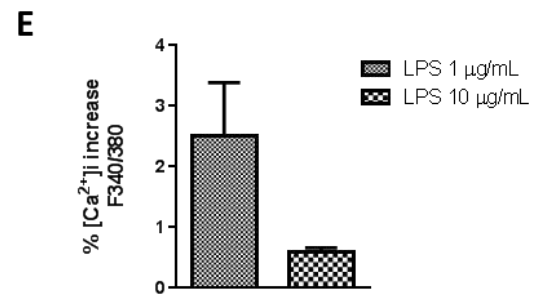
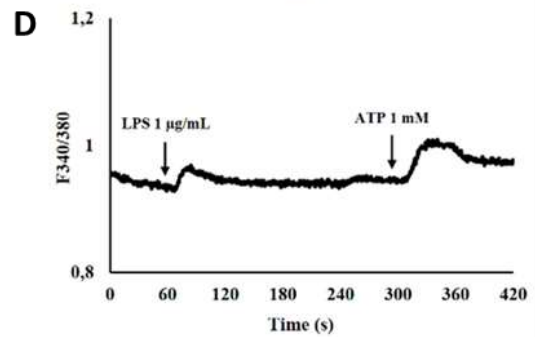
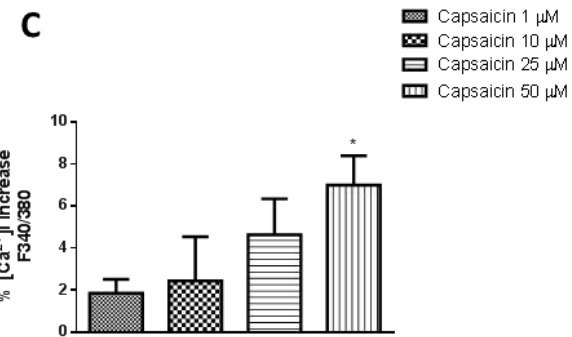
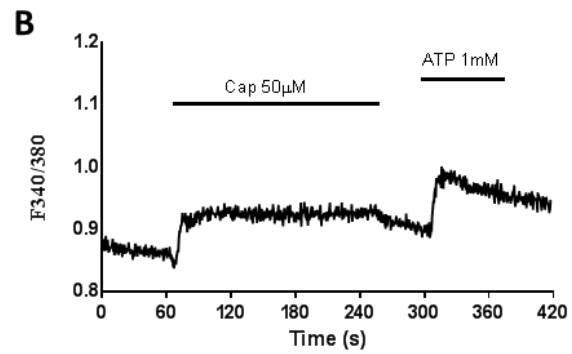
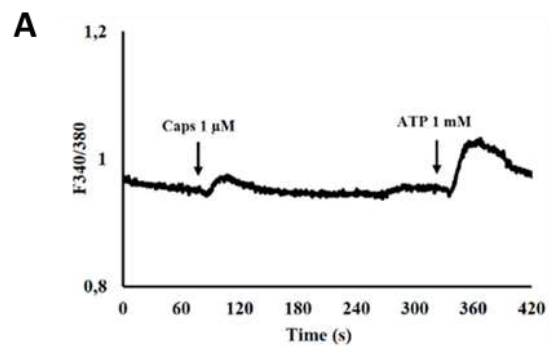


Figura 23 – Capsaicina, LPS e ACTH promovem aumento de Ca²⁺ intracelular em células Y1.

As células Y1 foram cultivadas em lamínulas de vidro estéreis imersas em meio de cultura em placas de cultura. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. A Figura 23A mostra o aumento transitório de cálcio intracelular promovido pela concentração de 1 µM de capsaicina. A Figura 23B mostra um aumento sustentado de cálcio intracelular promovido pela concentração de 50 µM de capsaicina. Similarmente ao encontrado com a concentração de 1µM de capsaicina, LPS 1 µg/mL e ACTH 1 nM também promoveram um aumento de cálcio intracelular. As Figuras 23C, 23E e 23G mostram a quantificação das curvas de cálcio. A Figura 18H mostra a quantificação das curvas proveniente da ativação por ATP 1mM. A Figura 23I é uma imagem representativa da qualidade de carregamento das células anteriormente aos tratamentos. ANOVA p<0.05, Tukey post-test * (p <0.05). Os experimentos foram realizados em três dias distintos.

5.6 Ativação do TRPV1 inibe a esteroidogênese *in vitro*

Uma vez confirmadas a expressão e a funcionalidade do TRPV1 em células Y1, investigamos se o TRPV1 modularia a esteroidogênese em células adrenais. Células Y1 foram tratadas com ou sem LPS 10 µg/mL e com ou sem capsacina (1-25 µM) por 24 horas. A ativação do TRPV1 em células Y1 inibiu a produção de corticosterona induzida por LPS *in vitro*, seguindo um padrão concentração-dependente (Figura 23).

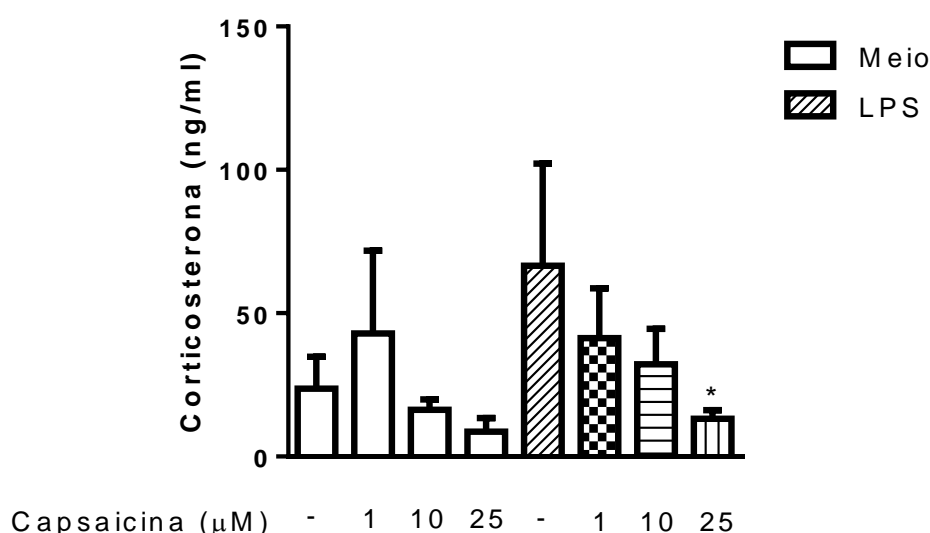


Figura 24 - Capsaicina inibe a produção de corticosterona induzida por LPS *in vitro*.

As células Y1 foram cultivadas em meio de cultura e acondicionada à 37°C em estufas de CO₂. Após 48 horas, as células sofreram tratamentos e foram levadas para análise. Linhagem celular Y1 foi submetida a tratamento com diferentes concentrações de capsacina. Os tratamentos foram concomitantes à estimulação com LPS 10µg/mL por 24h. ANOVA P <0.05, Tukey post-test * (p <0.05). Os experimentos foram realizados com três passagens distintas.

5.7 Ativação do TRPV1 inibe a esteroidogênese *in vivo*

A partir dos dados *in vitro*, partimos para um experimento *in vivo*, no qual camundongos *Swiss webster* foram submetidos a tratamentos intraperitoneais com capsaicina e LPS. Neste experimento, camundongos *Swiss webster* foram submetidos a pré-tratamentos com capsaicina (administração intraperitoneal 30 min antes da injeção de LPS) e LPS (administração intraperitoneal 2 horas antes dos procedimentos). Similarmente ao apresentado *in vitro*, o pré-tratamento com capsaicina inibiu a produção de corticosterona induzida pelo LPS (Figura 25).

