

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
BRUNO DALLA VECCHIA DE OLIVEIRA

**"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DA INOSINA NO
MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON EM
CAMUNDONGOS."**

CURITIBA
2009

Bruno Dalla Vecchia De Oliveira

**"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DA INOSINA NO
MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON EM
CAMUNDONGOS."**

Projeto de monografia.

Laboratório de inflamação, dor e febre;

Departamento de Farmacologia;

Setor de Ciências Biológicas;

Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

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

Co-orientadora:

Msc. Fernanda da Rocha Lapa

CURITIBA

2009

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
1. Introdução.....	7
1.1 Inflamação.....	7
1.2 Pele.....	11
1.2.1 A pele como um órgão do sistema imune.....	11
1.2.2 As Doenças de pele.....	14
1.3 Inosina.....	17
2. Objetivos.....	20
2.1 Gerais.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. Materiais 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 do óleo de cróton.....	22
3.4 Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....	22
3.5 Análise Histológica.....	23
3.6 Análise estatística.....	23
4. Resultados.....	24
4.1 Efeito da inosina em modelo de edema induzido por óleo de cróton.....	24
4.2 Efeito da inosina na atividade da MPO (mieloperoxidase).....	25
4.3 Histologia.....	26
5. Discussão.....	28
6. Conclusão.....	33
7. Referencias Bibliográficas.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células imunes hospedadas na pele. (Modificado de NESTLE et al, 2009).....	13
Figura 2	Via de biosíntese da Inosina. (figura modificada de POLOSA et al,2002).....	18
Figura 3	Efeito da inosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, em camundongos.....	24
Figura 4	Efeito da inosina sobre a atividade da mieloperoxidase.....	25
Figura 5	Avaliação da análise histológica 24 horas após a aplicação tópica de óleo de cróton.....	27

RESUMO

As doenças inflamatórias da pele apresentam uma série de características em comum: hiperproliferação de queratinócitos e infiltração de neutrófilos na epiderme assim como a infiltração de células T, macrófagos, linfócitos e monócitos na derme e epiderme. Dentro deste contexto, vários estudos mostram que purinas como a adenosina e seu metabólito, a inosina, apresentam importante efeito imunomodulador. A inosina é considerada um ligante natural dos receptores de adenosina denominados: A1, A2_A, A2_B e A3 e tem sido proposto que a inosina exerce seus efeitos anti-inflamatórios através da ativação dos mesmos. Vários estudos mostram que a inosina apresenta importante papel anti-inflamatório em modelos de asma, colite, sepse e artrite, sendo também descritos efeitos semelhantes para seu predecessor metabólico, a adenosina. Entretanto, existem poucos estudos mostrando a ação destas purinas, mais especificamente da inosina em modelos de inflamação cutânea. O presente estudo mostra que a inosina, testada no modelo de inflamação aguda induzida por óleo de cróton, foi capaz de reduzir significativamente o edema de orelha nas doses de 0,1 a 1,0 mg/orelha, apresentando uma inibição máxima de $57 \pm 12\%$ para a dose de 1,0 mg/orelha. A inosina também reduziu de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas doses de 0,3 a 1,0 mg/orelha, com inibição máxima de $84 \pm 6\%$ para a dose de 0,6 mg/orelha. A análise histológica demonstrou redução na migração celular e edema, corroborando os resultados anteriores. Os dados obtidos sugerem que a inosina apresenta potencial anti-inflamatório quando aplicada topicamente, um efeito que pode estar relacionado com ativação de receptores para adenosina. Desta forma a inosina torna-se um novo alvo de estudo para inflamações cutâneas. Novos experimentos serão conduzidos para tentar esclarecer esta hipótese, bem como o papel da inosina na pele.

