

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILHERME AUGUSTTO COSTA DAMASIO

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADENOSINA NO MODELO
DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON EM
CAMUNDONGOS**

CURITIBA

2009

Guilherme Augustto Costa Damasio

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA ADENOSINA NO MODELO
DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON EM
CAMUNDONGOS**

Monografia desenvolvida no Laboratório de Inflamação, Dor e Febre do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biologia.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini

CO-ORIENTADORA:

Msc. Fernanda da Rocha Lapa

CURITIBA

2009

*All we have to decide is
what to do with the time
that is given to us...*

Dedico todo esse trabalho à minha família, aos meus amigos e ao meu companheiro. Pelo apoio, amor e compreensão a mim dedicados. Pessoas que sempre estiveram comigo desde o início, sem eles não chegaria tão longe...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o amor, carinho, paciência e incentivos dados durante todo esse difícil processo. Sempre ao meu lado me empurrando pra frente, me ajudando a levantar nos momentos de desespero. Especialmente minha mãe Maria Julia Costa Damasio, sem ela talvez não estivesse aqui hoje concluindo esse curso.

Agradeço ao meu namorado por todo o amor e compreensão, pelos momentos de descontração, pelas boas risadas, pela força de vontade de ter que nos carregar nas costas praticamente sozinho nesse momento. Por estar ali, ao meu lado, até nas horas mais difíceis, sempre me incentivando a seguir em frente, a não desistir nunca. Afinal, “nunca nos dão um fardo que não se possa carregar”, não é mesmo meu amor? Você tinha razão, eu consegui! Cheguei até aqui! Aprendi muito contigo. Obrigado por ser quem você é, por existir, por fazer parte da minha vida... Te amo.

A todos os meus amigos, não vou citar nomes, não quero esquecer ninguém. Sejam os novos, os de longa data, os de infância, os de fazer festa! Todos vocês foram essenciais para formar a pessoa que sou hoje. Nunca vou me esquecer de onde vim e os amigos que trouxe de lá, esses são companhia por toda uma vida, amigos que me acompanham desde os tempos remotos do Bom Jesus. Ao meu irmão adotivo querido que eu amo e nunca vou deixar de proteger, você sabe que estou falando de você! Obrigado por ser o melhor amigo que alguém poderia esperar ter na faculdade. Meninas: não tenho palavras pra expressar o quanto importante foi a amizade de vocês ao longo desses 4 anos, que passamos por tanta coisa juntos. Eu sei que não estaria aqui hoje sem vocês, nunca vou esquecer disso! Mas agora chegou a hora de cada um seguir seu próprio caminho, só nos resta as saudades dos bons momentos que passamos juntos....

Agradeço à Fernanda da Rocha Lapa, pela excelente orientação e ajuda ao longo da minha iniciação científica e por ser essa pessoa maravilhosa, divertida e única! Não preciso dizer o quanto sua passagem significou na minha vida profissional...

À minha orientadora Daniela Cabrini por toda a ajuda e compreensão, e por me alçar na vida científica.

A todo o pessoal do Laboratório de inflamação, dor e febre! Vocês são demais. Arthur e Daniel pela ajuda com os experimentos, Bruna por toda a ajuda e boa vontade, além de muitos momentos de diversão... Meu amigo e companheiro de experimentos Bruno, por toda a ajuda. Não posso deixar de agradecer a Haíssa, o Alex, o René, o Felipe e a Juliana por todas as risadas e momentos de descontração.

Aos professores da graduação por ceder todo seu conhecimento e experiência a nós alunos, criando em nós o espírito de pesquisador.

Aos meus professores de ensino médio que sempre me incentivaram a fazer Biologia, dando conselhos, idéias e ajudando a enraizar os valores que tenho hoje. Meu agradecimento especial vai pra você Ivo Lessa Filho, a maior influência e inspiração que eu pude ter na minha formação, vou ter você como exemplo para o resto da vida. Algo em que se espelhar... meu melhor professor, conselheiro, amigo, irmão, PAI....

SUMÁRIO

	Lista de figuras.....	viii
	Resumo.....	ix
	Abstract.....	x
1	Introdução.....	1
1.1	Inflamação.....	1
1.2	Inflamação aguda.....	2
1.3	A amplificação da resposta inflamatória – Sistema imune inato e resposta imune adquirida.....	5
1.4	Inflamação crônica.....	10
1.5	A pele.....	11
1.6	Inflamação na pele.....	12
1.7	As doenças de pele.....	15
1.8	Adenosina e o processo inflamatório.....	17
2	Objetivos.....	20
2.1	Gerais.....	20
2.2	Específicos.....	20
3	Material e métodos.....	21
3.1	Animais e manutenção.....	21
3.2	Avaliação do edema de orelha.....	21
3.3	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	21
3.4	Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....	22
3.5	Análise histológica.....	22
3.6	Análise estatística.....	23
4	Resultados.....	24
4.1	Efeito da Adenosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....	24
4.2	Efeito da Adenosina sobre a atividade da mieloperoxidase.....	25
4.3	Histologia.....	26
5	Discussão.....	29
6	Conclusões.....	33
7	Referências.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Recrutamento e migração de leucócitos para os locais de infecção.....	4
Figura 2	Fase de resolução.....	5
Figura 3	Panorama de uma resposta imune contra uma infecção.....	6
Figura 4	Respostas Th1 e Th2.....	10
Figura 5	A pele e seus principais componentes.....	12
Figura 6	Efeito da adenosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, em camundongos.....	24
Figura 7	Efeito da Adenosina sobre a atividade da mieloperoxidase.....	25
Figura 8	Avaliação histológica após 6 horas da aplicação de óleo de cróton.....	27
Figura 9	Avaliação histológica após 6 horas da aplicação de óleo de cróton, maior aumento das fotos anteriores.....	28

RESUMO

As doenças cutâneas são geralmente marcadas por características como interrupção da barreira e perda da função de proteção, inflamação e alterações no padrão de proliferação e diferenciação de queratinócitos. A maior parte das doenças inflamatórias cutâneas ainda não possui sua etiologia e fisiopatologia bem definidas, prejudicando assim o tratamento, não sendo este totalmente eficaz e apresentando efeitos colaterais. Muitos estudos mostram que a adenosina apresenta grande efeito imunomodulatório sobre o processo inflamatório, exercendo sua ação através de receptores pertencentes à família P_1 (acoplados à proteína G), chamados de A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 . A adenosina, bem como agonistas de seus receptores tem sido muito estudada em modelos de cicatrização na pele, porém na literatura poucos trabalhos são encontrados tendo como enfoque modelos de inflamação na pele como o de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Nossos resultados demonstram que a adenosina aplicada topicamente é capaz de inibir de forma significativa a formação de edema, nas doses de 0,001; 0,3 e 1,0 mg/kg, com inibições máximas de $81 \pm 8 \%$; $75 \pm 6 \%$ e $78 \pm 5 \%$, respectivamente. No entanto, o efeito inibitório não é dependente da dose. A adenosina também foi capaz de reduzir de maneira significativa a atividade da mieloperoxidase, mas apenas na dose de 1,0 mg/kg, com inibição de $77 \pm 2 \%$. A análise histológica corroborou com estes dados. O efeito observado pode estar ligado à ativação de receptores para adenosina, porém novos experimentos serão realizados com o objetivo de estudar o possível mecanismo de ação envolvido. Os dados obtidos neste estudo, contribuem para estender os conhecimentos acerca da atividade anti-inflamatória da adenosina na pele.

ABSTRACT

Skin diseases are frequently marked by features like barrier interruption and loss of the protection function, inflammation and changes in the keratinocyte differentiation and proliferation patterns. There is no well defined physiopathology and etiology for the majority of inflammatory skin diseases, difficulting so the treatment, making it not completely efficient and presenting side effects. Many studies have shown that adenosine presents a great immunomodulatory effect over the inflammatory process, acting through P1 family receptors (G protein-binded), named A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃. Adenosine, as well as its receptor agonists has been largely studied in models of skin wound healing, however there are very few studies in literature focusing in skin inflammation models, such as croton oil induced ear edema. Our results show that adenosine, administrated topically, is capable of inhibit the ear edema formation in doses of 0,001; 0,3 and 1,0 mg/kg, with inhibition of $81 \pm 8 \%$; $75 \pm 6 \%$ and $78 \pm 5 \%$, respectively. However, this inhibitory effect was not dose-related. Adenosine has also been able to significantly reduce the mieloperoxidase activity, but only at doses of 1,0mg/kg, with inhibition of $77 \pm 2 \%$. The histological data was in agreement. The observed effect might be related to the activation of adenosine receptors, however another experiments will be performed aiming the understanding of the possible action mechanism involved. The obtained data in this work contribute to the best understanding of knowledge related to the anti-inflammatory activity of adenosine in skin.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é um processo extremamente complexo que ocorre em resposta a vários fatores exógenos e/ou endógenos e visa manter o equilíbrio (homeostase) e a defesa do organismo. A sobrevivência de todos os seres vivos requer que agentes invasores estranhos, como patógenos infecciosos sejam eliminados, assim como tecidos danificados ou mortos. Sem a existência da inflamação as infecções seguiriam sem ser cheçadas e eliminadas e as feridas nunca cicatrizariam. No entanto, apesar de necessária e fundamental para a manutenção da vida, ela também pode causar danos consideráveis ao próprio corpo durante a sua evolução (ROBBINS, 2007).

As células e mediadores envolvidos na resposta inflamatória geralmente estão presentes na corrente sanguínea e estes são recrutados para o local da lesão quando necessário por meio de atração química e sinalização. Existem vários tipos de células e moléculas participando dessa resposta, e que desempenham papéis muito importantes na inflamação: leucócitos do sangue, proteínas plasmáticas, células da parede vascular, e células e matriz extracelular do tecido conectivo circundante. O processo da resposta inflamatória tem suas peculiaridades dependendo do órgão em questão no qual está se manifestando (ROBBINS, 2007).

Os sinais clínicos da inflamação podem ser caracterizados por eritema (rubor), calor, inchaço (edema) e dor, que foram descritos no início da era clássica pelos gregos e romanos (FANTONE e WARD, 1990). O quinto sinal da inflamação, lesão dos tecidos, com perda da função dos órgãos foi mencionado mais tarde por Virchow, no século XIX (ROCHA e SILVA, 1978; LAPA, 2006).

É importante lembrar também que a inflamação pode se manifestar de duas formas distintas em um organismo podendo ser aguda ou crônica. Cada qual com características e peculiaridades distintas e únicas, mas também com muitos aspectos conservados em comum. A inflamação aguda é, no geral, rápida e de curta duração. Pode durar de alguns minutos a alguns dias e é caracterizada por vasodilatação, pela exudação de fluidos e proteínas plasmáticas, bem como uma predominante migração e acumulação de neutrófilos. Em alguns casos ocorre também a ativação da cascata de coagulação (SPLETTSTOESSER e SCHUFF-WERNER, 2002). Já no caso da inflamação crônica o processo ocorre de forma distinta. Ela é mais persistente e de longa duração, podendo durar de dias a anos. E esta apresenta um influxo típico de linfócitos e macrófagos com

proliferação vascular e fibrose associada (DAVIES et al., 2003). São exemplos de doenças inflamatórias crônicas: artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, silicose, aterosclerose, entre outras. Essas doenças são caracterizadas por apresentarem longa duração, na qual inflamação ativa, destruição tecidual e tentativas de reparo ao tecido lesado ocorrem simultaneamente (LIEW, 2003).

De forma geral os passos de uma resposta inflamatória podem ser lembrados de forma didática pelos 5 R's: 1. Reconhecimento do agente infeccioso ou causador da lesão; 2. Recrutamento de leucócitos para o local alvo; 3. Remoção desse agente; 4. Regulação e controle da resposta inflamatória e 5. Resolução e reparo (ROBBINS, 2007).

1.2. Inflamação aguda

A inflamação aguda é caracterizada por vários eventos. O organismo passa por modificações vasculares, nas quais ocorre vasodilatação induzida por mediadores químicos como a histamina, causando eritema e estase do fluxo sanguíneo. Clinicamente isto pode ser caracterizado por vermelhidão e aumento da temperatura no local. O propósito da vasodilatação é facilitar a distribuição de mediadores solúveis e migração de células inflamatórias para o sítio inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Esse fenômeno é mediado principalmente pelo óxido nítrico (NO) e por prostaglandinas vasodilatadoras. O NO produzido causa relaxamento da musculatura lisa através de mecanismos dependentes do GMP cíclico (MONCADA e HIGGS, 1991). As prostaglandinas vasodilatadoras são PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}. Esses mediadores lipídicos são produzidos a partir do ácido araquidônico através da ação das ciclooxigenases (TABERNERO et al., 2003). Também há um aumento da permeabilidade vascular, induzido pela histamina, cininas e outros mediadores que promovem a formação espaços entre as células endoteliais, desencadeada pela lesão ao tecido ou induzida por leucócitos ao endotélio, aumentando a passagem de fluidos através deste. O aumento da permeabilidade vascular permite que proteínas plasmáticas e leucócitos migrem para o sítio inflamatório, resultando em edema (ROBBINS, 2007).