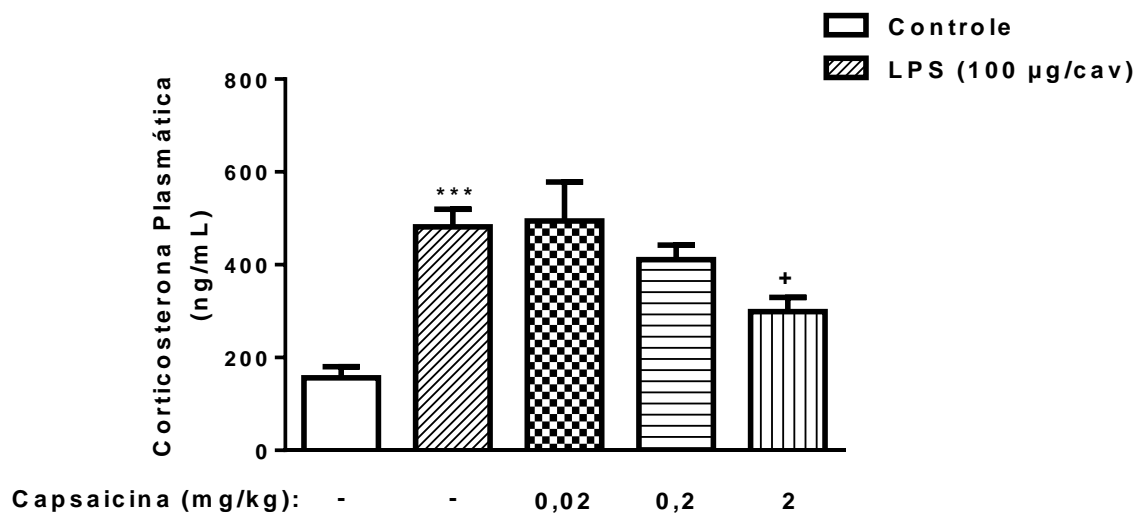


Figura 25 - Capsaicina inibe a produção de corticosterona induzida por LPS em camundongos *Swiss webster*.

Camundongos *Swiss webster* foram tratados primeiramente com capsaicina em diferentes doses. Após 1 hora, os animais foram tratados com 100µg por cavidade peritoneal. Após esse período foram tratadas com LPS. Diferentes grupos receberam pré-tratamento com capsacina nas seguintes doses: 0,02, 0,2 e 2 mg/Kg, por 1 hora. Em seguida, tratou-se com LPS 100µg/cavidade (i.p.) por 3h. Em seguida, o sangue foi coletado e a corticosterona foi quantificada por RIA. N=10 animais/grupo. ANOVA P <0.05, Tukey post-test *** (p <0.001 com o controle) e + (p <0.05 com o LPS).

Diante desses dois últimos resultados, foi possível confirmar o caráter inibitório da ativação do TRPV1 durante a esteroidogênese. É preciso ressaltar que durante o processo de síntese de glicocorticoides, as células de adrenais sofrem alterações estruturais. Tais alterações vêm acompanhadas de um aumento do conteúdo citoplasmático, de proteínas importantes para a esteroidogênese, como síntese de StAR (130–132). Essas alterações refletem o aumento das próprias células de adrenais, ou seja, essas células sofrem um processo de hipertrofia. Dessa forma, ao analisar a produção de corticosterona descrita anteriormente, nós verificamos que a glândulas adrenais sofreram hipertrofia diante do estímulo com LPS. Corroboram-se os dados acima à medida que constatamos que a ativação do TRPV1 inibe a hipertrofia das adrenais diante do estímulo estressor, ou seja, do LPS, conforme mostra a Figura 26.

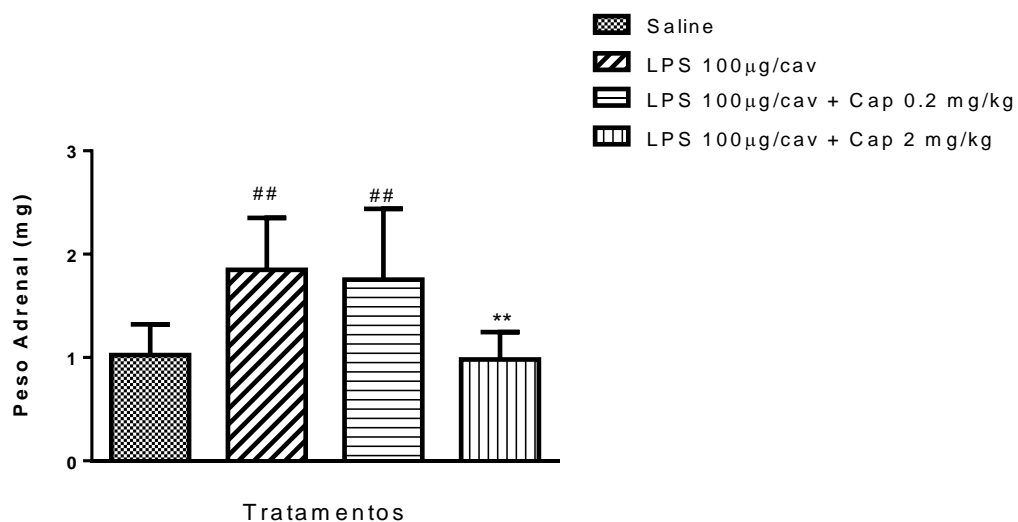


Figura 26 - Capsaicina inibe a hipertrofia das glândulas adrenais induzida por LPS em camundongos Swiss webster.

Camundongos *Swiss webster* foram tratados primeiramente com capsaicina em diferentes doses. Após 1 hora, os animais foram tratados com 100µg por cavidade peritoneal. Após esse período foram tratadas com LPS. Diferentes grupos receberam pré-tratamento com capsacina nas seguintes doses: 0,02, 0,2 e 2 mg/Kg, por 1 hora. Em seguida, tratou-se com LPS 100µg/cavidade (i.p.) por 3h. As glândulas adrenais ao lado direito do animal foram coletadas e pesadas. N=8-10 animais/grupo. ANOVA P <0.05, Tukey post-test ### (p <0.001 com o controle) e ** (p <0.05 com o LPS).

Após verificarmos como a esteroidogênese se comporta diante da ativação do TRPV1, buscamos observar se a inibição também se daria em relação às citocinas com potencial esteroidogênico. As citocinas analisadas, de IL-1 β e TNF- α , são as principais observadas na esteroidogênese induzidas por essa sinalização. Observamos, de acordo com a Figura 27, que o tratamento com capsacina não alterou a produção de IL-1 β em camundongos tratados com LPS. Por outro lado, a produção de TNF- α foi aumentada após tratamento com 0,2 mg/kg de capsacina em camundongos tratados com LPS.