ABSTRACT

Inflammatory skin diseases have a series of common features, such as: keratinocytes hyperproliferation and neutrophils infiltration in the epidermis and infiltration of T cells, macrophages, lymphocytes and monocytes in the dermis and epidermis. Within this context, several studies show that purines such as adenosine and its metabolite, inosine, present a significant immunomodulatory effect. Inosine is considered a natural ligand of adenosine receptors known as A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃, and it has been proposed that inosine exerts its anti-inflammatory effects through the activation of these receptors. Several studies show that inosine plays an important anti-inflammatory effect in models of asthma, colitis, sepsis and arthritis. However, there are few studies showing the action of these purines, especially inosine in models of skin inflammation. This study shows that inosine, tested in the model of acute inflammation induced by croton oil, was able to significantly reduce ear edema at doses 0.1 to 1.0 mg/ear, with a maximum inhibition of $57 \pm 12\%$ at 1.0 mg/ear. Topical application of inosine also reduced significantly the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) from 0.3 to 1 mg/ear, with a maximum inhibition of $84 \pm 6\%$ (0.6 mg/ear). The histological analysis show a reduction in cell migration and edema, confirming previous results. These data suggest that inosine has a potential anti-inflammatory effect when applied topically, an effect that may be related to activation of adenosine receptors. Thus, the inosine becomes a new target to study skin inflammatory processes. New researches are required in order to clarify the role of inosine in the skin and in skin diseases.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

Inflamação é o termo genérico para definir a cascata de eventos que ocorrem em resposta a uma infecção ou lesão ao tecido. A principal função da inflamação é o reparo da lesão levando o tecido ao estado de homeostase (BARTON et al, 2008).

Em um nível básico a resposta inflamatória pode ser vista como dois ramos interconectados, a resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune inata é o ramo mais antigo. As células que participam desta resposta usam receptores invariáveis os TLR (tool like receptors) para detectar e sinalizar a ocorrência de uma invasão por agentes infecciosos. Estes sinais possuem duas principais funções: iniciar uma cascata inflamatória, que ajuda a conter a infecção, e a ativação da resposta imune adaptativa, o segundo ramo do sistema imune (BARTON et al, 2008).

Assim, imunidade inata não age apenas como a primeira linha de defesa contra agentes nocivos, mas após o reconhecimento do estímulo apropriado, ela fornece os sinais que instruem o sistema imune adaptativo a montar uma resposta (LAWRENCE et al, 2002). A resposta imune adaptativa consiste na proliferação de linfócitos antígeno-específicos, um processo altamente efetivo e específico, porém demora dias para ser totalmente desenvolvido (BARTON et al, 2008).

Inflamação pode ser dividida em duas categorias principais, aguda e crônica, baseando-se na duração e nas características patológicas. As doenças inflamatórias crônicas incluem artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, a silicose, aterosclerose e doença inflamatória intestinal. Essas doenças são caracterizadas por um período prolongado, semanas, meses ou anos em que inflamação, destruição do tecido e reparação da lesão estão acontecendo ao mesmo tempo. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas da inflamação crônica (SHERWOOD et al, 2004).

A resposta inflamatória ideal é específica e auto-limitante. A importância deste balanço é demonstrada uma vez que em infecções crônicas ou doenças auto-imunes, a resposta inflamatória causa mais dano que seu agente ativador (BARTON et al, 2008).

A inflamação aguda é caracterizada por curta duração (horas ou dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de plasma, e migração de células, primariamente neutrófilos, ao local da lesão e em alguns casos ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD et al, 2004).

Os sinais cardinais da inflamação, rubor, calor, edema e dor são iniciados pelo reconhecimento da resposta imune inata. Células da resposta imune adaptativa podem agravar esses efeitos, mas o sinal que inicia e promove a resolução da inflamação são inicialmente do sistema imune inato (BARTON et al, 2008).

O principal ativador da inflamação aguda é o reconhecimento de microorganismos e antígenos pelos receptores do sistema imune inato. A resposta inflamatória a infecções é tradicionalmente dividida em quatro fases: reconhecimento da infecção, recrutamento de células ao local da infecção, eliminação do microorganismo, resolução da inflamação e retorno da homeostase (BARTON et al, 2008).

A vasodilatação, clinicamente definida como rubor e calor na região injuriada do tecido, tem como propósito facilitar a solubilização local de mediadores e a migração de células inflamatórias. Pode ser induzida por inflamação, neste caso é mediada primariamente por óxido nítrico (NO), bradicinina, histamina, substância P e prostaglandinas. Inicialmente a vasodilatação acontece nas arteríolas, seguido da abertura de poros microvasculares. Em casos de inflamação sistêmica severa assim como sepsia, a vasodilatação pode causar hipotensão sistêmica e choque (SHERWOOD et al, 2004).