O edema é um dos sinais iniciais da resposta inflamatória, ocasionado basicamente pelo fluxo transvascular de fluidos ricos em proteínas do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF) (FRIEDL et al., 1989; DENSLINGER et al., 1985). Ocorre um aumento da pressão hidrostática nos capilares sanguíneos durante o processo devido a vasodilatação local (SHERWOOD e

TOLIVER-KINSKY, 2004). Em conjunto, o aumento da permeabilidade vascular, aumento da pressão hidrostática dos capilares e a queda da pressão oncótica do plasma agem para induzir um fluxo transvascular de fluidos e proteínas para o interstício inflamado. O objetivo dessas alterações é permitir a chegada de fatores solúveis como anticorpos e proteínas de fase aguda para o local da lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Ainda, na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o local da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

Ocorre também o recrutamento de leucócitos para os locais da inflamação. Os leucócitos são recrutados com o auxílio de moléculas de adesão que facilitam a migração leucocitária para o sítio inflamatório. Citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1, aumentam a expressão de moléculas de adesão que iniciam a captura de leucócitos circulantes (LAWRENCE et al., 2002). O recrutamento dos leucócitos é um processo de vários passos, consistindo de adesão fraca e rolamento no endotélio, mediado por selectinas que são expressas em leucócitos (L-selectinas), células endoteliais (E-selectinas) e plaquetas (P-selectinas); a adesão forte ao endotélio é mediada por integrinas como a ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) e a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), sendo que a adesão dos leucócitos à PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) dão início à transmigração para o sítio inflamatório (Figura 1) (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

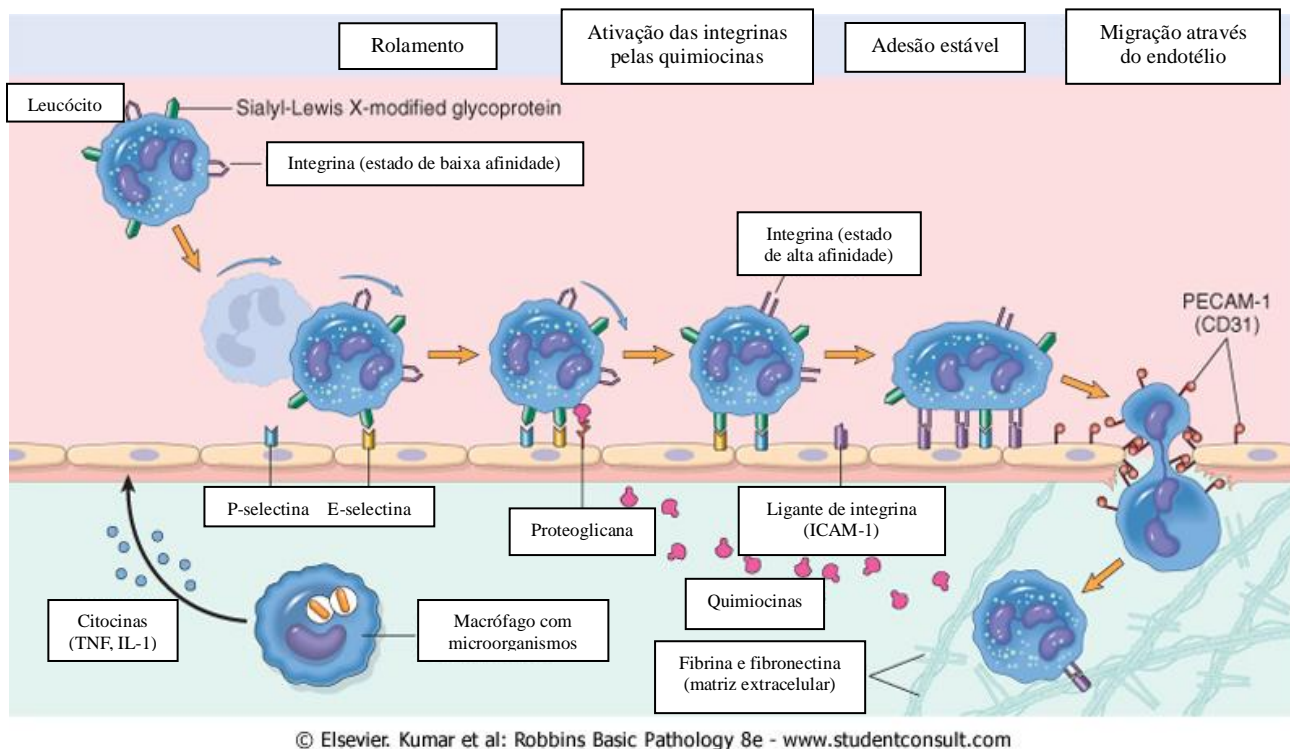


Figura 1 - Recrutamento e migração de leucócitos para os locais de infecção.

Fonte: adaptado de ROBBINS (2007).

Os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório inicial, sendo substituídos posteriormente por monócitos/macrófagos. Os mecanismos efetores dos leucócitos podem ser diversos. Eles podem eliminar bactérias e células mortas por meio de fagocitose com subsequente destruição em fagolisossomos. Essa destruição é causada por radicais livres (ROS, NO) produzidos por leucócitos ativados e enzimas lisossomais. Essas enzimas e radicais livres podem ser liberados no espaço extracelular. E o mesmo mecanismo pelo qual são eliminados os patógenos também pode ocasionar danos aos tecidos saudáveis, por isso faz-se necessária a existência de uma fase chamada de fase de reparo ou resolução, na qual ocorre a reparação do tecido lesado e sua cicatrização (ROBBINS, 2007).

Assim, após a eliminação do agente causador da resposta inflamatória, os neutrófilos ativados durante toda a resposta entram em apoptose, ocorrendo conseqüente redução da produção de mediadores pró-inflamatórios e a fagocitose destas células de defesa apoptóticas por macrófagos ("clearance"). Estes são considerados importantes mecanismos de resolução e indícios apontam para a participação de mediadores lipídicos como: prostaglandinas, lipoxinas, resolvinas, protectinas e de citocinas como TGF- α , IL-10 neste processo (GILROY et al., 2002; GILROY et al., 2004).

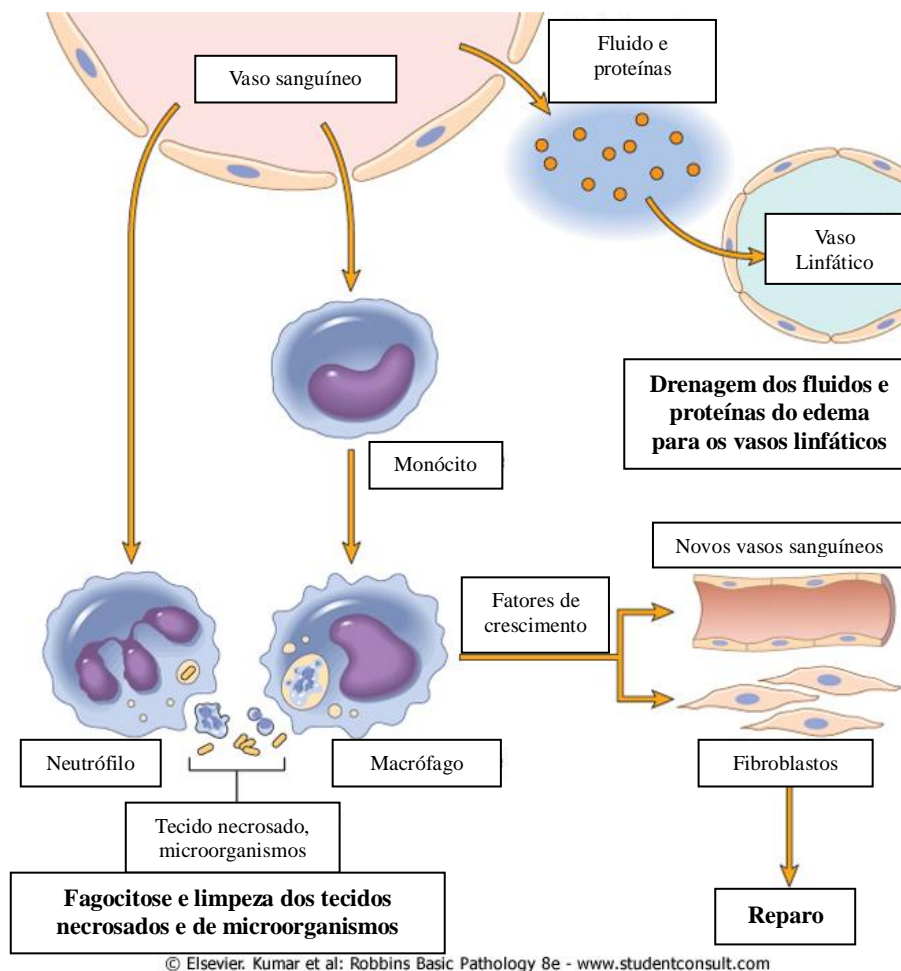


Figura 2 - Fase de resolução. Fonte: adaptado de ROBBINS (2007).

1.3. A amplificação da resposta inflamatória – Sistema imune inato e resposta imune adquirida

Como se sabe o sistema imunológico tem dois mecanismos de ação distintos no organismo quando este se depara com um agente estranho ou infeccioso. A resposta imune inata e a resposta imune adquirida. A resposta imune inata é responsável por criar a resposta inicial contra uma possível invasão tecidual. As fases já retratadas anteriormente como, vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e infiltração celular são parte dessa resposta. Os principais componentes celulares participantes desse processo são: macrófagos, células dendríticas, células NK (natural killers) e neutrófilos. Em adição a esses componentes celulares, também têm importante papel as proteínas circulantes no plasma como as proteínas do complemento, reativos de fase aguda e a cascata de coagulação (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

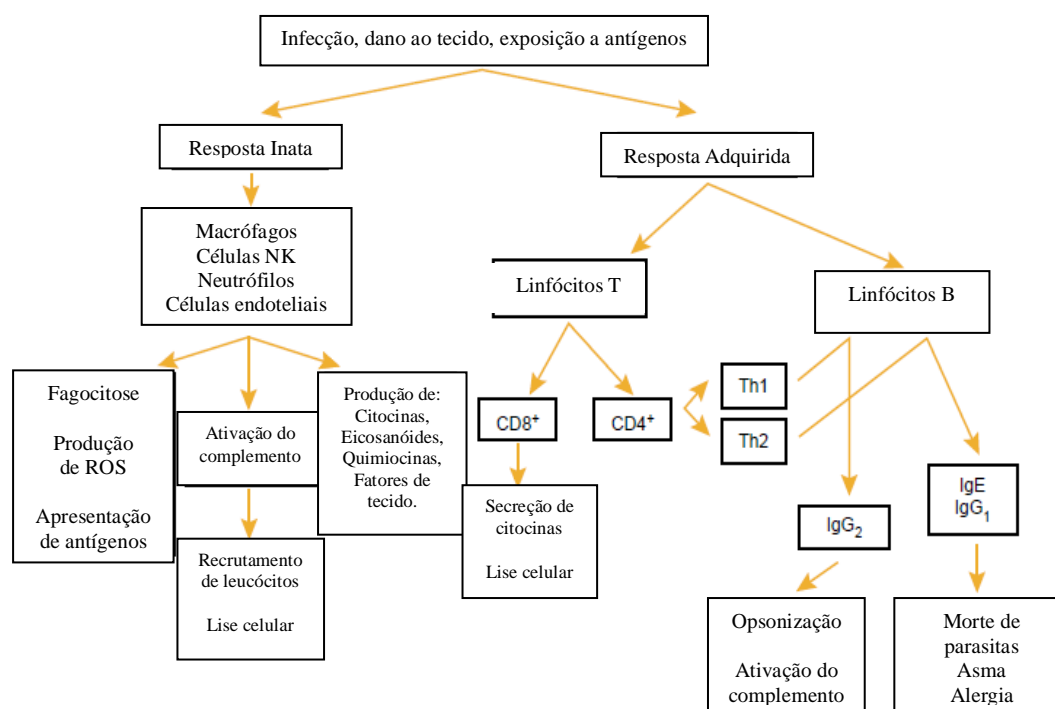


Figura 3 - Panorama de uma resposta imune contra uma infecção.