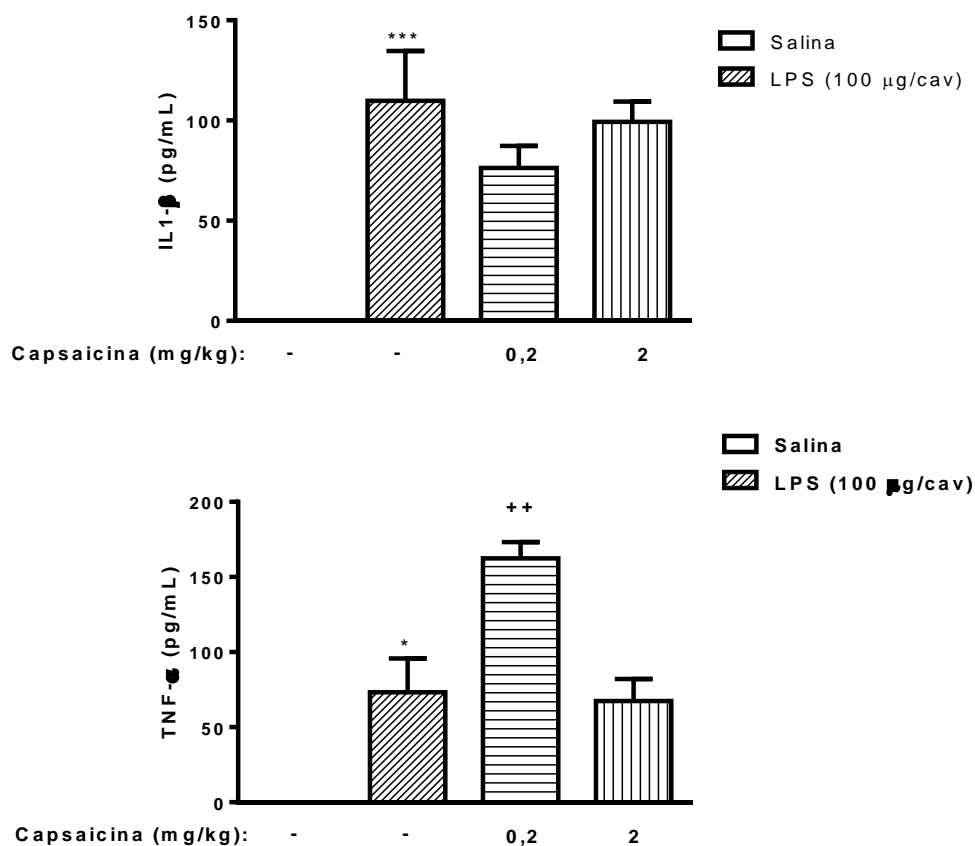


Figura 27 - Capsaicina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Camundongos *Swiss webster* foram tratados primeiramente com capsacina em diferentes doses. Após 1 hora, os animais foram tratados com 100 μ g por cavidade peritoneal. Após esse período foram tratadas com LPS. Diferentes grupos receberam pré-tratamento com capsacina nas seguintes doses: 0,2 e 2 mg/Kg, por 1 hora. Em seguida, tratou-se com LPS 100 μ g/cavidade (i.p.) por 3h. A produção de IL-1 β (A) e TNF- α (B) induzida por LPS em camundongos *Swiss webster* foi inibida com tratamento com capsacina. Diferentes grupos receberam pré-tratamento com capsacina nas seguintes doses: 0,2 e 2 mg/Kg, por 1 hora. Em seguida, tratou-se com LPS 100 μ g/cavidade (i.p.)

por 3h. N=10 animais/grupo. ANOVA P <0.05, Tukey post-test *** ($p < 0.001$ com o controle) e + ($p < 0.05$ com o LPS).

6 DISCUSSÃO

O eixo HPA é um complexo circuito de troca de informações entre os componentes dos sistemas nervoso, imune e endócrino. Sua principal finalidade é permitir que o organismo se adapte às influências dos ciclos claro/escuro, a estímulos estressores, a processos inflamatórios e a fatores emocionais, dentre outros.

Através de uma sinalização finamente ajustada entre hipófise (pela produção de ACTH) e adrenal (pelo reconhecimento desse peptídeo), os hormônios glicocorticoides são produzidos para preparar o organismo àqueles estímulos citados anteriormente. Contudo, a interface imunoendócrino não está totalmente elucidada, tanto na relação aos mecanismos quanto nos agentes celulares e seus produtos que atuam na adrenal para a produção de glicocorticoides independentemente da via do ACTH (133,134).

Contudo, sabe-se que agentes como o LPS e citocinas pró-inflamatórias são capazes de deflagrar a produção de glicocorticoides (135–138). Visto que os macrófagos possuem papel-chave no reconhecimento desses agentes, passamos a avaliá-los nesse processo.

Devido a sua expressão tanto em macrófagos (113) quanto em adrenais (112) e por atuar como um sensor celular, o TRPV1 poderia ser um ponto de destaque na interface imunoendócrina, atuando tanto nas adrenais quanto nos macrófagos. Além disso, TRPV1 mobiliza as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e AMPc, que são segundos mensageiros importantes na esteroidogênese (139,140). Contudo, a participação do TRPV1, no contexto imunoendócrino carece de informações no que se refere à produção e à liberação de glicocorticoides. Embora haja resultados na literatura que mostrem a expressão do TRPV1 em células adrenais e em macrófagos, a função desse receptor nesses tipos celulares ainda não está bem descrita (112,141,142). Ao buscar a elucidação dessa questão, realizamos ensaios para avaliar a expressão e as funções do TRPV1 nesses tipos celulares.

Inicialmente, confirmamos a expressão do TRPV1 em adrenais (Figura 6) e macrófagos peritoneais de camundongos (Figura 7). Além disso, observamos que a

linhagem de células imortalizadas Y1 capaz de produzir e secretar glicocorticoide também expressa TRPV1. Vale ressaltar que o padrão de marcação encontrado neste trabalho são similares àqueles encontrados na literatura, ou seja, uma marcação predominantemente intracelular e difusa.

Em seguida, realizamos os ensaios eletrofisiológicos na configuração *whole cell*. Rapidamente, a vantagem em se utilizar essa configuração se baseia no princípio que todas as proteínas TRPV1 presentes na membrana plasmática responderão a um estímulo específico, no presente trabalho a capsaicina. Dessa forma, outras proteínas não serão estimuladas, resultando em uma resposta global, ou seja, a resultante da atividade de todas as proteínas TRPV1 na membrana plasmática.

É necessário frisar que a funcionalidade do TRPV1 em macrófagos realmente carece de parâmetros quanto ao grau de atividade, probabilidade de abertura do canal, dentre outros. Neste caso, foi necessário apenas avaliar um número limitado de parâmetros, uma vez que não foi possível um aprofundamento biofísico do mesmo. Além disso, a extensa maioria dos dados presentes na literatura sobre esses pontos foram desenvolvidos em modelos heterólogos, através de uma superexpressão do TRPV1 (143–147). Embora, seja uma forma bastante utilizada para se realizarem esses tipos de ensaios, o modelo de expressão heteróloga carece em responder fielmente como o TRPV1 se comporta com outras proteínas endogenamente coexpressas.

Contudo, os nossos resultados foram similares àqueles encontrados na literatura, tais como correntes de entrada, padrões de dessensibilização, abertura de poros na membrana plasmática e mobilização de Ca^{2+} intracelular (148–150). É preciso ressaltar que nesse último aspecto, a mobilização desse segundo mensageiro após a ativação do TRPV1 é o principal agente de inibição do TRPV1. Essa relação já foi descrita na literatura, nos quais essa ação inibitória é revertida pela proteína cinase C. Além disso, a inibição também se daria a partir de mecanismos de *turnover* do TRPV1, de forma dependente das concentrações de Ca^{2+} intracelular (148,150,151).

Após a confirmação das correntes de entrada e mobilização dos níveis de Ca^{2+} intracelular, buscamos avaliar se o TRPV1 forma poros membranares em

macrófagos peritoneais. Vale ressaltar que proteínas formadoras de poros são encontradas tanto em organismos invertebrados quanto em vertebrados. Algumas delas possuem propriedades biofísicas (152–154) e funções similares, tais como o perfil de corrente, seletividade e *cut-off* (154–156).

Dentre as principais proteínas estudadas, destaca-se o P2X7R por sua capacidade de formar poros na membrana plasmática. Esse receptor ao ser ativado fisiologicamente ou em condições adversas pela adenosina 5`-trifosfato extracelular (ATP), apresenta características distintas dos demais quanto ao seu mecanismo de ativação. Uma vez ativado, ele altera a permeabilidade da membrana celular a solutos de elevado peso molecular (até 900 Da) carregados ou não (152–154).

Apesar de os estudos acerca do poro do P2X7R datem desde os anos de 1970, ainda há muitos dados controversos. Há uma discussão vigente, há pelo menos 30 anos, sobre a identidade do poro associado ao P2X7R e se esse poro depende ou não de mensageiros intracelulares, como cálcio e MAP cinases (127,152,157–160). Existem evidências que apontam que a formação do poro associado ao P2X7R se dá pela própria dilatação desse receptor, embora fortes indícios recentemente tenham favorecido a teoria de que haja uma proteína distinta que promova a abertura do poro do P2X7R, como mostramos previamente (95,118).

A partir 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 a panexina-1 (102,161). Alguns grupos afirmam categoricamente que essa proteína seria o poro do P2X7R (102,161). Entretanto, essa afirmação não seria verdade em todos os modelos celulares, inclusive naqueles testados, uma vez que uma gama de artigos não tem mostrado reprodutibilidade 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 (162). Mas, o que tem se mostrado é que o tipo e o estado de ativação celular podem ser preponderantes para a formação do poro do P2X7R. Assim, iniciamos uma série de experimentos a fim de trazer um pouco mais de luz à teoria de que esse poro seria uma proteína distinta do P2X7R.

Em 2005, *Alberto et al.* (118) avaliou a possibilidade de a proteína formadora panexina-1 participar na formação do poro ou no canal iônico formado pelo P2X7R em macrófagos peritoneais. Neste trabalho, os registros eletrofisiológicos de corrente iônica provocada pelo P2X7R 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 (118,158,162). 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.

