

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO DALLA VECCHIA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA PURINA INOSINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
CUTÂNEA: A POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR P1 (A2a).

CURITIBA

2013

BRUNO DALLA VECCHIA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA PURINA INOSINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
CUTÂNEA: A POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR P1 (A2a).

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

2013

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliveira, Bruno Dalla Vecchia de

Avaliação da purina inosina sobre a resposta inflamatória cutânea : a possível participação do receptor P1 (A2a) / Bruno Dalla Vecchia de Oliveira. – Curitiba, 2013.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini.

Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

1. Inosina. 2. Pele - Inflamação. 3. Óleo de Cróton. 4. Imiquimode. I. Cabrini, Daniela de Almeida, 1970-. II. Otuki, Michel Fleith. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

## PARECER

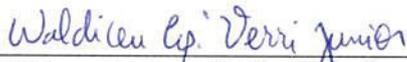
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "AVALIAÇÃO DA PURINA INOSINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA CUTÂNEA: A POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR P1 (A2a)", de autoria do pós-graduando **BRUNO DALLA VECCHIA DE OLIVEIRA**, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela de Almeida Cabrini e composta pelos professores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia – UFPR); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eunice André (Farmacologia – UFPR) e Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior (Ciências Patológicas – UEL), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi Aprovado. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 18 de outubro de 2013.



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia – UFPR)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eunice André (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior (Ciências Patológicas – UEL)

Dedico este trabalho ao futuro. Que minhas falhas sirvam de lição, meus acertos de base e ambos de inspiração, para que o conhecimento seja multiplicado, em sua essência pacífica e sincera, simplesmente multiplicado.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho é o resultado não somente do esforço de um, mas de todos que direta ou indiretamente contribuíram para que ele acontecesse. Principalmente ao longo dos anos de laboratório, todos que passaram pela bancada ao meu lado, ensinando técnicas e macetes. Aos orientadores que permitiram o meu desenvolvimento criativo, e deram oportunidade e liberdade para que eu aprendesse a fazer ciência. E a minha família, aquela na qual nasci, e todas as outras que escolhi participar ao longo da vida, pelo apoio e incentivo, pela estrutura e tudo mais.

"Ao perguntarem se sabes fazer algo, diga que sim, e ponha-se a aprender como".

(Autor desconhecido)

## RESUMO

A inosina, primeiro metabólito da adenosina, foi quase esquecida ao longo de 20 anos, mas no final da década de 90, com a descoberta do seu efeito anti-inflamatório, atividade citoprotetora e clonagem de receptores purinérgicos P1 (A1, A2a, A2b, A3), a atenção voltou-se para inosina como um alvo farmacológico. Nosso estudo teve como objetivo verificar se a inosine exerce seu efeito sobre a inflamação da pele através do receptor A2a, da família P1. A inflamação aguda e crônica foi produzida por aplicação tópica única ou múltipla de óleo de cróton, ou ainda pela aplicação múltipla de imiquimode na orelha de camundongos. A espessura da orelha foi medida para determinar a formação de edema. Antagonistas dos receptores P1 foram aplicados (i.p.) para verificar a participação destes na ação anti-inflamatória da inosina na pele. Amostras de tecidos foram coletadas para análise enzimática, imunoenzimática, histológica e morfológica. A inosina reduziu o edema agudo em  $57 \pm 12\%$  (1 mg/orelha) e atividade da mieloperoxidase (MPO) em  $84 \pm 6\%$  (0,6 mg/orelha). O pré-tratamento com ZM241385 (antagonista A2a) e cafeína (antagonista inespecífico) reverteram o efeito da inosina em  $79 \pm 7\%$  e  $77 \pm 10\%$ , respectivamente. Ambos os antagonistas também reverteram em  $89 \pm 5\%$  e  $86 \pm 6\%$ , respectivamente, o efeito da inosina na redução da celularidade na derme. Os antagonistas dos receptores DPCPX (A1) e alloxazina (A2b) não reverteram o efeito da inosina sobre o edema e celularidade. O nível das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido, foi reduzidos pelo tratamento com inosina em 100% e  $65 \pm 11\%$ , respectivamente. Também ocorreu diminuição do edema crônico em  $64 \pm 4\%$  pelo tratamento com inosina no modelo de múltiplas aplicações de óleo de cróton e em  $77 \pm 3\%$  no modelo de imiquimode (0,6 mg/orelha). A Inosina também reduziu atividade da MPO e N-acetil- $\beta$ -d-glucosaminidase (NAG) em  $57 \pm 8\%$  e  $34 \pm 7\%$ , respectivamente no modelo crônico por óleo de cróton e  $76 \pm 3\%$  e  $19 \pm 2\%$  no modelo de imiquimode. Nossos dados incluem na literatura a ação anti-inflamatória tópica da inosina, mostrando seu efeito sobre diferentes parâmetros inflamatórios na pele. O efeito anti-inflamatório mediado pela inosina na pele está provavelmente relacionado com a ativação do receptor A2a, embora na inflamação crônica outras vias possam estar relacionadas. Estes resultados incentivam de forma mais direcionada a pesquisa da ação da inosina em doenças de pele crônicas.

Palavras chave: Inosina, pele, inflamação, óleo de cróton, imiquimode

## ABSTRACT

Inosine, adenosine first metabolite, was almost forgotten over 20 years, but in the late 90's with the discovery of its cytoprotective and anti-inflammatory effect and cloning of P1 adenosine receptors, attention turned again to inosine as a pharmacologic target. Our study aimed to verify if inosine exerted its effect on inflamed skin throughout a purine receptor (Burnstock *et al.*, 2012; Shafy *et al.*, 2012). Acute and chronic inflammation was produced by croton oil single and multiple topical applications in mice ear, respectively. Thickness of ear was measured to ascertain oedema formation. P1 receptors antagonists were applied (ip) to verify inosine activation of these receptors on skin. Tissue samples were collected to enzymatic, immunoenzymatic, histological and weighted analysis. All experiments were approved by the Institutional Ethics Committee (approval protocol number 392/2009). Inosine reduced acute oedema in  $57 \pm 12$  % (1 mg/ear), and myeloperoxidase (MPO) activity in  $84 \pm 6$ % (0.6 mg/ear). The pretreatment with ZM241385 (A2a antagonist) and Caffeine (unspecific antagonist) reverted inosine effect in  $79 \pm 7$  % and  $77 \pm 10$  %, respectively. Both antagonists also reverted the inosine reduction effect on dermis cellularity with inhibition of  $89 \pm 5$  % and  $86 \pm 6$  % respectively. The DPCPX (A1) and alloxazine (A2b) receptors antagonists did not altered inosine oedema and cellularity reduction. Cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were reduced by inosine treatment in 100% and  $65 \pm 11$  %, respectively. Inosine also reduced croton oil induced chronic edema in  $64 \pm 4$ % and imiquimod (0.6 mg/ear) induced edema in  $77 \pm 3$ %, and MPO and N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase (NAG) activity in  $57 \pm 8$ % and  $34 \pm 7$ %, respectively, in croton oil-induced oedema and  $76 \pm 3$ % e  $19 \pm 2$ % in imiquimode-induced oedema. Our data includes to the literature the topical anti-inflammatory action of inosine, showing reduction of inflammatory parameters on skin. This anti-inflammatory effect of inosine on skin is probably related to A2a receptor activation, although in chronic inflammation this action may be related to other pathway. Thus, these results encourage the research about inosine as treatment on chronic skin disorders.

**Key words:** Inosine, skin, inflammation, croton oil, imiquimode.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	A pele, suas camadas, estruturas e células residentes do sistema imune. Figura modificada de Nestle <i>et al.</i> (2009a).....	22
Figura 2-	Aspectos patológicos da psoríase nos queratinócitos. (Adaptado de Perera <i>et al.</i> (2012).....	29
Figura 3-	A síntese da inosina e seu precursor metabólico, adenosina, em homeostase. Adaptada de Shafy <i>et al.</i> (2012).....	32
Figura 4-	Análise da ação da inosina no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton e atividade da MPO.....	47
Figura 5-	Análise da ação da inosina e participação dos antagonistas P1 no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton e atividade da MPO.....	49
Figura 6-	Imagens representativas da análise histológica (HE) da ação da inosina e participação dos antagonistas P1 no edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	50
Figura 7-	Análise da quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton.....	51
Figura 8-	Análise da ação da inosina no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton e atividade das enzimas MPO e NAG.....	53
Figura 9-	Análise da ação da inosina na espessura da epiderme e celularidade na epiderme e derme no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	54
Figura 10-	Imagens representativas de espessura da orelha e celularidade na análise histológica (HE) da ação da inosina no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	55
Figura 11-	Imagens representativas da celularidade de queratinócitos imunopositivos para PCNA e espessura da epiderme no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	56
Figura 12-	Análise da ação da inosina no edema de orelha crônico induzido por imiquimode e ação das enzimas MPO e NAG.....	58

Figura 13-	Análise ponderada dos órgãos linfoides e adrenais no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	60
Figura 14-	Imagem representativa da análise ponderada dos órgãos linfoides e adrenais no edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	60
Figura 15-	Análise ponderada dos órgãos linfoides e adrenais no edema de orelha crônico induzido por imiquimode.....	62
Figura 16-	Análise da participação da inosina na ação mediada por receptores de glicocorticoides no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton.....	64
Figura 17-	Vias de ação hipotéticas para o tratamento com inosina exógena.....	71

## LISTA DE SIGLAS

ADA	- Adenosina deaminase
ADP	- Adenosina difosfato
ALEEAN	- Alanina leucina ácido glutâmico ácido glutâmico alanina asparagina
AMP	- Adenosina monofosfato
AMPs	- Peptídeos anti-microbianos
AMPC	- AMP cíclico
APC	- Célula apresentadora de antígeno
ATP	- Adenosina trifosfato
CCL	- Ligante de quimiocina
CCR	- Receptor de quimiocina
CD	- Conjunto de diferenciação
CLA	- Antígeno cutâneo associado a linfócito
CXCL	- Ligante de quimiocina $\alpha$
DAMPS	- Padrões moleculares associados a dano
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
ENT1	- Transportador de nucleotídeo equilibrativo
EpCAM	- Molécula de adesão celular epitelial
ERK	- Quinases reguladas por sinal extracelular
FOXP3	- Forkhead box P3
HE	- Hematoxilina e eosina
IFN	- Interferom
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
IMP	- Inosina monofosfato
INOS	- Óxido nítrico sintase induzida
ITP	- Inosina trifosfato
JAM-1	- Molécula de adesão juncional-1
JNK	- Janusquinase
KGF-1	- Fator de crescimento de queratinócitos - 1
M-CSFR	- Fator estimulador de colônia de macrófagos
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno

MHC	- Complexo de histocompatibilidade principal
MPO	- Mieloperoxidase
NAG	- n-acetil- $\beta$ -glucosaminidase
NGF	- Fator de crescimento neuronal
NLR	- Domínio de ligação ao nucleotídeo rico em repetições de leucina
NTDases	- nucleotidases
PAMP	- Padrões moleculares associados a patógeno
PCNA	- Antígenos nuclear de proliferação celular
PI3K-AKT	- Phosphatidylinositide 3-kinases - protein kinase B
PKC	- Proteína quinase C
PLA2	- Fosfolipase A2
RNA	- Ácido ribonucleico
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SALT	- Tecidos linfoides associados à pele
TGF	- Fator transformador de crescimento
TH	- T helper
TLR	- Receptor toll-like
TNF	- Fator de necrose tumoral
TNK	- T natural killer
TPA	- 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRP	- Receptor transiente vanilóide
UV	- Ultra violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 O EPITÉLIO.....	15
1.1.1 A epiderme.....	16
1.1.2 A derme e hipoderme.....	19
1.2 A PELE UM ÓRGÃO SENSORIAL DO SISTEMA IMUNE.....	20
1.3 DESORDENS FISIOLÓGICAS DA PELE.....	28
1.4 INOSINA.....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 DROGAS E REAGENTES.....	37
4.2 ANIMAIS E MANUTENÇÃO.....	37
4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA.....	38
4.4 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DO ÓLEO DE CRÓTON.....	38
4.4.1 Participação dos receptores para adenosina nos efeitos da inosina no edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton.....	39
4.4.2 Participação dos receptores para glicocorticoides nos efeitos da inosina no edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton.....	39
4.5 EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON.....	39
4.6 EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DO IMIQUIMODE.....	39
4.7 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	41
4.8 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA N-ACETIL-B-D-GLUCOSAMINIDASE (NAG).....	42
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	42
4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	43

4.11 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
4.12 ANÁLISE DE EFEITOS ADVERSOS SISTÊMICOS.....	45
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1 AÇÃO DA INOSINA NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON.....	46
5.2 EFEITO DA INOSINA NO MODELO DE APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON NA ORELHA.....	52
5.3 CONSEQUÊNCIA DA INOSINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA DA PELE CAUSADA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE IMIQUIMODE.....	57
5.4 ESTUDO DOS EFEITOS ADVERSOS SISTÊMICOS DA APLICAÇÃO TÓPICA DE INOSINA.....	59
5.4.1 Análise ponderada dos órgãos linfóides e adrenais no modelo do óleo de cróton.....	59
5.4.2 Análise ponderada dos órgãos linfóides e adrenais no modelo de imiquimode .....	59
5.5 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES PARA GLICOCORTICÓIDES NO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA INOSINA.....	63
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
6.1 OS MODELOS EXPERIMENTAIS.....	65
6.2 POSSÍVEIS VIAS DE AÇÃO DA INOSINA.....	69
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O EPITÉLIO

O epitélio é formado por uma estrutura multilamelar e estratificada, através da sobreposição de tecidos, que conferem resistência, elasticidade e semipermeabilidade a ele, formando assim a delimitação entre o organismo e o meio externo. Essa organização tecidual do epitélio surgiu ao longo da evolução a mais de 420 milhões de anos, mantendo-se uma estrutura conservada ao longo da evolução dos vertebrados (Choi *et al.*, 2007). O tecido epitelial recobre toda a superfície do organismo, sendo dividido em epitélio simples, aquele que recobre os ductos glandulares exócrinos, e epitélio estratificado, que se subdivide em queratinizado, e recobre os ductos do trato gastrintestinal, e cornificado aquele que forma a pele unhas e cabelo. O epitélio em toda sua estrutura é considerado o maior órgão do corpo humano, totalizando 15% do peso em um adulto (Bragulla *et al.*, 2009).

Dentre as várias funções exercidas pelos tipos de epitélio, a pele destaca-se por possuir funções altamente especializadas e fundamentais para homeostase. As camadas que compõe a pele são penetradas, por diversos tecidos, combinando suas funções com outros sistemas da maquinaria do corpo, como sistema nervoso e imune. Entre essas características a pele apresenta funções fisiológicas importantes como a produção de vitamina D e também funções biológicas como participação importante na seleção sexual na espécie humana (Kanitakis, 2002; Rees *et al.*, 2012).

A pele tem como principal função a formação de uma barreira entre o organismo e o ambiente. Através da formação desta barreira a pele auxilia na manutenção da homeostase ao evitar a perda de água, assim como calor, para o meio externo. A pele também forma, macroscopicamente, uma barreira física contra lesões por impacto mecânico e fricção, e microscopicamente, uma barreira física contra agentes agressores como micro organismos, substâncias químicas tóxicas e radiação UV (Shetty *et al.*, 2012). A pele em si é composta de três diferentes tecidos. A sua camada mais externa é composta pela epiderme. A camada diretamente abaixo da epiderme é a derme. E a camada mais interna da pele é a hipoderme. Em sua origem embrionária a pele se distingue, de forma que, a epiderme é proveniente

da ectoderme diferenciando-se assim da derme e hipoderme formadas pela mesoderme, respectivamente (Bragulla *et al.*, 2009). As várias camadas da pele desempenham funções diferentes sendo tecido-dependentes.

### 1.1.1 Epiderme

A epiderme é a primeira barreira do organismo contra adversidades nocivas provocadas pelo ambiente. Devido a isso, a epiderme é um tecido especializado em formar uma superfície protetora, o estrato córneo. Esta camada é composta de células anucleadas, altamente queratinizadas, envoltas por uma matriz lipídica apolar, caracterizando o estrato mais externo da epiderme, que forma um escudo de permeabilidade seletiva. Através da impermeabilização formada pela camada córnea e alta coesão de células na epiderme, mediada por junções celulares, ela desempenha sua segunda principal função: a prevenção da perda de água para atmosfera (Proksch *et al.*, 2008).

A pele encontra-se em estresse ambiental constante e devido a isso a epiderme possui uma taxa de renovação alta, sendo completamente renovada em aproximadamente 30 dias. A principal célula da epiderme, sendo responsável por essas funções, é o queratinócito. Os queratinócitos compõem cerca de 90-95% da epiderme. O seu estágio de diferenciação, o processo de deposição de queratina, essencial para formação do estrato córneo, define os estratos em que a epiderme é classificada. São esses estratos: a camada basal, onde os queratinócitos são gerados mitoticamente a partir de uma célula mãe; o estrato espinoso, onde é iniciada a diferenciação; o estrato granuloso, o penúltimo estágio de queratinização; e o estrato córneo onde ocorre o final da diferenciação (Kanitakis, 2002).

O processo de diferenciação dos queratinócitos é um processo altamente controlado e composto de etapas bem definidas. Após a sua geração na camada basal o queratinócito inicia, na camada suprabasal, a síntese de diversas proteínas que irão desencadear a queratinização. Neste processo primeiro é iniciada a síntese de queratina do tipo 1, que induz a síntese de queratina 10 e a formação de heterodímeros de ambas. Os heterodímeros de queratina 1-10 ancoram-se nos filamento constitutivamente expressos de queratina 5-14, formando tonofilamentos que se distribuem ao longo da célula radialmente a partir da região perinuclear. Este processo inicia uma mudança no citoesqueleto celular iniciando um processo de

achatamento, mudando o padrão colunar das células na camada basal para um padrão horizontal na camada espinhosa (Bragulla *et al.*, 2009).

Os filamentos de queratina ligam-se em suas porções dianteiras a proteínas de junção intercelular, os desmossomos e hemidesmossomos. Os desmossomos são proteínas que transmitem forças mecânicas de uma célula para outra, mantendo a integridade do cito esqueleto, associadas às fibras de queratina, que se ligam a sua porção *cadherin-like* na face interna da membrana da célula. Além de desmossomos, os queratinócitos possuem outros tipos de junções aderentes que controlam o fluxo paracelular como acludinas, claudinas (1, 4 e 7) JAM-1 (molécula de adesão juncional-1) e proteína zona ocludens - 1. Ainda junções do tipo *gap* que permitem a comunicação célula-célula. A associação de todas essas estruturas, além de manter a coesão do tecido, auxilia no processo de impermeabilização, impedindo a perda de água e mantendo a permeabilidade seletiva da barreira epidérmica (Proksch *et al.*, 2008).

A continuação do processo de queratinização, no estrato granuloso inicia a formação do envelope cornificado na epiderme, a cornificação. Nesta etapa ocorre a associação dos feixes de queratina com proteínas associadas: involucrina, loricreína e filagrina. A partir deste momento os feixes de queratina podem-se ligar além dos desmossomos a qualquer ponto do envelope cornificado que recobre a face interna da membrana plasmática (Bragulla *et al.*, 2009).

Paralelamente ao processo de queratinização e cornificação ocorre a síntese da matriz extracelular lipídica do estrato córneo. As células da interface entre o estrato espinhoso e granuloso começam a apresentar vesículas, provenientes do complexo de golgi, contendo lipídeos polares, chamadas de corpos lamelares. Contidos nos corpos lamelares estão: glico-esfingolipídeos livres, esteróis, fosfolipídios e enzimas catabólicas (Proksch *et al.*, 2008). Em resposta a certos sinais, por exemplo, um aumento na concentração de cálcio na camada granular, os corpos lamelares movem-se para o superior das células granulares, coordenados por um sistema vesículo-tubular, se fundem com a membrana plasmática secretando o seu conteúdo para os espaços intercelulares, através de exocitose. Os lipídeos derivados dos corpos lamelares são posteriormente modificados e dispostos em lamelas intercelulares posicionadas paralelamente à superfície da célula. Os lipídios

polares são enzimaticamente convertidos em produtos não polares. Ocorre a hidrólise de glicosfingolípideos para ceramidas e fosfolípideos em ácidos graxos livres. Resultando em uma proporção (1:1:1) de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol (Iwai *et al.*, 2012).

Este processo de exocitose das células da interface do estrato espinhoso e do estrato córneo, representa o final do estágio de cornificação. Neste processo os queratinócitos perdem completamente seu citoplasma ocorrendo a colabação da célula. A transformação do queratinócito em corneócito é abrupta e conjunta com a liberação dos corpos lamelares para o meio extracelular, quando ocorre a exocitose de vesículas queratohialinas associadas a pró-filagrina. A este processo global de exocitose libera no meio intercelular um pool de enzimas cálcio-dependentes responsável pela clivagem tanto de lipídeos como de proteínas, para promover o *crosslink* de queratina e lipídeos cimentando a camada córnea (Nguyen *et al.*, 2001).

Pertencem também à estrutura da epiderme os melanócitos. Estas células são pertencentes às células dendríticas e embriologicamente são formadas na crista neural, de onde migram para a epiderme, localizando-se na camada basal. A sua densidade varia consideravelmente dependendo da região da epiderme e por fatores étnicos. Sua principal função é a síntese de feomelanina (amarela) e eumelanina (marrom). A síntese de melanina é realizada pela enzima tirosinase através do substrato tirosina. A melanina é contida em organelas específicas, os melanossomos. Através de ligações dendríticas entre os melanócitos e os queratinócitos adjacentes, os melanossomos são transferidos para queratinócitos recém-formados na camada basal, e da camada Espinhosa. Cada queratinócito transporta os melanossomos até a região perinuclear, onde são depositados em uma estrutura lamelar sobre o núcleo, formando assim uma proteção contra radiação UV (Kanitakis, 2002).