Fonte: adaptado de SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY (2004)

A produção de citocinas é geralmente auto limitada, apesar de que algumas delas podem permanecer na circulação por longos períodos de tempo. Deve-se ressaltar também que os efeitos das citocinas são pleiotrópicos e redundantes. Por pleiotropismo entende-se que uma única citocina pode ter várias funções. Já no caso da redundância é quando várias citocinas diferentes atuam em uma mesma função. Um exemplo clássico é o caso do $\text{TNF-}\alpha$ e da IL-1 , ambas as citocinas têm capacidade de induzir febre, estimular a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado e causar a ativação das células endoteliais (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). As citocinas, no entanto, são proteínas com funções múltiplas e que se sobrepõem umas as outras. Por esse motivo, o bloqueio de uma única citocina irá geralmente ter um efeito limitado no processo geral da inflamação (PARRILLO et al., 1990).

Os macrófagos sempre foram as células mais típicas e clássicas da resposta imune inata, no entanto, estudos recentes têm mostrado que as células dendríticas também apresentam importante papel como células efetoras para reconhecimento de microorganismos e produção de citocinas (GRANUCCI et al., 2003; GRANUCCI et al., 2003). Tanto macrófagos quanto células dendríticas têm a habilidade de responder a uma variedade de produtos bacterianos através do reconhecimento de padrões de receptores presentes na superfície dos microorganismos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Uma citocina pró-inflamatória típica é o TNF- α . Este é liberado primariamente por macrófagos em questão de minutos após a detecção de uma lesão tanto local quanto sistêmica e modula uma grande variedade de eventos metabólicos e imunológicos. Em lugares onde ocorre infecção ou inflamação local o TNF- α inicia uma resposta imune que ativa os mecanismos de defesa contra microorganismos e, uma vez que a infecção tenha sido erradicada, participa do reparo tecidual. Ele é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares, também atuando como fator de crescimento para fibroblastos e como um fator de angiogênese (DINARELLO, 2000).

A liberação sistêmica de TNF- α , no entanto pode ocasionar ou iniciar uma cascata destrutiva de eventos que podem resultar em danos aos tecidos, disfunção dos órgãos e potencialmente pode levar a morte. Entre os efeitos sistêmicos desse mediador inflamatório estão: indução à febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação, supressão do miocárdio, indução de vasodilatadores sistêmicos com conseqüente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia. Vários estudos demonstraram que a administração de TNF- α em animais experimentais induzem respostas fisiológicas que simulam as respostas inflamatórias sistêmicas observadas na sepsis e após danos severos (LEON et al., 1998).

Outro efeito importante do TNF- α é a habilidade de induzir apoptose depois de se ligar ao complexo TNF-RI. A ativação desse complexo causa o recrutamento do receptor do domínio da morte do TNF (TRADD) para a membrana plasmática. O TRADD recruta outras proteínas como a proteína do domínio da morte associada ao FAS (FADD), que por sua vez recruta e ativa a caspase-8, levando a indução da cascata de caspases e resultando em morte celular (apoptose). A apoptose é um importante processo para a resolução do processo inflamatório (MAC EWAN, 2002).

Os efeitos fisiológicos do IL-1 são essencialmente idênticos aos do TNF- α . No entanto, o IL-1 não induz lesão tecidual nem apoptose por si própria, mas este ajuda a potencializar os efeitos danosos do TNF- α . A família de proteínas IL-1, incluindo IL-18, é o único grupo de citocinas para o qual antagonistas naturais já foram identificados (PRUITT et al., 1995). Apesar dessas duas citocinas atuarem por vias de sinalização semelhantes, suas funções são muito distintas. Enquanto a IL-1 serve para ativar uma grande variedade de mecanismos pró-inflamatórios, a IL-18 age em conjunto com a IL-12 para estimular a produção de IFN- γ pelas células NK e Th1.

As quimiocinas fazem parte de uma família de proteínas cuja função é, primariamente, servir como fatores quimiotáticos para leucócitos. IL-8 é um potente fator de atração de neutrófilos para o local da inflamação. Ela é produzida por macrófagos e é

uma das mais bem estudadas quimiocinas participantes do processo inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outra citocina com papel importante é a IL-12, ela é produzida por macrófagos ativados e células dendríticas. Sua principal função é estimular a produção de IFN- γ por células T e células NK. Além disso, essa citocina é um mediador da resposta imune inicial contra microorganismos intracelulares e participa da facilitação da imunidade adaptativa. Muitos tipos diferentes de microorganismos induzem a produção de IL-12, que age em conjunto com IL-15 e IL-18 para induzir a produção de IFN- γ por células NK (WYSOCKA et al., 2001).

O IFN- γ é responsável pela amplificação da resposta inflamatória, através da estimulação da secreção de citocinas, fagocitose e explosão respiratória dos macrófagos. A IL-12 e IFN- γ atuam em conjunto para amplificar tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. A produção inicial desses dois mediadores durante as respostas imunes cria um círculo de *feedback* positivo que potencializa a resposta inflamatória (VARMA et al., 2002). Um bloqueio da produção ou funcionamento de IL-12 ou IFN- γ mostrou ser capaz de diminuir os efeitos deletérios da inflamação durante choque séptico (EMOTO et al., 2002).

Os eicosanóides são metabólitos derivados do ácido araquidônico que regulam muitos aspectos da resposta imunológica. Leucotrienos induzem a contração das células endoteliais e contribuem para o extravasamento dos capilares. Tromboxano A₂ é um fator derivado de plaquetas e macrófagos e promove agregação plaquetária, vasoconstrição e, potencialmente, trombose do tecido (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A resposta imune é altamente controlada e geralmente funciona de forma efetiva para limitar e controlar a infecção, além de promover reparo tecidual. Normalmente existe um equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. IL-10, por exemplo, funciona como um inibidor de macrófagos ativados e células dendríticas, servindo dessa forma como um importante regulador da resposta inflamatória (OBERHOLZER et al., 2002). O efeito principal do IL-10 é a supressão da produção de IL-12 por macrófagos ativados e células dendríticas. Isso conseqüentemente resulta na supressão da produção de IFN- γ por células NK e células T ativadas, causando uma quebra na amplificação da resposta pró-inflamatória mediada por IL-12 e IFN- γ (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Até agora tudo que foi comentado neste tópico teve um enfoque para a resposta imune inata, no entanto a resposta imune adquirida também tem papel muito importante nesse processo, como será descrito a seguir.

A resposta imune adquirida ou adaptativa pode ser ativada e amplificada pela própria resposta imune inata. Este fenômeno é primariamente mediado por IL-12, que causa a ativação de células T e promove a diferenciação de células T virgens em células do fenótipo Th1 (O'SULLIVAN et al., 1995). A resposta adaptativa é, no entanto, induzida primariamente pela apresentação de antígenos estranhos para células T CD4+ e CD8+. A ativação de células T CD4+ causa produção adicional de citocinas e amplifica as respostas imunes tanto inatas quanto adquiridas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os mais bem definidos subgrupos das células T CD4+ são as células Th1 e Th2. Esses subgrupos são definidos basicamente pelo tipo de citocinas que eles produzem. A principal citocina produzida pelas células Th1 é o IFN- γ (WOLK et al, 2000). Essa citocina amplifica a resposta pró-inflamatória através da ativação de macrófagos e estimulação das funções citolíticas das células T CD8+. Ela também estimula as células B a produzirem anticorpos IgG₂ que se ligam ao complemento e que fazem opsonização. A indução de uma resposta Th1 é promovida pela IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas. Bactérias intracelulares, produtos bacterianos e alguns outros parasitas estimulam a produção de IL-12. Este ativa o fator de transcrição STAT4 nas células T ativadas e promove a diferenciação Th1 (DECKER et al., 2002). Há também outros fatores de transcrição envolvidos. Em suma, a função principal das células Th1 é promover imunidade antimicrobiana mediada por fagócitos.

Já a exposição a alérgenos e helmintos desencadeia a diferenciação do tipo Th2. Esses estímulos ocasionam estimulação prolongada de células T sem ativação de macrófagos ou uma resposta imune inata significativa. A diferenciação do tipo Th2 é induzida por IL-4 (ROBINSON, 2000). Essa citocina causa a ativação do fator de transcrição STAT6, que promove a diferenciação Th2 (LEONARD, 2001). As células Th2 diferenciadas produzem preferencialmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. A IL-4 em conjunto com a IL-10 e a IL-13 causa a supressão de macrófagos assim como a produção de anticorpos IgG₁ e IgE que medeiam reações alérgicas, asma e respostas imunes contra parasitas (ROBINSON, 2000). A ativação de eosinófilos é induzida por IL-5. Em resumo, a principal função da resposta Th2 é a defesa do hospedeiro contra infecções de helmintos, no entanto as células Th2 também apresentam um papel patológico importante na facilitação da asma e reações alérgicas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

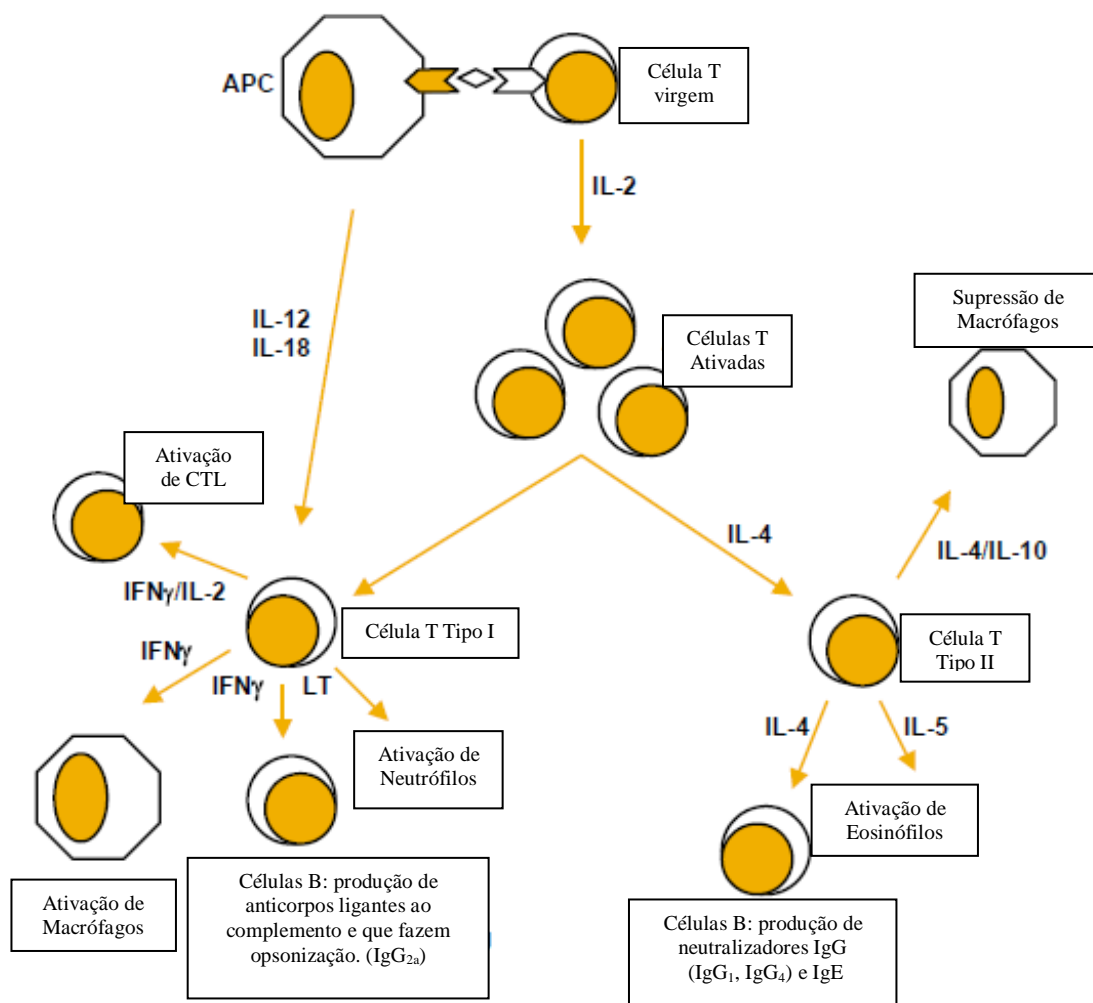


Figura 4 - Respostas Th1 e Th2.

Fonte: adaptado de SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY (2004)

1.4. Inflamação crônica

Quando ocorre uma falha na conclusão do processo de resolução, a resposta tecidual progride para inflamação crônica (LAWRENCE E GILROY, 2007).

É caracterizada por resposta prolongada do organismo hospedeiro a um estímulo persistente. Causada geralmente por microorganismos resistentes a eliminação, respostas imunes direcionadas contra antígenos próprios ou ambientais, e algumas substâncias tóxicas (sílica) (ROBBINS, 2007).