Não obstante, alguns autores que defendem a panexina-1 como o poro associado ao P2X7R mostram a expressão da panexina-1 em células macrófágicas, como a linhagem J774 (102,161). Confirmamos essa evidência através dos resultados de RT-PCR, porém curiosamente, apesar de a linhagem J774 apresentar a expressão de panexina-1, no nosso modelo principal utilizado neste estudo, macrófagos peritoneais de camundongos, não se observa a expressão do hemicanal (118). Contudo, macrófagos peritoneais tratados por lipopolissacarídeo (LPS) passaram a expressá-la, que foi silenciada quando sob tratamento com RNA de interferência (RNAi) para panexina-1. Os resultados 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. Mostramos que não somente a probenecida, como também a carbenoxolona não apresentaram qualquer influência na formação do poro do P2X7R (Figura 15). Adicionalmente, o silenciamento da panexina-1 não inibiu a formação do poro do P2X7R. Portanto, isso significa que em macrófagos peritoneais, o modelo utilizado nesta dissertação, a panexina-1 não apresenta influências à formação do poro do P2X7R, indo ao encontro com diversos trabalhos da literatura (134, 147, 152).

O passo seguinte foi avaliar se outras estruturas formadoras de poros descritas na literatura poderiam ser ou participar da formação do poro do P2X7R. Vale a pena mencionar que há moléculas, como a ionomicina, um ionóforo de cálcio (158) e a maitotoxina, uma toxina marinha (153), 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. Além disso, há os poros que apresentam permeabilidade a ânions (163–165), os quais foram descartados no ensaio realizado com fluoresceína. Nesse ensaio, não houve captação de corante após a ativação por capsaicina. Uma observação se faz necessária, uma vez que ao se usar a fluoresceína nesse caso. Não é possível obter imagens satisfatórias ao se utilizar o detergente Triton X como controle positivo. Diferentemente do que ocorre com corantes catiônicos e intercalantes de DNA, há um extravasamento do corante aniônico ao meio extracelular. Assim, para compararmos o desempenho do poro do TRPV1 nesse caso, realizamos comparações com ensaios com Yopro-1 e brometo de etídeo.

Dessa forma, avaliamos se o receptor de potencial transitório vaniloide subtipo-1 (TRPV1) poderia participar do processo de formação do poro do P2X7R e vice e versa. Nesse sentido, o principal ensaio utilizado para esse fim foi a avaliação da captação de corantes fluorescente impermeáveis à membrana plasmática. Excluída a possibilidade de rupturas na membrana plasmática, realizamos ensaios em microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, nos quais a ativação do TRPV1 levou à abertura de um poro catiônico na membrana plasmática de macrófagos peritoneais. A corrente iônica e a mobilização de Ca^{2+} intracelular provocadas pelo ATP foram inibidas pelos antagonistas do TRPV1 ao avaliarmos o contexto de um canal iônico.

Uma vez averiguada a expressão do TRPV1 em macrófagos, verificamos o funcionamento do canal iônico e a formação do poro do TRPV1. Os resultados foram bastante semelhantes aos apresentados pelos registros da glia de Müller, tanto pela amplitude da corrente desenvolvida nos tipos celulares após exposição à capsaicina, quanto ao próprio formato 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. Vale destacar que o imageamento individual é uma abordagem que nos permite analisar cada tipo celular presente no campo de visualização do microscópio.

Portanto, os resultados apresentados na Figuras 9A e 9B corroboram com os dados da eletrofisiologia quanto a sua funcionalidade e são bastante ilustrativos quanto aos processos de dessensibilização do TRPV1, o qual pode encontrar padrões semelhantes na literatura (148,150,151).

Contudo, o dado mais relevante para trazermos luz ao papel da ativação do TRPV1 em macrófagos na esteroidogênese foi a inibição cruzada dos antagonistas do TRPV1 sobre a liberação de IL-1 β induzida pela ativação do P2X7. O potente antagonista do TRPV1, AMG 9810, inibiu a liberação tanto de IL-1 β quanto de TNF- α induzida por ATP em macrófagos peritoneais. Ressaltamos o uso do potente antagonista AMG9810 nesses ensaios para nos certificarmos de que de fato o TRPV1 participa da liberação dessas citocinas. É importante frisar que esse achado não era esperado, principalmente em relação à capsazepina e ao AMG9810, por serem antagonistas competitivos da capsaicina e terem seus sítios de ligação na porção intracelular da estrutura do TRPV1 (166,167).

Assim, a existência de uma rede intracelular de comunicação entre P2X7R e TRPV1 emerge como uma possibilidade a ser investigada posteriormente a este trabalho. É importante mencionar que dois artigos já mostraram uma via de comunicação entre o receptor purinérgico metabotrópico P2Y2 e o TRPV1 (82,83). Os elementos centrais desses trabalhos foram evidenciados à medida que ao se constatar que a ativação do TRPV1 sofria menor taxa de dessensibilização concomitantemente à ativação do receptor P2Y2. Possivelmente, uma vez que esse receptor metabotrópico aumenta os níveis de cAMP/PKA no interior celular, retardaria a dessensibilização. Além disso, o término da dessensibilização e retorno à capacidade de se ativar novamente foram mais breves quando houve uma pré-ativação do P2Y2 à ativação do TRPV1.

Por outro lado, a ativação do TRPV1 levou à liberação de IL-6 e IL-10, mas não de TNF- α . É digno de nota que a IL-10 exerce um papel anti-esteroidogênico conforme mostrado por Koldzic-Zivanovic e colegas, em 2006 (168). Os resultados

por eles apresentados revelam que a IL-10 é expressa majoritariamente na zona fasciculada, exerce um efeito negativo sobre a expressão da StAR, inibe a esteroidogênese e regula a ação da IL-6 nesse processo. Além disso, dois grupos de pesquisa demonstraram que a ativação do TRPV1 está relacionada ao aumento das concentrações de IL-10 *in vitro* e *in vivo* (169,170). Marshall e colaboradores em 2013 demonstraram, através de um modelo de cardiopatia relacionada à obesidade, que o aumento dos níveis circulantes de IL-10 dependem da ativação de TRPV1 em camundongos submetidos à dieta hipercalórica. (169). Por sua vez, o grupo de Billeter demonstrou que a produção de IL-10 em monócitos frente ao estímulo com LPS depende da ativação de TRPV1 (170). Dessa forma, se a ativação do TRPV1 em macrófagos levaria à produção de IL-10, poderia sugerir outra possibilidade de inibição por parte do TRPV1 na esteroidogênese na adrenal. Diante da importância desse tipo celular e dessas citocinas para a esteroidogênese, fica mais evidente o papel do TRPV1 na estimulação de células da adrenal no eixo imunoendócrino.

Mesmo assim, apenas com os dados de macrófagos peritoneais *in vitro* não é possível afirmar se a ativação do TRPV1 é pró- ou anti-esteroidogênica, uma vez que a capsaicina foi capaz de induzir a produção de IL-6, que é uma conhecida citocina pró-esteroidogênica.

Os experimentos desenvolvidos no eixo endócrino deste trabalho, ou seja, focando o comportamento das células de origem adrenal, revelaram tanto a expressão do TRPV1, quanto a sua funcionalidade de acordo com os ensaios de cálcio. Esse último ponto necessita de uma maior atenção aos experimentos em futuros trabalhos. De acordo com a literatura, as flutuações intracelulares dos íons cálcio são de grande importância na esteroidogênese e possuem capacidade tanto de estimular (em pequenas concentrações intracelulares de Ca^{2+}) quanto de inibir (em elevadas concentrações intracelulares de Ca^{2+}) a síntese de glicocorticoides (171,172).

Nós observamos que há comportamentos distintos da atividade do TRPV1 de acordo com as concentrações de seu agonista. De modo peculiar, os sinais de cálcio intracelulares a partir de um estímulo com baixa concentração de capsaicina foram muito semelhantes aos apresentados após os estímulos com ACTH e LPS.

Uma vez que esses elementos são pró-esteroidogênicos e supondo que o Ca^{2+} intracelular exerça papel importante nesse processo, poderíamos propor um circuito quantal em proporções desses íons transacionariam numa condição a favor ou contra a esteroidogênese. Se observarmos o comportamento do nível de Ca^{2+} intracelular após ativação por concentrações maiores de capsaicina, atingiu-se um platô. Talvez seja esse platô as adições quantais que exerceriam influência sobre uma ação anti-esteroidogênica do TRPV1 em células da suprarrenal. Contudo, ainda resta saber por que processos as menores concentrações de capsaicina não induziram a esteroidogênese.