Toda estrutura da epiderme é fortemente ligada a derme pela junção dérmica-epidérmica. A junção dérmica-epidérmica é sintetizada em parte pelos queratinócitos da camada basal e em parte pelas células que compõem a derme, os fibroblastos. Essa estrutura é fundamental para o suporte mecânico da epiderme e para o fluxo de metabólitos entre os tecidos. A junção dérmica-epidérmica é uma região ondulada, composta pela porção inferior dos queratinócitos do estrato basal, ligados

através de proteínas de adesão, principalmente hemidesmossomos, a uma matriz laminar proteica, à lâmina lúcida, que é seguida da lâmina densa e da lâmina sub-basal, a zona filamentosa (Kanitakis, 2002). Ambos queratinócitos e fibroblastos são responsáveis pela síntese de colágeno do tipo IV e VII, e laminina-5 e 1 respectivamente, que formam as lâminas da junção dérmica-epidérmica (Sorrell *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Derme e Hipoderme

A derme é a estrutura que se encontra logo abaixo da epiderme e possui como principal função a ligação da epiderme com o organismo de forma a promover mobilidade, capacidade de compressão e elasticidade à pele. A derme também é a interface da pele onde ocorre a ligação dos sistemas nervoso e circulatório com a epiderme, promovendo a sinalização nervosa periférica, oxigenação e o transporte de nutrientes. A derme é formada majoritariamente de tecido conjuntivo, tendo como sua principal célula o fibroblasto. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese do colágeno e outras proteínas acessórias que formam a rica matriz extracelular da derme. Os fibroblastos dividem-se em dois tipos distintos em situação fisiológica normal: papilares e reticulares, e durante o processo de cicatrização, miofibroblastos (Kanitakis, 2002).

Os fibroblastos papilares são encontrados na região papilar da derme, a região superior logo abaixo da junção dérmica-epidérmica onde ondulações formam uma camada com projeções cônicas produzindo cristas e sulcos que conferem a essa porção seu nome. Nesta região a ondulação promovida pelas papilas promove uma maior área de contato com a epiderme, aumentando a superfície para a comunicação entre os tecidos e um melhor ancoramento desta na derme. Os fibroblastos papilares são responsáveis pela síntese do colágeno I e principalmente colágeno III, mais expresso, que nesta região são organizados formando feixes pouco densos, no sentido perpendicular em relação às camadas da pele, sem formar fibras propriamente ditas (Kanitakis, 2002).

Delimitando a separação entre a região papilar e reticular está o rete subpapilar, um plexo vascular que irriga cada papila individualmente. Abaixo deste encontra-se a região reticular, composta por fibroblastos reticulares. Esses fibroblastos são responsáveis pela síntese do colágeno I, III e também IV, que são

organizados nesta região em forma de feixes de fibras bem organizadas e paralelas às camadas da pele, formando um gradiente crescente de fibras, da região papilar ao rete cutâneo, o plexo vascular que separa a derme da hipoderme (Sorrell *et al.*, 2004).

O colágeno é a principal proteína que confere resistência mecânica na pele, totalizando aproximadamente 95% das fibras da derme. Entra tanto os fibroblastos também produzem outras proteínas elásticas acessórias, entre elas estão fibras de elastina, associadas a fibras de eulanina-oxitalan e microfibrilas compostas de fibrilina, que aumentam em densidade da região papilar para reticular. Na região reticular também são produzidas fibras de fibronectina associadas com os feixes de colágeno. Além das fibras elásticas proteicas os fibroblastos são responsáveis pela síntese da matriz extracelular que permeia as fibras da derme (Sorrell *et al.*, 2004). Essa abundante matriz é formada de macromoléculas como glicoproteínas e proteoglicanas (ácido hialurônico, dermatan sulfato, condroitina sulfato entre outras) (Kanitakis, 2002).

A derme é suportada em sua região inferior pela hipoderme. Essa região é composta em sua maioria por células do tecido adiposo, os adipócitos. Na hipoderme os adipócitos estão organizados em lóbulos primários e secundários, sendo circundados de fibroblastos e tecido conjuntivo. É nesta camada que ocorre a maior parte do isolamento térmico, sendo também responsável pelo amortecimento de estresse mecânico e reserva energética. Na hipoderme se encontram as partes inferiores dos vários anexos epidérmicos. Os bulbos pilosebáceos e glândulas sudoríparas se ancoram na hipoderme, permeando a derme e epiderme (Kanitakis, 2002).

## 1.2 A PELE UM ÓRGÃO SENSORIAL DO SISTEMA IMUNE

A pele é atualmente considerada um complexo de sistemas. Além dos tecidos vasculares que permeiam a derme, ela é ricamente innervada, e células do sistema imune residem permanentemente em todas as suas camadas. A noção de que a pele é um órgão multissistêmico vem sendo desenvolvida ao longo de pelo menos quatro décadas. No final da década de setenta o conceito de tecidos linfóides

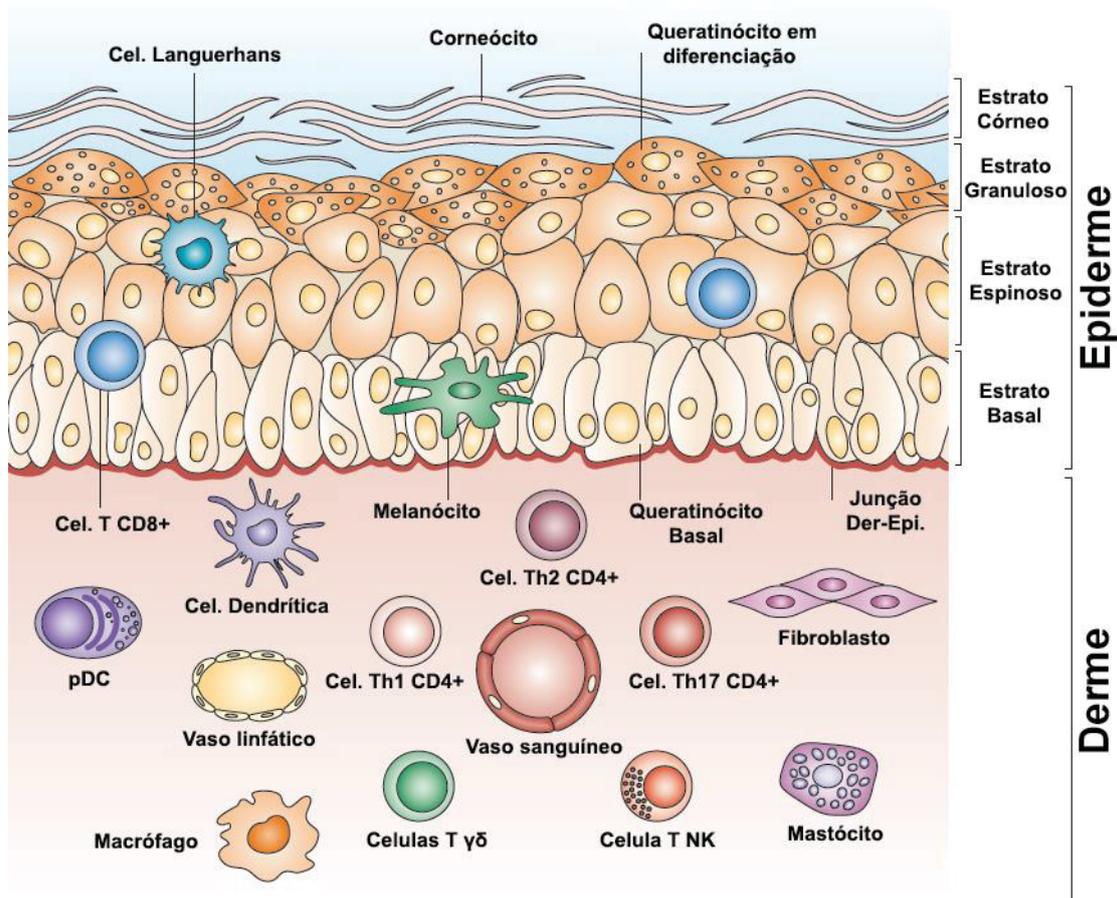
associados a pele (SALT – skin associated lymphoid tissues) foi proposto (Salmon *et al.*, 1994).

Uma vez que a pele forma uma barreira física para proteção do organismo, ela também se apropria de elementos para formar uma barreira imunológica. Para tal, é drenada por vasos linfáticos e células produzidas pelo sistema imune que ali residem ou migram para os tecidos cutâneos, tornando-a uma extensão deste sistema, pronta para atuar ao menor sinal de lesão desta barreira. O conceito de associação do sistema linfóide à pele foi expandido, englobando hoje todo o sistema imune e também o nervoso, de tal forma que a pele vem sendo denominada de sistema neuroimuno cutâneo (Boulais *et al.*, 2008).

Ao analisarmos a pele nos atentando ao sistema imune já na epiderme encontram-se, residindo na membrana supra-basal, uma população de células deste sistema, as células de langerhans. Estas células são pertencentes às células dendríticas do sistema imune. As células dendríticas são a maior população de células do sistema imune na pele e possuem importante função na identificação de patógenos e transmissão de sinais para outras células do sistema imune, sendo consideradas as mais importantes residentes da pele. Entre as células dendríticas, aquelas que residem na epiderme são denominadas células de langerhans, e diferem das células dendríticas encontradas na derme e em outros tecidos. Elas são ancoradas aos queratinócitos adjacentes por E-caderinas e EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) formando com seus dendritos uma teia de monitoramento na epiderme. São caracterizadas por apresentarem grânulos de Birbeck, organelas citoplasmáticas relacionadas com a fagocitose de antígenos, e pela expressão de langerina, um receptor de lecitina do tipo II. Também expressam MHC II sendo, portanto, importantes células apresentadoras de antígenos (APC) (Nestle *et al.*, 2009a).

As células de langerhans são provenientes de células mielóides hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, e em estado homeostático da pele possuem a capacidade de autorreplicação, com uma meia vida de aproximadamente 60 dias. Entretanto, durante um estado inflamatório as células de langerhans podem se diferenciar a partir de neutrófilos, mediante ativação do receptor M-CSFR (*macrophage colony-stimulating factor*) por IL-34, sendo a liberação parácrina de TGF-β1 (*transforming*

*growth factor-β1*) por queratinócitos, necessária para diferenciação por ambas as origens. Assim como na epiderme a derme é monitorada por células dendríticas. Na derme as células dendríticas são encontradas logo abaixo da junção dérmica-epidérmica. Diferentemente da epiderme as células dendríticas da derme são divididas em duas linhagens que são identificadas por expressarem langerina<sup>+</sup> ou langerina<sup>-</sup>, concomitante com outras proteínas de membrana como CD103 e CD11b. A taxa de renovação das células dendríticas dérmicas é superior às epidérmicas, entretanto o monócito precursor destas linhagens ainda não foi identificado (Merad *et al.*, 2008).



**Fig. 1:** A pele, suas camadas, estruturas e células residentes do sistema imune. Figura modificada de Nestle *et al.* (2009a).

Em resposta a um estímulo inflamatório proveniente da liberação de citocinas por queratinócitos e/ou encontro com um antígeno, as células de langerhans e

dendríticas são rapidamente ativadas. Os antígenos são fagocitados e estas migram através dos vasos linfáticos para os linfonodos próximos. Para as células de langerhans sabe-se que a sinalização ocorre pelas quimiocinas CCR6 e CCR7, entretanto para as células dendríticas ainda não foi identificado um quimioatratador específico. Uma vez no linfonodo ativam linfócitos Th2, principalmente por células de langerhans e linfócitos T CD8 por ambas, através de ativação cruzada. As células dendríticas também secretam mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e iNOS (Óxido nítrico sintase induzida), tendo importante função durante estados patológicos da pele. Em estados patológicos, as células de langerhans estão relacionadas com deficiência em sua função de tolerância no reconhecimento de antígenos, produzindo dessa forma anomalias autoimunes ou hipersensibilidade (Merad *et al.*, 2008).

Uma terceira célula dendrítica se destaca na derme. Os macrófagos são células residentes da pele que possuem como principal função a eliminação de bactérias. Durante um estado inflamatório os macrófagos ativados expressam citocinas inflamatórias e entram em atividade fagocítica, destruindo patógenos e processando antígenos. Eles possuem reduzida capacidade de migração para os linfonodos, promovendo uma ativação de linfócitos T locais. De maneira semelhante às células de langerhans e dendríticas da derme, os macrófagos são derivados de células mieloides mononucleares, monócitos, presentes no tecido hematopoiético. Esses monócitos expressam CD14<sup>hi</sup> e CD16<sup>-</sup> / CD14<sup>lo</sup> e CD16<sup>+</sup> e migram para a pele sendo responsáveis pela geração de macrófagos ou células dendríticas (Kasraie *et al.*, 2013).

Os macrófagos são divididos em várias sub-populações dependendo da maneira que são ativados, os seus marcadores de superfície ou a sua funcionalidade. Esquemáticamente os macrófagos ativados por estímulo de TLR e citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), são classificados como macrófagos M1. Estes macrófagos produzem um elevado grau de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias tais como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ou IL-12, e expressam MHC de classe II. Suas principais propriedades são ação antimicrobiana e antitumoral. Os macrófagos M2 são uma população mais heterogênea composta de todos os macrófagos que não correspondam às características que classificam os macrófagos M1. De modo geral sua ativação consiste na estimulação do receptor de IL-4, por IL-4 e IL-13, e

são dividido em três sub-populações. Os macrófagos ativados alternativamente ou M2a e M2b que promovem uma resposta inflamatória Th2, e respectivamente, aumento de IgE e propriedades de imunomodulação, e os macrófagos desativados ou M2c, envolvidos no controle da inflamação e no remodelamento de tecidos. Naturalmente, todas estas sub-populações não são considerados como populações distintas *in vivo*, mas como diferentes fases de um processo contínuo de ativação e diferenciação das populações de macrófagos (Rodero *et al.*, 2010).

Além das células de langerhans, dendríticas da derme e macrófagos, estão presentes na pele uma grande quantidade de linfócitos T. Em uma pele adulta saudável residem pelo menos  $2 \times 10^{10}$  linfócitos T, mais de 200% do total de linfócitos no sangue. Estes linfócitos compõem uma população heterogênea, sendo a maioria destes células  $T\alpha\beta CD8^+$ . Estes linfócitos encontram-se tanto na epiderme quanto na derme. Na epiderme eles se localizam nas camadas basais e supra basal próximos das células de langerhans. Na epiderme se localizam próximos as células dendríticas na região das vênulas pós-capilares, logo abaixo da junção dermica-epidermica, e próximo aos folículos pilosos (Nestle *et al.*, 2009a).

Os linfócitos T iniciam sua vida no timo, de onde são lançados na corrente sanguínea e iniciam sua migração direcionada para os linfonodos que drenam a pele, através da alta expressão de L-selectina e CCR7. Uma vez nos linfonodos, esses linfócitos T *naive* entram em contato com células dendríticas, provenientes de tecidos da pele, que apresentam antígenos e promovem o encontro dos linfócitos com seu antígenos cognato, realizando a maturação destes linfócitos, que adquirem função efetora de citotoxicidade e produção de citocinas. Após ser realizado o *imprinting* os linfócitos T passam a expressar adressinas, como a CCR4 e CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*), quimiocinas, que promovem a migração destes aos tecidos alvos, neste caso a pele (Clark, 2010).

Os linfócitos T efetores, deixam os linfonodos e são levados pela corrente sanguínea até o local inflamado. Estimulados por citocinas liberadas por queratinócitos, fibroblastos e células vizinhas, os linfócitos penetram no tecido em busca de seus antígenos. Uma vez que o antígeno tenha sido erradicado, os linfócitos que não sofreram apoptose, dividem-se em duas populações, aqueles que expressam CCR7 e L-selectina e os que não expressam. Aqueles que expressam

migram novamente para os linfonodos e tornam-se células T de memória central, e os linfócitos que não expressam permanecem na pele e tornam-se células T efetoras de memória residentes (Bevan, 2011; Clark, 2010).

Além da grande maioria de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória, estão presentes linfócitos que são encontrados convencionalmente na pele em situação de homeostase. Essa população heterogênea é composta de células Th CD4<sup>+</sup>, Th1, Th2 Th17 e aproximadamente 5% do total de células são T *naive*. Os linfócitos Th1 são relacionados principalmente com infecções e liberam IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) e linfotóxina, ativando macrófagos. Os linfócitos Th2 são ativados por macrófagos M2 e participam das ações mediadas por cada subtipo de M2 (Nestle *et al.*, 2009a). Os linfócitos Th17 participam da eliminação de infecções através de efeito citotóxico e são responsáveis pela desregulação em várias patologias cutâneas. Ainda encontramos na pele os linfócitos T NK e linfócitos T  $\gamma\delta$ . Os linfócitos T NK são importantes ferramentas do sistema imune inato, promovendo o controle de patógenos em uma situação de infecção, anterior à resposta da imunidade adaptativa. Os linfócitos T $\gamma\delta$  são importantes aliados dos queratinócitos na função de liberação de quimiocinas para sinalização de outras células do sistema imune (Havran *et al.*, 2010; Macleod *et al.*, 2011). Toda essa população de células é controlada por um tipo específico de linfócito T, os linfócitos T reguladores (Treg). Os Treg são uma população que se distingue das demais por expressar FOXP3<sup>+</sup>. Sua principal função é promover a tolerância a antígenos endógenos ou organismos comensais inofensivos e, assim, mediar a repressão da ativação de outras populações de linfócitos evitando a liberação de citocinas e proliferação (Clark, 2010).

Curiosamente, o queratinócito, uma célula que não possui origem no sistema imune e especializada no processo de diferenciação e cornificação, é a principal célula do sistema neuro-imuno cutâneo. O queratinócito torna-se uma célula do sistema imunológico quando observado através de suas habilidades de reconhecer organismos comensais do microbioma da pele como nocivos ou inofensivos (Grice *et al.*, 2009). Possui habilidade de reconhecer quando a barreira cutânea foi rompida e através de quimiocinas e citocinas, enviar sinais, para reparação da epiderme. Além disso, o queratinócito torna-se uma célula do sistema nervoso quando possui

mecanismos de comunicação parácrinos que promovem sinalização através de fibras neuronais (Boulais *et al.*, 2008; Nestle *et al.*, 2009a).

A capacidade dos queratinócitos de reconhecer antígenos de possíveis patógenos é conferida por uma classe de receptores de membrana os *Toll like receptors* (TLR). Os TLR são uma família de receptores que possuem a capacidade de reconhecimento de moléculas, expressas por patógenos, que apresentam um alto grau de conservação evolutiva. Essas moléculas são conhecidas pelo nome de PAMPs (Padrões moleculares associados ao patógeno) (Nestle *et al.*, 2009a). Os TLR dividem-se em sub-receptores especializados no reconhecimento de PAMPs específicos. Os TLR expressos pelos queratinócitos são bastante diversos, de forma que os presentes na membrana celular reconhecem: TLR1 (lipoproteínas tri-acetiladas), TLR2 (peptídeoglicanos), TLR4 (lipopolisacarídeo), TLR5 (flagelina bacterial), TLR6 (lipoproteína di-acetilada) TLR7 (RNA simples fita), e nos endossomos: TLR3 (RNA dupla fita) e TLR9 (DNA não metilado). O reconhecimento de PAMPs por TLR promove ativação de células T helper 1 (Th1) e liberação de citocinas, entre elas interferons (IFNs) (Mkaddem *et al.*, 2010).

Os queratinócitos também expressam NLR (Dominio de ligação ao nucleotídeo, *leucinerich repeat-containing*). Esse receptor reconhece uma variedade de DAMPs (Padrões moleculares associados a lesão) (Zhang *et al.*, 2010), que compreendem moléculas como: proteínas de choque térmico, fibrinogênio, fibronectina, surfactante,  $\beta$ -defensina, ácido úrico, hialurona, sulfato de heparam biglicano, DNA e mRNA liberados de células apoptóticas. Ainda, estímulo ou lesão produzido por radiação UV também promovem uma resposta através de NLR (Mkaddem *et al.*, 2010).

Os receptores TLR e NLR quando ativados, desencadeiam uma resposta através do inflamossomo, um complexo multiprotéico onde ocorre a associação de NLR com proteínas acessórias e pró-caspase1. A ativação do inflamossomo promove ativação da caspase 1 e consequente conversão de pró-interleucina-1 $\beta$  e 18 em IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente. Essas citocinas são elementos chave para a ativação de células residentes do sistema imune, mantendo ou amplificando o processo inflamatório (Nestle *et al.*, 2009a).

Os queratinócitos também são responsáveis pela direta ação citotóxica sobre patógenos através da produção de AMPs (Peptídeos antimicrobianos) catiônicos. AMPs também induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e efetuam o recrutamento de células residentes. De forma a manter um *feed-back loop*, citocinas como IL-17A e IL-22, produzidas por linfócitos Th17, promovem aumento da produção de AMPs por queratinócitos. Além de AMPs são produzidas de maneira constitutiva as pró-citocinas: IL-1, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- $\alpha$ . Mediante um estímulo esse aglomerado de citocinas é capaz de ativar células Th, células dendríticas e linfócitos B, induzindo a reprodução clonal. Os queratinócitos também são importantes produtores de quimiocinas, moléculas de sinalização celular que promovem a migração de células. Podem ser liberadas por queratinócitos CCL20 (que regula migração de células dendríticas precursoras), CXCL9, CXCL10, CXCL11 (que promovem a migração de linfócitos T) e CXCL1 e CXCL8 (que promovem a migração de neutrófilos). Os queratinócitos dessa forma regulam a liberação de mediadores inflamatórios ativando células residentes do sistema imune de maneira parácrina, porém ainda expressam MHC de classe II. Ao expressarem MHCII os queratinócitos possuem a habilidade de ativar linfócitos T de memória, embora não realizem *imprinting* em linfócitos T *naive* (Nestle et al., 2009a).