Além da vasodilatação, outro sinal inicial da inflamação é a formação de edema. O edema é causado pelo fluxo de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício como um resultado da ação de histamina, bradicinina e leucotrienos, componentes do sistema complemento e fator ativador de plaquetas. Esses mediadores alteram as funções da barreira dos vasos sanguíneos e aumentam a permeabilidade de capilares e vênulas para água. Ao mesmo tempo o aumento da permeabilidade vascular, aumento transitório da pressão hidrostática e a diminuição da pressão oncótica plasmática nos capilares, agem para induzir o fluxo transvascular de fluido e proteínas ao interstício inflamado. A função dessas alterações é permitir o

acesso de fatores como anticorpos e proteínas ao local da inflamação (SHERWOOD et al, 2004).

Existem muitos outros mediadores que coordenam os eventos iniciais da inflamação aguda como aminas vasoativas, citocinas e quimiocinas. Estes regulam adaptações vasculares, o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão, que facilitam o movimento das células inflamatórias da circulação periférica para o local da inflamação (LAWRENCE et al, 2002).

Citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IL-1, ativam uma sequência de sinalização nas células endoteliais que promovem a expressão de moléculas de adesão para a captura de leucócitos circulantes (LAWRENCE et al, 2002). Neutrófilos são atraídos primeiro, seguidos de um fluxo de monócitos algumas horas depois (BARTON et al, 2008). Além das citocinas, outros agentes quimioatratores como moléculas solúveis de produtos bacterianos ou produzidos por leucócitos, como componentes do sistema complemento, quimiocinas e leucotrienos, também atraem células de defesa para o local da inflamação.

As quimiocinas são divididas em pelo menos quatro famílias, duas das quais foram amplamente descritas, alfa e beta. A família alfa contém a IL-8 um poderoso quimioatrativo para neutrófilos. A família beta é um poderoso quimioatrativo para uma variedade de leucócitos incluindo basófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (SHERWOOD et al, 2004).

A transmigração dos leucócitos é um processo dividido em vários eventos distintos: marginação, rolamento, adesão e transmigração. Marginação é o processo de movimentação dos leucócitos da região central do vaso para a periferia dos vasos. Após marginação uma interação adesiva fraca se desenvolve entre leucócitos e as células endoteliais mantendo a sua proximidade com o endotélio vascular (SHERWOOD et al, 2004).

As interações que permitem o rolamento de leucócitos são facilitadas por selectinas e seus receptores. Selectinas são uma família de glicoproteínas de superfície celular que são expressas em leucócitos, células endoteliais e plaquetas. As forças combinadas das ligações de selectina e do fluxo vascular promovem o rolamento dos leucócitos. Ao longo do rolamento um processo de alta adesão ocorre. Este processo é

fundamental para a transmigração celular e é mediado pela ação de integrinas e seus receptores.

As integrinas são uma família de proteínas heterodiméricas compostas de unidades alfa e beta. As beta-2 integrinas e ICAMs são constitutivamente presentes na superfície de leucócitos e das células endoteliais, mas sua expressão é aumentada durante o processo inflamatório, promovendo a transição de rolamento para adesão que é caracterizada por uma forte adesão dos leucócitos para o endotélio (SHERWOOD et al, 2004).

Após a adesão o leucócito penetra no endotélio e membrana basal para entrar no ambiente inflamado. Os leucócitos passam através das junções celulares, processo facilitado pela retração das células endoteliais. Outras moléculas de adesão como moléculas de adesão plaquetas-células endoteliais (PECAM-1), que se localizam na superfície lateral das células endoteliais, assim como em neutrófilos, facilitam a transmigração (SHERWOOD et al, 2004).

Os leucócitos entram no sítio inflamatório armados com uma bateria de mecanismos que podem lesar microorganismos e o próprio tecido. Não apenas possuem grânulos com proteinases capazes de degradar material fagocitado, mas produzem substâncias reativas de oxigênio e nitrogênio que desnaturam proteínas, quebram lipídios e danificam DNA (BARTON et al, 2008).