Certamente, os níveis de Ca^{2+} intracelular são importantes para a esteroidogênese, mas é preciso ressaltar os papéis de outro segundo mensageiro, o cAMP, além do fator de transcrição $\text{NF}\kappa\text{B}$ (173). Se formos analisar o primeiro, ele está intimamente envolvido na sinalização “clássica” neuro-imuno-endócrina, na qual o ACTH sintetizado na hipófise se difunde pelo organismo até encontrar seus receptores. Neste caso, os receptores de ACTH encontrados nas células presentes na zona fasciculada disparam uma sinalização cAMP/PKA (174,175). Esse sinal culmina, dentre outros, na promoção do transporte de moléculas de colesterol para o interior das mitocôndrias para a síntese de glicocorticoides, via StAR.

Por sua vez, a sinalização pró-esteroidogênica promovida pela ativação com LPS acontece direta ou indiretamente nas células da zona fasciculada da adrenal. Diretamente, podemos ressaltar que as células produtoras de glicocorticoides possui toda a maquinaria capaz de responder ao estímulo do LPS, especificamente a via do $\text{NF}\kappa\text{B}$ e ativação da ciclooxygenase-2 (176–178). Independentemente de qual via se dá, ambas promovem um aumento de Ca^{2+} intracelular que vai favorecer a entrada e o transporte de colesterol às mitocôndrias, paralelamente à mobilização de outros estoques de Ca^{2+} e colesterol, como os corpúsculos lipídicos.

Posteriormente, os ensaios *in vivo* confirmaram os resultados encontrados nos ensaios *in vitro*, a influência do TRPV1 depende das concentrações de agonistas utilizadas. Podemos observar que houve um perfil anti-esteroidogênico da ativação do TRPV1 à medida que se aumentava as concentrações de capsaicina. Além disso, as concentrações plasmáticas de $\text{TNF-}\alpha$ foram aumentadas após estímulos com capsaicina em camundongos tratados com LPS. Esse dado é

interessante, pois esta citocinas é capaz de induzir esteroidogênese diretamente, mas de modo independente ao ACTH (21,179–181).

De fato, diante dos resultados obtidos até então, há a indicação de que a ativação do TRPV1 levaria à inibição da esteroidogênese de forma direta (nas adrenais) e indireta (células do sistema imune) (Figura 28). Isso vai de encontro com a nossa hipótese inicial, na qual ativação do TRPV1 levaria à indução da esteroidogênese. Portanto, podemos supor que em um contexto inflamatório, onde glicocorticoides têm um papel importante na resolução da inflamação, o TRPV1 poderia agir como um agente pró-inflamatório, retardando a ação resolutive de glicocorticoides. Entretanto, é necessário responder quais são os componentes e as etapas envolvidos após a ativação do TRPV1 nestes contextos direto e indireto.

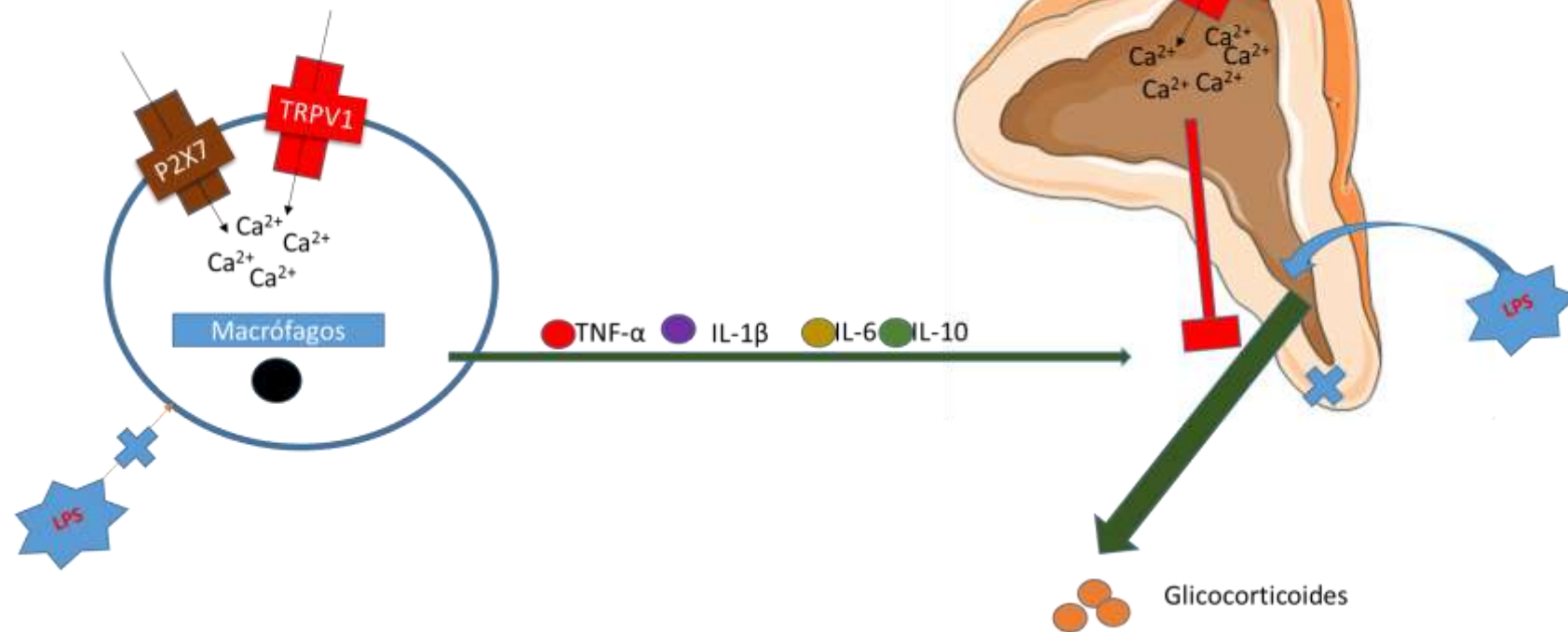


Figura 28 - Esquema representativo da hipótese atual.

Macrófagos peritoneais ativados por LPS produzem TNF- α , IL-1 β e IL-6 que induzem células da adrenal a produzir glicocorticoides. A ativação dos canais iônicos P2X7 e TRPV1 favoreceriam esse processo tanto nos macrófagos quanto nas células de adrenal. Neste sentido, os íons Ca²⁺ exerceriam papel fundamental na produção de glicocorticoides, uma vez que já foram vistos anteriormente como participantes na esteroidogênese. Contudo, a esteroidogênese induzida por LPS nas adrenais diretamente se apresentou comprometida com a ativação do TRPV1 na região cortical da glândula adrenal. Nessa etapa, o aumento de cálcio intracelular desfavoreceria a esteroidogênese.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados até este momento, constatamos a expressão e a funcionalidade TRPV1 em macrófagos peritoneais e células de adrenal de origem murina. É possível que estejamos diante de um circuito purinérgico-vaniloide que pode influir na esteroidogênese sob um contexto imunoendócrino, uma vez que ambos receptores participam da produção de citocinas pró-esteroidogênicas.