Os queratinócitos participam de forma tão ativa na sinalização imune que torna-se surpreendente sua participação, também, na sinalização nervosa. De forma coordenada, eles expressam receptores de membrana também expressos nas terminações nervosas, os receptores da família TRP (Receptores de potencial transitório) Vaniloide 1. O TRPV1 é o mais expresso na epiderme, entre tanto os subtipos TRPV3 e TRPV4 também são encontrados. Estes receptores são canais de cálcio dependentes e sua ativação promove entrada de cálcio e liberação de substância P. Os receptores TRPV são ativados mediante a percepção de estímulos térmicos ou através de ligantes exógenos. Respectivamente, o TRPV1 é ativado por temperatura ( $>42^{\circ}\text{C}$ ), TRPV3 ( $>31^{\circ}\text{C}/<39^{\circ}\text{C}$ ), TRPV4 ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ). A comunicação entre os queratinócitos e as fibras nervosas ainda permanece obscura, entretanto evidências apontam para participação do sistema purinérgico na transmissão do sinal. Através da ativação dos receptores de ATP, ocorre influxo de cálcio, que promove a formação de um gradiente de concentração que se estende às fibras nervosas adjacentes. Os neutrófilos também expressam NGF (Fator de crescimento

neuronal), que é liberado mediante estímulo por substância P e dessa forma possibilita a sinalização parácrina entre queratinócitos e neurônios (Boulais *et al.*, 2008).

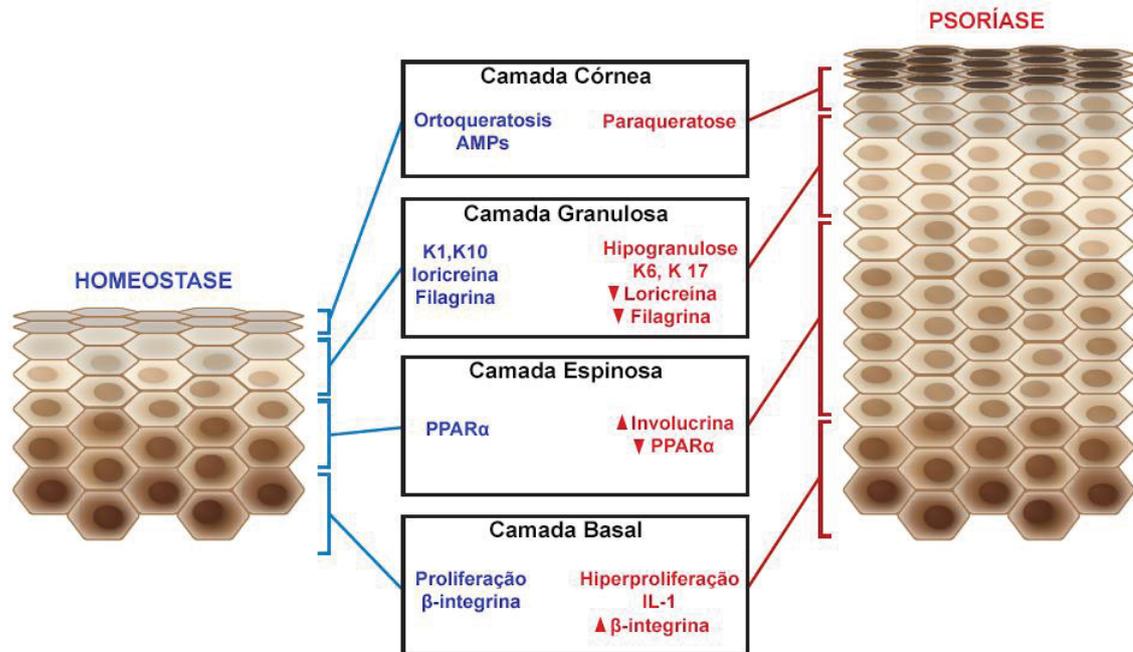
Da mesma maneira, a via contrária de sinalização sistêmica para a pele também é válida. Terminações nervosas aferentes liberam neurotransmissores na pele que promovem eventos de diferenciação de queratinócitos como, por exemplo, a diferenciação que necessita de um gradiente de cálcio na epiderme, e a degranulação de queratinócitos na camada espinhosa, que é dependente de acetilcolina (Nguyen *et al.*, 2001). Geralmente os queratinócitos expressam constitutivamente vários neurotransmissores, o que indica que eles possuem a habilidade de identificar e sinalizar através destes, constituindo uma linguagem comum entre os sistemas que funciona em sentido bidirecional (Boulais *et al.*, 2008).

Ainda outras células residentes na pele como as células de Langerhans, melanócitos e Merkel, possuem capacidade de sinalização através de neurotransmissores. Os melanócitos encontram-se intimamente relacionados com as terminações nervosas e secretam por estimulação UV pró-opiomelanocortina, que da origem a uma série de peptídeos com atividade melanogênica, imunomodulatória, neurogênica, proliferativa e quimioatratória para células dendríticas e de Merkel. As células de Langerhans não expressam receptores da família TRPV, entre tanto o aumento da temperatura tem como efeito aumentar a velocidade de fagocitose e de ativação. As células de Merkel são associadas aos folículos pilosos e às terminações nervosas adjacentes. Estão relacionadas com a identificação sensorial de movimento e são as únicas células na pele não pertencentes às fibras nervosas com a capacidade de despolarização (Boulais *et al.*, 2008).

### 1.3 DESORDENS FISIOLÓGICAS DA PELE

A regulação do sistema neuroimuno cutâneo é um processo que envolve a participação de inúmeras células, de diversos tecidos, envolvendo os sistemas endócrino, nervoso e imune. Este processo eventualmente apresenta falhas, caracterizando patologias que em alguns casos são crônicas e incuráveis. Entre estas desordens podemos citar várias doenças que são classificadas como

autoimunes. Compreendidas nesta classificação estão a psoríase, dermatite, vitiligo, pênfigo, epidermolises, ictioses e as variações de cada, respectivamente (Djordjic *et al.*, 2012; Nestle *et al.*, 2009b; Ring *et al.*, 2009; Shetty *et al.*, 2012).



**Fig. 2:** Aspectos patológicos da psoríase nos queratinócitos (Adaptado de Perera *et al.* (2012).

De forma generalizada essas doenças apresentam uma etiologia desconhecida, hipersensibilidade a fatores ambientais e anomalias na função de queratinócitos e leucócitos, que tem de forma consensual um fator genético embutido. Tomando por base a psoríase vemos que esses fatores se repetem. A psoríase é caracterizada pelo aparecimento de placas na pele, com distribuição aleatória ou em regiões de maior atrito, como dobras, com grande taxa de descamação, eritematose e aparência esbranquiçada. As lesões psoriáticas possuem essa aparência devido à desregulação no processo de diferenciação de queratinócitos onde a proliferação é exacerbada, e a queratinização, cornificação e maturação dos corneócitos não ocorre devidamente, apresentando queratinócitos nucleados na camada córnea. Uma característica comum associada a este processo é a presença de linfócitos T ativados e a infiltração de neutrófilos e monócitos na

epiderme (Perera *et al.*, 2012). O processo de formação destas lesões não é bem conhecido, entretanto sabe-se que uma vez desencadeado citocinas como a IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-17, são altamente expressas por queratinócitos e linfócitos e, dessa forma, promovem a hiperproliferação, síntese de queratina 17 e contínua ativação e quimiotaxia de células do sistema imune (Quatresooz *et al.*, 2012).

Assim, como a psoríase a dermatite é uma doença que se caracteriza pela responsividade exacerbada do sistema imune a estímulos ambientais inofensivos. A dermatite divide-se em dermatite de contato e dermatite atópica, entre outras, sendo caracterizada pela participação de IgE (imunoglobulina E) no seu processo patológico. As lesões são geralmente em regiões de dobras na pele, ou em locais onde ocorre contato com acessórios (relógios, pulseiras, cintos) ou cosméticos. São caracterizadas por eritema, edema e prurido intensos (Fuiano *et al.*, 2012). Na dermatite também encontramos uma situação de desbalanço entre as células Th1, Th2 e Th17 e suas citocinas relacionadas, mediados pelas APC (Peiser, 2013).

Entre essas doenças uma característica comum é a formação de uma resposta imune contra uma estrutura endógena. Como por exemplo, uma das possíveis causas da psoríase é a sensibilização contra a sequência de aminoácidos ALEEAN de queratina 17, análogos à M proteínas de membrana em *Streptococcus* (Chang *et al.*, 2011). Também podemos citar os casos de hiperreatividade, presentes na dermatite de contato a cosméticos, metais e roupas (Peiser, 2013). De maneira semelhante o vitiligo e o pênfigo apresentam reações autoimunes ao próprio organismo (Taieb, 2012). Ao vitiligo é atribuído um fator imunológico no desenvolvimento das lesões despigmentadas causada pela destruição dos melanócitos por células do sistema imune, linfócitos Th1 e Th17 (Glassman, 2011). Semelhantemente, o pênfigo é provocado pela reação autoimune contra a desmogleína e a e-caderina presente nos desmossomos, provocando a perda da coesão da pele (Mavropoulos *et al.*, 2013).

Em todas essas desordens o tratamento para controle do fator imune responsável pelo desenvolvimento da doença é realizado dependendo da intensidade apresentada. Nos casos em que as lesões são iniciais, o tratamento consiste de imunomoduladores, tais como, glicocorticoides e cotratamentos tópicos e dependendo da evolução do quadro clínico, decorre a utilização de glicocorticoides

ou outros imunossupressores por via oral e nos casos mais severos, tópica e oral concomitantes (Takahashi, 2012).

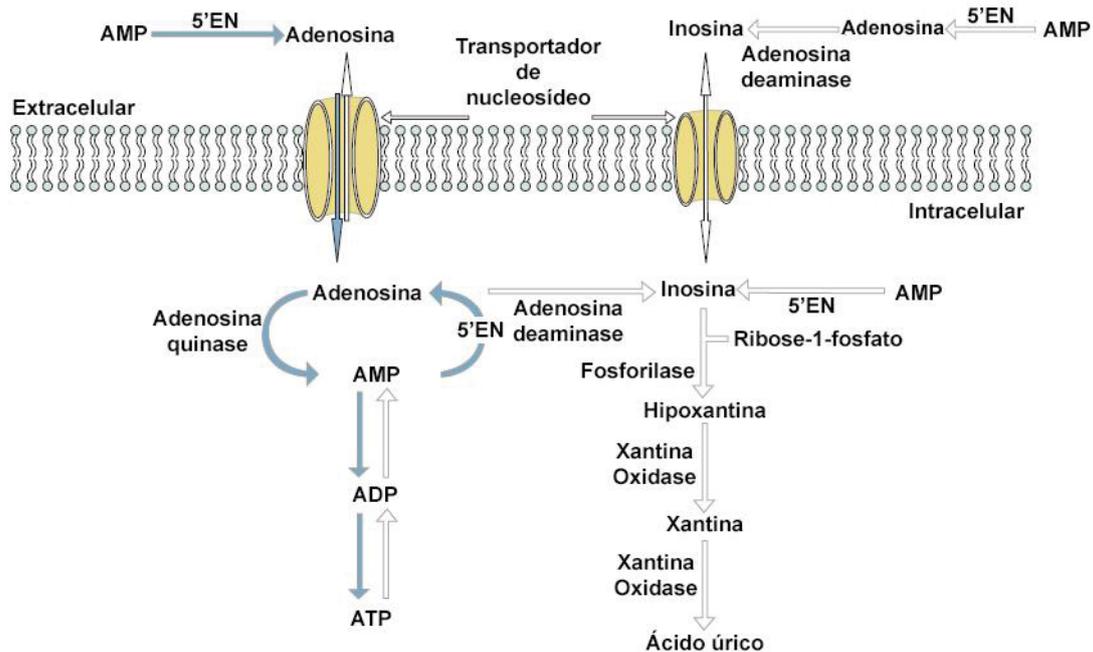
O tratamento com glicocorticoides é apesar de seus efeitos colaterais, como a aparência semelhante à síndrome de Cushing, atrofia da pele, remodelamento do tecido adiposo, osteoporose, glaucoma, imunossupressão, uma opção com nível de resposta alta. Os pacientes que se submetem à terapias com glicocorticoides observam os efeitos do tratamento rapidamente, entretanto existem alguns casos em que o organismo torna-se irresponsivo aos tratamentos (Schoepe *et al.*, 2006). É nesses casos que uma alternativa que possua menos efeitos colaterais, porém apresente eficácia local, sem promover toxicidade sistêmica, se torna fundamental para busca por novas terapias.

#### 1.4 A INOSINA

A inosina é uma molécula endógena pertencente à família dos nucleosídeos púricos. Assim como a guanina e a adenosina, o precursor metabólico da inosina, ela é um nucleosídeo formada por uma base nitrogenada púrica e uma ribose, ligadas através de uma ligação  $\beta$ -N<sub>9</sub>-glicosídica. A inosina é formada pela purina hipoxantina, sendo esta, formada pela ligação de um anel pirimidínico com um anel imidazólico (Munns *et al.*, 1970).

O interesse no estudo da inosina surgiu no final da década de 20 com os estudos de Drury *et al.* (1929) sobre os derivados da adenina. Os primeiros estudos com a inosina propriamente dita remontam a década de trinta como citado por Kleinzeller (1942), utilizando a inosina trifosfato (ITP) para estudo da participação desta no metabolismo de fósforo muscular. Nas décadas seguintes a inosina foi se destacando em estudos de viabilidade de eritrócitos para transfusão sanguínea (Zachara, 1974). Esses estudos levaram a inosina a dois caminhos distintos. Os estudos a cerca dos efeitos da inosina se voltaram para a modulação cardiovascular e modelos de hipóxia/reperfusão. Já na década de sessenta a inosina participava de testes clínicos como um medicamento para modulação cardíaca (De Benedetti, 1960), na Itália e em outros países da Europa, entre tanto os resultados não foram promissores. Na década de 70 a ação da inosina nos modelos de hipóxia/reperfusão e cultivo celular foi ganhando destaque, o que levou à sugestão dos seus efeitos citoprotetores (Hiramatsu *et al.*, 1971). Esses efeitos levaram a uma miríade de

estudos e modelos muitos dos quais relacionando a diminuição da liberação de citocinas inflamatórias às ações da inosina. O “boom” dos estudos envolvendo o sistema purinérgico ocorreu com os estudos de Burnstock (1972), quando foi postulada a existências dos receptores do sistema purinérgico e posteriormente, Burnstock *et al.* (1985), quando os receptores P1 e P2 foram descritos.



**Fig. 3:** A síntese da inosina e seu precursor metabólico, adenosina, em homeostase. Adaptada de Shafy *et al.* (2012)

Ao longo de sua história, fica cada vez mais evidente que a inosina é uma molécula endógena que pode exercer potentes efeitos moduladores, suprimindo a resposta inflamatória, no sistema imune (Hasko *et al.*, 2004; Mabley *et al.*, 2003). A inosina assim como outros nucleosídeos funciona como uma molécula de sinalização extracelular, e embora tanto a inosina como outras purinas estejam presentes apenas em baixas concentrações no espaço extracelular, condições de stress metabólico geradas por inflamação, lesões, hipóxia, isquemia/reperfusão e outros estados patológicos tendem a aumentar drasticamente as suas concentrações (Burnstock *et al.*, 2012; Mabley *et al.*, 2009).

Sob condições de estresse tecidual, o ATP, ADP, AMP e IMP são libertado intra e extracelular, e os grupos fosfato são rapidamente clivados por ectoenzimas trabalhando em conjunto, primeiro através difosfohidrolases trifosfato de nucleosídeo (NTDPases; por exemplo, CD39) (Robson *et al.*, 2005), seguido de hidrólise por meio de ecto-5-nucleotidase (CD73) (Fredholm *et al.*, 2011; Picher *et al.*, 2003), gerando a adenosina que é convertida em inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA). A adenosina tem uma meia-vida curta, devido a alta expressão de ADA ocorrendo sua rápida conversão em inosina (Eltzschig *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009).

O nucleosídeo adenosina é a purina melhor caracterizada (Garcia Soriano *et al.*, 2001). Estímulos nocivos aos tecidos promovem, em resposta, a rápida liberação de adenosina, que tem dois papéis na modulação da homeostase. Primeiro, a adenosina extracelular representa uma molécula de alarme que reporta lesão do tecido de uma forma autócrina ou parácrina para o tecido circundante. Em segundo lugar, adenosina extracelular gera uma variedade de respostas do tecido que podem ser consideradas de forma generalizada como de proteção, mediando assim a homeostase. A adenosina atua através da ativação de um ou mais receptores da família P1, denominados: A1, A2a, A2b e A3, todos receptores transmembrana acoplados a proteína G (Hasko *et al.*, 2008).

Vários análogos da inosina e agonistas dos receptores P1 também têm demonstrado redução de parâmetros inflamatórios em modelos de doenças, que incluem asma (El-Hashim *et al.*, 2009), inflamação crônica do intestino (Antonioli *et al.*, 2007), artrite reumatóide (Szabo *et al.*, 1998) e sepse (Hasko *et al.*, 1998; Law, 2006). Estes estudos recentes têm reforçado a hipótese de que nucleosídeos púricos podem exercer importante papel modulador na homeostase da pele. Foi descrito que, através de um mecanismo adenosina-dependente (provavelmente pelo envolvimento do receptor A1), as células T regulatórias podem suprimir hipersensibilidade de contato (Oliver *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2011; Ring *et al.*, 2009). Além disso, a ativação dos receptores, A1, A2a e A2b está envolvida com o processo de cicatrização (Montesinos *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999; Valls *et al.*, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que a inosina também apresenta um efeito anti-inflamatório relacionado com a ativação dos receptores P1, principalmente os receptores A2a e A3, que incluem a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (Gomez *et al.*, 2003; Hasko *et al.*, 2000; Rahimian *et al.*, 2010). Recentemente, em nosso laboratório demonstramos que o tratamento com inosina promoveu a redução da migração de neutrófilos e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em exsudado pleural, durante a inflamação pleural aguda, um efeito que envolveu os receptores A2a e A2b (da Rocha Lapa *et al.*, 2012).

Ainda hoje existe a necessidade de identificação de moléculas endógenas capazes de inibir a atividade exagerada ou inapropriada do sistema imune na pele e o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias novas que possam regular a inflamação com menos efeitos adversos, destacam o interesse para compreender melhor a sinalização purinérgica na inflamação da pele. Complementar a isso, apesar das evidências da ação da adenosina na pele, nada foi descrito para inosina na literatura. Tendo em conta que: (1) a inosina é conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios e (2) é gerada rapidamente no local da inflamação, e (3) pode ser considerada por alguns autores como um ligante natural dos receptores P1 (Gomez *et al.*, 2003), acreditamos relevante investigar o efeito de inosine tópica na inflamação cutânea induzida na orelha de camundongos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Notavelmente, existe uma grande quantidade de doenças de pele que possuem em seu desenvolvimento um estágio inflamatório, em que, muitas delas evoluem para uma desregulação crônica das funções fisiológicas da pele, como ocorre na psoríase, dermatite, vitiligo, pênfigo entre outras. As opções de tratamento disponíveis para uma grande parte delas promove a formação de efeitos adversos, assim como a diminuição de efeito responsivo ao tratamento convencional. Em vista disso é de grande interesse um melhor entendimento da etiologia e desenvolvimento dessas doenças e a investigação de possíveis alternativas, para serem aliadas ou substituir os tratamentos convencionais. Essa série de fatores se levados em conjunto formam um forte argumento para a pesquisa nesta área. É neste contexto que a inosina, por ser uma molécula endógena e de segurança relativa, aponta como uma forte opção de alvo. Estudos comprovando a eficácia da inosina em outros modelos experimentais são encontrados na literatura, contudo, os resultados aqui apresentados para os modelos utilizados neste estudo são inéditos, acrescentando de maneira promissora dados da ação da inosina utilizada topicamente.

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Através da administração tópica da inosina, avaliar a participação desta purina endógena na evolução da resposta inflamatória na pele, medindo parâmetros da inflamação aguda e crônica em modelos experimentais por óleo de cróton e imiquimode.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de várias doses de inosina frente à indução do edema agudo por óleo de cróton em relação aos parâmetros: edema, atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e celularidade na derme.
- Verificar a participação dos receptores purinérgicos P1 no efeito da inosina frente à indução do edema agudo com óleo de cróton em relação aos parâmetros: edema, atividade da enzima MPO e celularidade na derme.
- Analisar o efeito da inosina frente à indução do edema crônico por óleo de cróton em relação aos parâmetros: edema, atividade da enzima MPO, da enzima n-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e espessura e proliferação da epiderme assim como a celularidade na derme.
- Medir o efeito da inosina frente à indução do edema crônico por imiquimode em relação aos parâmetros: edema, atividade da enzima MPO, da NAG e espessura e proliferação da epiderme assim como a celularidade na derme.
- Avaliar o efeito da inosina frente à indução do edema crônico por óleo de cróton e por imiquimode quanto a possível alteração morfológica dos órgãos linfóides e adrenais.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DROGAS E REAGENTES

Nos experimentos descritos a seguir, as seguintes substâncias foram utilizadas: alloxazina, aprotinina, albumina de soro bovino (BSA), brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), cafeína, dexametasona, EDTA, fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF), glicina, inibidor de protease (P2714), inosina, Mifepristona (RU486), N,N-dimetilformamida (DMF), óleo de cróton, Tampão fosfato de sódio (PBS), tetrametilbenzidina HCl (TMB), Tween 80 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA). Acetona, ácido acético, dimetilformamida, etanol absoluto, formaldeído, (Merck Biosciences, Bad Soden, Alemanha). Eosina, hematoxilina, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), propilenoglicol, xilol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). DPCPX, ZM241385 (Tocris Cookson Ltd. Bristol, UK). IgG de burro anti-cabra (peroxidase), IgG policlonal de cabra anti-PCNA (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, EUA), Imiquimode 5% (Medley Indústria Farmacêutica Ltda, Campinas, SP, Brasil) ou (Germed Farmaceutica LTDA, Hortolândia, SP). Kit de análise de espectro celular total (eBioscience Inc, San Diego, CA). Creme não iônico, PEG 400 (polietilenoglicol) (Alchimia Farmácia de Manipulação e Homeopatia, Curitiba – PR, Brasil).