Quando chegam ao local da inflamação os neutrófilos fagocitam antígenos e direcionam o conteúdo de seus grânulos para o fagossoma formado. Porém, se o leucócito não encontrar um antígeno, mas for ativado por mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , os mesmos liberam o conteúdo de seus grânulos para o tecido de forma a criar um ambiente inóspito para qualquer patógeno próximo. O conteúdo desses grânulos não é apenas tóxico para microorganismos e causa dano significativo aos próprios tecidos e células. Essa toxicidade não é aleatória ou acidental, sua função é conter uma possível infecção na fase crítica antes que uma resposta imune completa tenha sido criada. Independente da resposta dos neutrófilos eles resultam no mesmo destino: morte por apoptose e sua remoção por macrófagos (BARTON et al, 2008).

Se a resposta inflamatória obteve sucesso contra os antígenos, a resposta muda para sinais anti-inflamatórios e de resolução da inflamação (BARTON et al, 2008). Está

claro que os mediadores anti-inflamatórios endógenos revertem as alterações vasculares e inibem a migração e ativação de leucócitos, além de promover uma remoção segura das células inflamatórias através de apoptose e fagocitose (LAWRENCE et al, 2002). Várias famílias de mediadores derivados de lipídio têm um papel importante. Particularmente lipoxinas, protectinas e resolvinas enviam sinais anti-inflamatórios que promovem a resolução da inflamação e reparação do tecido.

Os mais estudados são lipoxinas, derivadas do ácido araquidônico através de lipooxigenases. As lipoxinas param a migração de neutrófilos, promovem a remoção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos e recrutam monócitos que ajudam na remoção de células e detritos de tecidos (BARTON et al, 2008).

Os agentes anti-inflamatórios endógenos mais poderosos já descritos até agora são os glicocorticóides. Os glicocorticóides e seus miméticos sintéticos são usados para o tratamento de inúmeras doenças inflamatórias crônicas, incluindo artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, asma, psoríase e vasculite. A ação dos glicocorticoides ocorre através da ligação a receptores citoplasmáticos de hormônios esteróides que migram até o núcleo e antagonizam a transcrição de genes pro-inflamatórios. Por outro lado eles também induzem a expressão de proteínas que tem uma ação anti-inflamatória (LAWRENCE et al, 2002).

1.2 PELE

1.2.1 A Pele como um órgão do sistema imune

Em sua estrutura a pele pode ser dividida em duas porções principais: uma porção superficial, de menos espessura, composta de tecido epitelial, chamada de epiderme; e uma parte mais profunda e mais espessa, composta de tecido conjuntivo, denominada derme. A hipoderme encontrada baixo da derme forma uma tela subcutânea, no entanto sem fazer parte da pele. 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 função mais importante da pele é formar uma barreira entre o interior e o exterior do organismo. A epiderme compreende as barreiras físicas, químicas, bioquímicas através da imunidade inata e as barreiras da imunidade adaptativa. As barreiras físicas consistem quase exclusivamente do estrato córneo, mas a epiderme nucleada em particular as junções célula a célula associadas a proteínas de citoesqueleto conferem uma barreira extra. As barreiras químicas e bioquímicas consistem de lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas e macrófagos. E a barreira imunológica adaptativa consiste dos componentes humorais e celulares do sistema imune (PROKSCH et al, 2008).

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 (Figura 1). 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).

O maior mecanismo usado pelos queratinócitos para participar dos eventos imunes e inflamatórios é a produção de citocinas, ativando vários membros do sistema imune na pele: células de langerhans e células T da epiderme e macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células T da derme (figura 1). O vasto repertório de citocinas produzidas pelos queratinócitos é provavelmente a razão mais relevante para considerar a pele como um órgão imune (WILLIAMS et al, 1996).