A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses. A resposta crônica é mediada por citocinas produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos (notavelmente linfócitos T) (ROBBINS, 2007). Durante a

inflamação crônica ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (GILROY et al., 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

1.5. A pele

A pele, também chamada de membrana cutânea, cobre a superfície corporal externa. Ela é o maior órgão do corpo tanto em área superficial quanto em massa. Nos indivíduos adultos, a pele cobre uma área de cerca de 2 metros quadrados e pesa em torno de 4,5 a 5,0 kg, o que representa cerca de 16% da massa total do corpo humano (TORTORA et al., 2006).

Em questão de estrutura a pele pode ser dividida em duas porções principais: uma porção superficial, mais delgada, composta de tecido epitelial, chamada de epiderme; e uma parte mais profunda e mais espessa, composta de tecido conjuntivo, denominada derme. Abaixo da derme, no entanto sem fazer parte da pele, está a tela subcutânea também chamada de hipoderme. Esta camada é constituída de tecido conjuntivo areolar e adiposo, tendo como função armazenar gordura e os grandes vasos sanguíneos que irrigam a pele (TORTORA et al., 2006).

A epiderme é formada por epitélio estratificado escamoso queratinizado, na qual são encontrados quatro tipos principais de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. Cerca de 90% das células epidérmicas são queratinócitos, eles estão dispostos em 4 ou 5 camadas e produzem uma proteína chamada de queratina. Estas células também produzem grânulos lamelares, que liberam uma substância seladora hidrorrepelente. Cerca de 8% são os melanócitos, produtores do pigmento chamado melanina. Essas células possuem prolongamentos longos e delgados que se estendem entre os queratinócitos para os quais transferem os grânulos de melanina. As células de Langerhans participam das respostas imunes preparadas contra os microorganismos que possam vir a invadir a pele. As células de Merkel detectam diferentes aspectos das sensações relacionadas ao tato (TORTORA et al., 2006).

A epiderme é formada por várias camadas de queratinócitos em diversas fases de desenvolvimento. Na maioria das regiões do corpo humano, a epiderme possui quatro camadas distintas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e um estrato córneo fino. No entanto, em alguns locais como pontas dos dedos e planta dos pés, sujeitos a maior fricção, existem cinco camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato

granuloso, estrato lúcido e um estrato córneo espesso (TORTORA et al., 2006).

A derme é formada principalmente de tecido conjuntivo contendo fibras elásticas e colágenas. Na derme existem estruturas chamadas de papilas dérmicas, projeções digitiformes que penetram na epiderme e podem conter vasos capilares. Algumas delas também possuem receptores táteis chamados de corpúsculos de Meissner, responsáveis pelo tato. Também estão presentes as terminações nervosas livres, associadas com sensações de calor, frio, dor, sentir cócegas ou coceiras (TORTORA et al., 2006).

Na derme também estão presentes adipócitos, folículos pilosos, nervos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A combinação da presença de fibras elásticas e colágenas é que dá a pele sua capacidade de extensibilidade, força e elasticidade (TORTORA et al., 2006).

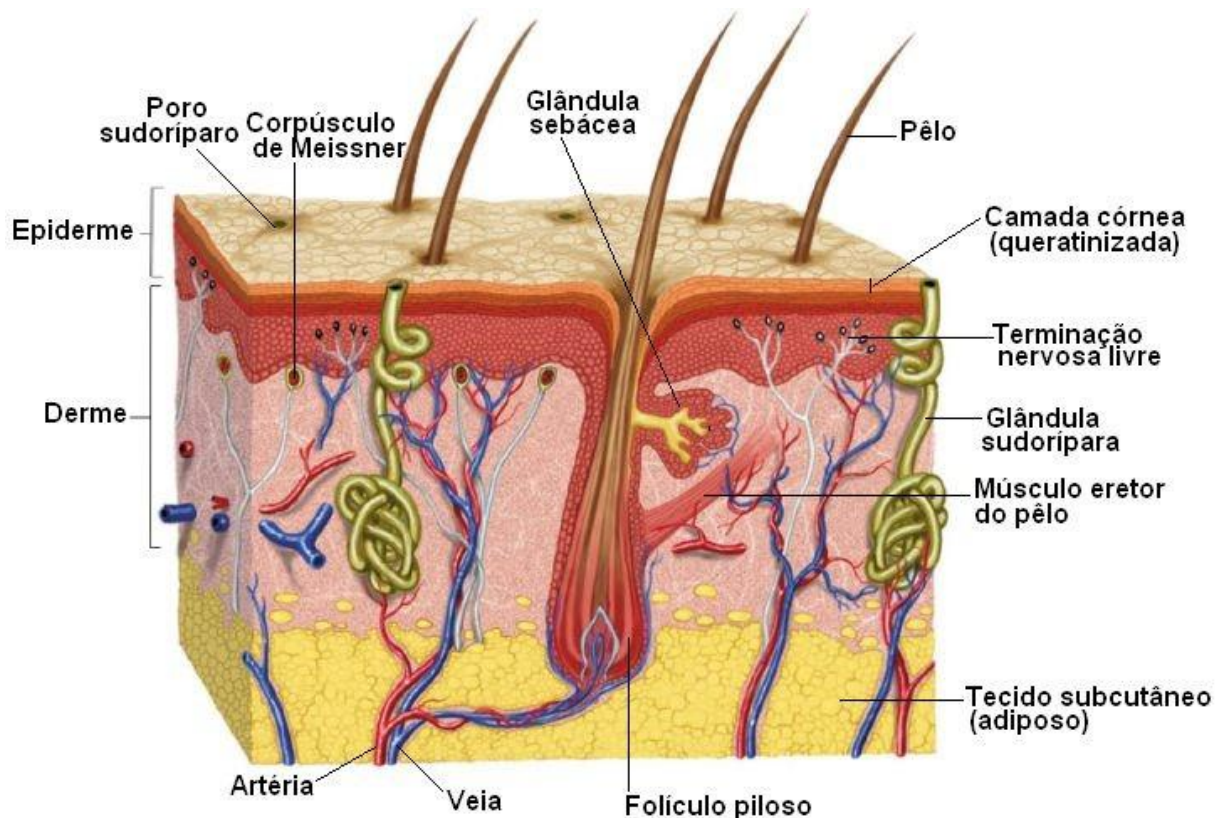


Figura 5 - A pele e seus principais componentes.

Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>

1.6. Inflamação na pele

Como já foi descrito anteriormente, a pele humana e suas células imunes provêm a proteção essencial do organismo contra infecções e danos. Uma vez que este órgão serve de interface entre o organismo e o meio externo, servindo como a primeira linha de defesa contra os patógenos de microorganismos além de proteger contra danos físicos e

químicos. Estudos recentes têm reforçado a importância dos queratinócitos como sensores de perigo através de sistemas de alerta tais como o inflamossoma. Além disso, as recentemente identificadas células dendríticas CD103+, que estão estrategicamente posicionadas para a apresentação de patógenos da pele e acumulação de dados e informações, demonstram um papel chave das células residentes do tecido ao invés das células T circulantes na homeostase e patologia da pele (NESTLE et al., 2009).

A vigilância do sistema imunológico sobre um órgão tão grande e tão exposto como a pele representa um enorme desafio para as sentinelas imunes e células efetoras. Se ocorrer uma pequena falha nesse sistema ou uma resposta imune inadequada, uma infecção muito grande ou até mesmo câncer podem se instalar. Por outro lado, se a resposta imune for muito intensa e excessiva, pode ocorrer o desenvolvimento de doenças auto-imunes ou inflamação crônica. Portanto, há uma grande necessidade de esses mecanismos estarem sempre em equilíbrio e bem ajustados, para manter dessa forma a integridade da pele (NESTLE et al., 2009).

Apesar de os estudos anteriores tratarem as células da pele de forma individual, foram o conceito visionário e inovador do tecido linfóide associado à pele, descrito por Streilein em 1983 (STREILEIN, 1983), e posteriormente a idéia de um “sistema imune da pele” (BOS e KAPSENBERG, 1986) que serviram de base para uma interpretação moderna do panorama geral dos mecanismos de defesa da pele para os pesquisadores interessados na imunidade cutânea.

O conceito de tecido linfóide associado à pele é baseado no fato de que existem células imunes distintas que trafegam continuamente entre a pele, os nódulos linfáticos drenantes e a circulação sanguínea, provendo dessa forma uma vigilância imunológica otimizada. Já a idéia de um “sistema imune da pele”, baseia-se no fato de que vários tipos de células dendríticas bem como células do sistema imune inato, presentes na derme, apresentam um papel relevante na proteção da pele (NESTLE et al., 2009).

A epiderme é constituída de um tecido relativamente simples, a derme, no entanto possui uma anatomia muito mais complexa e com uma diversidade celular bem maior. Ela possui muitas células especializadas, incluindo células dendríticas, células T CD4+ e células NK. Além disso, macrófagos, mastócitos, fibroblastos e tipos celulares relacionados ao sistema nervoso também estão presentes. A derme é drenada por vasos tanto linfáticos quanto sanguíneos, através dos quais células migrantes podem trafegar (NESTLE et al., 2009).

Os queratinócitos são uma das células mais importantes e bem estudadas que fazem parte de todo esse processo de defesa e inflamação da pele. Similares às células

epiteliais do intestino, os queratinócitos podem detectar patógenos e mediar respostas imunes para distinguir o que são organismos comensais e inofensivos dos patógenos causadores de danos. As células eucarióticas podem detectar a presença de produtos bacterianos usando receptores que reconhecem vários componentes bacterianos conservados evolutivamente, que incluem lipopolissacarídeos, peptidoglicanas, flagelinas e ácidos nucléicos (JANEWAY, 1989). Os mais bem estudados desses receptores são os “Toll-like receptors” (TLRs). É a ligação a esses receptores que desencadeia o processo de sinalização nas células do hospedeiro, com conseqüente ativação das respostas imunes inata e adaptativa. A expressão de TLR pelos queratinócitos pode ser crucial para o desencadeamento das respostas imunes na pele, uma vez que a ativação desses receptores nos queratinócitos humanos leva a uma resposta imune predominantemente do tipo Th1 e à produção de interferons (IFNs) do tipo 1 (MILLER e MODLIN, 2007).

A exposição prolongada da pele à radiação ultravioleta e haptenos causa a ativação de sensores intracelulares contidos no complexo do inflamossoma presente em queratinócitos, levando à ativação da caspase-1 e ao processamento e secreção de citocinas pró-inflamatórias fundamentais. Isso, por sua vez, resulta na ativação de células imunes residentes no tecido, que induzem e perpetuam a resposta inflamatória (NESTLE et al., 2009).

Outro tipo de célula muito importante que também participa da resposta inflamatória da pele é constituído pelas células dendríticas residentes nesse tecido. Essas células podem ser classificadas de acordo com a sua localização em compartimentos anatômicos distintos da pele. As células de Langerhans são o principal subconjunto de células dendríticas presentes na epiderme, na qual elas residem de forma constitutiva nas camadas suprabasais e estão espaçadas regularmente entre os queratinócitos. Por outro lado as células dendríticas dermais residem na derme imediatamente abaixo da junção entre derme e epiderme, estando dispersas através de todo o compartimento dermal (NESTLE et al., 2009).

Além de essas células possuírem localizações anatômicas diferentes, estas também possuem funções distintas e específicas. Por exemplo: secreção de mediadores pró-inflamatórios (células dendríticas inflamatórias), produção de IFNs de tipo I (células dendríticas plasmacitóides), ou então apresentação cruzada de antígenos (células dendríticas CD103+ da pele). O progresso das pesquisas com células dendríticas ganhou força quando um subtipo dessas células, chamadas de células dendríticas langerina+, foram descritas na derme de camundongos sendo claramente distintas das células de

Langerhans langerina+ que residem na epiderme (BURSCH et al., 2007; GINHOUX et al., 2007; POULIN et al., 2007; NAGAO et al., 2009).

Finalizando, segue-se a descrição das células T da pele e seu papel funcional. Uma pele normal e saudável contém mais de 2×10^{10} células T residentes, o que é um número maior, mais até do que o dobro do número dessas células circulantes no sangue (CLARK et al., 2006). Apesar de se desconfiar da presença de linfócitos mesmo em uma pele saudável, essas células foram negligenciadas por quase 40 anos. Só no final dos anos 1980 é que estudos mostraram que a epiderme normal abriga uma população extremamente heterogênea de células T, a maioria sendo células T de memória CD8+ (BOS et al., 1987; FOSTER et al., 1990).

As células T epidérmicas estão basicamente distribuídas nas camadas basal e suprabasal de queratinócitos, ocasionalmente em grande proximidade com as células de Langerhans (FOSTER et al., 1990). Células T CD4+ e CD8+ estão presentes em mesma quantidade e a maioria é composta de células T de memória que expressam antígenos associados a linfócitos cutâneos (CLA) (BOS e KAPSENBERG, 1993). As células T de memória específicas da pele adquirem propriedades de residir neste órgão após passarem por um processo conhecido como “imprinting”, que envolve contato com células dendríticas derivadas do tecido (MORA et al., 2005; EDELE et al., 2008).