### 4.2 ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* e *BALBc* fêmeas (25-35 g) mantidos em condições de temperatura controlada (22±2°C), respeitando uma fase clara/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial (Nuvital). Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos um dia para adaptação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os camundongos *Swiss* foram obtidos no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Brasil). Os da linhagem *BALBc* foram cedidos pelo professor João Bosco Pesqueiro da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, São Paulo,

Brasil). Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo 392, seguindo as normas do COBEA.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha, nos camundongos em  $\mu\text{m}$ , de acordo com a metodologia revisada por Hecker *et al.* (1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B), antes (espessura basal) e após determinado tempo da indução do processo inflamatório, dependendo do agente flogístico utilizado. Os compostos foram dissolvidos em acetona (exceto no modelo de edema crônico induzido por imiquimode) e aplicados na orelha direita dos camundongos. Para minimizar variações concernentes à técnica, as medidas das orelhas foram conduzidas sempre por um único experimentador.

#### 4.4. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DO ÓLEO DE CRÓTON

O óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) apresenta como princípio ativo majoritário o TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato), um éster de forbol, potente agente flogístico e promotor de tumor, capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (Gábor, 2003). Para avaliar a atividade da inosina nesse modelo, o edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 0,4 mg/orelha de óleo de cróton, dissolvido em 20  $\mu\text{l}$  de acetona. A inosina foi diluída no veículo Tween 80 (0,5%) e em acetona de forma a obter-se concentrações variando de 0,01 até 1 mg/orelha. Tanto a inosine quanto o controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente logo após o tratamento com o óleo de cróton. Paralelamente, um grupo controle de animais foi tratado com o veículo. A espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação do óleo de cróton (De Young *et al.*, 1989b), conforme descrito no item anterior. Ao final do experimento, 24 h após a aplicação do óleo de cróton, os animais foram eutanasiados e amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para

a posterior avaliação da atividade da enzima MPO e análise da celularidade na derme.

#### 4.4.1 Participação dos receptores para adenosina nos efeitos da inosina no edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton

Para avaliar o envolvimento dos receptores para adenosina na resposta da inosina no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, foram administrados por via intraperitoneal antagonistas seletivos para os receptores A<sub>1</sub> (DPCPX, 2,5 mg/kg); A<sub>2A</sub> (ZM241385, 1,5 mg/kg); A<sub>2B</sub> (aloxazina, 5,0 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg) em solução salina (NaCl) 0,9%, 30 min antes da administração tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Após a aplicação do óleo de cróton, a inosina (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 mg/orelha), diluída no veículo tween 80 (0,5%) e acetona, foi administrada por via tópica. Paralelamente, um grupo controle de animais foi tratado com o veículo dexametasona (controle positivo; 0,05 mg/orelha). A espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação do óleo de cróton (De Young *et al.*, 1989b), conforme descrito no item anterior. Ao final do experimento, 24 h após a aplicação do óleo de cróton, os animais foram eutanasiados e amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para a posterior avaliação da atividade da enzima MPO e análise da celularidade na derme.

#### 4.4.2 Participação dos receptores para glicocorticoides nos efeitos da inosina no edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton

Para determinar a participação de receptores de glicocorticóides na resposta da pele inflamada frente ao tratamento de inosina (0,6 mg/orelha), utilizou-se o antagonista de receptores glicocorticoides mifepristona (RU486). O antagonista foi aplicado subcutaneamente (50 mg/kg) em veículo PEG 400 (polietilenoglicol) na concentração de 1:1, 30 minutos antes do tratamento, seguindo a metodologia adaptada a partir da literatura (Pinto *et al.*, 2010). A indução, tratamento e medida da espessura da orelha foram realizados conforme a descrição da metodologia para o edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton. Ao final do experimento, 24 h após a aplicação do óleo de cróton, os animais foram

eutanasiados e amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para a posterior avaliação da atividade da MPO.

#### 4.5 EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da inosina em um processo inflamatório já estabelecido, foi utilizado o modelo de inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla do óleo de cróton, como descrito na literatura (Stanley *et al.*, 1991). O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20ml de acetona) em dias alternados (dias: 1; 3; 5; 7; 9) durante 9 dias. A inosina (0,6 mg/orelha), a dexametasona (0,05 mg/orelha, controle positivo) e o veículo Tween 80 (0,05%), foram dissolvidas em 20 µl de acetona e posteriormente aplicados por via tópica durante 5 dias (dias: 5; 6; 7; 8; 9) iniciando no quinto dia do experimento. O tratamento foi realizado duas vezes ao dia com um intervalo de seis horas entre tratamento-indução-tratamento respectivamente, totalizando doze horas entre tratamentos. O edema foi avaliado diariamente como previamente descrito no item 4.2, antes do tratamento. No nono dia do experimento os animais foram sacrificados e biópsias (círculos de 6 mm de tecido) das orelhas foram coletados para serem, posteriormente, submetidas a avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG, bem como a análise histológica de celularidade na derme e de queratinócitos na epiderme. Os órgãos linfoides e adrenais foram coletados para análise morfológica.

#### 4.6 EDEMA DE ORELHA CRÔNICO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE IMIQUIMODE

O imiquimode é um agonista de receptores TLR 7-8 e sua aplicação tópica em camundongos BALBc produz hiperproliferação e infiltração celular semelhantes à encontrada na psoríase (Cai *et al.*, 2011). Para avaliar a participação da inosina neste modelo, a espessura basal da orelha de camundongos BALBc foi medida, conforme descrito na metodologia 4.2. O creme comercial imiquimode (5%) foi aplicado na orelha dos camundongos (10 mg) com auxílio de espátula, para induzir a

resposta inflamatória, como descrito previamente (van der Fits *et al.*, 2009). A indução da inflamação ocorreu por seis dias seguidos, sendo aplicada uma vez ao dia. Para o tratamento com a inosina foi realizado o preparado de um creme contendo inosina (6%) em creme não iônico e propilenoglicol (10%). Como controle positivo foi utilizado a formulação de creme comercial acetado de dexametasona (1 mg/g) (SEM S/A, São Bernardo do Campo, SP). A realização dos tratamentos ocorreu com aplicação de 10 mg/orelha de inosina (6%) ou dexametasona (1 mg/g), iniciados no segundo dia de experimento. Os animais foram tratados a cada 12 h respeitando um intervalo de 6 h entre os tratamentos e a indução. A medida do edema foi feita uma vez ao dia, previamente à indução do edema. Ao final do sexto dia foram retiradas amostras das orelhas para análise da atividade das enzimas MPO e NAG. Os órgãos linfoides e adrenais foram coletados para análise morfológica.

#### 4.7 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando as metodologias descritas anteriormente (Bradley *et al.* (1982) modificada por De Young *et al.* (1989a)). As amostras coletadas a partir das orelhas foram obtidas com o auxílio de um punch, produzindo círculos de 6 mm de diâmetro de tecido das orelhas dos camundongos. As amostras foram adicionadas a 0,2 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizadas em criotubo por cerca de 20s a 0°C. Ao homogenato foram adicionados 0,65 mL do tampão anteriormente descrito e homogeneizado novamente por 20 s a 0°C. O homogenato foi transferido para microtubo e o criotubo lavado com mais 0,65 ml do tampão descrito. A amostra (1,5 mL) colocada em microtubo foi centrifugada a 11200 xg a 4 °C por 20 minutos. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foi adicionado 200 µL de uma solução de peróxido de hidrogênio (0,017 %) contendo: 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µL de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µL em cada poço. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi posteriormente incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de

sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) em comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em absorbância por poço.

#### 4.8 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

Para analisar o efeito do tratamento com inosina sobre a infiltração de macrófagos e monócitos na pele, foi realizada a avaliação da atividade da enzima NAG, que é utilizada como indicativo indireto da presença de leucócitos mononucleares, seguindo a metodologia de Sánchez *et al.* (1999). As amostras coletadas a partir das orelhas foram obtidas com o auxílio de um punch, produzindo círculos de 6 mm de diâmetro de tecido das orelhas dos camundongos. As amostras foram adicionadas a 0,2 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizadas em criotubo por cerca de 20 s a 0°C. Ao homogenato foram adicionados 0,65 mL do tampão anteriormente descrito e homogeneizado novamente por 20 s a 0°C. O homogenato foi transferido para microtubo e o criotubo lavado com mais 0,65 ml do tampão descrito. A amostra (1,5 mL) colocada em microtubo foi centrifugada a 11200 xg a 4 °C por 20 minutos. Triplicatas de 25 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e em seguida foram adicionados 25 µl de uma solução de 2,24 mM de NAG ( $\rho$ -nitrophenyl-2-acetamide- $\beta$ -D-glucopiranoside) e 100 µl de tampão Citrato (50 mM, pH 4,5). A placa foi incubada em 60°C por 1 h e posteriormente foi adicionado 100 µl de tampão glicina 200 nM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) em comprimento de onda de 405 nm, sendo expressa em absorbância por poço.

#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Para avaliar os efeitos do tratamento tópico com inosina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias foi realizada a quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nas orelhas dos camundongos. As amostras coletadas a partir das orelhas foram obtidas com o auxílio de um punch, produzindo círculos de 6 mm de diâmetro de tecido imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram adicionadas a

0,2 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); 0,05% de tween 20; 0,4% inibidor de protease; 0,5% albumina sérica bovina (BSA) e homogeneizadas em criotubo por cerca de 20 s a 0 °C. Ao homogenato foram adicionados 0,8 mL do tampão anteriormente descrito e homogeneizado novamente por 20 s a 0 °C. O homogenato foi transferido para microtubo e o criotubo lavado com mais 1,0 ml do tampão descrito. A amostra (2,0 mL) colocada em microtubo foi centrifugada a 11200 xg a 4 °C por 10 minutos. O preparo da placa de 96 poços ocorreu conforme descrito no kit comercial [Full spectrum cell analysis (eBioscience Inc, San Diego, CA)], para adição do anticorpo de captura para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , incubação da triplicata do homogenato e do anticorpo de revelação. A reação colorimétrica foi determinada pela leitura em leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), determinada pelo delta de absorbância 570-450 nm e expressa em pg/ml.

#### 4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para avaliar o efeito do tratamento tópico com inosina na celularidade na derme e espessura da epiderme foram feitos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Esta análise foi realizada em amostras de orelha coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. As amostras coletadas a partir das orelhas foram obtidas com o auxílio de um punch, produzindo círculos de 6 mm de diâmetro. Cada amostra foi cortada ao meio, perpendicularmente aos vasos sanguíneos do tecido e fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) num período de 16 h, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As amostras foram posteriormente desidratadas em uma bateria seriada de concentrações de álcool hidratado-xilol e emblocadas em parafina a 60° C. Os blocos obtidos foram seccionados em um micrótomo, cortes não sequenciais de 5  $\mu$ m foram posicionados sobre uma lâmina contendo solução de albumina (2%) e secadas a 45° C *overnight*. As lâminas foram reidratadas em uma bateria seriada de concentrações de xilol-álcool hidratado, coradas com hematoxilina-eosina, desidratados em uma bateria seriada de álcool hidratado-xilol e seguidas da montagem com balsamo do Canadá e lamínula. As lâminas foram observadas em

microscópio óptico e fotografadas (aumento 20-40x). As imagens geradas foram randomizadas utilizando o software on-line Randomizer® (n = 10-15) e analisadas por um único observador. A celularidade da derme e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas utilizando o software ImageJ 1.46R, em aumento de 40x e plotadas em gráficos.

#### 4.11 QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Para analisar o efeito da inosina sobre a celularidade da epiderme foi realizada a análise imunohistoquímica para verificar a expressão de marcadores celulares como marcadores de proliferação e diferenciação celular. Um desses marcadores é o PCNA que foi descrito como marcador da atividade proliferativa (Einspahr *et al.*, 2006). Para verificar expressão de PCNA, amostras de orelhas de animais submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton, foram processadas conforme descrito no item anterior. Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas gelatinizadas (gelatina tipo A e cromo alúmem) contendo uma solução de albumina 1%. As lâminas foram reidratadas em uma bateria seriada de concentrações de xilol-álcool hidratado e seguidas de banho de PBS. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina (0,1 M) para o bloqueio dos radicais aldeídos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) em metanol para bloqueio da peroxidase endógena e PBS/BSA (1%) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA (1:100) durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram incubadas, com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase (1:100), durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e desidratadas em uma bateria seriada de álcool hidratado-xilol, seguidas da montagem com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e fotografadas (aumento 40x). As imagens geradas foram randomizadas utilizando o software on-line Randomizer® (n = 10-15) e analisadas por um único observador. A celularidade da epiderme foi

avaliada na área representativa de imunomarcção para o marcador PCNA de queratinócitos, em marrom, utilizando o software ImageJ 1.46R, em aumento de 40x e plotada em gráfico.

#### **4.12 Análise de efeitos adversos sistêmicos**

Entre os efeitos colaterais apresentados pelo tratamento crônico com os glicocorticoides está a atrofia dos órgãos linfoides e adrenais (Schacke *et al.*, 2004). Através da análise ponderada dos órgãos linfóides (timo, baço, linfonodos) e adrenais, é possível avaliar de maneira indireta a absorção sistêmica e parâmetros como toxicidade e imunossupressão mediada pelo tratamento tópico. Os órgãos analisados foram provenientes dos animais sujeitos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton e aplicação múltipla de imiquimode. Os animais foram eutanasiados em câmara de gás (éter) e os órgãos retirados foram mantidos em soro fisiológico por até duas horas. Os órgãos foram secos em papel toalha, pesados (linfonodos e adrenais aos pares) e posteriormente fotografados com câmara digital (modelo Sony DSC 5950, zoom 2.5x).

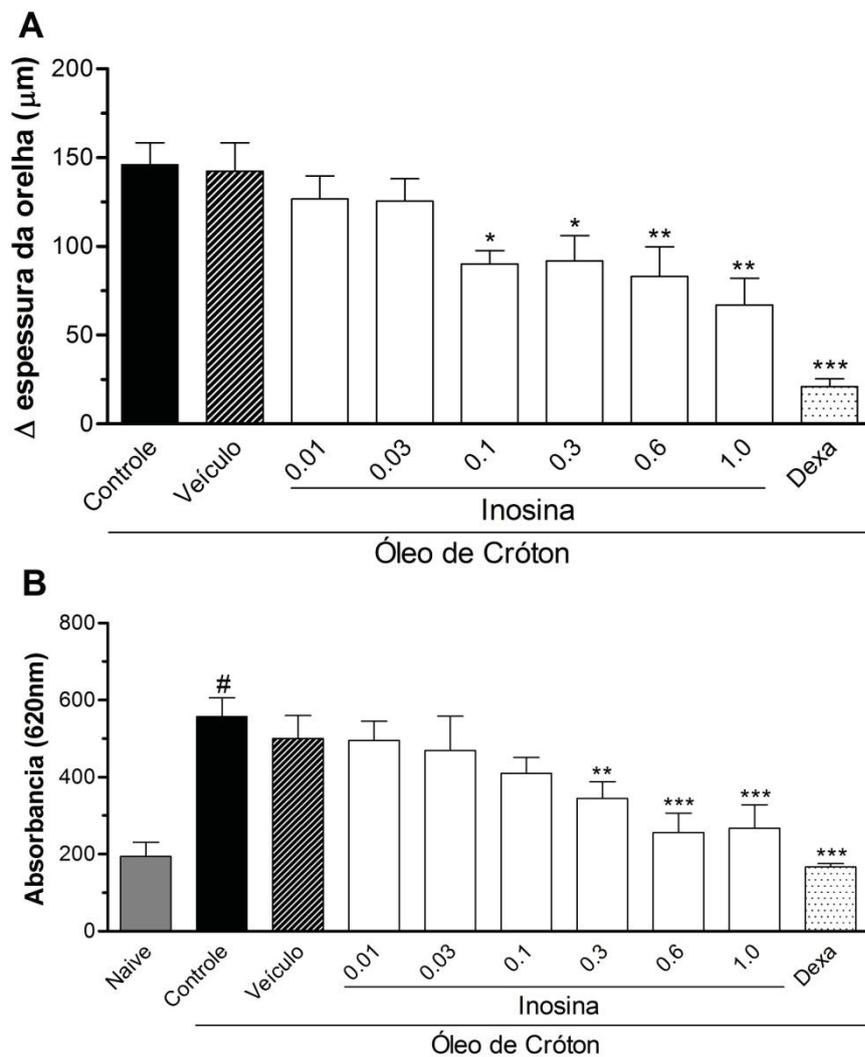
#### **4.13 Análise Estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), Os dados são avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) são considerados como indicativos de significância. Os cálculos são realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism version 5.00*, San Diego Califórnia, EUA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AÇÃO DA INOSINA NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON.

A análise aqui descrita da ação da inosina mostrou que esta possui capacidade de reduzir o efeito edematogênico provocado pela aplicação do óleo de cróton na dose de 0,4 mg/orelha. A inosina apresentou efeito inibitório não dependente da dose, atingindo significância nas doses de 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 mg/orelha, em comparação ao grupo veículo (Fig. 4A). A inibição máxima ocorreu para a dose de 1,0 mg/orelha que reduziu o edema em  $57 \pm 12\%$ . A droga de referência dexametasona (0,05 mg/orelha) reduziu em  $83 \pm 3\%$  a formação do edema e a aplicação do veículo não alterou o edema quando foi comparado ao controle. A análise da atividade da enzima MPO demonstrou que o tratamento com inosina reduziu a atividade desta enzima nas doses de 0,3; 0,6; 1,0 mg/orelha, atingindo inibição máxima de  $84 \pm 6\%$  para a dose de 0,6 mg/orelha (Fig. 4B). O tratamento com dexametasona reduziu em  $92 \pm 2\%$  a atividade da MPO e o veículo não causou alteração, quando comparados ao controle.

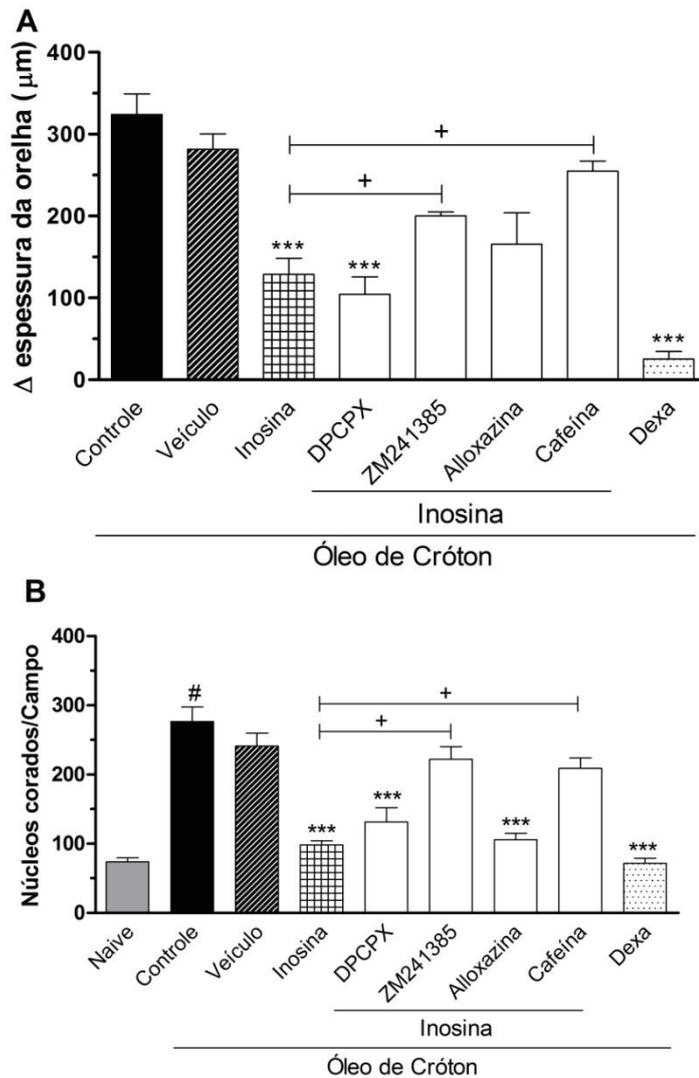


**Fig. 4:** Efeito da aplicação tópica de inosina nas doses (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 mg/orelha) e Dexa (dexametasona, 0,05 mg/orelha) na inflamação aguda induzida por óleo de cróton. Ação da inosine sobre a formação do edema (A) e a atividade da enzima MPO (B) induzidos pela aplicação do óleo de cróton. O grupo controle recebeu apenas acetona e o agente flogístico (óleo de cróton 0,4 mg/orelha) para indução da inflamação. O grupo veículo foi tratado topicamente com acetona e Tween 80 (0,5%). O tratamento com as doses de inosina e dexa (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após o desafio com o agente flogístico. O edema nas orelhas foi medido 6h após a indução com óleo de cróton. Foram coletadas amostras das orelhas 24h após a indução e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante o ensaio da MPO foi realizado para medida da atividade enzimática. As barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo de veículo; # P <0,001 quando comparado com o grupo naive, não tratado (B).