As queratinas são as proteínas de maior importância estrutural sintetizadas pelos queratinócitos. Dessa forma é uma proteína fibrosa que ajuda no processo de formação da estrutura do corpo. Sua constituição é de 15 aminoácidos, sendo a cisteína a mais predominante. Elas assumem um padrão de rede formada por filamentos que emanam de um anel perinuclear e se estendem pelo citoplasma até os desmossomos e hemidesmossomos. Durante o estágio final de diferenciação os queratinócitos são alinhados de forma altamente organizada através de interações com filagrina, uma proteína da matriz. Esta proteína agrega os filamentos de queratinócitos em feixes. Esse processo causa o colapso da célula e subsequente achatamento, característico

dos corneócitos. Estes são células anucleadas, que se situam na camada mais externa da pele, o estrato córneo. O estrato córneo serve de principal barreira contra lesões mecânicas, químicas e microorganismos capazes de lesionar o tecido. Também é responsável pela regulação da eliminação de água pelo organismo na atmosfera, conhecida como: perda de água transepidermal. Apesar de o estrato córneo ser reconhecido como a barreira física mais importante, as outras camadas da epiderme também tem importância significativa nesta função (PROKSCH et al, 2008).

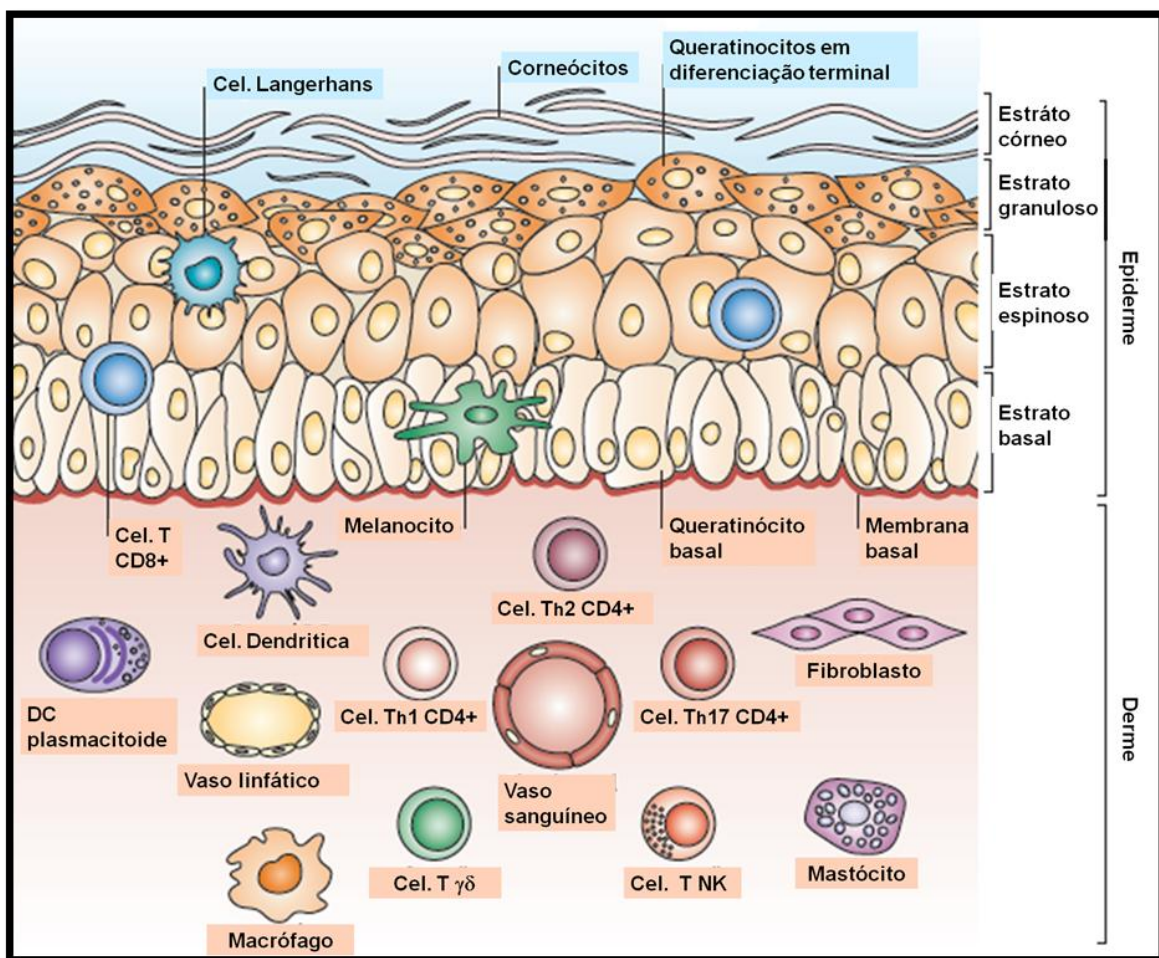


Figura 1: Células imunes hospedadas na pele (Modificado de NESTLE et al, 2009).