A ativação do TRPV1 foi capaz de induzir a formação de poro com P2X7R em macrófagos, o que levou a uma redução na produção de citocinas pró-esteroidogênicas *in vitro*. Além disso, a ativação do TRPV1 em linhagem de células de adrenal culminou com inibição na liberação de corticosterona em paralelo com elevação supra-fisiológica das concentrações de Ca^{2+} intracelular *in vitro*. Em adição, observamos que a ativação de TRPV1 com capsaicina reduziu as concentrações plasmáticas de corticosterona, enquanto aumentou a produção de TNF- α na cavidade peritoneal de camundongos. Esses dados nos sugerem que a ativação do TRPV1 levaria à inibição da esteroidogênese tanto de forma direta, em células da adrenal produtoras de glicocorticoides, possível por sinalização intracelular mediada por íons cálcio. Finalmente, os resultados encontrados trazem luz a novas abordagens quanto a doenças metabólicas, com a resistência à insulina e, àquelas em distúrbios do eixo HPA, como a síndrome de Cushing.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008;9(10):764–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802415>
2. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* [Internet]. 2007 Nov;195(2):187–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951531>
3. Spies CM, Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F. Circadian rhythms in rheumatology--a glucocorticoid perspective. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2014;16 Suppl 2:S3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608777>
4. Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA axis-rhythms. *Compr Physiol* [Internet]. 2014;4(3):1273–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24944037>
5. Arnett MG, Muglia LM, Laryea G, Muglia LJ. Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26189452>
6. Keller-Wood M. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis-Feedback Control. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. p. 1161–82. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c140065>

7. Walker DJ, Spencer KA. Glucocorticoid programming of neuroimmune function. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2018;256:80–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.016>
8. Belda X, Fuentes S, Daviu N, Nadal R, Armario A. Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* [Internet]. 2015;18(3):269–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300109>
9. Boutzios G, Kaltsas G. Immune System Effects on the Endocrine System [Internet]. *Endotext*. 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905362>
10. Trianti-Dimoleni V, Mastorakos G, Nezi M. Corticotropin Releasing Hormone And The Immune/Inflammatory Response [Internet]. *Endotext*. 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905246>
11. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383–95.
12. Gruenwald P. Embryonic and postnatal development of the adrenal cortex, particularly the zona glomerulosa and accessory nodules. *Anat Rec*. 1946;August.
13. Miller WL. A brief history of adrenal research: steroidogenesis - the soul of the adrenal. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2013;371(1–2):5–14. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123735>

14. Cabrera-Sharp V, Mirczuk SM, Shervill E, Michael AE, Fowkes RC. Regulation of glucocorticoid metabolism in the boar testis and caput epididymidis by the gonadotrophin-cAMP signalling pathway. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2013;352(3):751–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568656>
15. Hernandez-Morante JJ, Gomez-Santos C, Milagro F, Campión J, Martínez JA, Zamora S, et al. Expression of cortisol metabolism-related genes shows circadian rhythmic patterns in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* [Internet]. 2009;33(4):473–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204728>
16. González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell Tissue Res*. 1994;278(2):201–5.
17. Magalhães MM, Magalhães MC. Effects of orchidectomy on the adrenal macrophage system. *Anat Rec*. 1980;198(2):209–18.
18. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Viral Infection. *Viral Immunol* [Internet]. 2005 Mar;18(1):41–78. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2005.18.41>
19. Bailey M, Engler H, Hunzeker J, Sheridan JF. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and viral infection. *Viral Immunol* [Internet]. 2003;16(2):141–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828866>

20. Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, et al. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2006 Apr;173(1–2):12–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494952>
21. Päch G, Scherbaum W a, Bornstein SR. The role of interleukin-6 in the human adrenal gland. *Eur J Clin Invest*. 2000;30 Suppl 3:91–5.
22. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2003;4(11):897–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625539>
23. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2009;27:669–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132917>
24. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* [Internet]. 1992 Jul 1;176(1):287–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462>
25. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* [Internet]. 2000 Jun 15;164(12):6166–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843666>
26. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental

- Guidelines. *Immunity* [Internet]. 2014 Jul;41(1):14–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314002283>
27. Rőszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:816460. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089604>
 28. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014 Mar 3;6. Available from: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/13>
 29. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2015 May 26;6. Available from: http://www.frontiersin.org/Molecular_Innate_Immunity/10.3389/fimmu.2015.00263/abstract
 30. Fuchs T, Hahn M, Riabov V, Yin S, Kzhyshkowska J, Busch S, et al. A combinatorial $\alpha\beta$ T cell receptor expressed by macrophages in the tumor microenvironment. *Immunobiology* [Internet]. 2017;222(1):39–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26494401>
 31. Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* [Internet]. 2014 Nov;262(1):36–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25319326>
 32. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 25;496(7446):445–55.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619691>

33. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* [Internet]. 2004 Dec;25(12):677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>
34. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* [Internet]. 2011 Apr 29;145(3):341–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529710>
35. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* [Internet]. 2003 May 15;423(6937):337–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748652>
36. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2010;72:219–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148674>
37. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Oct 10;11(11):738–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984069>
38. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2010 Aug;30(3):245–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665377>
39. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* [Internet]. 2014 Jul;41(1):49–61. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314002301>

40. Kandel ER, Schwartz JHJ, Jessell TTM, Eric Kandel, James Schwartz TJ, Kandel ER, Schwartz JHJ, et al. Principles of Neural Science. Neurology [Internet]. 4 edition. McGraw-Hill Medical; 2000;1414. Available from: <http://www.amazon.com/Principles-Neural-Science-Eric-Kandel/dp/0071120009>
41. 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. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. 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 [cited 2014 Jan 4];4(8):e751. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3763436&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
43. 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 [cited 2013 Nov 11];18(4):600–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321107&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
44. 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 [cited 2014 May 25];2013:271813. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3568910&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
45. 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 [cited 2013 Nov 25];177(5):2842–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920919>
46. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2014 Jan 4];22(3):364–73. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hq0302.105360>
47. Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 3;278(40):39014–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857742>
48. Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* [Internet]. 2001 Mar;29(3):645–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301024>
49. Oancea E, Vriens J, Brauchi S, Jun J, Splawski I, Clapham DE. TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci Signal* [Internet]. 2009 Jan;2(70):ra21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436059>

50. Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2015;77:57–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25668017>
51. Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Jan 25];62(3):381–404. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2964900&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
52. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* [Internet]. 2003 Dec 4;426(December):517–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654832>
53. Montell C, Caterina MJ. Thermoregulation: Channels that Are Cool to the Core. *Curr Biol*. 2007;17:885–7.
54. Tsui H, Paltser G, Dorfman R, Dosch HM. “ Sensing ” the link between type 1 and type 2 diabetes. 2011;(July):913–8.
55. Voets T, Nilius B. TRPs make sense. *J Membr Biol* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2013 Dec 12];192(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12647029>
56. 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 [cited 2014 Jan 21];389(6653):816–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349813>

57. Palazzo E, Luongo L, De Novellis V, Rossi F, Marabese I, Maione S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. *Curr Opin Pharmacol*. Elsevier Ltd; 2012 Feb;12(1):9–17.
58. Idris AI, Landao-Bassonga E, Ralston SH. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Apr [cited 2014 Jun 29];46(4):1089–99. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328210003741>
59. 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 [cited 2014 Jan 26];718(1–3):154–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041928>
60. Bishnoi M, Kondepudi KK, Gupta A, Karmase A, Boparai RK. Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacol Reports*. 2013 Jan;65(3):751–5.
61. 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]. Elsevier B.V.; 2013 Mar [cited 2014 Jan 2];15(3):597–605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453702>
62. Yang Y, Yang H, Wang Z, Mergler S, Wolosin JM, Reinach PS. Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Feb [cited 2014 Jan 2];107:121–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483512003314>

63. 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 [cited 2013 Nov 7];92(3):421–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753949>
64. Davis JBB, Gray J, Gunthorpe MJJ, Hatcher JPP, Davey PTT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* [Internet]. 2000 May 11 [cited 2014 Jan 2];405(6783):183–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821274>
65. Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, et al. TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci*. 2009 Jan;29(1):153–8.
66. Cortright DW, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1: An update. *Eur J Biochem*. 2004 May;271(10):1814–9.
67. Tominaga M, Moriyama T. Functional interaction between ATP and TRPV1 receptors. In: *Molecular Sensors for Cardiovascular Homeostasis*. 2007. p. 133–40.
68. Krarup AL, Ny L, Gunnarsson J, Hvid-Jensen F, Zetterstrand S, Simrén M, et al. Randomized clinical trial: inhibition of the TRPV1 system in patients with nonerosive gastroesophageal reflux disease and a partial response to PPI treatment is not associated with analgesia to esophageal experimental pain. *Scand J Gastroenterol*. 2013 Mar;48(3):274–84.
69. Kissin I, Szallasi A. Therapeutic Targeting of TRPV1 by Resiniferatoxin, from Preclinical Studies to Clinical Trials. *Curr Top Med Chem*. 2011 Jan;11(17):2159–70.