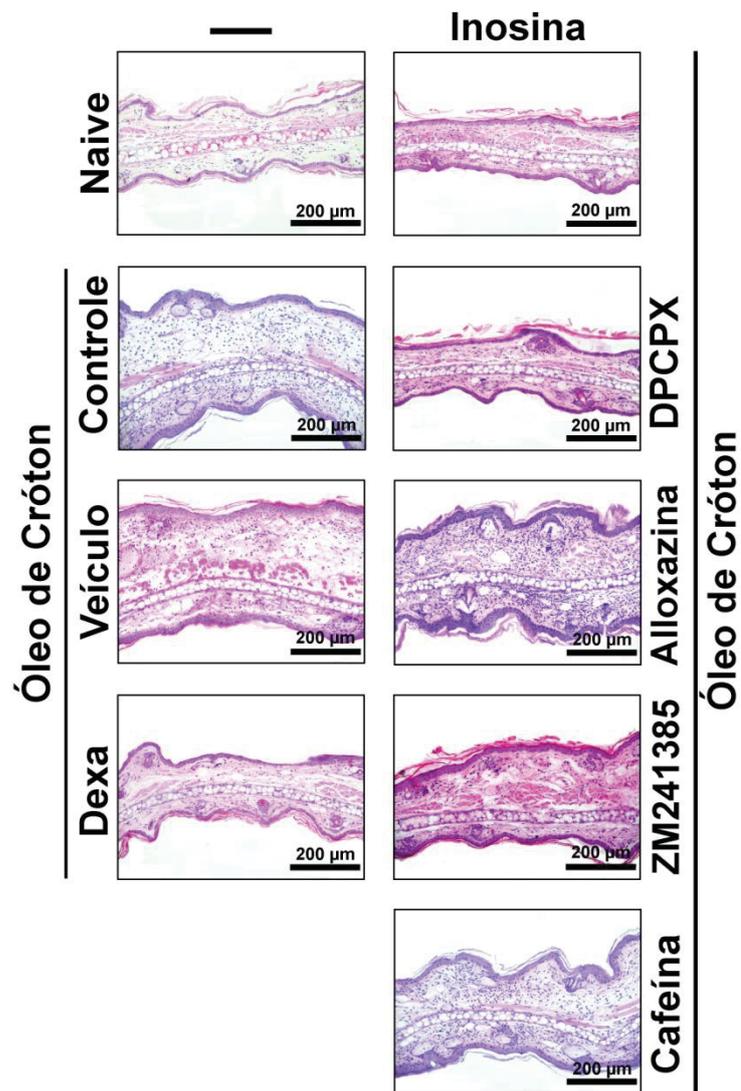
A figura 5A mostra o efeito dos antagonistas dos receptores P1: DPCPX (receptor A1), ZM241385 (receptor A2a), aloxazina (receptor A2b) e cafeína (antagonista inespecífico) sobre o efeito da inosina no edema de orelha causado por óleo de cróton. O pré-tratamento com os antagonistas DPCPX e aloxazina não promoveram alteração no efeito anti-edematogênico mediado pela inosina. De maneira contrária, o pré-tratamento com os antagonistas ZM241385 e cafeína, apresentaram reversão do efeito inibitório da inosina sobre o edema, em  $79 \pm 7\%$  e  $77 \pm 10\%$ , respectivamente.

As amostras retiradas e submetidas à análise histológica (hematoxilina-eosina) mostraram que os tratamentos com inosina ou dexametasona reduziram a celularidade na derme em  $65 \pm 2\%$  e  $74 \pm 3\%$ , respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (Fig. 5B e 6). Nos grupos que receberam o pré-tratamento com ZM241385 e cafeína, além de inosina e óleo de cróton, apresentaram redução na inibição da celularidade em  $89 \pm 5\%$  e  $86 \pm 6\%$ , respectivamente, quando comparados com o grupo tratado com inosina (Fig. 5B e 6). Na figura 6 estão mostrados cortes representativos da análise histológica mostrada na figura 5B.

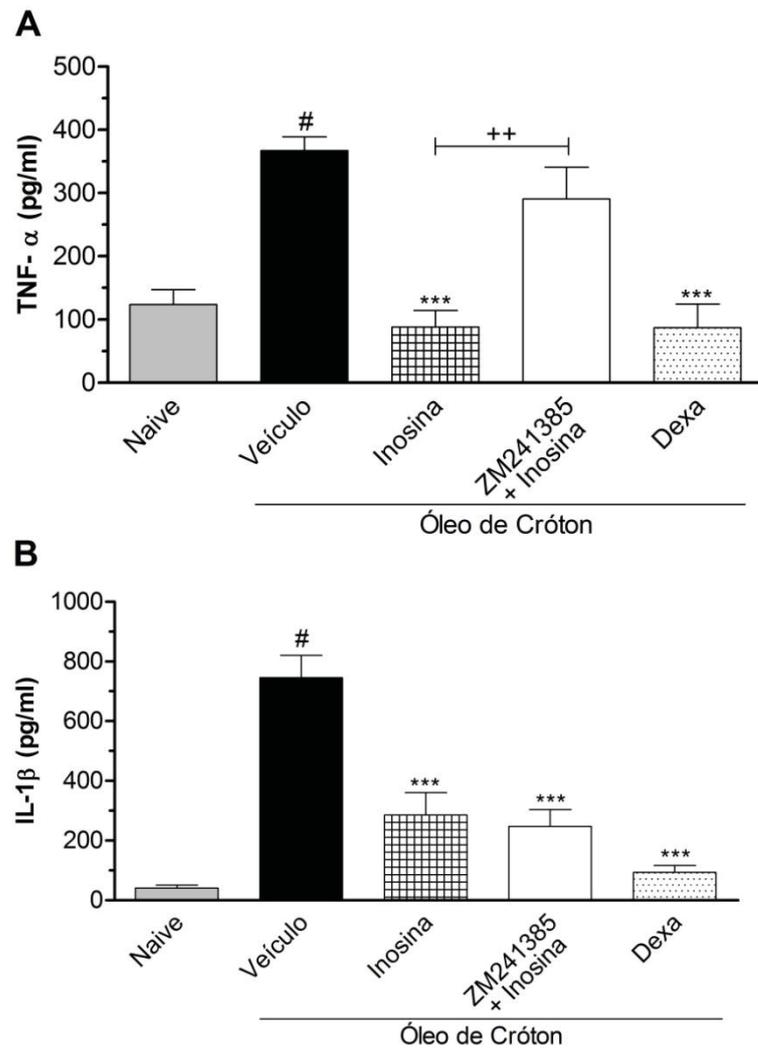
Ao avaliar da ação da inosina frente à liberação de citocinas no modelo de edema agudo induzido por óleo de cróton foi possível constatar que no grupo veículo ocorreu aumento das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , causado pelo óleo de cróton, quando comparado com o grupo naivo (Fig. 7). O tratamento com a inosina (0,6 mg/orelha) promoveu diminuição de 100% e  $65 \pm 11\%$ , respectivamente, na quantidade das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido, quando comparadas ao veículo. O pré-tratamento com ZM241385 promoveu reversão em  $65 \pm 11\%$  do efeito redutor na quantificação de TNF- $\alpha$  pela inosina (Fig. 7). Contrariamente, os níveis de IL-1 $\beta$  não foram alterados pelo pré-tratamento com o antagonista ZM241385.



**Fig. 5:** Efeito dos antagonistas dos receptores P1: DPCPX (A1), ZM241385 (A2a), alloxazina (A2b), cafeína (antagonista inespecífico) na inflamação aguda induzida por óleo de cróton e celularidade na derme. Os antagonistas dos receptores P1 foram aplicados intra-peritoneal, 30 minutos antes do procedimento de indução do edema, no modelo de inflamação aguda induzido por óleo de cróton. O grupo controle recebeu apenas acetona e o agente flogístico (óleo de cróton 0,4 mg/orelha) para a indução da inflamação. O grupo veículo foi tratado topicamente com acetona e Tween 80 (0,5%). O tratamento com inosina na dose de (0,6 mg/orelha) e dexa (0,05 mg / orelha) foram aplicados logo após o desafio com o agente flogístico. O edema nas orelhas foi medido 6 horas após a indução (A). Amostras das orelhas foram coletadas 24 h após o desafio para análise histológica. A celularidade na derme foi analisada com o software Image J®, em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (200X - escala de 200 mm) (B). Barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo de veículo; + P <0,05, quando comparada com o grupo tratado com inosina; # P <0,001 quando comparado com o grupo naive, não tratado (B).



**Fig. 6:** Imagens representativas dos cortes histológicos após o tratamento com inosine (0,6 mg/orelha) e os antagonistas dos receptores P1 na inflamação aguda induzida por óleo de cróton. A tabela mostra imagens de cortes transversais de orelhas coletadas 24 horas após a indução da inflamação e corados com HE (aumento de 200 x - escala de 200 µm). Com exceção de grupo naive, todos os grupos receberam óleo de cróton (0,4 mg/orelha). A coluna da esquerda representam os grupos sem tratamento com inosine. As linhas da esquerda representam grupos naive, controle, veículo e dexa. A coluna da direita representa os grupos tratados com inosine (0,6 mg/orelha), e nas linhas da direita, os grupos pré-tratados com antagonistas dos receptores P1: DPCPX (A1), alloxazina (A2a), ZM241385 (A2b) e cafeína (antagonista inespecífico).

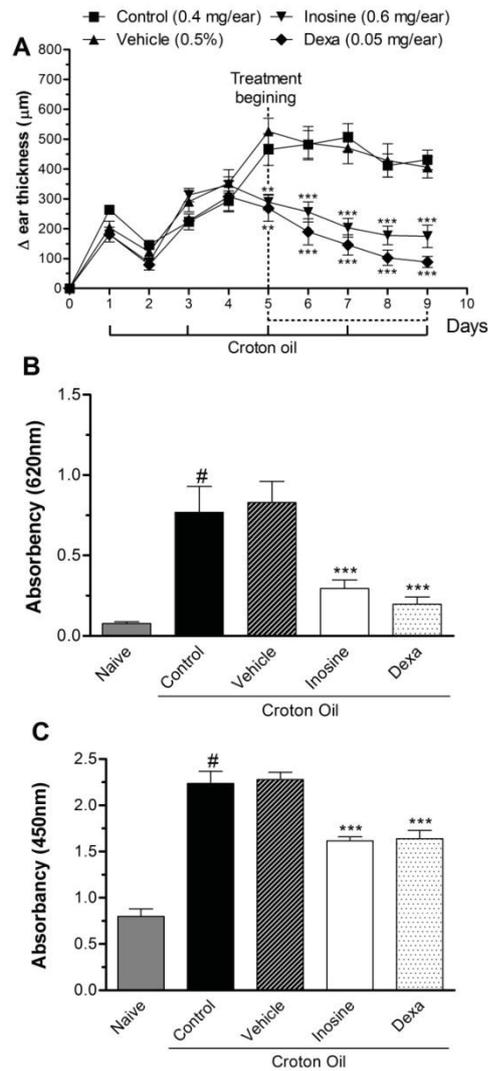


**Fig. 7:** Efeito da inosina nos níveis de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) tecidual em camundongos pré-tratados com o ZM241385, antagonista do receptor P1 (A2a), na inflamação aguda induzida por óleo de cróton. O antagonista foi aplicado intraperitoneal, 30 minutos antes do procedimento de indução do edema no modelo de inflamação aguda induzido por óleo de cróton. O grupo veículo foi tratado topicamente com acetona e tween 80 (0,5%). O tratamento com inosina na dose de (0,6 mg/orelha) e dexta (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após a indução com o agente flogístico. A medida dos níveis das citocinas foi realizada com kit de ELISA comercial. As barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos para indicar os níveis de significância: \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo de veículo; # P <0,001 quando comparado com o grupo naive, não tratado, e + + P <0,01, quando comparada com o grupo tratado com a inosina.

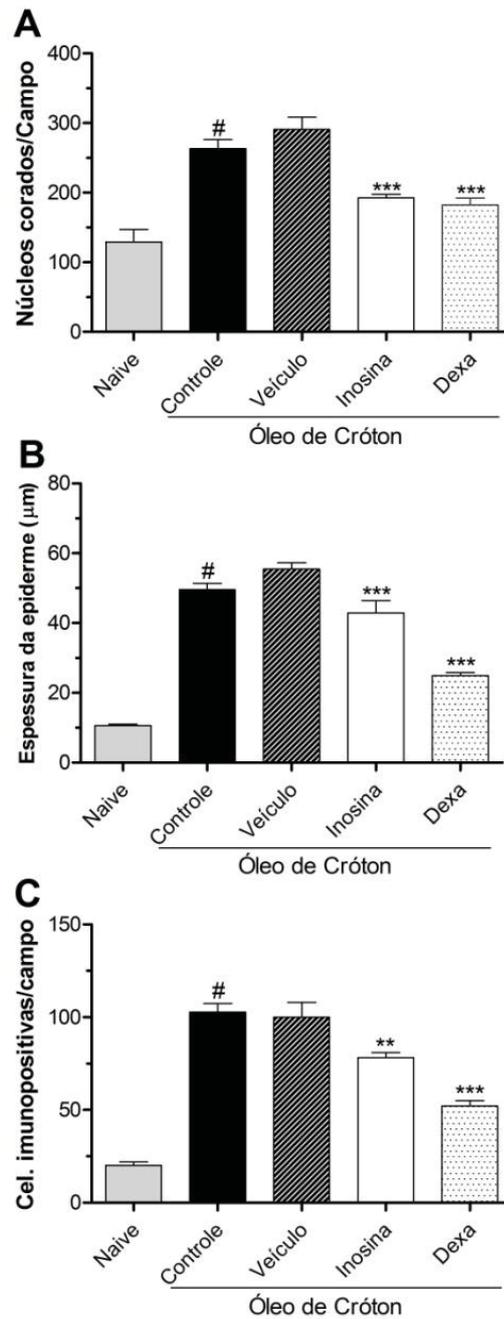
## 5.2 EFEITO DA INOSINA NO MODELO DE APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON NA ORELHA.

A aplicação de óleo de cróton repetidas vezes na orelha, ao final de nove dias, produziu edema intenso e lesões no tecido (grupos controle e veículo). O grupo tratado com inosina 0,6 mg/orelha mostrou redução significativa do edema a partir do primeiro dia de tratamento, atingindo redução máxima de  $64 \pm 4\%$  no último dia de tratamento (Fig. 8A). O tratamento com o fármaco de referência dexametasona, mostrou redução significativa do edema a partir do primeiro dia de tratamento e promoveu inibição de  $79 \pm 4\%$  no último dia de experimento. As amostras retiradas para análise da MPO e NAG mostraram que o tratamento com a inosina também reduziu a atividade das enzimas, respectivamente em  $57 \pm 8\%$  e  $34 \pm 7\%$  (Fig. 8B e C). Como esperado, o tratamento com dexametasona também inibiu a atividade das enzimas MPO e NAG em  $74 \pm 22\%$  e  $27 \pm 5\%$ , respectivamente. As amostras coletadas e analisadas através de histologia com coloração de HE, mostram que ocorreu redução de  $26 \pm 1\%$  da celularidade na derme para o grupo tratado com inosina (0,6 mg/orelha) e de  $30 \pm 3\%$  para o grupo tratado com dexametasona, quando comparados com o veículo (Fig. 9A e 10).

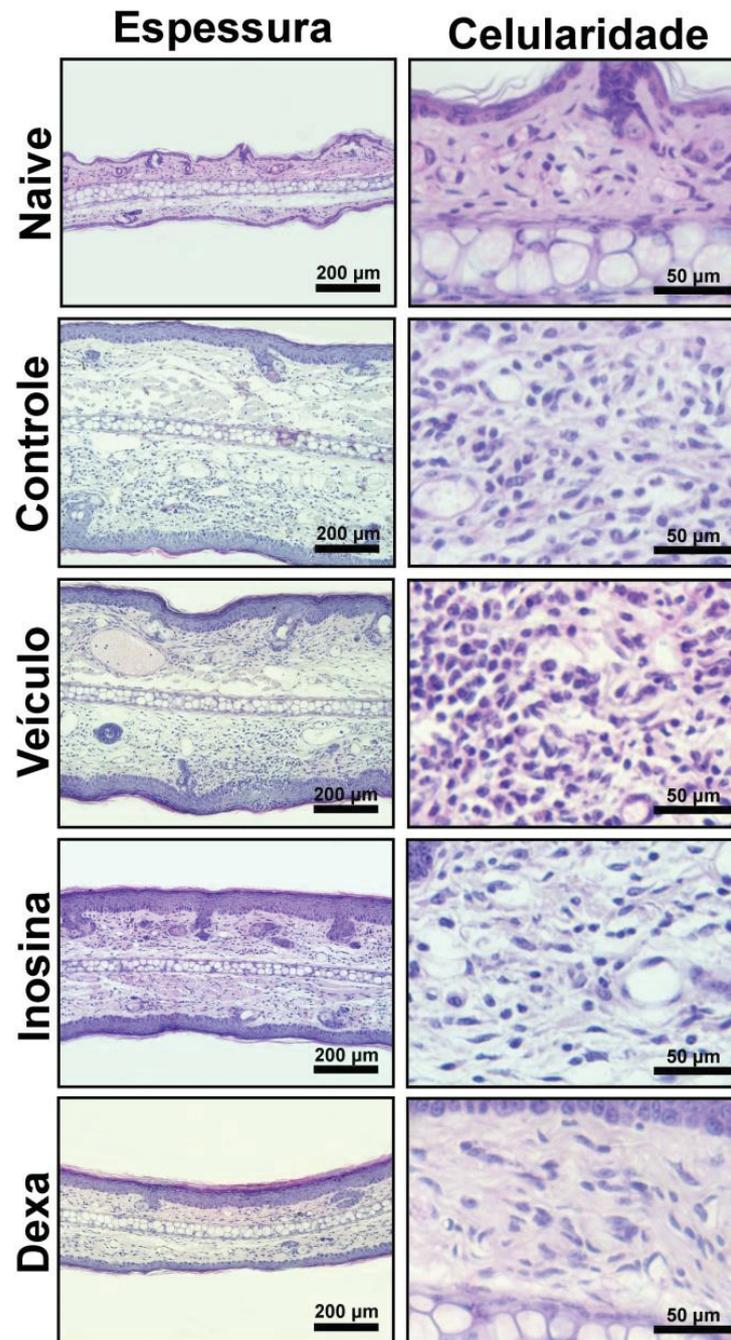
A análise da espessura da epiderme no grupo tratado com inosina mostrou redução de  $13 \pm 7\%$  na espessura, enquanto que o grupo tratado com dexametasona apresentou redução de  $49 \pm 2\%$  quando comparado com o controle (Fig. 9B e 11). Complementando esses resultados, foi realizada a análise de proliferação de queratinócitos através da marcação da PCNA por imunohistoquímica e assim foi possível verificar que o tratamento continuado com óleo de cróton causou aumento de  $514 \pm 4\%$  na quantidade de células positivas para o PCNA, quando comparado com o grupo naive (Fig. 9C e 11). A aplicação concomitante do veículo não causou nenhuma alteração na marcação para PCNA em comparação com o controle (somente óleo de cróton). Além disso, a quantidade de células positivas para PCNA foi reduzida em  $23 \pm 2\%$  pelo tratamento com inosina e em  $49 \pm 2\%$  com a aplicação de dexametasona, quando comparado com o veículo.