Na camada nucleada da epiderme podemos citar mecanismos de barreira como as junções fortes, que são junções célula-a-célula que conectam células vizinhas e controlam a passagem paracelular de moléculas e separam a região apical da

basolateral na membrana celular. Junções aderentes e desmossomos que mantêm a coesão do tecido, e as junções gap, que permitem a passagem de íons pequenos (PROKSCH et al, 2008).

A derme hospeda um grande número de mastócitos do tecido conjuntivo. Mastócitos expressam uma grande afinidade por IgE e são conhecidas por sua participação nas respostas alérgicas mediadas por IgE. Entre tanto outros estímulos como neuropeptídios e componentes do sistema complemento também podem causar a liberação de mediadores. Os mediadores pré-formados nos grânulos dos mastócitos incluem aminas vasoativas, fatores quimiotáticos de neutrófilos e eosinófilos, TNF- α e várias proteases (WILLIAMS et al, 1996).

As células de langerhans são caracterizadas por um tipo especial de organela citoplasmática conhecida como o grânulo de birbeck. Tradicionalmente as células de langerhans são distinguidas de outras células pela expressão de langerina. Elas estão entre as primeiras células dendríticas a entrar em contato com antígenos (NESTLE et al, 2009). Como normalmente residem na epiderme, as células de langerhans podem ser mobilizadas por um estímulo e deslocar-se ao linfonodos da região onde assumem o papel de células apresentadoras de antígeno, dando sequência na resposta imune adaptativa (WILLIAMS et al, 1996).

1.2.2 As doenças de pele

As doenças dermatológicas que tem em sua etiologia, componentes inflamatórios e ou imunológicos nas quais se incluem as dermatites, eczemas e psoríase, caracterizam-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável na pele e necessitam de tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, os quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões (SOARES et al., 1995). Essas doenças inflamatórias de pele afetam vários indivíduos no mundo e a prevalência dessas doenças tem duplicado nos últimos 10 a 15 anos (RUSSEL-JONES et al., 2005; LJOBOJEVIE et al., 2002).

Os mecanismos envolvidos na patogênese dessas doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas iniciadas por um processo alérgico ou

irritativo. Assim, tais patologias não apresentam necessariamente o mesmo perfil e conseqüentemente o mesmo tipo de tratamento (FIRESTEIN et al., 2004; LEUG et al., 2004).

A ocorrência do rompimento da barreira de impermeabilidade, hiperproliferação da epiderme e inflamação, presentes em vários distúrbios epidérmicos como a dermatite alérgica ou de contato, dermatite atópica e psoríase podem agravar o estado da doença (PROKSCH et al, 2008).

Dentre as doenças de pele podemos citar a psoríase que é uma doença crônica de pele e que afeta aproximadamente 1-2% dos adultos. A maioria dos casos são de uma variedade chamada psoríase vulgar que afeta de 85 a 90% das pessoas acometidas com a doença. Psoríase é considerada uma doença severa uma vez que os doentes tem vergonha da aparência de sua pele e devido os efeitos colaterais dos medicamentos.

Assim como outras enfermidades crônicas os pacientes tem reduzidas possibilidades de trabalho e qualidade de vida reduzida (NESTLE et al, 2009). A psoríase é caracterizada pela formação de placas cutâneas cobertas com descamação da pele. Histologicamente as placas de psoríase mostram a hiperproliferação de queratinócitos e infiltração de neutrófilos na epiderme assim como a infiltração de células T, células dendríticas e macrófagos na derme e epiderme. A psoríase é considerada uma desordem de natureza imune, entretanto, sua etiologia é indeterminada (KUPPER et al, 2004).