1.7. As doenças de pele

As doenças de pele podem ser desencadeadas tanto por estímulos endógenos, como mutações gênicas, quanto por estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes. Existem diversos tipos de doenças cutâneas as quais são geralmente marcadas por características como interrupção da barreira e conseqüente perda da função de proteção, inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação de queratinócitos (PROKSCH et al., 2008).

Uma das disfunções de maior incidência é a psoríase a qual atinge cerca de 2% da população mundial e promove um alto impacto na qualidade de vida do paciente por afetar não somente a pele, mas também gerar situações de embaraço, medo, depressão, problemas de auto-estima e com a imagem corporal (NESTLE et al., 2009). Diversos aspectos da vida do paciente são diretamente afetados por esses sentimentos como o relacionamento pessoal, prática de esportes, sexualidade, cuidados pessoais e atividades no trabalho e na escola (VAN DE KERKHOF et al., 2008; SEELIGER et al., 2003).

A psoríase é um distúrbio de pele crônico no qual os queratinócitos se dividem e

passam do estrato basal para o estrato córneo mais rápido do que seria normal. Estes são descamados prematuramente em cerca de 7 a 10 dias. Os queratinócitos imaturos produzem queratina anormal, que forma películas escamosas esbranquiçadas na superfície da pele, principalmente nos joelhos, cotovelos e couro cabeludo (TORTORA, 2006).

A evolução da psoríase e suas lesões são baseadas numa complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Uma cascata de eventos leva a ativação de células dendríticas e à produção de células T efectoras que migram e residem no tecido da pele. A comunicação entre células epiteliais e células imunes dá forma e mantém o complexo processo inflamatório. As terapias para tratamento da psoríase visam o ataque principalmente às células T e as citocinas. No entanto é um tratamento caro e complicado, e que, se interrompido, apresenta uma volta aos sintomas iniciais. Há também uma grande dificuldade em se obter modelos animais que simulem as características da psoríase, uma vez que essa é uma doença exclusiva de humanos e alguns primatas (NESTLE et al., 2009; ROBERT et al., 1999).

Outra doença de pele muito importante é a dermatite atópica, caracterizada por intenso prurido e eritema. Na sua forma crônica há ainda a formação de escamas e liquens na superfície da pele. As características histológicas mostram um infiltrado mononuclear da derme associado a uma hiperplasia da epiderme. A dermatite atópica é iniciada por células T CD4+ e CLA positivas, onde há liberação de citocinas por linfócitos Th2 (T helper-2), como interleucinas (ILs) 4, 5, 10 e 13. Apesar disso, em algumas lesões persistentes, no entanto, verificou-se também a liberação de citocinas por linfócitos Th1 (T helper-1). Alérgenos ambientais, como as proteínas produzidas e liberadas por ácaros domésticos como o *Dermatophagoides pteronyssinus* também podem desencadear essa patologia (ROBERT et al., 1999; BIEBER, 2008).

A maior parte das doenças inflamatórias cutâneas ainda não possui sua etiologia e fisiopatologia bem definidos, como é o caso da psoríase. Essa falta de informação prejudica principalmente o tratamento dessas doenças. Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis não são totalmente eficazes, sendo que aqueles que promovem melhoras no quadro do paciente promovem uma gama de efeitos colaterais e indesejáveis. Assim, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático, e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias excessivas (SEELIGER et al., 2003; MAN et al., 2008).

1.8. Adenosina e o processo inflamatório

Estudos anteriores demonstram que o nucleotídeo endógeno adenosina-5'-trifosfato (ATP) e seus metabólitos adenosina e inosina atuam como moléculas sinalizadoras e mediadoras da resposta imune e inflamatória (BOURS *et al*, 2006; SWENNEN *et al*, 2006; GOMEZ e SITKOVSKY, 2003).

A adenosina é formada através da ligação glicosídica entre uma base púrica adenina e uma D-ribose. Este nucleosídeo é gerado a partir do ATP por uma 5'-nucleotidase e rapidamente convertido pela adenosina deaminase à inosina, xantina, hipoxantina e ácido úrico (POLOSA, 2002).

A adenosina interage com mastócitos e basófilos e é conhecida como potente broncoconstritor quando inalada por asmáticos. É importante ressaltar também que ela possui atividade tanto anti-inflamatória quanto pró-inflamatória no organismo humano e atua em uma grande variedade de células (LIVINGSTON *et al.*, 2004).

O papel fisiológico da adenosina foi investigado primeiramente por Drury e Szent-Györgyi, que demonstraram que esta apresentava efeitos biológicos pronunciados como redução da pressão arterial, efeito inotrópico negativo e vasodilatação coronariana (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). Com base nestas pesquisas iniciais, atualmente a adenosina é empregada na clínica para o tratamento de arritmias cardíacas, principalmente taquicardias supraventriculares (WILBUR e MARCHLINSKII1997).

Até o presente momento, tem sido descrito que a adenosina exerce seu papel fisiológico e imunomodulador ligando-se a receptores de superfície de membrana, pertencentes à família P_1 (acoplados à proteína G). Estes receptores estão amplamente distribuídos por vários tecidos em mamíferos, incluindo cérebro, tireóide, rins, coração, pulmão e células imunes (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; FREDHOLM *et al.*, 2001). Vários estudos demonstram que a adenosina apresenta participação em vários processos fisiológicos, como na regulação da vigília e do sono, cognição e memória, regulação da transmissão nociceptiva, efeitos cardiovasculares e na inflamação (POLOSA, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2002; SAWYNOK e LIU, 2003).

Os receptores para a adenosina presente nas células e que já foram identificados até o momento podem ser divididos em quatro tipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 . Os receptores A_1 e A_{2A} são chamados receptores de alta afinidade e os receptores A_{2B} e A_3 chamados de receptores de baixa afinidade devido ao padrão de ligação da adenosina aos mesmos (FREDHOLM *et al.*, 2001).

A atenção dada aos efeitos anti-inflamatórios da adenosina e seus receptores

aumentou quando se foi demonstrado que drogas anti-inflamatórias como o metotrexato apresentam, como um dos mecanismos, o aumento da sua concentração endógena (CRONSTEIN, 1994; SITKOVSKY, 2003). Tal fato foi descrito recentemente demonstrando que esta atividade está relacionada à interação com seus receptores A_{2A} e A_3 (MONTESINOS et al., 2003).

A atividade anti-inflamatória da adenosina está ligada ao seu efeito inibitório sobre células do sistema imune como neutrófilos, linfócitos T, mastócitos e monócitos, segundo já foi descrito em inúmeros trabalhos. O desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para os receptores da adenosina, bem como, de camundongos nocaute para seus receptores, tem facilitado os estudos do seu papel na resposta inflamatória (SITKOVSKY, 2003).

Outros estudos têm demonstrado que a ativação de receptores A_3 em ratos promove degranulação de mastócitos, o que poderia contribuir com a patogenia de alguns processos alérgicos (FOZARD et al., 1996). O receptor do tipo A_3 também é encontrado em eosinófilos e o tratamento de camundongos deficientes para ADA com seu antagonista seletivo MRS 1523 promoveu uma redução da produção de muco e da eosinofilia observada na inflamação pulmonar (YOUNG et al., 2004). Por outro lado, de forma contraditória, em animais endotoxêmicos foi demonstrado que o agonista seletivo do receptor A_3 (IB-MECA) reduziu a liberação de citocinas como $INF-\gamma$, IL-12 e de NO, reduzindo a letalidade (HASKÓ et al., 1998).

Estudos demonstraram que a aplicação tópica na pele, de agonistas seletivos para os receptores A_1 e A_{2a} promove a cicatrização de feridas (SUN, et al., 1999; MONTESINOS et al., 1997; MONTESINOS et al., 2002) sendo que estudos complementares demonstraram que a adenosina, ligando-se no seu receptor A_{2a} , estimula migração e proliferação de células endoteliais e fibroblastos e secreção do fator de crescimento endotelial (VEGF) *in vitro* (MONTESINOS et al., 1997; MONTESINOS et al., 2002). Em adição, foi demonstrado farmacologicamente e através do uso de animais nocaute para receptores A_{2a} , que a aplicação tópica de agonistas para este receptor acelera a cicatrização de feridas em ambos, animais saudáveis e ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, que apresentavam cicatrização mais lenta (SUN et al., 1999; MONTESINOS et al., 1997; VICTOR-VEGA et al. 2002; VALLS et al., 2009).

Embora evidências indiquem que em modelos de cicatrização, os efeitos benéficos da adenosina sejam mediados por receptores A_{2a} , em modelos experimentais, os quais envolvem indução de inflamação em outros tecidos, a adenosina apresenta efeitos duais. Os resultados contraditórios da literatura nos permitem sugerir que diferentes estímulos

inflamatórios irão resultar no recrutamento de diferentes células imunes e expressão de diferentes subtipos de receptores para adenosina que possivelmente irão determinar sua modulação na resposta inflamatória.

Logo, este estudo procurou avaliar uma possível ação anti-inflamatória da adenosina na pele pela sua aplicação tópica, utilizando para tanto o modelo de inflamação de pele induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. O interesse foi de agregar conhecimentos acerca da compreensão do real papel da adenosina nos mecanismos que regulam o processo inflamatório na pele.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da adenosina na inflamação cutânea induzida por óleo de cróton em camundongos.

2.2. Específicos

- Verificar a ação da adenosina sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos;
- Verificar a ação da adenosina tópica na migração celular no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos, através de análises histológicas e da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Manutenção

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25-35g) do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, CCB-UFPR, mantidos em condições de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 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 1 hora para adaptação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório (CEEA, 2003), e os protocolos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e aprovados sob o número 392.

3.2. Avaliação do Edema de Orelha

O edema de orelha é expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos (μm), de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974). Inicialmente, a espessura da orelha é medida próxima à extremidade medial da mesma, com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT-045B). Após a indução tópica do estímulo inflamatório (óleo de cróton) é aguardado um intervalo de 6 horas e em seguida o edema é medido novamente. A adenosina foi dissolvida em acetona e 1% de tween e aplicada topicamente na orelha direita dos camundongos. Para minimizar variações decorrentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador.

3.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton

O 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) é um éster de forbol presente no óleo de cróton (*Croton tiglium* L.), que apresenta um potente efeito flogístico e promotor de tumor capaz de induzir uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2003; GÁBOR, 2000). Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, assim é amplamente utilizado na triagem de compostos

que pertencem à classe dos inibidores da COX e/ou LOX, bem como compostos com atividade similar a corticóide (GÁBOR, 2000).

Para avaliar a atividade da adenosina nesse modelo, o edema de orelha é induzido pela aplicação tópica de 0,4 mg /orelha de óleo de cróton, dissolvido em 20 µl de acetona. A adenosina (0,00001 até 1 mg/orelha), o controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha) e o veículo Tween (0,5% em acetona), foram aplicados topicamente logo após o tratamento com o óleo de cróton. A espessura da orelha é avaliada 6 horas após a aplicação do óleo de cróton (DE YOUNG et al., 1989), conforme descrito no item anterior. Amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram obtidas 24 horas após a aplicação do óleo de cróton e submetidas a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e histologia.

3.4. Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, é avaliada utilizando a metodologia de Bradley *et al* (1982) modificada por De Young *et al* (1989). As amostras (círculos de 6 mm do tecido das orelhas dos camundongos) são adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0° C. O homogenato é decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) é colocada em microtubo e centrifugada a 11.200 g a 4 °C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante são colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente é adicionado 200 µL de uma mistura 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 de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação é iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa é posteriormente incubada a 37 °C por 3 min 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 é determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader 808) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/tecido.

3.5. Análise Histológica

Amostras de orelhas coletadas de camundongos submetidos ao modelo agudo de

edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) por um período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até o início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina (RECIO et al., 2000). A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200x.

3.6. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} (dose necessária para reduzir em 50 % das respostas dos grupos de animais que receberam tratamento em relação ao grupo de animais que não recebeu nenhum tratamento, denominado de grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. 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 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 3.00, San Diego Califórnia, EUA.

4 RESULTADOS

4.1. Efeito da adenosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

A figura 6 mostra que o tratamento com adenosina (0,00001 – 1,0 mg/kg) administrada topicamente foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Entretanto, o efeito inibitório da adenosina não foi dependente da dose, apresentando inibições máximas de 81 ± 8 %; 75 ± 6 % e 78 ± 5 % para as doses de 0,001; 0,3 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A adenosina foi administrada 30 minutos após a indução do edema.