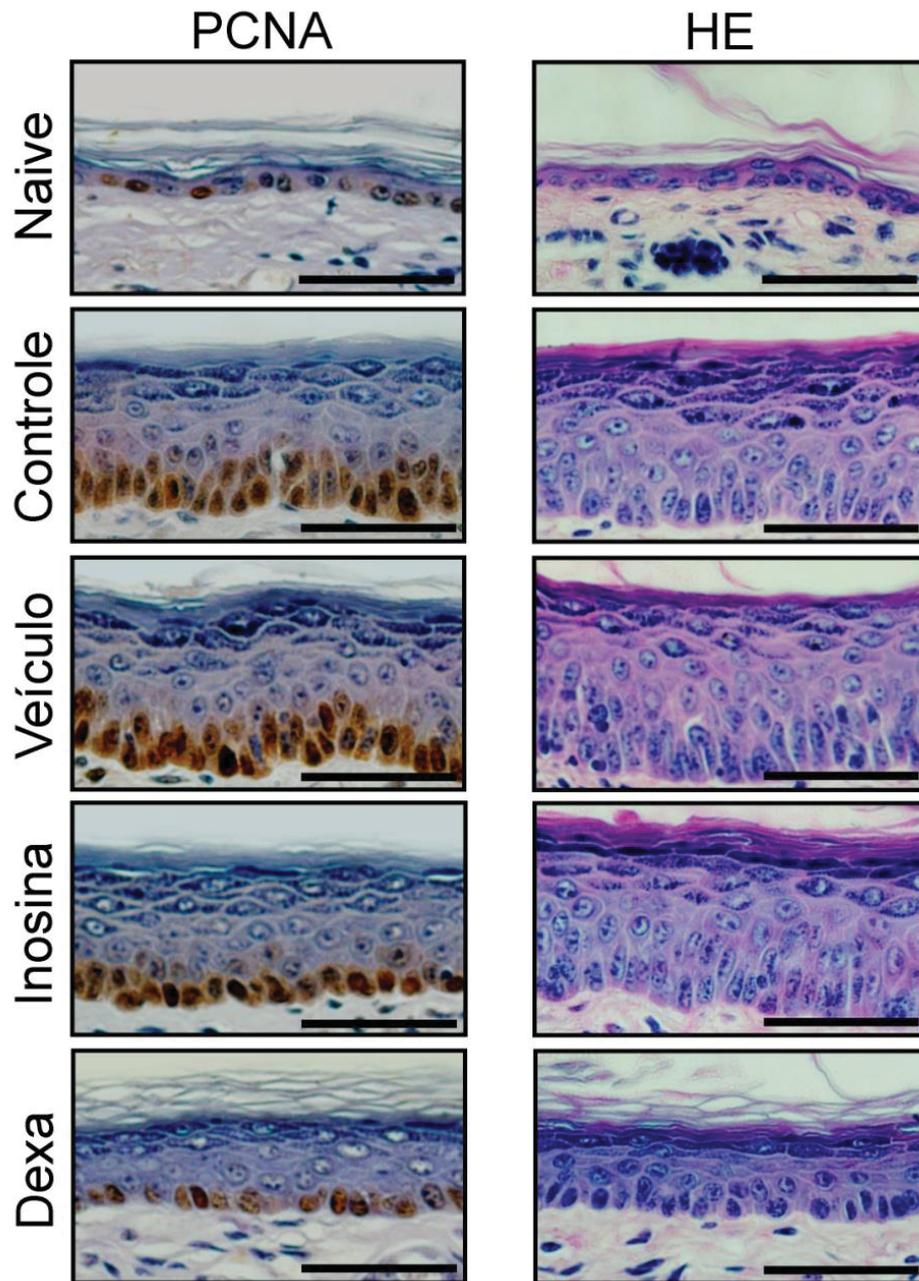
**Fig. 8:** Efeito tóxico da inosina no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton, e atividade das enzimas MPO e NAG. O óleo de cróton foi aplicado em dias alternados, durante nove dias (pontos quadrados / linha inferior). Os tratamentos com veículo (0,5%) (pontos triângulares), inosina (0,6 mg/orelha) (pontos triângulos invertidos) e dexa (0,05 mg/orelha) (pontos losangulos), começaram no quinto dia de experimento, duas vezes por dia (linha tracejada). A espessura da orelha foi medida diariamente (A). No último dia de experimento as amostras da orelha foram coletadas e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante foram realizados os ensaios para as atividades enzimáticas da MPO (B) e NAG (C). Linhas (A) e barras (B e C) representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6-8$ ). Símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo veículo; #  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo naive, não tratado.



**Fig. 9:** Análise do efeito da inosine sobre alterações histológicas no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton. As amostras foram colhidas no nono dia de experimento e processadas de acordo com o procedimento de histologia para coloração de hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para PCNA. Fotos foram tiradas a partir de slides (aumento de 20-40x / escala 200-50µm) e analisadas. Avaliação da celularidade através do número total de núcleos corados com HE em células da derme (A). Espessura da epiderme avaliada em imagens coradas com HE (B). Análise das células da epiderme imunopositivas para PCNA, em marrom, e contracoradas com hematoxilina (C). Barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo veículo; # P <0,001 quando comparado com o grupo naive, não tratado.



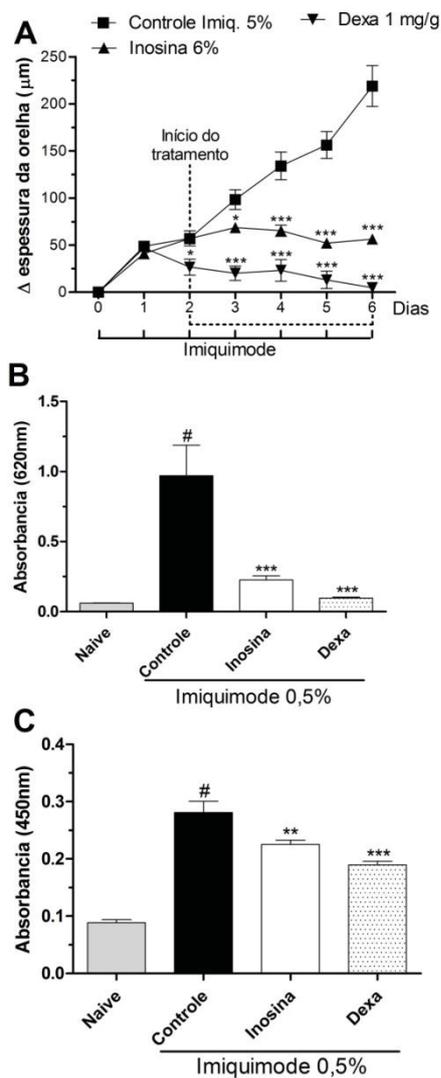
**Fig. 10:** Imagens representativas da análise histológica de lâminas coradas com hematoxilina-eosina no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton. As amostras foram colhidas no nono dia de experimento e processadas de acordo com o procedimento de histologia para coloração de hematoxilina-eosina. A coluna da esquerda contém imagens representativas da espessura das orelhas (aumento de 20X / escala de 200 $\mu$ m) A coluna da direita possui imagens representativas da análise de celularidade na derme (aumento de 40X / escala 50 $\mu$ m). As linhas representam os grupos: naive (não tratado), controle (óleo de cróton: 0,4 mg/orelha), veículo (Tween 80: 0,5%), Inosina (0,6 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha).



**Fig. 11:** Figura com imagens representativas da análise de proliferação da epiderme. As amostras foram colhidas no nono dia de experimento e processadas de acordo com o procedimento de histologia para coloração de hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para PCNA. Fotos foram tiradas a partir de slides (aumento de 40x / escala 50 $\mu$ m) e analisadas. Na coluna da esquerda são representados queratinócitos imunopositivos para PCNA, em marrom. Na coluna da direita é representada a espessura epiderme coradas com HE. As linhas representam os grupos: naive (não tratado), controle (óleo de cróton: 0,4 mg/orelha); veículo (tween 80: 0,5%); Inosine (0,6 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha).

### 5.3 CONSEQUÊNCIA DA INOSINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA DA PELE CAUSADA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE IMIQUIMODE

Ao final do sexto dia de experimento o grupo controle, que recebeu imiquimode, apresentou edema (Fig. 12A) e lesões visíveis na orelha tratada. Ao contrário, o grupo tratado com inosina apresentava menos edema em comparação com o controle, sendo esta diminuição de  $77 \pm 3\%$  no último dia de experimento. O grupo tratado com dexametasona apresentou redução de  $98 \pm 3\%$  no edema quando comparado ao grupo controle. Quando submetidas à análise das enzimas MPO e NAG, as amostras do grupo que recebeu tratamento com inosina revelaram inibição de  $76 \pm 3\%$  e  $19 \pm 2\%$  (Fig. 12B e C), respectivamente. Já os grupos tratados com dexametasona apresentaram inibição de  $90 \pm 0,7\%$  e  $67 \pm 2\%$ , respectivamente para MPO e NAG, quando comparados ao controle.



**Fig. 12:** Efeito tópico da inosina no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de imiquimode, e atividade das enzimas MPO e NAG. O imiquimode foi aplicado durante seis dias (pontos quadrados/linha inferior). Os tratamentos com inosina 6% (10 mg/orelha) (pontos triangulares) e dexa 1mg/g (10 mg/orelha) (pontos triângulos invertidos), começaram no segundo dia de experimento, duas vezes por dia (linha tracejada). A espessura da orelha foi medida diariamente (A). No último dia de experimento as amostras da orelha foram coletadas e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante foram realizados os ensaios para as atividades enzimáticas da MPO (B) e NAG (C). Linhas (A) e barras (B e C) representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6-8$ ). Símbolos indicam os níveis de significância para: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo controle; #  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo naive, não tratado.

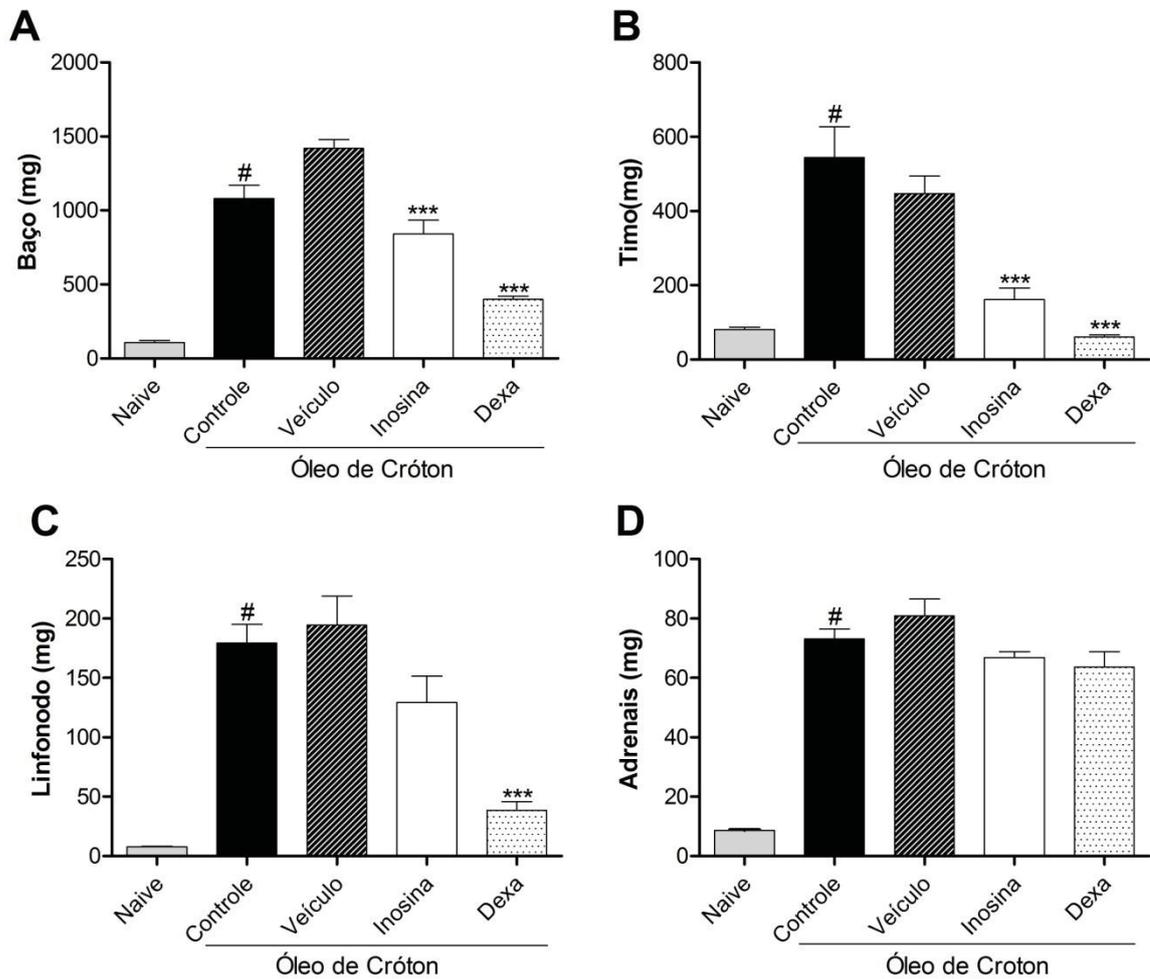
## 5.4 ESTUDO DOS EFEITOS ADVERSOS SISTÊMICOS DA APLICAÇÃO TÓPICA DE INOSINA

### 5.4.1 Análise ponderada dos órgãos linfóides e adrenais no modelo do óleo de cróton

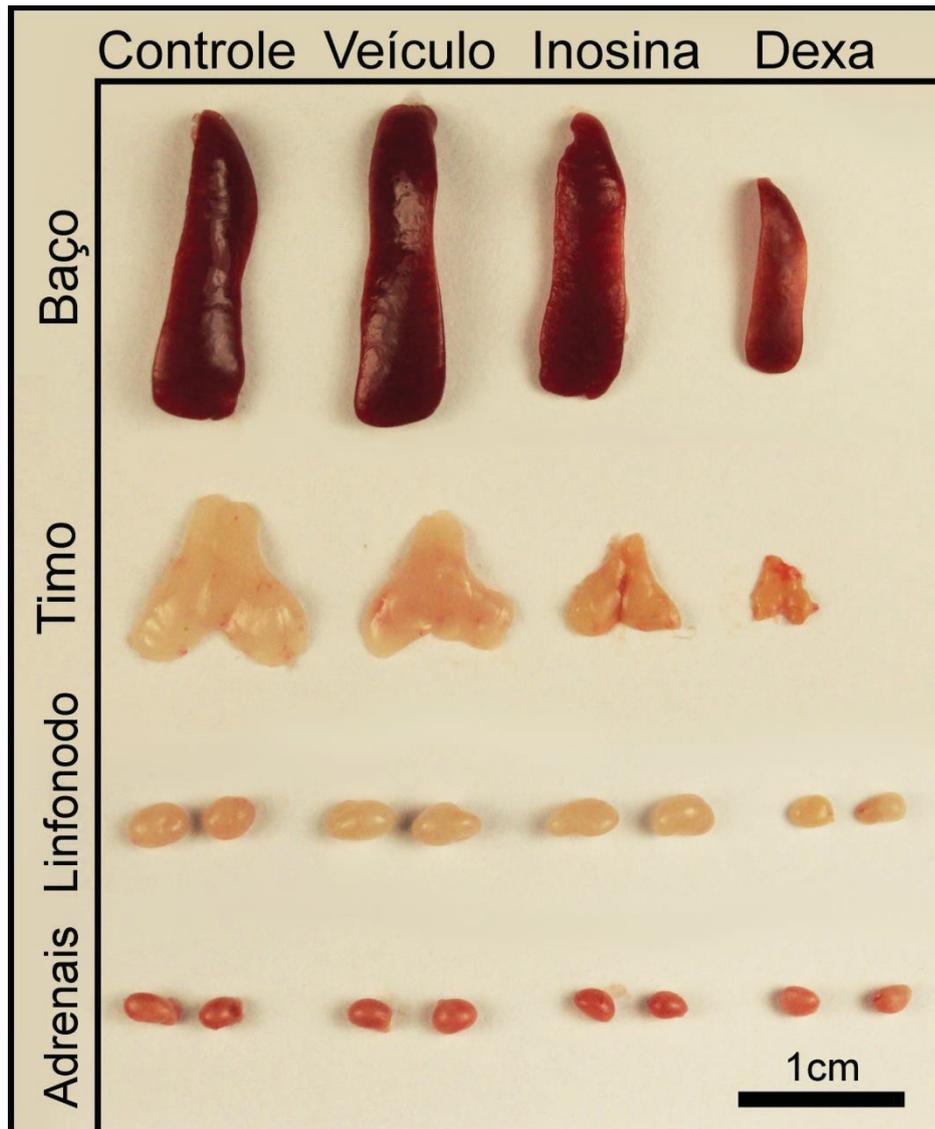
Os órgãos linfóides e adrenais coletados para a análise ponderada demonstraram que ocorreu importante redução do peso úmido do baço em  $40 \pm 11\%$  e do timo em  $64 \pm 19\%$  no grupo tratado com inosina (0,6 mg/orelha, 5 dias, duas vezes ao dia), em relação ao grupo veículo (Fig. 13A e B). Entretanto, esta redução no peso no grupo inosina não foi observada para os linfonodos e glândulas adrenais (Fig. 13C e D). Adicionalmente, os órgãos baço, timo e linfonodos tratados com dexametasona apresentaram diferença de  $71 \pm 5\%$ ,  $86 \pm 9\%$  e  $80 \pm 18\%$  respectivamente, quando comparados ao veículo, diferença não observada para as adrenais (Fig. 13). Estes efeitos estão apresentados na forma de fotos representativas dos tecidos na figura 14.

### 5.4.2 Análise ponderada dos órgãos linfóides e adrenais no modelo de imiquimode

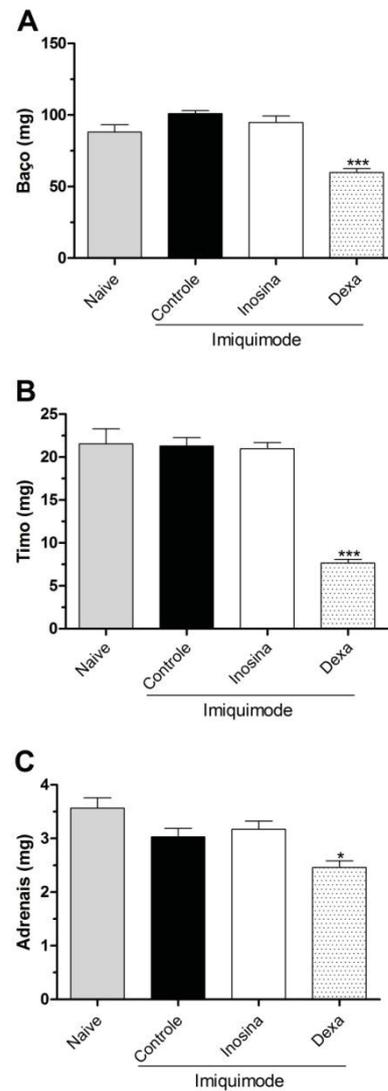
Como mostrado na figura 12, o peso úmido do baço, timo e adrenais não apresentaram diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com inosina. Diferentemente, os tecidos do grupo que recebeu tratamento com dexametasona tiveram redução significativa no peso em  $41 \pm 3\%$  para o baço,  $62 \pm 2\%$  para o timo e  $19 \pm 4\%$  para as adrenais (Fig. 15).



**Figura 13:** Análise do efeito da inosine sobre alterações no peso de órgãos linfóides no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton. Os órgãos foram coletados no nono dia de experimento, lavados em soro fisiológico e pesados. Peso do baço em (mg)(A). Peso do timo em (mg)(B). Peso dos linfonodos auriculares em (mg)(C). Peso das adrenais em (mg)(D). Barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo de veículo, # P <0,001 quando comparado ao grupo naive, não tratado.



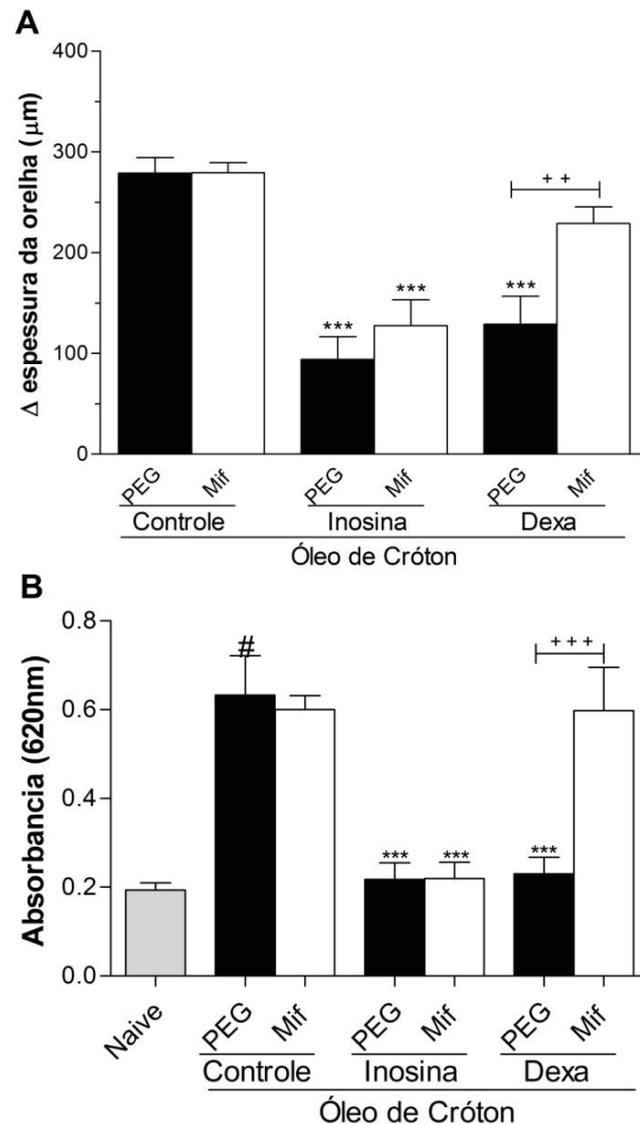
**Figura 14:** Figura com imagens representativas da análise do efeito da inosine sobre alterações histopatológicas em órgãos linfoides e adrenais no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de óleo de cróton. Os órgãos foram coletados no nono dia de experimento, lavadas em soro fisiológico e fotografados. Câmera Sony DSC 5950 (zoom 2.5x / escala 1cm). Nas colunas estão representados os grupos controle, veículo, inosina e dexa respectivamente. Nas linhas estão representados os órgãos: baço, timo, linfonodos auriculares e adrenais.



**Figura 15:** Análise do efeito da inosine sobre alterações no peso em órgãos linfóides no modelo de indução de inflamação crônica mediado por aplicações múltiplas de imiquimode. Os órgãos foram coletados no sexto dia de experimento, lavados em soro fisiológico e pesados. Peso do baço em (mg)(A). Peso do timo em (mg)(B). Peso das adrenais em (mg)(C). Barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Os símbolos indicam os níveis de significância para: \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001 quando comparado com o grupo de veículo.