Já a dermatite atópica é uma doença comum que afeta pessoas de todas as faixas etárias em todo mundo. Em crianças tem uma porcentagem de 7-17% de ocorrência e entre esse casos 60% persistem até a vida adulta. Atopia é a predisposição hereditária para alergias ou hipersensibilidade. O termo dermatite atópica é usado para descrever um tipo de doenças cutâneas associadas com algumas condições: rinite alérgica, queratoconjuntivite alérgica, asma e eczema, que podem ser vistos em todas as faixas etárias. Clinicamente a dermatite atópica é caracterizada pela formação de lesões exsudativas eritematosas, nas dobras da pele, associadas com coceira intensa. Histologicamente apresenta infiltração de linfócitos, monócitos e macrófagos na derme e epiderme. A dermatite atópica aguda é mediada

especificamente por linfócitos T contra antígenos ambientais. Entretanto outros subgrupos de dermatites atópicas possivelmente apresentam outros mecanismos de gatilho para iniciar a inflamação (KUPPER et al, 2004).

A melhor compreensão da imunologia cutânea permitiu grandes avanços em relação ao desenvolvimento de novas terapias na última década e aumentou o arsenal de agentes disponíveis para o tratamento dessas doenças inflamatórias tanto na forma de monoterapia quanto na forma de um esquema terapêutico que inclui diferentes agentes utilizados simultaneamente (SKINNER et al., 2005).

Em busca desse objetivo alguns estudos mostraram que certos mediadores lipídicos podem ter um importante papel na resolução da inflamação como anti-inflamatórios endógenos (LAWRENCE et al, 2002).

Os agentes imunossupressores são utilizados no tratamento de afecções cutâneas que tenham em sua patogênese o envolvimento do sistema imune e exercem seus efeitos via inibição da produção ou ação da IL-2 (ex: tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina), inibição da expressão de genes de citocinas (ex: glicocorticóides), e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas (ex: micofenolato de mefetila) (RANG et al., 2003).

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas condições dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes permite a transição da terapia clássica com os glicocorticóides tópicos para a terapia com agentes imunomoduladores (SKINNER et al., 2005; NICKOLOFF et al., 2004).

Apesar de estarem disponíveis agentes cada vez mais específicos para o tratamento de doenças inflamatórias, os efeitos colaterais dos medicamentos atuais são um obstáculo a ser superado. Estes efeitos incluem entre outros: síndrome de Cushing iatrogênica, osteoporose e afinamento da pele, no caso dos corticóides imunossupressão com reativação de infecções latentes como tuberculose e risco aumentado de aparecimento de tumores malignos sólidos, no caso de agentes imunossupressores (DIAZ-BORJON et al., 2006).

Apesar de a terapêutica atual reduzir a sintomatologia e a progressão das doenças, a mesma não é considerada curativa uma vez que o processo inflamatório cutâneo instala-se novamente seguindo a interrupção do tratamento. Além disso, os

efeitos colaterais atribuídos aos medicamentos usuais podem reduzir a adesão à mesma, prejudicando a qualidade de vida do paciente. Isto vem instigando a busca de agentes anti-inflamatórios eficazes.

1.3 INOSINA

Muitos estudos indicam que os nucleosídeos endógenos adenosina e inosina apresentam um importante papel modulatório sobre a inflamação (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).

Os nucleosídeos purícos como a inosina, são moléculas de peso molecular baixo, envolvidas em uma ampla variedade de processos bioquímicos intracelulares. Estes nucleosídeos normalmente encontram-se em concentrações baixas no espaço extracelular, porém em condições de estresse metabólico como isquemia, hipóxia e processos inflamatórios suas concentrações aumentam consideravelmente (MABLEY et al., 2009), refletindo um aumento no metabolismo da adenosina.

De acordo, enquanto a concentração intersticial de inosina é em taxas micromolares, em tecidos apresentando sepsia foram observadas concentrações milimolares (Gomez et al, 2003).

Tanto a inosina e adenosina tem mostrado ação anti-inflamatória *in vitro*, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos humanos e de camundongos, estimulados com LPS. Em adição, *in vivo* um efeito semelhante foi observado após o tratamento com inosina em leucócitos estimulados por lipopolisacarídeos bacterianos (LPS) em modelos de inflamação pulmonar (LIAUDET et al, 2001). A inosina ainda atenuou doenças inflamatórias crônicas como colite (MABLEY et al., 2009).