70. Kort ME, Kym PR. TRPV1 antagonists: Clinical setbacks and prospects for future development. *Prog Med Chem* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jun 29];51:57–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123964939000029>
71. 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 [cited 2014 Jan 21];389(6653):816–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349813>
72. Samways DSK, Egan TM. Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Arch* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 Jan 25];462(5):681–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3339194&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
73. 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 [cited 2013 Dec 4];504(7478):107–12. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12822>
74. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of TRP channels. [Internet]. Vol. 68, Annual review of physiology. 2006 [cited 2014 Jan 14]. 685-717 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460288>
75. 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. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2396679&tool=pmc>

entrez&rendertype=abstract

76. 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 [cited 2014 Jan 26];54(6):905–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582331>
77. 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. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133377>
78. Conway SJ. TRPing the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chem Soc Rev*. 2008;37(8):1530–45.
79. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* [Internet]. 2008 Feb [cited 2014 Feb 22];24(2):142–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209521>
80. Jones VM, Moore KA, Peterson DM. Capsaicin 8% topical patch (Qutenza)--a review of the evidence. *J Pain Palliat Care Pharmacother* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jan 26];25(1):32–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21426216>
81. 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 [cited 2013 Oct 5];25(19):4835–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888659>

82. 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 [cited 2013 Aug 17];298(6):R1634-41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886708&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
83. 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. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853424>
84. 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 [cited 2013 Nov 14];25(5):819–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133936>
85. Chung M-K, Güler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* [Internet]. 2008 May [cited 2014 Jan 2];11(5):555–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391945>
86. Alves LA, De Melo Reis RA, De Souza CAM, De Freitas MS, Teixeira PCN, Neto Moreira Ferreira D, et al. The P2X7 receptor: Shifting from a low- to a high-conductance channel - An enigmatic phenomenon? *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 May 20 [cited 2014 May 28];1838:2578–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24857862>

87. Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Mar 31 [cited 2014 Jan 26];281(13):8991–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431906>
88. 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. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764092>
89. Myrdal SE, Steyger PS. TRPV1 regulators mediate gentamicin penetration of cultured kidney cells. *Hear Res* [Internet]. 2005 Jun [cited 2013 Dec 2];204(1–2):170–82. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378595505000493>
90. Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 4 [cited 2013 Dec 22];449(7162):607–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914397>
91. 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 [cited 2014 Jan 6];109(7):1704–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303863>
92. 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 [cited 2014 Jan 2];279(33):34553–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173182>

93. Ferreira LGB, Faria RX. TRPping on the pore phenomenon: what do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. 2016 Feb 4;48(1):1–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-015-9634-8>
94. Ferreira LG., Pereira L, Faria R. Fluorescent dyes as a reliable tool in P2X7 receptor-associated pore studies. *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-015-9613-0>
95. Faria RX, Reis RAM, Ferreira LGB, Cezar-de-Mello PFT, Moraes MO. P2X7R large pore is partially blocked by pore forming proteins antagonists in astrocytes. *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; 2016;48(3):309–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-016-9649-9>
96. 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 [cited 2014 Jan 12];47(4):705–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415476>
97. 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 [cited 2014 Jan 12];23(3):795–805. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971257>
98. 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*. 2013 Jan;9:1.

99. Bartlett R, Yerbury JJ, Sluyter R. P2X7 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species Formation and Cell Death in Murine EOC13 Microglia. 2013;2013.
100. Freitas HR, Ferraz G, Ferreira GC, Ribeiro-Resende VT, Chiarini LB, do Nascimento JLM, et al. Glutathione-Induced Calcium Shifts in Chick Retinal Glial Cells. PLoS One [Internet]. 2016;11(4):e0153677. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27078878>
101. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2007 Sep [cited 2013 Nov 18];28(9):465–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692395>
102. 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 [cited 2013 Nov 11];25(21):5071–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1630421&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
103. 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 [cited 2013 Dec 31];28(3):351–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435013>
104. 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 [cited 2013 Dec 31];190(3):1217–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267025>

105. 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 [cited 2013 Dec 31];278(33):30732–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796490>
106. Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1999 Aug [cited 2013 Dec 31];127(8):1915–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1566177&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
107. 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 [cited 2013 Nov 8];176(7):3877–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547218>
108. Sanz JM, Di Virgilio F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* [Internet]. 2000 May 1;164(9):4893–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779799>
109. Kawamura M, Matsui T, Niitsu A, Kondo T, Ohno Y, Nakamichi N. Extracellular ATP Stimulates Steroidogenesis in Bovine Adrenocortical Fasciculata Cells via P2 Purinoceptors. *Jpn J Pharmacol* [Internet]. 1991;56(4):543–5. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/jphs1951/56.543?from=CrossRef>
110. Matsui T. Biphasic rise caused by extracellular ATP in intracellular calcium concentration in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1991 Aug 15;178(3):1266–72. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1908234>

111. Afework M, Burnstock G. Distribution of P2X receptors in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1999;298(3):449–56.
112. Yu Q, Wang Y, Yu Y, Li Y, Zhao S, Chen Y, et al. Expression of TRPV1 in rabbits and consuming hot pepper affects its body weight. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2012;39(7):7583–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327653>
113. Assas BM, Wakid MH, Zakai HA, Miyan JA, Pennock JL. Transient receptor potential vanilloid 1 expression and function in splenic dendritic cells: a potential role in immune homeostasis. *Immunology* [Internet]. 2016;147(3):292–304. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12562>
114. de Torre-Minguela C, Barbera-Cremades M, Gomez AI, Martin-Sanchez F, Pelegrin P. Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6(October 2015):22586. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4776275/pdf/srep22586.pdf>
115. Romanovsky A a, Almeida MC, Garami A, Steiner A a, Norman MH, Morrison SF, et al. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev.* 2009;61(3):228–61.
116. Mingam R, De Smedt V, Amédée T, Bluthé R-M, Kelley KW, Dantzer R, et al. In vitro and in vivo evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 beta in the murine brain. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2008 Feb;22(2):234–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905568>

117. Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3210–8.
118. Alberto AVP, Faria RX, Couto CGC, Ferreira LGB, Souza C a M, Teixeira PCN, et al. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 2013 Sep 9 [cited 2013 Nov 22];386(9):775–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657251>
119. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man* [Internet] [Internet]. 2013;114(8):785–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
120. Ninomiya Y, Tanuma S-I, Tsukimoto M. Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Mar 11;484(3):668–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28153725>
121. Zhao JF, Ching LC, Kou YR, Lin SJ, Wei J, Shyue SK, 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. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3710635&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

122. Wang Y, Wang DH, Wang H. TRPV1 ablation aggravates inflammatory responses and organ damage during endotoxic shock. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Jan 26];20(7):1008–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3697449&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
123. Cui Y-Y, Xu H, Wu H-H, Qi J, Shi J, Li Y-Q. Spatio-Temporal Expression and Functional Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Diabetic Mechanical Allodynia in Rats. Hou B, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 14;9(7):e102052. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0102052>
124. Ma F, Zhang L, Westlund KN. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol Pain* [Internet]. 2009 Jun 17;5:31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531269>
125. Sappington RM, Sidorova T, Ward NJ, Chakravarthy R, Ho KW, Calkins DJ. Activation of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) influences how retinal ganglion cell neurons respond to pressure-related stress. *Channels* [Internet]. 2015 Mar 4;9(2):102–13. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19336950.2015.1009272>
126. Amantini C, Ballarini P, Caprodossi S, Nabissi M, Morelli MB, Lucciarini R, et al. Triggering of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) by capsaicin induces Fas/CD95-mediated apoptosis of urothelial cancer cells in an ATM-dependent manner. *Carcinogenesis* [Internet]. 2009 Aug [cited 2013 Aug 17];30(8):1320–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502594>

127. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* [Internet]. 1999 Apr [cited 2013 Nov 25];2(4):315–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204537>
128. Alves LA, de Melo Reis RA, de Souza CAM, de Freitas MS, Teixeira PCN, Neto Moreira Ferreira D, et al. The P2X7 receptor: Shifting from a low- to a high-conductance channel? An enigmatic phenomenon? *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2014 Oct;1838(10):2578–87. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273614001874>
129. Ferreira LGB, Faria RX. TRPping on the pore phenomenon: what do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? *J Bioenerg Biomembr* [Internet]. 2016 Feb 4;48(1):1–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-015-9634-8>
130. Garcia R, Vilorio MD, Municio AM. Influence of *E. coli* endotoxin on acth induced adrenal cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem*. 1985;22(3):377–85.
131. Held Hales K, Hales KH, Diemer T, Ginde S, Shankar BK, Roberts M, et al. Diametric Effects of Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide on Adrenal and Leydig Cell Steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Endocrinology* [Internet]. 2000;141(11):4000–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089530>
132. Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Samus M, Tran N, Zacharowski K, Chavakis T, et al. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;371(1–2):228–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.020>