## 5.5 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES PARA GLICOCORTICÓIDES NO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA INOSINA

Para este estudo o modelo escolhido foi o modelo de inflamação aguda pela aplicação única de óleo de cróton na orelha de camundongos. Na análise realizada para verificação da participação de receptores dos glicocorticoides na via de ação da inosina, constatamos que não houve diferença entre os grupos veículo PEG e mifepristona (RU 486, o antagonista dos receptores para glicocorticoides) mais óleo de cróton (Fig. 16A). Também observamos que os grupos tratados com inosina apresentaram redução do edema em  $66 \pm 23\%$  para o veículo PEG e  $54 \pm 20\%$  para o grupo que recebeu a mifepristona. O efeito inibitório da inosina também foi verificado quanto a atividade da MPO, calculando-se redução de  $63 \pm 17\%$  para o grupo PEG mais inosina e de  $63 \pm 16\%$  para mifepristona mais inosina (Fig. 16B). Entretanto, os grupos tratados com o controle positivo dexametasona, agonista dos receptores glicocorticoides, apresentaram alteração na formação do edema em  $53 \pm 21\%$  para o grupo PEG mais dexametasona, enquanto o tratamento com mifepristona apresentou reversão do efeito inibitório da dexametasona em  $43 \pm 7\%$  (Fig. 16A). Similarmente, o grupo que recebeu somente PEG mais dexametasona mostrou menos  $61 \pm 16\%$  na atividade da MPO e a reversão de  $38 \pm 16\%$  desse efeito da dexametasona foi observada para o grupo que recebeu mifepristona (Fig. 16B).



**Fig. 16:** Análise do efeito da inosina na inflamação aguda induzida por óleo de cróton na presença do antagonista de receptores para glicocorticóides mifepristona (RU486). A formação do edema foi medida 6 horas após a indução (A). Foram recolhidas amostras da orelha 24 h após o desafio e homogeneizadas em HTAB. A partir do sobrenadante o ensaio de atividade enzimática para MPO a foi realizado (B). Os grupos tratados com o antagonista mifepristona (MIF) (50 mg/kg), e seu veículo, polietileno-glicol (PEG) na concentração (1-1), foram aplicados intra-peritoneal, 30 minutos antes do procedimento de indução do edema no modelo de inflamação aguda induzido por óleo de cróton. O grupo naive não recebeu tratamento. O grupo controle recebeu apenas a acetona e o agente flogístico (óleo de cróton 0,4 mg/orelha) para a indução da inflamação. O tratamento com inosina na dose de (0,6 mg/orelha) e dexa (0,05 mg/orelha) foram aplicados logo após o desafio. Barras representam a média  $\pm$  EPM para (n = 6-8). Símbolos indicam os níveis de significância para: \*\*\* P <0,001 quando comparado com o grupo controle; + + P <0,01; + + + P <0,001, quando comparado com o grupo tratado com o veículo PEG; # P <0,001 quando comparado ao grupo naive, não tratado.

## 6.0 DISCUSSÃO

### 6.1 OS MODELOS EXPERIMENTAIS

Apresentamos aqui os efeitos da inosina administrada topicamente em orelhas de camundongos e no contexto das desregulações fisiológicas cutâneas, o edema de orelha induzido por óleo de cróton é um modelo bem conhecido de respostas inflamatórias da pele, e pode ajudar a elucidar o papel da inosina neste tecido durante o processo de inflamação (De Young *et al.*, 1989a; Gábor, 2003). O óleo de cróton é extraído a partir da planta *Croton Croton tiglium* L. pertencente a família das *Euphorbiaceae* e é um agente flogístico que provoca irritação e efeito vesiculante na pele. O efeito do óleo de cróton é devido aos seus ésteres de forbol, sendo 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) o que possui maior concentração. Topicamente o óleo de cróton induz uma resposta inflamatória aguda sinalizada por rubor, calor, dor e extravasamento plasmático, levando à formação de edema e caracterizando os sinais cardinais da inflamação. Além disso, promove a infiltração de leucócitos polimorfonucleares para os tecidos da pele. O TPA, entre outros ésteres de forbol, desencadeia a ativação da proteína quinase C (PKC), que é responsável por uma série de eventos celulares que conduzem à inflamação. A PKC ativada aumenta os níveis de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), o que resulta em aumento de ácido araquidônico e da concentração de seus metabólitos, tais como prostaglandinas e leucotrienos. Em conjunto a PKC induz a produção e liberação de mediadores imunes, como quimiocinas e citocinas, que desempenham um papel importante no aumento e na manutenção da inflamação (de Bernardis *et al.*, 1994; Murakawa *et al.*, 2006). Devido a estes fatores o modelo do óleo de cróton representa vários eventos presentes em doenças de pele diferentes, como a dermatite.

Em conjunto com os dados apresentados para os tratamentos com inosina no modelo anterior utilizamos também o modelo de edema de orelha crônico induzido por imiquimode. O imiquimode é uma imidazolina que possui potente atividade imunomodulatória, e é descrito clinicamente para tratamento de verrugas provocadas por papiloma vírus, assim como lesões pré-cancerígenas. Curiosamente o imiquimode promove em pacientes psoriáticos o retorno de lesões em remissão e o surgimento de lesões em pele saudável. O imiquimode possui a capacidade de

ativar os receptores TLR7 e TLR8, principalmente de células dendríticas, macrófagos e monócitos, mas também de queratinócitos. A ativação destes receptores promove a liberação de várias citocinas, entre elas IFN- $\alpha$ , promovendo a infiltração de células do sistema imune e ativação de linfócitos Th1 (van der Fits *et al.*, 2009). A combinação destes fatores promove no modelo de inflamação crônica induzida por imiquimode um quadro semelhante ao observado em pacientes com psoríase, se tornando a mais moderna ferramenta experimental para estudo da doença.

É importante notarmos que nestes modelos a administração tópica é suscetível da interferência do comportamento de limpeza dos animais. O *grooming* facial é um comportamento de limpeza que envolve a higiene da orelha pelos camundongos (Sachs, 1988). Durante o *grooming* esses animais podem eventualmente retirar o tratamento da orelha e levá-lo a boca, uma vez que lambe as patas é o comportamento comum. No modelo de indução por óleo de cróton, para evitar que o tratamento seja retirado pelos animais, a dissolução das drogas utilizadas é realizada em acetona. A acetona é utilizada devido sua rápida volatilização e baixa viscosidade, proporcionando uma rápida distribuição por toda superfície da orelha. A inosina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) apresenta-se como um pó cristalino de hidrossolubilidade indeterminada. Na dose utilizada na maioria dos experimentos aqui descritos (0,6 mg/orelha) a inosina apresenta-se pouco diluída em acetona. A sua administração promove a formação de precipitado sobre a orelha dos camundongos. Uma vez que a inosina não foi completamente diluída existe a possibilidade do tratamento ter sido removido, pelo menos em parte, causando uma menor disponibilidade de inosina por via tópica, e casualmente absorção também por via oral.

Diferentemente do modelo de óleo de cróton, no modelo de indução do edema por imiquimode, a inosina foi administrada em creme (propilenoglicol 10%/ Creme não iônico), uma vez que o imiquimode foi utilizado a partir de sua formulação comercial disponível, em creme. A inosina apresentou fácil solubilidade em propileno glicol, proporcionando a criação de um creme de grande estabilidade. A administração com o auxílio de uma espátula foi realizada através de movimentos circulares na orelha até a absorção dos 10 mg/orelha do creme. Esse procedimento

diminui de forma considerável as chances de remoção do tratamento, em relação ao modelo de indução por óleo de cróton.

Os modelos experimentais do óleo de cróton e do imiquimode promovem a quimiotaxia de leucócitos para o tecido, sendo a migração de células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (monócitos) passível de quantificação. A infiltração de células inflamatórias como neutrófilos, no modelo agudo, pode ser inferida e indiretamente quantificada neste modelo através da medida da atividade da enzima MPO. A MPO é uma enzima altamente expressa nos lisossomos dos granulócitos, podendo ser quantificada em um ensaio colorimétrico (Marquez *et al.*, 1990). Assim como a MPO é expressa nos neutrófilos, a enzima NAG é expressa nos lisossomos de linfócitos mononucleares, como macrófagos e neutrófilos. Da mesma forma, a atividade enzimática da NAG, pode ser quantificada colorimetricamente e de forma indireta, a presença de infiltrado celular aferida (Dean *et al.*, 1979; Sánchez *et al.*, 1999).

A avaliação das atividades das respectivas enzimas torna-se dessa forma uma ferramenta experimental útil a ser adicionada à análise do edema. Ainda, uma vez que a diminuição da atividade destas enzimas é somente uma forma indireta de avaliação, podemos complementar essas análises ao realizamos a análise histológica de celularidade na derme, refinando mais nossas análises. Através da contagem dos núcleos corados, com hematoxilina e eosina neste tecido, fomos capazes de observar alterações no número de células nos grupos tratados com inosina que corroboraram os resultados observados para edema e atividade das enzimas MPO e NAG (Mendes *et al.*, 2012).

Os efeitos observados nos modelos descritos até o momento são respostas fisiológicas dos tecidos cutâneos reguladas por uma série de citocinas modulatórias da resposta inflamatória. O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton promove seus efeitos inflamatórios através da via da PKC, resultando na liberação de TNF- $\alpha$ . A liberação desta citocina por queratinócitos neste modelo foi atribuída à liberação de outras citocinas, entre elas a IL-1 $\beta$ . Cientes da participação destas nos efeitos observados, realizamos a análise das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , em Busca de um melhor entendimento das vias de ação da inosina (Murakawa *et al.*, 2006).

A análise histológica realizada neste estudo foi uma importante ferramenta experimental para comparação de resultados observados nos outros experimentos aqui descritos. A análise da celularidade na derme através da histologia por HE torna-se um parâmetro confiável se tomados alguns procedimentos de segurança padrão. Diferentemente de uma análise de neutrófilos ou monócitos no sangue, onde seria possível, através da análise do formato do núcleo caracterizar cada célula, nos cortes de tecido os núcleos de fibroblastos, células residentes e linfócitos transitórios são igualmente corados e núcleos polimórficos são seccionados ao meio, sendo impossível sua identificação. Para minimização de erros, os cortes avaliados não são sequenciais, de forma a evitar que uma mesma célula seja contada duas vezes. A constatação através da análise histológica de diferença no número de células na região da derme, quando associado às análises enzimáticas, torna-se um dado passível de confiança. Utopicamente, nossos resultados seriam mais elegantes se possuíssemos ferramentas imunohistoquímicas para marcação de neutrófilos com Ly-6g, ou citometria de fluxo respectivamente (Cho *et al.*, 2012).

Diferentemente da celularidade na derme, nossas ferramentas experimentais nos possibilitaram observar de maneira mais precisa um dos principais parâmetros apresentados quando ocorre uma desregulação inflamatória cutânea: a hiperproliferação de queratinócitos. Nos modelos avaliados foi realizada a análise histológica da epiderme, através das técnicas de coloração por hematoxilina e eosina, além de imunohistoquímica para PCNA. A associação dos dados da análise da espessura da epiderme e celularidade de queratinócitos nos indicam que o tratamento com inosina, no edema crônico induzido por óleo de cróton, reduziu a proliferação dos queratinócitos.

Por fim, a análise ponderada dos órgãos linfoides e adrenais teve como propósito a avaliação de dois parâmetros, a toxicidade e absorção sistêmica. De maneira grosseira esses dados indicam que a inosina foi absorvida pela pele em níveis suficientes para produzir efeitos sobre órgãos do sistema imunológico, reduzindo seu peso. A análise destes parâmetros foi realizada nos modelos de edema crônico, porém para melhor comparação dos resultados seria necessário à realização de um experimento de atrofia cutânea (Schacke *et al.*, 2004).

## 6.2 POSSÍVEIS VIAS DE AÇÃO DA INOSINA

A Inosina é produzida em uma via de síntese em que o ATP ou IMP são convertidos em inosina por diversas enzimas. Uma vez que a inosina não seja desviada para uma via alternativa, ela é então degradada em, hipoxantina, pela ação de uma fosforilase de nucleosídeo de purina, e subsequente conversão em xantina e ácido úrico, pela enzima xantina oxidase (Hasko *et al.*, 2004). Tanto a inosina quanto a adenosina são enviados para o exterior da célula por um transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT1) através de difusão facilitada (Polosa, 2002; Ward *et al.*, 2000). Uma vez no ambiente extracelular, a inosina pode se ligar a receptores de adenosina classificados como P1 (A1, A2a, A2b, A3). Toda a família P1 de receptores é acoplada a proteína G, sendo A1 e A3 inibidores e A2a e A2b estimuladores da produção de AMPc. Recentemente a expressão dos receptores do sistema purinérgico na pele, foi revisada e os receptores A1, A2a e A2b foram clonados, mas o receptor A3 não apresentou expressão significativa. Estes receptores são encontrados em células endoteliais do sistema vascular cutâneo, além de células da derme e epiderme. O subtipo A2a é encontrado principalmente em fibroblastos e A2b principalmente em queratinócitos (Burnstock *et al.*, 2012). Em condições de estresse do tecido, tais como hipóxia e inflamação, a quantidade extracelular de purinas torna-se elevada. A taxa metabólica alta e aumento na demanda de energia promovem a clivagem de ATP e elevação das purinas adenosina e inosina, que se difundem através de seu transportador (Polosa, 2002). Entretanto, o seu metabolismo é rápido e em concentrações endógenas podem não afetar totalmente o desenvolvimento da inflamação (Mabley *et al.*, 2009).

Os mecanismos de ação da aplicação tópica de inosina na redução do edema de orelha parecem ser uma combinação de vias de ação ligeiramente relacionadas, que diferem quanto ao ponto de análise no decorrer da inflamação. O efeito mais clássico da inosina é o seu efeito citoprotetor. As primeiras observações indicavam que a inosina exógena era capaz de redirecionar o equilíbrio de citocinas para um perfil mais anti-inflamatório. Nessas investigações anteriores foi sugerido que a ação da inosina, pelo menos em parte, era através da ligação ao receptor A3 (Liaudet *et al.*, 2002). A Inosina exógena em concentrações acima das fisiológicas, em vários estados inflamatórios é atribuída à diminuição da produção de uma série de

citocinas pró-inflamatórias que incluem: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, MIP-1 $\alpha$  e IFN- $\delta$ , e aumento de IL-10, um mediador anti-inflamatório (Hasko *et al.*, 2000).

Existe uma miríade de modelos de inflamação em que a inosina exerce efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (Buckerley *et al.*, 2005; Garcia Soriano *et al.*, 2001; Liaudet, 2001; Liaudet *et al.*, 2002; Mabley *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2001) e *ex vivo* (Goldhaber *et al.*, 1982). Em adição a isso, ela também demonstrou efeito, ao diminuindo o perfil inflamatório de monócitos humanos, neutrófilos e células epiteliais, *in vitro* (Soriano *et al.*, 2001). Uma série de estudos indicou que os efeitos citoprotetores da inosina são mediados principalmente pelo receptor A3, e não os receptores A2a, e nenhuma evidência para efeitos de proteção através da ativação do receptor A2b foi observada (Modis *et al.*, 2009). Recentemente, contrariando esses estudos prévios, novos resultados indicaram que a inosina suprimiu a síntese de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos, linfócitos e principalmente, apresentou efeitos inibitórios sobre neutrófilos, mediados por ativação dos receptores A2a (Frasson *et al.*, 2012). Os modelos que descrevem essas ações mediadas por receptores distintos, são diferentes, de tal forma que podemos supor que a diferença na expressão dos receptores promova resultados antagônicos interteciduais (Burnstock *et al.*, 2012). Como anteriormente descrito, os receptores A3 não possuem grande expressão na pele, de forma que esta situação também pode estar ocorrendo no efeito da inosina sobre a inflamação da pele aguda induzida pelo óleo de cróton. Visto que em nos nossos dados, na inflamação cutânea aguda, a inosina mostrou redução de parâmetros da inflamação através da ativação de receptores A2a, promovendo a redução do edema e da migração de leucócitos, possivelmente através da redução da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esses efeitos foram revertidos pelo antagonista do receptor A2a, ZM241385, demonstrando que estes receptores purinérgicos também estão envolvidos nas respostas anti-inflamatórias que avaliamos na pele.

Outra via descrita, pode estar somando seus efeitos, ao efeito anti-inflamatório aqui visto. A inosina exógena pode estar relacionada com a restauração dos níveis de ATP em condições anóxicas (Veres *et al.*, 2010). Em estudo *in vitro*, a inosina mostrou um efeito protetor contra a depleção de oxigênio e glicose, que foi revertida por antagonistas dos receptores A2a e principalmente A3, CSC e MRS 1523, respectivamente, embora o agonista do receptor A3, IB-MECA, não exerceu o

mesmo efeito. Essa observação sugere que a inosina pode promover citoproteção contra hipoxia por uma via complementar ou independente de receptores P1 (Modis *et al.*, 2009). De acordo com Gavard *et al.* (2006), na ocasião de inflamação da pele, ocorre vasodilatação, reduzindo significativamente o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular aumenta, permitindo extravasamento de plasma para o tecido, produzindo, por conseguinte, no local da inflamação uma condição de hipoxia. Quando a hipoxia persiste, em conjunto com a taxa metabólica elevada, pode ocasionar em depleção grave na síntese de ATP (Shafy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) promovendo a indução de apoptose e, juntamente com as células necróticas, causar a liberação de DAMPS e ativar receptores TLR, em conjunto levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação da quinase N-terminal c-jun (JKN), quinase ativada por proteína-mitógeno (MAPK), quinase extracelular regulada por sinal (ERK), e em síntese, a produção de citocinas e quimioatratores, amplificando e mantendo a inflamação (Mkaddem *et al.*, 2010).

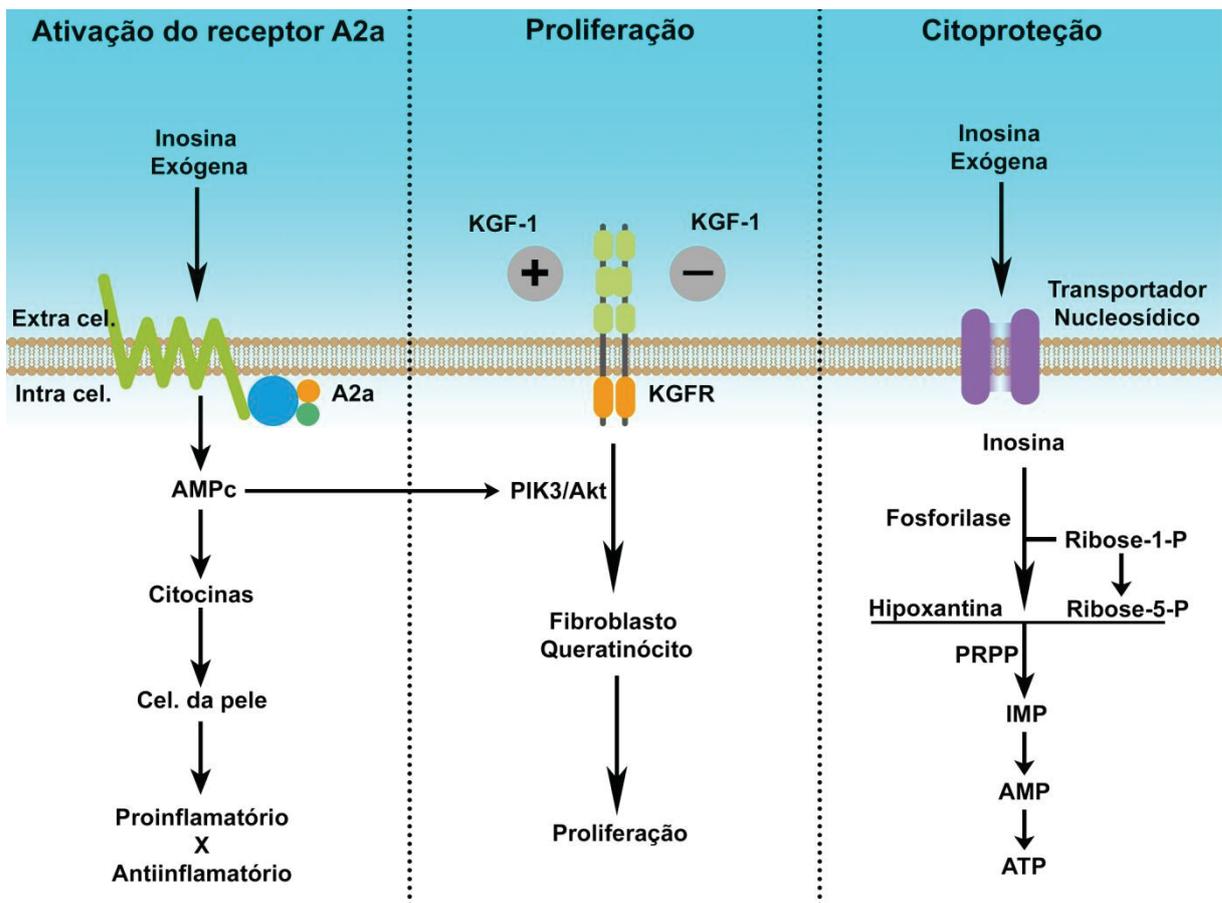


Fig 17. Vias de ação hipotéticas para o tratamento com inosina exógena.

Ao reverter o quadro de inflamação induzido por hipóxia, algumas evidências sugerem que a inosina é um substrato fosforilado para a produção glicolítica do ATP (Jurkowitz *et al.*, 1998). A porção ribose fosforilada da inosina, poderia ser utilizada para a reposição de energia através do processo de glicólise anaeróbia, como uma alternativa da utilização de glicose. O ATP pode ser gerado através da via da hipoxantina-IMP-AMP. Em pH 7.4 a ribose-1-fosfato, é convertida a ribose-5-fostato pela via anaeróbia das pentoses, reconstruindo o ciclo de síntese dos nucleosídeos de purinas. Trabalhando em conjunto com esta via, a hipoxantina é refosforilada em inosina monofosfato pela enzima fosforribosil pirofosfato (PRPP) e a IMP disponível pode então ser convertida a AMP (Shafy *et al.*, 2012).