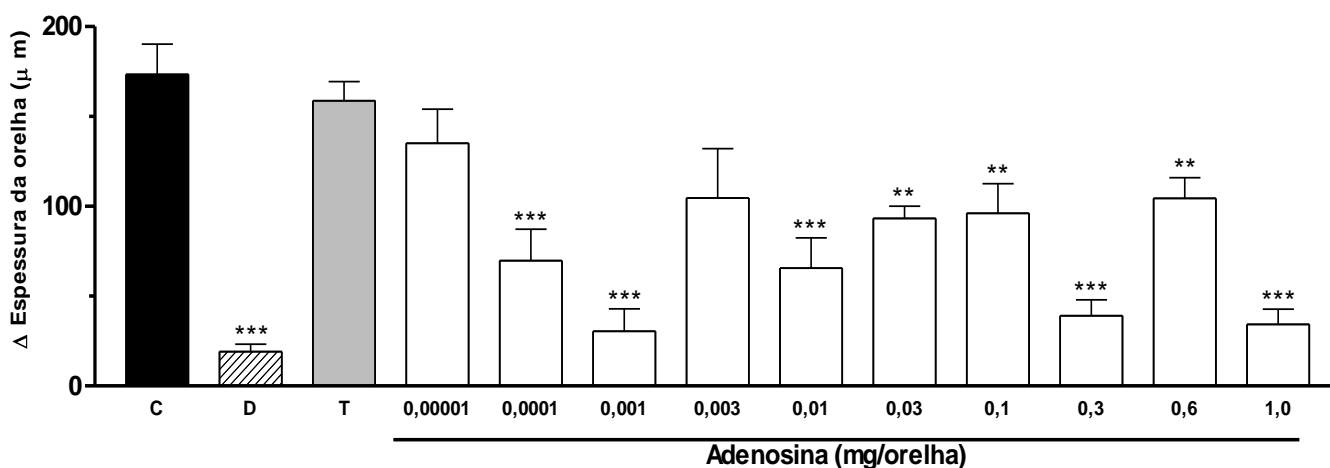


Figura 6: Efeito da adenosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, em camundongos. Os animais foram tratados com aplicação tópica de óleo de cróton e avaliados 6 horas após. A barra fechada (C) corresponde ao grupo controle, representado por animais tratados somente com óleo de cróton (0,4mg por orelha); a barra hachurada (D), o grupo que recebeu tratamento com dexametasona (0,05 mg/ orelha); a barra cinza (T), o grupo tratado com veículo tween (0,5%); as barras abertas, os grupos tratados com adenosina nas doses indicadas. Cada grupo representa a média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado significativo **P < 0,01 e ***P < 0,001 quando comparado ao grupo veículo (T).

4.2. Efeito da Adenosina sobre a atividade da mieloperoxidase

A figura 7 mostra que a aplicação tópica de adenosina (0,00001 – 1,0 mg/kg) foi capaz de reduzir de maneira significativa a atividade da mieloperoxidase somente quando os animais foram tratados com uma dose de 1,0 mg/kg, com inibição de $77 \pm 2 \%$, quando avaliada 24 horas após a indução do edema pelo óleo de cróton.

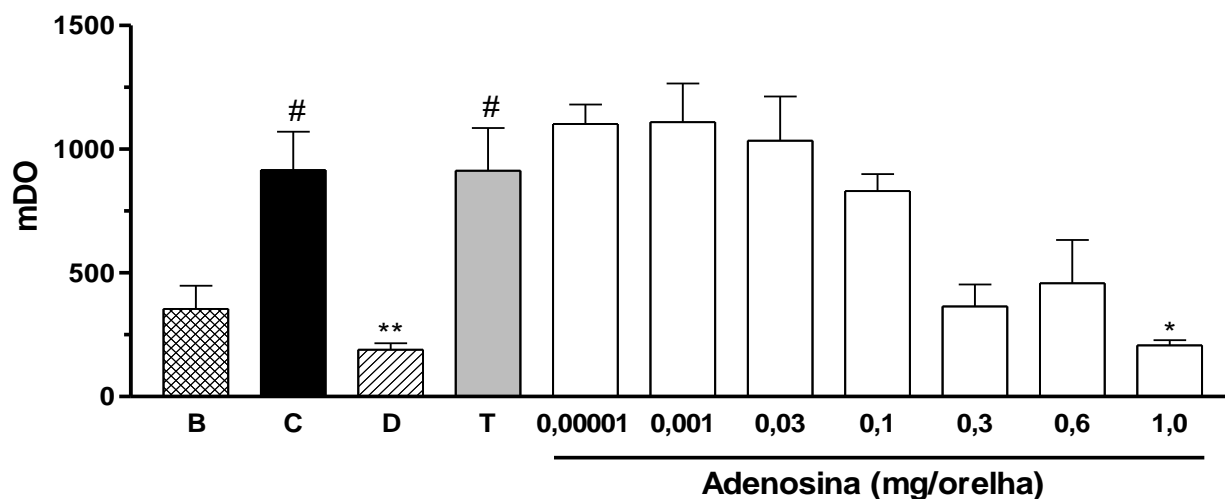


Figura 7 – Efeito da Adenosina sobre a atividade da mieloperoxidase. Os animais foram tratados com aplicação tópica de óleo de cróton e avaliados 24 horas após. A barra quadriculada (B) representa o grupo basal ou branco, no qual os animais não receberam qualquer tipo de tratamento; a barra fechada (C) corresponde ao grupo controle, no qual os animais foram tratados somente com óleo de cróton (0,4mg por orelha); a barra hachurada (D), o grupo tratado com dexametasona (0,05 mg/ orelha); a barra cinza (T), o grupo tratado com o veículo tween (0,5%); as barras abertas, os grupos tratados com adenosina nas doses indicadas. Cada grupo representa a média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado significativo * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo (T).

4.3. Histologia

Os cortes histológicos demonstrados na figura 8 indicam que a aplicação tópica de adenosina (0,001 e 1,0 mg/kg) foi capaz de inibir o edema induzido pelo óleo de cróton, como pode ser observado nas fotos dos cortes histológicos. Nessa análise foram utilizadas as orelhas que receberam tratamento de adenosina nas concentrações de 0,001 e 1,0 mg/kg, uma vez que estas foram as doses que apresentaram maior inibição no edema.

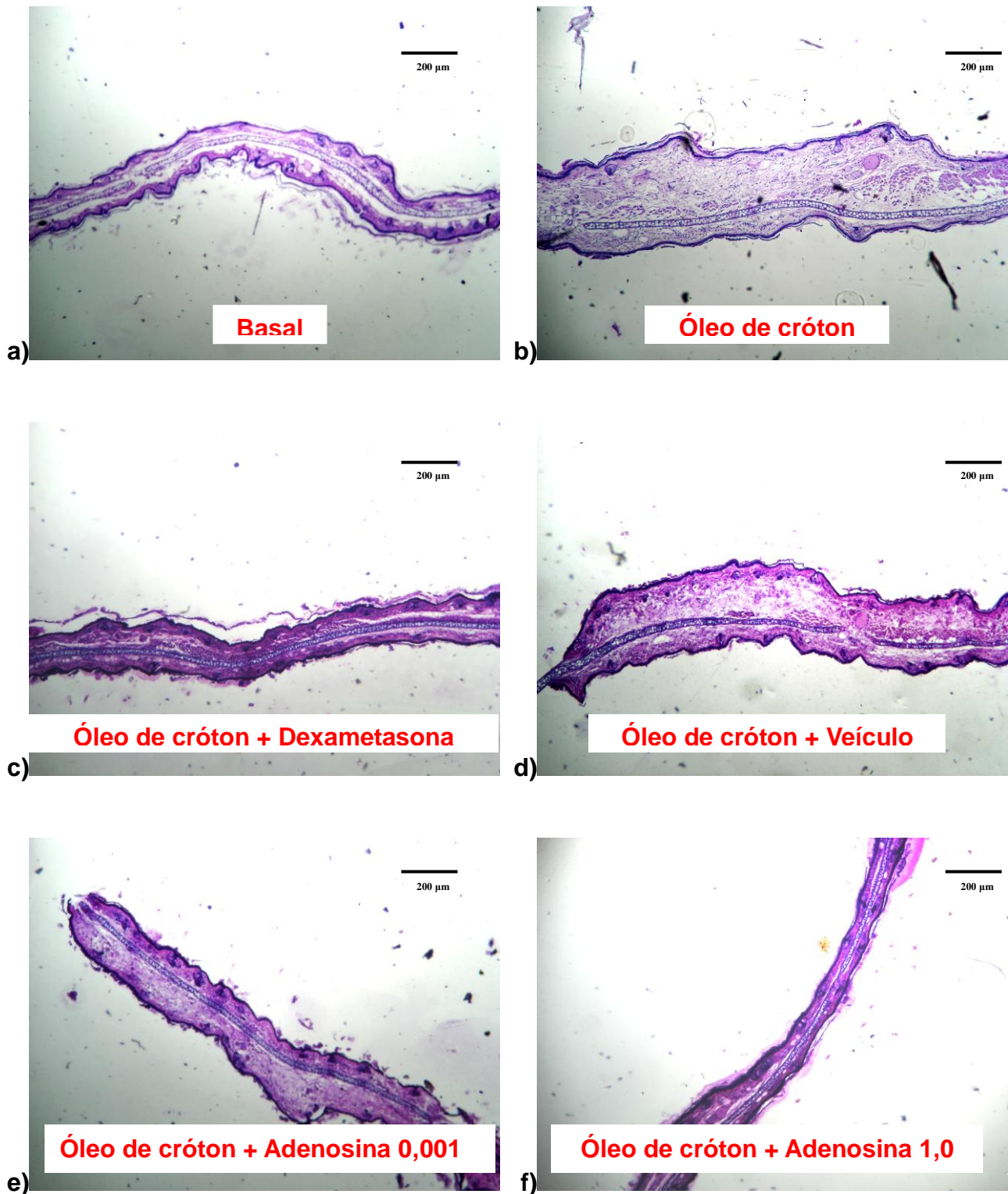


Figura 8 – Avaliação histológica após 6 horas da aplicação de óleo de cróton. Fotos representativas de 6 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina em aumento de 100x e escala de 200µm para avaliação do edema, que apresenta um pico máximo cerca de 6 horas após a aplicação do óleo de cróton. Nas fotos podem-se observar claramente as diferenças na espessura dos cortes de orelhas nos diferentes grupos tratados. A foto “a)” representa uma orelha que não sofreu qualquer tipo de tratamento, denominada basal. As demais fotos (b até f) representam orelhas de animais que receberam tratamento tópico de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), seguido dos respectivos tratamentos: Dexametasona 0,05 mg/orelha; veículo Tween 0,5% (diluído em acetona); adenosina 0,001 mg/orelha e adenosina 1,0 mg/orelha. Como pode ser observado nas legendas das fotos.