133. Bellavance M-A, Rivest S. The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Mar 31;5:136. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00136/abstract>
134. Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2001 Nov;26(8):761–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585678>
135. Tilders FJH, DeRuk RH, Van Dam A-M, Vincent VAM, Schotanus K, Persoons JHA. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: Routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 1994 Jan;19(2):209–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306453094900108>
136. Beishuizen A, Thijs LG. Review: Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* [Internet]. 2003 Feb 3;9(1):3–24. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09680519030090010101>
137. RIVIER C, CHIZZONITE R, VALE W. In the Mouse, the Activation of the Hypothalamic Pituitary-Adrenal Axis by a Lipopolysaccharide (Endotoxin) Is Mediated through Interleukin-1*. *Endocrinology* [Internet]. 1989 Dec;125(6):2800–5. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-125-6-2800>
138. Givalois L, Dornand J, Mekaouche M, Solier MD, Bristow AF, Ixart G, et al. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*

- [Internet]. 1994 Jul;267(1):R164–70. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1994.267.1.R164>
139. Gallo-Payet N, Payet MD. Mechanism of action of ACTH: Beyond cAMP. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2003 Jun 15;61(3):275–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.10337>
140. Omura M, Suematsu S, Nishikawa T. Role of calcium messenger systems in ACTH-induced cortisol production in bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Endocr J* [Internet]. 2007 Aug;54(4):585–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634670>
141. Devesa I, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *J Inflamm Res* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jan 30];4:67–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3218746&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
142. 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;188(11):5741–51. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/188/11/5741%5Cnhttp://www.jimmunol.org/content/188/11/5741.full.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547700>
143. Veldhuis NA, Lew MJ, Abogadie FC, Poole DP, Jennings EA, Ivanusic JJ, et al. N -Glycosylation Determines Ionic Permeability and Desensitization of the TRPV1 Capsaicin Receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 22;287(26):21765–72. Available from:

<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.342022>

144. Li H, Wang S, Chuang AY, Cohen BE, Chuang H -h. Activity-dependent targeting of TRPV1 with a pore-permeating capsaicin analog. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 May 17;108(20):8497–502. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018550108>
145. Wang C, Hu H-Z, Colton CK, Wood JD, Zhu MX. An Alternative Splicing Product of the Murine *trpv 1* Gene Dominant Negatively Modulates the Activity of TRPV1 Channels. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Sep 3;279(36):37423–30. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M407205200>
146. Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, et al. TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem* [Internet]. 2006 Nov;99(4):1088–102. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2006.04145.x>
147. Weyer M, Jahnke H-G, Krinke D, Zitzmann FD, Hill K, Schaefer M, et al. Quantitative characterization of capsaicin-induced TRPV1 ion channel activation in HEK293 cells by impedance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2016 Nov 8;408(29):8529–38. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-016-9978-x>
148. Sanz-Salvador L, Andrés-Borderia A, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R. Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 1;287(23):19462–71. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.289751>

149. Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent Desensitization in the Vanilloid Receptor TRPV1 by Calcineurin and cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 8;280(14):13424–32. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M410917200>
150. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* [Internet]. 2004 May;35(5):471–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014341600300232X>
151. Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. A “cute” desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011 Jan 1;12(1):122–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932251>
152. Coutinho-Silva R, Persechini PMM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *Am J Physiol* [Internet]. 1997 Dec [cited 2014 Jan 1];273(6 Pt 1):C1793-800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435482>
153. 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. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516107>
154. 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 [cited 2014 Jan 27];89(1):264–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030411>

155. 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 [cited 2014 Jan 27];16(8):3659–65. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1182305&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
156. 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 [cited 2014 Jan 27];25(1):34–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1356351&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
157. Faria RX, Ferreira LG., Alves L. The Mystery of P2X7 Ionotropic Receptor: From a Small Conductance Channel to a Large Conductance Channel. In: cdn.intechopen.com. 2010.
158. 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 [cited 2014 Jan 23];288(2):C260-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469955>
159. Faria RX, Cascabulho 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 [cited 2014 Jan 23];382(1):73–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508916>

160. 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. InTech; 2012.
161. 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 [cited 2014 Jan 1];295(3):C752–60. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2544446&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
162. 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 [cited 2014 Jan 12];132(5):563–73. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2571973&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
163. Elinder F, Akanda N, Tofighi R, Shimizu S, Tsujimoto Y, Orrenius S, et al. Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli. *Cell Death Differ* [Internet]. 2005 Aug [cited 2014 Aug 5];12(8):1134–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861186>
164. Glogowska E, Dyrda A, Cueff A, Bouyer G, Egée S, Bennekou P, et al. Anion conductance of the human red cell is carried by a maxi-anion channel. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Apr 15 [cited 2014 Aug 4];44(4):243–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.02.014>
165. Islam MR, Uramoto H, Okada T, Sabirov RZ, Okada Y. Maxi-anion channel and pannexin 1 hemichannel constitute separate pathways for swelling-

- induced ATP release in murine L929 fibrosarcoma cells. *AJP Cell Physiol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2014 Jun 23];303(9):C924–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785119>
166. Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, et al. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2005 Apr [cited 2013 Nov 21];313(1):474–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615864>
 167. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1992 Oct;107(2):544–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422598>
 168. Koldzic-Zivanovic N, Tu H, Juelich TL, Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, et al. Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: A preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata. *Brain Behav Immun*. 2006;20(5):460–8.
 169. Marshall NJ, Liang L, Bodkin J, Dessapt-Baradez C, Nandi M, Collot-Teixeira S, et al. A role for TRPV1 in influencing the onset of cardiovascular disease in obesity. *Hypertension*. 2013;61(1):246–52.
 170. Billeter AT, Galbraith N, Walker S, Lawson C, Gardner SA, Sarojini H, et al. TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. *Surg (United States)* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;158(3):646–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2015.03.065>
 171. LEFKOWITZ RJ, ROTH J, PASTAN I. Effects of Calcium on ACTH Stimulation

- of the Adrenal: Separation of Hormone Binding from Adenyl Cyclase Activation. *Nature* [Internet]. 1970 Nov 28;228(5274):864–6. Available from: <http://bioinfcpcri.org/misc/nature.pdf>
172. Podesta EJ, Milani A, Steffen H, Neher R. Steroidogenic action of calcium ions in isolated adrenocortical cells. *Biochem J* [Internet]. 1980 Feb 15;186(2):391–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6246883>
173. Gallo-Payet N, Payet MD. Mechanism of action of ACTH: Beyond cAMP. *Microsc Res Tech*. 2003;61(3):275–87.
174. Farese R V, Sabir MA, Larson RE. On the mechanism whereby ACTH and cyclic AMP increase adrenal polyphosphoinositides. Rapid stimulation of the synthesis of phosphatidic acid and derivatives of CDP - diacylglycerol. *J Biol Chem* [Internet]. 1980 Aug 10;255(15):7232–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248553>
175. Shima S, Kawashima Y, Hirai M. STUDIES ON CYCLIC NUCLEOTIDES IN THE ADRENAL GLAND. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 1979 Jan 1;90(1):139–46. Available from: <http://www.eje-online.org/cgi/doi/10.1530/acta.0.0900139>
176. Vakharia K, Hinson JP. Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Endocrinology* [Internet]. 2005;146(3):1398–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15564329>
177. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. *Neuron* [Internet]. 2009 Oct;64(1):33–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627309007430>

178. Kanczkowski W, Sue M, Zacharowski K, Reincke M, Bornstein SR. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2015 Jun;408:241–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720714004225>

179. Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2002 Dec;133(1–2):1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446003>

180. Tkachenko I V, Jääskeläinen T, Jääskeläinen J, Palvimo JJ, Voutilainen R. Interleukins 1 α and 1 β as regulators of steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells. *Steroids* [Internet]. 76(10–11):1103–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600230>

181. Mikhaylova I V., Kuulasmaa T, Jääskeläinen J, Voutilainen R. Tumor necrosis factor- α regulates steroidogenesis, apoptosis, and cell viability in the human adrenocortical cell line NCI-H295R. *Endocrinology*. 2007;148(1):386–92.