Quando analisamos pontualmente os parâmetros da inflamação nos modelos de inflamação crônica por óleo de cróton e por imiquimode, observamos que os efeitos mediados pelo tratamento com a inosina se tornam ainda mais eficazes. Em todos os modelos testados, a inosina foi capaz de inibir mais de 50% do edema, agindo na prevenção (modelo agudo) e na cura, mesmo depois de estabelecido o processo inflamatório (modelos crônicos). Podemos ver a complementação desses efeitos quando extrapolados para as análises da atividade da MPO e NAG, de forma que podemos sugerir que a redução nos níveis de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no modelo agudo, também persiste durante a estimulação crônica.

A aplicação múltipla de óleo de cróton e do imiquimode leva além da inflamação, a necrose da pele e formação de feridas (Burke *et al.*, 2001; van der Fits *et al.*, 2009). Mais uma vez, os nossos dados mostram que a aplicação local da inosina foi capaz de melhorar o aspecto geral da orelha depois de instalada a inflamação na pele, reduzindo a celularidade e hiperproliferação da epiderme. Embora a cicatrização de feridas não seja um parâmetro diretamente analisado por este modelo, estudos anteriores relataram que em camundongos nocaute para o receptor A2a submetidos ao modelo de lesão excisional na pele, ocorreu menor formação de tecido de granulação densa e vasos sanguíneos durante o processo de cicatrização (Montesinos, 2002). Além disso, o tratamento com agonista do receptor A2a, CGS21680, mostrou progresso da cicatrização de feridas, principalmente por aumento da formação de tecido de granulação, densidade vascular arterial, infiltração de fibroblastos, densidade da matriz, e da re-epitelização em

camundongos selvagem, mas não teve qualquer efeito nos nocautes para A2a (Cronstein, 2006).

Algumas citocinas liberadas em situação de estresse inflamatório como a IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, são potentes mitógenas e sinalizadoras de síntese de lipídeos da camada córnea, sendo importantes para o início do reparo de lesões. O aumento agudo destas citocinas durante o processo de cicatrização é de fundamental importância durante um processo inflamatório controlado, como demonstrado em nocautes para os receptores destas citocinas (Jensen *et al.*, 1999). Entretanto, quando ocorre uma elevação crônica da concentração destas citocinas, efeitos nocivos do processo inflamatório e hiperproliferação levam a desregulação das funções da pele (Proksch *et al.*, 2008). Nos modelos crônicos a inosina pode estar atuando através da modulação destas citocinas, como observamos na quantificação de citocinas no modelo de inflamação aguda.

Além destas citocinas, o fator de crescimento de queratinócitos-1 (KGF-1) é liberado por fibroblastos. *In vitro*, a liberação de KGF-1 por fibroblastos é estimulada por IL-1. Paralelamente o estímulo de queratinócitos por KGF-1 induz a liberação de IL-1 $\alpha$ , sugerindo assim que existe um loop parácrino que promove a regulação da proliferação de queratinócitos (Sorrell *et al.*, 2004). Fortalecendo ainda mais essa hipótese, apenas queratinócitos expressam o receptor do fator de crescimento de queratinócitos (KGFR). Além disso, fibroblastos expressam o receptor A2a, que quando ativado estimula a atividade da adenilato ciclase, promovendo modulação da via da fosfatidilinositideo 3-quinase (PI3K)-Akt também conhecida como proteína quinase B (Ahmad *et al.*, 2013). Belleudi *et al.* (2011) demonstraram recentemente que o aumento da atividade da PI3K/Akt regula a afinidade do KGFR ao seu ligante. Quando analisadas em conjunto essas hipóteses sugerem que o receptor A2a pode desempenhar um importante papel não só sobre a liberação de citocinas inflamatórias, mas também na modulação sobre os queratinócitos hiperproliferativos.

É importante notarmos que a farmacocinética da inosina administrada topicamente tanto em acetona quanto em creme (creme não iônico/propilenoglicol 10%) não foi determinada e pode ter repercussão importante no efeito final, em termos de penetração ou absorção sistêmica, na taxa de eliminação e também quando a barreira da pele é danificada durante o processo inflamatório induzido.

Nossos resultados revelaram de forma inesperada a redução do peso dos órgãos linfoides, baço e timo, no modelo de edema crônico induzido por óleo de cróton. De forma indireta pudemos observar um nível de absorção sistêmica, o que era inesperado devido a rápida degradação da inosina no plasma pelas 5'NTs e fosfatases alcalinas solúveis (Pettengill *et al.*, 2013). Esses resultados, entretanto, sugerem um efeito menor na redução dos órgãos, que o observado para a dexametasona. Levando isto em conta podemos sugerir que estes resultados sejam positivos, uma vez que os efeitos adversos causados pela atrofia destes órgãos seja menor, quando o tratamento é realizado com inosina. Para refinarmos mais esta análise, a utilização da razão entre o peso dos órgãos e de cada animal seria uma ferramenta interessante, pois possibilitaria diminuir a variação gerada pelos diferentes tamanhos dos animais e/ou a hiperplasia provocada pela indução da inflamação.

De forma congruente os dados obtidos com a análise ponderada do modelo induzido por imiquimode não apresentaram redução do peso dos órgãos analisados. Como era previsto também demonstramos que a ação sobre os órgãos linfoides não envolve a participação de receptores de glicocorticoides (Pinto *et al.*, 2010). Portanto, esses resultados podem diferir devido à ativação de uma resposta imunológica mais mieloide, e inata, no modelo induzido por óleo de cróton, e uma resposta mais linfóide ou adaptativa no modelo induzido por imiquimode. Esses dados mostraram que aplicações repetidas de inosina provocam um efeito anti-inflamatório local, entre tanto interferem com outros tecidos, com menor potência e eficácia do que acontece pelo tratamento com glicocorticoides, como a droga utilizada como controle dexametasona (Schacke *et al.*, 2004).

## 7.0 CONCLUSÃO

A maioria das doenças da pele é causada por desregulação do sistema imune ou devido uma lesão que age como gatilho em doenças tais como psoríase (Perera *et al.*, 2012), dermatite (Kasraie *et al.*, 2013) e vitiligo (Djordjic *et al.*, 2012). Estas doenças são crônicas e com poucas opções de tratamento eficaz e seguro. Casos de queimaduras, traumas, feridas, infecções ou substâncias tóxicas também podem produzir uma resposta inflamatória persistente (Nestle *et al.*, 2009a). Ao considerarmos a associação dos modelos utilizados neste estudo, podemos extrapolar os nossos resultados para essas desregulações cutâneas. Sintetizando todos os parâmetros da inflamação avaliados por esses modelos, podemos afirmar que os nossos resultados foram capazes de demonstrar que a inosina mediou redução de todos esses parâmetros em algum nível. Tais resultados abrem uma premissa para utilização da inosina, ou agonistas do receptor A2a, no tratamento de doenças de pele, semelhantes à dermatite e psoríase. Até o momento, se a inosina é transportada para o interior da célula e conduzida a outras vias não descritas, que produzam seus efeitos, ou interage com receptores diferentes, permanece apenas uma hipótese e deve ser vista com atenção, para total entendimento de seu papel na homeostase da pele. Nossos resultados acrescentam à literatura informações importantes, uma vez que dados de avaliação da inosina administrada topicamente *in vivo*, se não inexistentes, são escassos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad A, Schaack JB, White CW, Ahmad S (2013). Adenosine A2A receptor-dependent proliferation of pulmonary endothelial cells is mediated through calcium mobilization, PI3-kinase and ERK1/2 pathways. *Biochemical and biophysical research communications* **434**(3): 566-571.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Da Settimo F, Natale G, *et al.* (2007). Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **322**(2): 435-442.
- Belleudi F, Purpura V, Torrisi MR (2011). The Receptor Tyrosine Kinase FGFR2b/KGFR Controls Early Differentiation of Human Keratinocytes. *PloS one* **6**(9): e24194.
- Bevan MJ (2011). Memory T cells as an occupying force. *European journal of immunology* **41**(5): 1192-1195.
- Boulais N, Misery L (2008). The epidermis: a sensory tissue. *European journal of dermatology : EJD* **18**(2): 119-127.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology* **78**(3): 206-209.
- Bragulla HH, Homberger DG (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy* **214**(4): 516-559.
- Buckerley S, Barsky K, Weinberg K, Warburton D (2005). In vivo inosine protects alveolar epithelial type 2 cells against hyperoxia-induced DNA damage through MAP kinase signaling. *American Journal Of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **228**: 569-575.
- Burke JR, Davern LB, Stanley PL, Gregor KR, Banville J, Remillard R, *et al.* (2001). BMS-229724 is a tight-binding inhibitor of cytosolic phospholipase A2 that acts at the lipid-water interface and possesses anti-inflammatory activity in skin inflammation models. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **298**(1): 376-385.
- Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews* **24**(3): 509-581.
- Burnstock G, Kennedy C (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General pharmacology* **16**(5): 433-440.
- Burnstock G, Knight GE, Greig AV (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *The Journal of investigative dermatology* **132**(3 Pt 1): 526-546.

Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, *et al.* (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* **35**(4): 596-610.

Chang T, Sun L, Wang Y, Wang D, Li W, Li C, *et al.* (2011). Inhibition of keratin 17 expression with antisense and RNAi strategies: exploring novel therapy for psoriasis. *Experimental dermatology* **20**(7): 555-560.

Cho JS, Guo Y, Ramos RI, Hebroni F, Plaisier SB, Xuan C, *et al.* (2012). Neutrophil-derived IL-1beta is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS pathogens* **8**(11): e1003047.

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, *et al.* (2007). Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **20**(2): 120-127.

Clark RA (2010). Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *The Journal of investigative dermatology* **130**(2): 362-370.

Cronstein BM (2006). Adenosine receptors and wound healing, revised. *TheScientificWorldJournal* **6**: 984-991.

da Rocha Lapa F, da Silva MD, de Almeida Cabrini D, Santos AR (2012). Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A(2) receptors. *Purinergic signalling*.

De Benedetti F (1960). [Inosine in the therapy of heart diseases]. *La Riforma medica* **74**: 827-832.

de Bernardis E, Leonardi G, Caruso A, Cutuli VM, Amico-Roxas M (1994). Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. *Agents Actions* **42**(1-2): 29-33.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989a). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **26**(3-4): 335-341.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989b). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **26**(3-4): 335-341.

Dean RT, Hylton W, Allison AC (1979). Lysosomal enzyme secretion by macrophages during intracellular storage of particles. *Biochimica et biophysica acta* **584**(1): 57-65.

Djordjic M, Matic IZ, Filipovic-Ljeskovic I, Dzodic R, Sasic M, Eric-Nikolic A, *et al.* (2012). Immunity to melanin and to tyrosinase in melanoma patients, and in people with vitiligo. *BMC complementary and alternative medicine* **12**(1): 109.

Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology* **68**(3): 213-237.

Einspahr JG, Xu MJ, Warneke J, Saboda K, Ranger-Moore J, Bozzo P, *et al.* (2006). Reproducibility and expression of skin biomarkers in sun-damaged skin and actinic keratoses. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**(10): 1841-1848.

El-Hashim AZ, Abduo HT, Rachid OM, Luqmani YA, Al Ayadhy BY, Alkhaledi GM (2009). Intranasal administration of NECA can induce both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects in BALB/c mice: evidence for A<sub>2A</sub> receptor sub-type mediation of NECA-induced anti-inflammatory effects. *Pulm Pharmacol Ther* **22**(3): 243-252.

Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, *et al.* (2006). Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* **108**(5): 1602-1610.

Frasson AP, De Carli GA, Bonan CD, Tasca T (2012). Involvement of purinergic signaling on nitric oxide production by neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Purinergic signalling* **8**(1): 1-9.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews* **63**(1): 1-34.

Fuiano N, Incorvaia C (2012). Dissecting the causes of atopic dermatitis in children: less foods, more mites. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* **61**(2): 231-243.

Gábor M (2003). Models of Acute Inflammation in the Ear. *Methods in molecular biology* **225**: 129-137.

Garcia Soriano F, Liadet L, Marton A, Hasko G, Batista Lorigados C, Deitch EA, *et al.* (2001). Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care Med* **29**(4): 703-708.

Gavard J, Gutkind JS (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* **8**(11): 1223-1234.

Glassman SJ (2011). Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. *Clin Sci (Lond)* **120**(3): 99-120.

Goldhaber SZ, Pohost GM, Kloner RA, Andrews E, Newell JB, Ingwall JS (1982). Inosine: a protective agent in an organ culture model of myocardial ischemia. *Circulation Research* **51**(2): 181-188.

Gomez G, Sitkovsky MV (2003). Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood* **102**(13): 4472-4478.

Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, *et al.* (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **324**(5931): 1190-1192.

Hasko G, Kuhel DG (2000). Inosine Inhibits Inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *The Journal of Immunology* **164**: 1013-1019.

Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **7**(9): 759-770.

Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C (1998). An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol* **358**(3): 261-268.

Hasko G, Sitkovsky MV, Szabo C (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends in pharmacological sciences* **25**(3): 152-157.

Havran WL, Jameson JM (2010). Epidermal T cells and wound healing. *J Immunol* **184**(10): 5423-5428.

Hecker E, Schmidt R (1974). Phorbol esters--the irritants and cocarcinogens of *Croton Tiglium* L. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe = Progress in the chemistry of organic natural products. Progres dans la chimie des substances organiques naturelles* **31**(0): 377-467.

Hiramatsu Y, Takahashi H, Izumi A (1971). Effect of inosine on adrenaline and vasopressin induced myocardial hypoxia. *Japanese journal of pharmacology* **21**(3): 355-360.

Iwai I, Han H, den Hollander L, Svensson S, Ofverstedt LG, Anwar J, *et al.* (2012). The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *The Journal of investigative dermatology* **132**(9): 2215-2225.

Jensen JM, Schutze S, Forl M, Kronke M, Proksch E (1999). Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *The Journal of clinical investigation* **104**(12): 1761-1770.

Jurkowitz MS, Litsky ML, Browning MJ, Hohl CM (1998). Adenosine, Inosine, and Guanosine Protect Glial Cells During Glucose Deprivation and Mitochondrial Inhibition: Correlation Between Protection and ATP Preservation. *Journal of Neurochemistry* **71**(2): 535-548.

Kanitakis J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD* **12**(4): 390-399; quiz 400-391.

Kasraie S, Werfel T (2013). Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators of inflammation* **2013**: 942375.

Kleinzeller A (1942). Adenosine- and inosine-nucleotides in the phosphorus metabolism of muscle. *The Biochemical journal* **36**(10-12): 729-736.

Kumar V, Sharma A (2009). Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* **616**(1-3): 7-15.

Law WR (2006). Adenosine receptors in the response to sepsis: what do receptor-specific knockouts tell us? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**(4): R957-958.

Liaudet L (2001). Inosine Reduces Systemic Inflammation and Improves Survival in Septic Shock Induced by Cecal Ligation and Puncture. *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**.

Liaudet L, Mabley JG (2002). Inosine Exerts a Broad Range of Antiinflammatory Effects in a Murine Model of Acute lung Injury. *Annals of Surgery* **235**(4): 568-578.

Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Hasko G, Marton A, *et al.* (2003). Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **284**(1): G138-144.

Mabley JG, Pacher P, Murthy KG, Williams W, Southan GJ, Salzman AL, *et al.* (2009). The novel inosine analogue INO-2002 exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. *Shock* **32**(3): 258-262.

Macleod AS, Havran WL (2011). Functions of skin-resident gammadelta T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**(14): 2399-2408.

Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H (1990). Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *The Journal of biological chemistry* **265**(10): 5666-5670.

Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, Smyk DS, Spyrou V, Sakkas LI, *et al.* (2013). p38 MAPK Signaling in Pemphigus: Implications for Skin Autoimmunity. *Autoimmune diseases* **2013**: 728529.

Mendes DA, Horinouchi CD, Prudente Ada S, Soley Bda S, Assreuy J, Otuki MF, *et al.* (2012). In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. *Eur J Pharmacol* **687**(1-3): 1-8.

Merad M, Ginhoux F, Collin M (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* **8**(12): 935-947.

Mkaddem SB, Bens M, Vandewalle A (2010). Differential activation of Toll-like receptor-mediated apoptosis induced by hypoxia. *Oncotarget* **1**(8): 741-750.

Modis K, Gero D, Nagy N, Szoleczky P, Toth ZD, Szabo C (2009). Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. *British journal of pharmacology* **158**(6): 1565-1578.

Montesinos MC (2002). Adenosine Promotes Wound Healing and Mediates Angiogenesis in Response to Tissue Injury Via Occupancy of A2a Receptors. *American Journal Of Pathology* **160**(6): 2009-2015.

Montesinos MC, Gadangi P, Longaker M, Sung J, Levine J, Nilsen D, *et al.* (1997). Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. *J Exp Med* **186**(9): 1615-1620.

Munns AR, Tollin P (1970). The crystal and molecular structure of inosine. *Acta crystallographica. Section B: Structural crystallography and crystal chemistry* **26**(8): 1101-1113.

Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochemical pharmacology* **71**(9): 1331-1336.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ (2009a). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**(10): 679-691.

Nestle FO, Kaplan DH (2009b). Mechanisms of disease: Psoriasis. *The New England Journal of Medicine* **361**: 496-509.

Nguyen VT, Ndoeye A, Hall LL, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky AL, *et al.* (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of Cell Science* **114**(6): 1189-1204.

Oliver SJ, Mathew S, Wilder TF, Cronstein BN (2011). Restraint stress fails to modulate cutaneous hypersensitivity responses in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Purinergic signalling* **7**(1): 47-56.

Peiser M (2013). Role of Th17 Cells in Skin Inflammation of Allergic Contact Dermatitis. *Clinical & developmental immunology* **2013**: 261037.

Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO (2012). Psoriasis. *Annual review of pathology* **7**: 385-422.

Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millan JL, Usheva A, Bingham T, *et al.* (2013). Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *The Journal of biological chemistry*.

Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Szychala J, Boucher RC (2003). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *The Journal of biological chemistry* **278**(15): 13468-13479.

Pinto NB, Morais TC, Carvalho KMB, Silva CR, Andrade GM, Brito GAC, *et al.* (2010). Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine* **17**: 740–743.

Polosa R (2002). Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* **20**(2): 488-496.

Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* **17**(12): 1063-1072.

Quatresooz P, Hermanns-Le T, Pierard GE, Humbert P, Delvenne P, Pierard-Franchimont C (2012). Ustekinumab in psoriasis immunopathology with emphasis on the Th17-IL23 axis: a primer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**: 147413.

Rahimian R, Fakhfour G, Daneshmand A, Mohammadi H, Bahremand A, Rasouli MR, *et al.* (2010). Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* **649**(1-3): 376-381.

Rees JL, Harding RM (2012). Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics. *The Journal of investigative dermatology* **132**(3 Pt 2): 846-853.

Ring S, Enk AH, Mahnke K (2011). Regulatory T cells from IL-10-deficient mice fail to suppress contact hypersensitivity reactions due to lack of adenosine production. *The Journal of investigative dermatology* **131**(7): 1494-1502.

Ring S, Oliver SJ, Cronstein BN, Enk AH, Mahnke K (2009). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *The Journal of allergy and clinical immunology* **123**(6): 1287-1296 e1282.

Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* **31**(2): 217-233.

Rodero MP, Khosrotehrani K (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **3**(7): 643-653.

Sachs BD (1988). The development of grooming and its expression in adult animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* **525**: 1-17.

Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC (1994). The skin as an immune organ. *West Journal of Medicine* **160**: 146-152.

Sánchez T, Moreno JJ (1999). Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochemical pharmacology* **58**: 877-879.

Schacke H, Schottelius A, Docke WD, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, *et al.* (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(1): 227-232.

Schoepe S, Schacke H, May E, Asadullah K (2006). Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Experimental dermatology* **15**(6): 406-420.

Shafy A, Molinie V, Cortes-Morichetti M, Hupertan V, Lila N, Chachques JC (2012). Comparison of the effects of adenosine, inosine, and their combination as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction. *ISRN cardiology* **2012**: 326809.

Shetty S, Gokul S (2012). Keratinization and its disorders. *Oman Medical Journal* **27**(5): 348-357.

Soriano FG, Liudet L (2001). Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care Med* **29**(4).

Sorrell JM, Caplan AL (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science* **117**: 667-675.

Stanley PL, Steiner S, Havens M, Tramposch KM (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* **4**(4): 262-271.

Sun LL, Xu LL, Nielsen TB, Rhee P, Burris D (1999). Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth. *The Journal of surgical research* **87**(1): 14-24.

Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, Salzman AL, Shanley TP, *et al.* (1998). Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *British journal of pharmacology* **125**(2): 379-387.

Taieb A (2012). Vitiligo as an inflammatory skin disorder: a therapeutic perspective. *Pigment cell & melanoma research* **25**(1): 9-13.

Takahashi MDF (2012). Consenso Brasileiro de Psoríase. *Sociedade Brasileira de dermatologia*: 1-108.

Valls MD, Cronstein BN, Montesinos MC (2009). Adenosine receptor agonists for promotion of dermal wound healing. *Biochemical pharmacology* **77**(7): 1117-1124.

van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, *et al.* (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* **182**(9): 5836-5845.

Veres G, Radovits T, Seres L, Horkay F, Karck M, Szabo G (2010). Effects of inosine on reperfusion injury after cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic surgery* **5**: 106.

Ward JL, Sherali A, Mo Z, Tse C (2000). Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 Cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *The Journal of biological chemistry* **275**(12): 8375-8381.

Zachara B (1974). In vitro synthesis of inosinetriphosphate in human erythrocytes. *Journal of biochemistry* **76**(4): 891-895.

Zhang B, Shen M, Xu M, Liu LL, Luo Y, Xu DQ, *et al.* (2012). Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension. *Mediators of inflammation* **2012**: 840737.

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, *et al.* (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**(7285): 104-107.