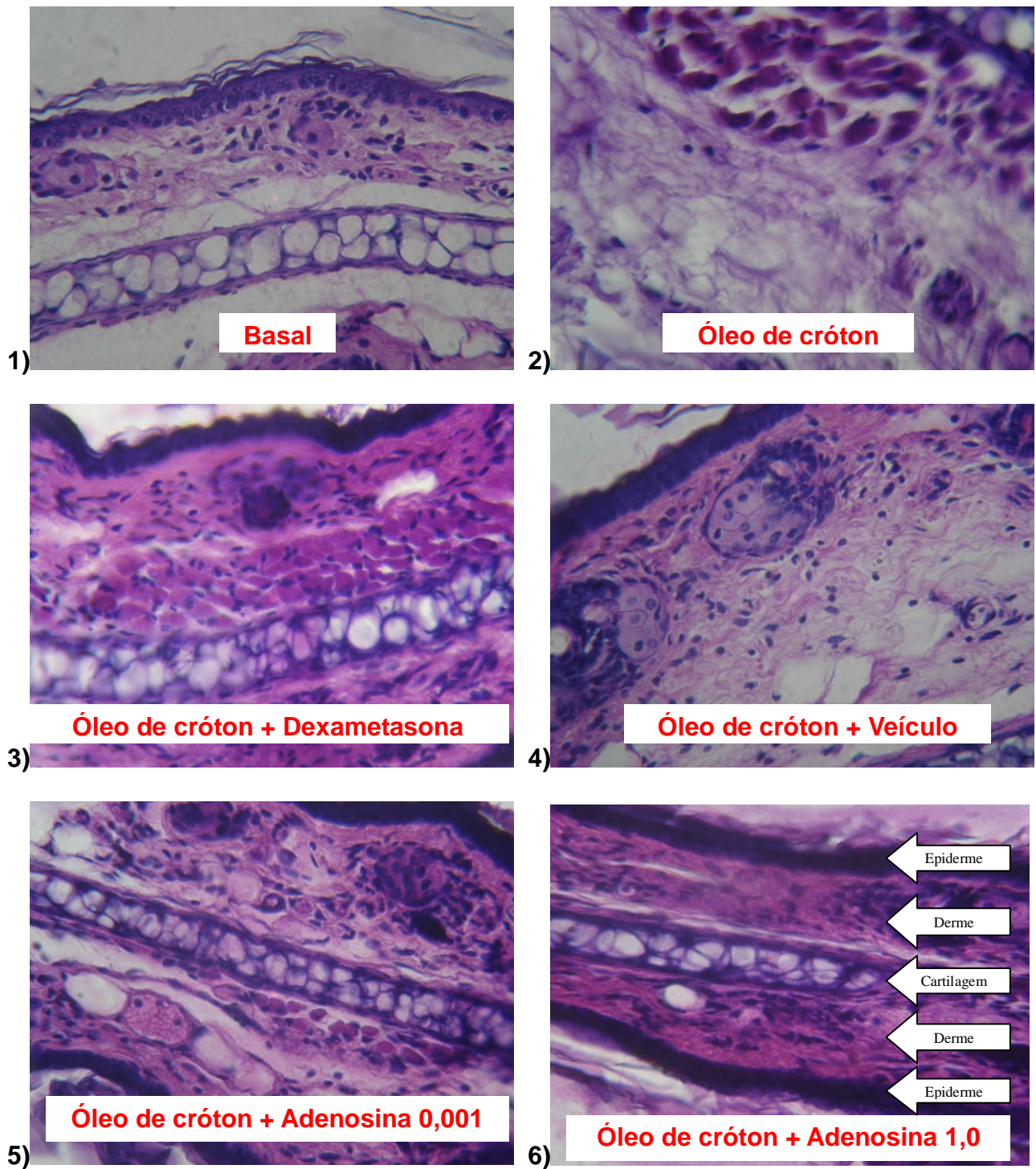


Figura 9 – Avaliação histológica após 6 horas da aplicação de óleo de cróton, maior aumento das fotos anteriores. Fotos representativas de 6 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina em aumento de 400x (fotos de 1 a 6) para avaliação do edema, que apresenta um pico máximo cerca de 6 horas após a aplicação do óleo de cróton. Nas fotos podem-se observar claramente as diferenças na espessura dos cortes de orelhas nos diferentes grupos tratados, bem como a variação da migração celular observada. A foto número “1” ,chamada de basal, representa uma orelha que não sofreu qualquer tipo de tratamento. As demais fotos representam orelhas de animais que receberam tratamento tópico de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), seguido dos respectivos tratamentos: Dexametasona 0,05 mg/orelha; veículo Tween 0,5% (diluído em acetona); adenosina 0,001 mg/orelha e adenosina 1,0 mg/orelha. Como pode ser visto nas legendas das fotos.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho contribuem para ampliar os conhecimentos acerca da atividade anti-inflamatória da adenosina. No nosso estudo, foi analisado o efeito da adenosina no edema de orelha induzido por óleo de cróton, um agente pró-inflamatório.

A adenosina é formada no meio extracelular por ação de ectoenzimas que são responsáveis pelo rápido metabolismo do ATP para adenosina difosfato, adenosina monofosfato, adenosina e hipoxantina entre outros, no espaço extracelular (POLOSA, 2002). O interesse nos efeitos anti-inflamatórios da adenosina e seus receptores aumentou quando foi demonstrado que drogas anti-inflamatórias como o metotrexato e sulfalazina apresentam como um dos mecanismos, o aumento da sua concentração endógena e dessa forma, são utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite-reumatóide (CRONSTEIN, 1994; SITKOVSKY, 2003).

Além de algumas drogas aumentarem os níveis de adenosina, que normalmente encontram-se entre 30-300 nM, no meio extracelular, lesões teciduais também podem promover uma elevação da sua concentração para níveis muito maiores. Estas situações promovem um desbalanço entre suprimento de energia e o gasto da mesma, como é observado em situações de baixo suprimento de oxigênio, necrose tecidual ou estresse, como resultado do catabolismo do ATP (SCHULTE e FREDHOLM, 2003). Muitos autores sustentam a hipótese de que este aumento da adenosina teria um efeito protetor para o tecido (CRONSTEIN, 1994; SITKOVSKY e OHTA, 2005).

Numerosos estudos mostram que a adenosina através da ativação dos seus diferentes subtipos de receptores (A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3) é um potente regulador da inflamação e do sistema imune inato (HASKO et al., 2008; VALLS et al., 2009). A ativação dos receptores A_1 e A_3 está ligada à redução do AMPc intracelular, enquanto a ativação dos receptores A_{2a} e A_{2b} , está ligada à um aumento do AMPc intracelular, com adicional ativação da PKA (proteína quinase A) (HASKÓ e CRONSTEIN, 2003).

Durante processos inflamatórios na pele, como o observado na cicatrização de feridas, os receptores para adenosina são funcionalmente expressos em diferentes tipos celulares que participam deste processo como macrófagos, células epidermais, fibroblastos e células da microvasculatura endotelial. Estes receptores apresentam diferentes padrões de expressão que diferem entre os tipos celulares mencionados, porém não foi bem estabelecido (FEOKTISTOV et al., 2002; VALLS et al., 2009).

Muitos trabalhos mostram que a ativação destes receptores durante o processo

inflamatório na pele apresentam importância farmacológica, uma vez que em modelos de cicatrização foi demonstrado que a aplicação tópica de agonistas para os receptores para adenosina A₁ e A_{2a} aumenta o processo de cicatrização (SUN, et al., 1999; MONTESINOS et al., 1997; MONTESINOS et al., 2002). Apesar de muitos trabalhos tratarem da adenosina na cicatrização da pele, estudos envolvendo modelos de inflamação na pele são escassos.

A aplicação tópica do óleo de cróton é um método usado para identificação de anti-inflamatórios esteroidais e agentes não esteroidais aplicados topicamente. O óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) apresenta como princípio ativo majoritário o TPA, 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; GÁBOR, 2000). Sua aplicação promove o desenvolvimento de eventos inflamatórios como formação de edema, infiltração e proliferação celular, com a produção de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (GABOR, 2000; OTUKI et al., 2005).

Os ésteres de forbol são diterpenos com propriedades anfilílicas que exercem sua ação ligando-se a uma proteína quinase chamada de PKC (proteína quinase C). A PKC também ativada pelo diacilglicerol (DAG), sendo que os ésteres de forbol ligam-se a esta enzima no mesmo sítio de ligação do DAG, no domínio C1, mimetizando a ação do mesmo (GOEL et al., 2007). Atualmente se tem conhecimento de que as PKCs compreendem um grupo de 12 isoenzimas, divididas em duas famílias, as clássicas (cPKC) e as novas (nPKC). Os ésteres de forbol são capazes de ativar as duas famílias da PKCs, com posterior ativação de diferentes vias de sinalização incluindo: a) as Raf-MEK (proteína quinase quinase ativada por mitogênio) - ERK 1 e 2 (quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2); b) vias das IKKs (I κ B quinases) que ativam o NF κ B (fator nuclear K β); c) outras vias como as que envolve ativação de p38 MAPK (p38 quinase ativada por mitogênio), JNK (cJUN – proteína quinase N-terminal) e NFAT (fator nuclear ativado em células T). Todas essas vias ativadas levam a efeitos em comum como proliferação e transformação celular, expressão de genes, morte celular e inflamação (YANG e KAZANIETZ, 2003).

Nosso estudo mostra que a administração tópica de adenosina é capaz de reduzir de forma significativa a formação de edema na orelha dos camundongos e migração celular, como pode ser confirmado com base nos ensaios de mieloperoxidase. Além disso, os dados obtidos com a análise histológica demonstram claramente a redução no edema tecidual e reforçam estes resultados. Tendo como base trabalhos da literatura, estes

dados sugerem que a adenosina apresenta um importante efeito no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton e talvez possa apresentar como possível mecanismo de ação, a ativação dos seus receptores.

Estudos acerca do papel da adenosina em processos inflamatórios relacionam diretamente seus efeitos com a ativação de seus receptores. Um dos receptores adenosinérgicos que está envolvido com sua ação anti-inflamatória é o receptor A_{2a} (SITKOVSKY, 2003). Estudos demonstram que a ativação do receptor A_{2a} reduz a migração celular, atenuação do extravasamento vascular (MONTESINOS et al., 2002; ELTZSCHIG et al., 2003). Além disso, aderência de neutrófilos ao endotélio, pode ser inibida pela ativação do receptor A_2 , porém estimulada pela ativação A_1 (CRONSTEIN et al., 1992; SITKOVISKY e OHTA, 2005). Em adição, outros estudos mostram que sua ativação, além de reduzir a migração neutrofílica, reduz a explosão respiratória em monócitos, degranulação e liberação de citocinas e quimiocinas (HASKÓ e CRONSTEIN, 2003; VALLS et al., 2009). Desta forma, um dos mecanismos que podem estar relacionados aos efeitos da adenosina no edema induzido pelo óleo de cróton, pode ser a ativação do receptor A_{2a} .

A ativação de outro receptor da classe A_2 , o receptor A_{2b} também pode estar envolvida na redução do edema de orelha, uma vez que Eltzschig e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação destes receptores reduz o extravasamento plasmático. Este trabalho levanta a hipótese de que o aumento do AMPc intracelular que ocorre após a ativação do receptor A_{2b} , em células endoteliais ativaria a PKA (proteína quinase A), que fosforilaria a VASP (fosfoproteína estimulante vasodilatadora), uma proteína que controla a geometria dos filamentos de actina presentes no citoplasma, o que mudaria a distribuição de complexos juncionais entre células endoteliais, promovendo aumento da barreira endotelial.

Outros efeitos anti-inflamatórios como redução da ativação celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias, também são descritos para os receptores A_{2b} (ELTZSCHIG et al., 2003), porém dados contraditórios são encontrados, uma vez que efeitos pró-inflamatórios foram descritos após a ativação deste receptor, como degranulação de mastócitos, com posterior liberação de histamina (POLOSA, 2002). Em adição, o receptor A_3 induz também a degranulação de mastócitos e em adição, migração de eosinófilos. Sua ativação parece estar relacionada diretamente à processos alérgicos (TILLEY et al., 2000).

Nossos resultados também demonstram que o tratamento com baixas doses de adenosina (0,0001-0,1 mg/kg, tópico) com excessão da dose de 0,003 mg/kg, foi capaz

de inibir o edema, sem no entanto, interferir na migração celular. Já o tratamento com doses mais altas como a de 1 mg/kg foi capaz de inibir ambos, edema e migração celular. Isto sugere mecanismos de ação diferentes para a adenosina, que podem envolver ou não receptores adenosinérgicos. Estudos adicionais com o uso de antagonistas específicos para os receptores de adenosina ajudarão a esclarecer este possível mecanismo dual.

O fato de a adenosina ser rapidamente convertida à inosina no sítio inflamatório e de ambos ligarem-se aos mesmos receptores e possuírem estruturas semelhantes, permitiu à vários autores sugerir que parte do efeito modulatório da adenosina se deve à inosina (LIAUDET et al., 2002; GÓMEZ e SITKOVSKY, 2003). Esta hipótese precisa ser investigada e facilitará a compreensão sobre os efeitos da adenosina na pele observados em nosso trabalho.

Em síntese nossos resultados demonstraram que a adenosina apresenta um efeito importante sobre o edema de orelha e migração celular, quando analisada no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Contudo, novos experimentos devem ser realizados utilizando outros agentes pró-inflamatórios, bem como, agonistas e antagonistas dos diferentes subtipos de receptores para a adenosina, para esclarecer o papel da mesma no controle da resposta inflamatória na pele.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo estendem os dados presentes na literatura sobre inflamação na pele. Neste estudo foi mostrado que a adenosina aplicada topicamente foi capaz de reduzir a inflamação na pele causada pela ativação de PKC. Este efeito possivelmente está ligado à ativação dos receptores para adenosina. Em nosso estudo, a adenosina interferiu principalmente com o edema, no entanto este não foi dependente da dose. Quanto à migração leucocitária, o efeito inibitório da adenosina ocorreu apenas nas maiores doses, sugerindo que talvez os mecanismos de controle do edema podem não ser os mesmos que interferem com a migração celular. Os resultados sugerem que receptores diferentes possam estar envolvidos, dependendo da dose. Como a adenosina é convertida à inosina no sítio inflamatório, não podemos descartar a participação da inosina neste efeito, uma vez que já foi demonstrado que a inosina apresenta atividade anti-inflamatória. Assim, novo estudo seria fundamental para esclarecer os mecanismos através dos quais a adenosina atua na pele como anti-inflamatória.

7 REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; SMITH, K.D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Sem. Immunol.**, 16:55-67, 2004.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. **N. Engl. J. Med.**, 358:1483-94, 2008.

BOS, J.D.; ZONNEVELD, I.; DAS, P.K.; KRIEG, S.R.; VAN DER LOOS, C.M.; KAPSENBERG, M.L. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. **J. Invest. Dermatol.** 88: 569–573, 1987.

BOS, J. D. & KAPSENBERG, M. L. The skin immune system (SIS): its cellular constituents and their interactions. **Immunol. Today**, 7:235–240, 1986.

BOS, J. D. & KAPSENBERG, M. L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. **Immunol. Today**, 14:75–78, 1993.

BOURS, M.J.L.; SWENNEN, E.L.R.; VIRGILIO, F. D.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Therap.**, 112: 358-404, 2006.

BURSCH, L.S.; WANG, L.; IGYARTO, B.; KISSENPENNIG, A.; MALISSEN, B.; KAPLAN, D.H.; HOGQUIST, K.A. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. **J. Exp. Med.**, 204:3147–3156, 2007.

CLARK, R.A.; CHONG, B.; MIRCHANDANI, N.; BRINSTER, N.K.; YAMANAKA, K.; DOWGIERT, R.K.; KUPPER, T.S. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. **J. Immunol.**, 176: 4431–4439, 2006.

CRONSTEIN, B. N. Adenosine and endogenous anti-inflammatory agent. **J. Appl. Physiol.**, 76(1): 5-13, 1994.

CRONSTEIN, B.N.; LEVIN, R.I.; PHILIPS, N.; HIRSCHHORN, R.; ABRAMSON, S.B.;

WEISSMANN, G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors, **J. Immunol.**,148:2201-2206, 1992.

DAVIES, D.E.; WICKS, J.; POWELL, R.M. et al. Airway remodeling in asthma: new insights. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**; 111: 215–225. 2003.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M. et al. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. **J. Clin. Invest.**, 109: 1271–1277, 2002.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN W & KEPPLER, D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, 230: 330–332, 1985.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, 118: 503–508, 2000.

EDELE, F.; MOLENAAR, R.; GÜTLE, D.; DUDDA, J.C.; JAKOB, T.; HOMEY, B.; MEBIUS, R.; HORNEF, M.; MARTIN, S.F. Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. **J. Immunol.** 181, 3745–3749, 2008.

EMOTO, M.; MIYAMOTO, M.; YOSHIZAWA, I. et al. Critical role of NK cells rather than V alpha 14(b)NKT cells in lipopolysaccharide-induced lethal shock in mice. **J. Immunol.**, 181, 3745–3749, 2008.

FANTONE J. C.; WARD, P. A.. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, p.34-58, 1990.

FEOKTISTOV, I.; GOLDSTEIN, A.E.; RYZHOV, S.; ZENG, D.; BELARDINELLI, L.; VOYNO-YASENETSKAYA, T.; BIAGGIONI, I. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. **Circ Res.**, 90(5):531–8, 2002.

FOSTER, C.A.; YOKOZEKI, H.; RAPPERSBERGER, K.; KONING, F.; VOLC-PLATZER, B.; RIEGER, A.; COLIGAN, J.E.; WOLFF, K.; STINGL, G. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. **J. Exp. Med.**, 171: 997–1013, 1990.

FOZARD, J.R.; PFANNKUCHE, H.J.; SCHUURMAN, H.J. Mast cell degranulation following adenosine A₃ receptor activation in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 298: 293-297, 1996.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, AP.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. **Pharmacol. Rev.**, 53: 527–552, 2001.

FRIEDL, H.P.; TILL, G.O.; TRENTZ, O. & WARD, P.A. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am. J. Pathol.**, 135: 203–217, 1989.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications.** Budapest: Akade´miai Kiado´, p. 24–37, 2000.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug. Disc.**, 3:401-416, 2004.

GINHOUX, F.; COLLIN, M.P.; BOGUNOVIC, M.; ABEL, M.; LEBOEUF, M.; HELFT, J.; OCHANDO, J.; KISSENPFENNIG, A.; MALISSEN, B.; GRISOTTO, M.; SNOECK, H.; RANDOLPH, G.; MERAD, M. Blood-derived dermal langerin⁺ dendritic cells survey the skin in the steady state. **J. Exp. Med.**, 204: 3133–3146, 2007.

GÓMEZ, G.; SITKOVSKY, M. V. Differential requirement for A_{2a} and A₃ adenosine receptors for the protective effect of inosine *in vivo*. **Blood**, 102(13):4472-4478, 2003.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. **Int. J. Toxicol.**, 26: 279–288, 2007.

GRANUCCI, F.; FEAU, S.; ANGELI, W. et al. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. **J. Immunol.**, 170: 5075–5081, 2003.

GRANUCCI, F.; FEAU, S.; ZANONI, I. et al. The immune response is initiated by dendritic cells via interaction with microorganisms and interleukin-2 production. **J. Infect. Dis.**, 187(supplement 2): S346–S350, 2003.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunol.**, 25: 33-38, 2004.

HASKO, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B., PACHER, P.; Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nat Rev Drug Discov.**, 7(9):759–70, 2008.

HUANG, S.; APASOV,S.; KOSHIBA, M.; SITKOVSKY, M. Role of A2a extracelular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. **Blood**, 90:1600-1610, 1997.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 54:1–13, 1989.

LAPA, F.R. **Avaliação da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico bruto da *Polygala paniculata* L.**, Curitiba, 2006 (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Paraná.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int. J. Exp. Path.**, 88: 85-94, 2007.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, 2:787-795, 2002.

LEONARD, W.J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. **International Journal of Hematology**; 73: 271–277. 2001.

LEON, L.R.; WHITE, A.A. & KLUGER, M.J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **Am. J. Physiol.**, 275(1 part 2): R269–R277, 1998.

LIAUDET, L. M.; MABLEY, J.G.; PACHER, P.; VIRÁG, L.; SORIANO, F.G.; MARTON, A.; HÁSKÓ, G.; DEITCH, E.A.; SZABÓ, C. Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. **Ann. Surg.**, 235(4): 568-578, 2002.

- LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol. Lett.**, 85: 131–134, 2003.
- LIVINGSTON, M.; HEANEY, L. G.; ENNIS, M. Adenosine, inflammation and asthma – a review. **Inflamm. Res.**, 53:171–178, 2004.
- MACEWAN, D.J. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. **Br. J. Pharmacol.**, 135: 855–875, 2002.
- MILLER, L. S. & MODLIN, R. L. Human keratinocyte Tolllike receptors promote distinct immune responses. **J. Invest. Dermatol.**, 127:262–263, 2007.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. & HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43:109–142, 1991.
- MONTESINOS, C.M.; DESAI, A.; CHEN, J.F.; YEE, H.; SCHWARZSCHILD, M.A.; FINK, J.S.; CRONSTEIN B.N. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. **Am. J. Pathol.**, 160(6):2009-2018, 2002.
- MONTESINOS, M.C.; GADANGI, P.; LONGAKER, M.; SUNG, J.; LEVINE, J.; NILSEN, D.; REIBMAN, J.; LI, M.; JIANG, C.K.; HIRSCHHORN, R.; RECHT., P.A.; OSTAD, E.; LEVIN, R.I.; CRONSTEIN, B.N.; Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. **J. Exp. Med.**, 186:1615-1620, 1997.
- MORA, J.R.; CHENG, G.; PICARELLA, D.; BRISKIN, M.; BUCHANAN, N.; VON ANDRIAN, U.H. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. **J. Exp. Med.** 201: 303–316, 2005.
- NAGAO, K.; GINHOUX, F.; LEITNER, W.W.; MOTEGI, S.; BENNETT, C.L.; CLAUSEN, B.E.; MERAD, M.; UDEY, M.C. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 106: 3312–3317, 2009.

NESTLE, F.O.; MEGLIO, P. D.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, 9: 679-691. 2009.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; BAHJAT, K.S.; UNGARO, R.; TANNAHILL, C.L.; MURDAY, M.; BAHJAT, F.R.; ABOUHAMZE, Z.; TSAI, V.; LAFACE, D.; HUTCHINS, B.; MOLDAWER, L.L.; CLARE-SALZLER, M.J. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. **J. Immunol.**, 168: 3412–3418, 2002.

O’SULLIVAN, S.T.; LEDERER, J.A.; HORGAN, A.F.; CHIN, D.H.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. **Ann. Surg.**, 222: 482–490, 1995.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and -amyryn pentacyclic triterpene. **Eur. J. Pharmacol.**, 507:253–259, 2005.

PARRILLO, J.E.; PARKER, M.M.; NATANSON, C. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Inter. Med.**, 113: 227–242, 1990.

POLOSA, R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. Respir. J.**, 20: 488-496, 2002.

POULIN, L.F.; HENRI, S.; DE BOVIS, B.; DEVILARD, E.; KISSENFENNIG, A.; MALISSEN, B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. **J. Exp. Med.** 204:3119–3131, 2007.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M. & JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp. Dermatol.**, 17:1063–1072, 2008.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, 50: 413-492, 1998.

RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M.; MENDONÇA, A. adenosine receptors in nervous system: pathophysiological implications. **Prog. Neurobiol.**, 68: 377-392, 2002.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHEL, R.N. **Basic Pathology**. Saunders; 8 edition, 960p, 2007.

ROBERT C.; KUPPER T. S. Inflammatory Skin Diseases, T Cells, and Immune Surveillance. **N. Engl. J. Med.**, 341(24):1817-1828, 1999.

ROBINSON, D.S. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. **Chem. Immunol.**, 78: 50–61, 2000.

ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. In: Vane, J.R.; FERREIRA, S.H., **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag, p.6- 25, 1978.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog. Neurobiol.**, 69: 313-340, 2003.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell Signal**, 15(9):813–27, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18: 385–405, 2004.

SITKOVISKY, M. V. Use of the A(2A) adenosine receptors as a physiological immunosuppressor an to engineer inflammation in *vivo*. **Biochem. Pharmacol.**, 65(4): 493-501, 2003.

SITKOVISKY, M.V.; OHTA, A. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends Immunol.**, 26(6):299-304, 2005.

SPLETTSTOESSER, W.D. & SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. **Microsc. Res. Tech.**, 57: 441–455, 2002.

STREILEIN, J. W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. **J. Invest. Dermatol.** 80:12S–16S, 1983.

SUN, L.L.; XU, L.L.; NIELSEN, T.B.; RHEE, P.; BURRIS, D: Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth. **J. Surg. Res.**, 87:14–24,1999.

SWENNEN, E.L.R.; BAST, A.; DAGNELIE, P.C. Purinergic receptors involved in the immunomodulatory effects of ATP in human blood. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 348: 1194-1199, 2006.

TABERNEIRO, A.; SCHNEIDER, F.; POTENZA, M.A.; RANDRIAMBOAVONJY, V.; CHASSEROT, S.; WOLF, P.; MITOLO-CHIEPPA, D.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immuno-localization and influence on vascular tone. **Int. Care Med.** 29: 262–270, 2003.

TILLEY, S.L.; WAGONER, V.A.; SALVATORE, C.A.; JACOBSON, M.A.; KOLLER, B.H. Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. **J Clin Invest.**, 105: 361-367, 2000.

TORTORA G. J. **Corpo humano – fundamentos de anatomia e fisiologia**. Artmed; 6ª edição; 718p, 2006..

VALLS, M.D.; CRONSTEIN,N.B.; MONTESINOS, M.C. Adenosine receptor agonists for promotion of dermal wound Healing. **Biochem. Pharmacol.**, 77:1117-1124, 2009.

VARMA, T.K.; LIN, C.Y.; TOLIVER-KINSKY, T.E. & SHERWOOD, E.R. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, 9: 530–543, 2002.

VICTOR-VEJA, C.; DESAI, A.; MONTESINOS, M.C.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine A2A receptor agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet-derived growth factor (Becaplermin gel). **Inflammation**. 26(1):19–24, 2002.

WILBUR, S.L.; MARCHLINSKI, F.E. Adenosine as an antiarrhythmic agent. **Am. J. Cardiol.**, 79: 30-37, 1997.

WOLK, K.; DÖCKE, W.D.; VON BAEHR, V.; VOLK, H.D.; SABAT, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. **Blood**, 96: 218–223, 2000.

WYSOCKA, M.; ROBERTSON, S.; RIEMANN, H. et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. **J. Immunol.**, 166: 7504–7513, 2001.

YANG, C.; KAZANIETZ, M.G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. **Trends Pharmacol. Sci.**, 24(11):602-8, 2003.

YOUNG, H.W.; MOLINA, J.G.; DIMINA, D.; ZHONG, H.; JACOBSON, M.; CHAN, L.N.; CHAN, T.S.; LEE, J.J.; BLACKBURN, M.R. A₃ adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. **J. Immunol.**, 173(2): 1380-1389, 2004.