Além disso, a inosina assim como outros análogos da adenosina são conhecidos por apresentar um papel importante na percepção de dor em vários modelos, incluindo agudo, neuropático e inflamatório (SAWYNOK et al, 2003).

A inosina também apresenta um papel protetor contra dano nos tecidos pulmonares e na musculatura esquelética em modelos de lesão induzida por reperfusão (SORIANO et al, 2001).

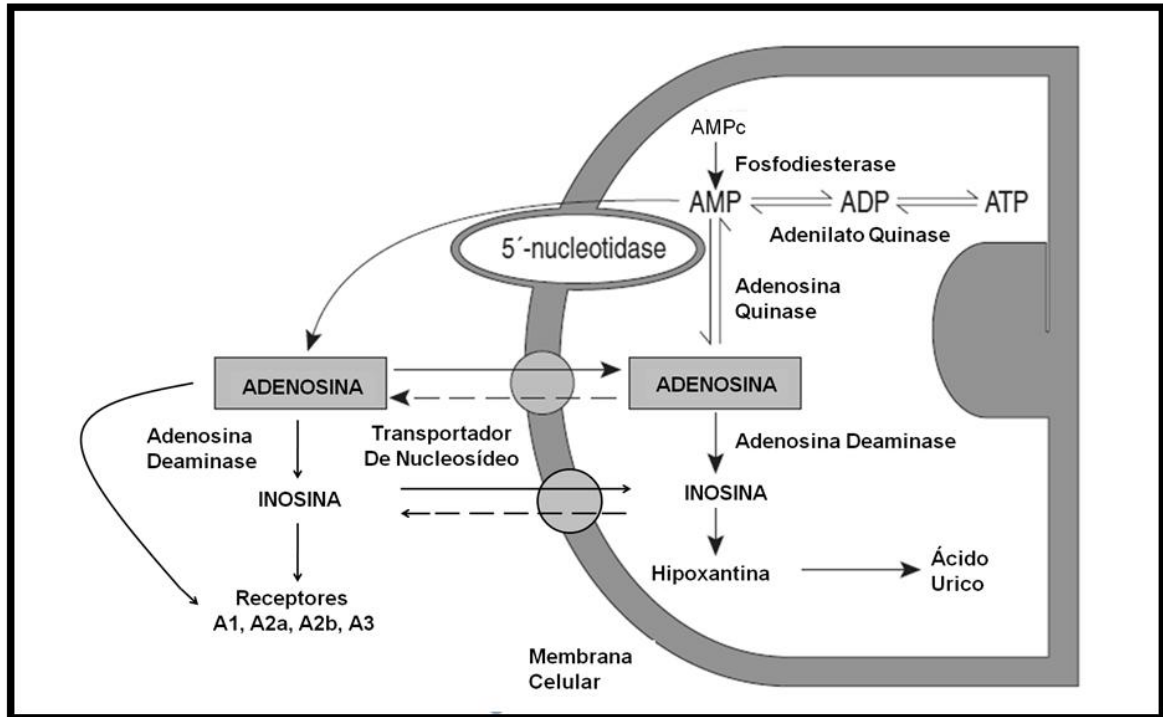


Figura 2: Via de biosíntese da Inosina. (figura modificada de POLOSA et al, 2002)

Até o momento, tem sido descrito que a inosina exerce seu papel fisiológico e imunomodulatório ligando-se aos mesmos receptores da adenosina. Estes são receptores de superfície de membrana, amplamente distribuídos, pertencentes à família P_1 (acoplados à proteína G), que quando ativados liberam segundos mensageiros (GÓMEZ E SITKOVISKY, 2003). Existem quatro subtipos de receptores de membrana para a adenosina que já foram identificados, são eles: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 . No epitélio os receptores encontram-se no tecido conjuntivo, células residentes do sistema imune e principalmente nos queratinócitos. Os subtipos de receptor A_1 e A_{2A} são chamados receptores de alta afinidade e os receptores A_{2B} e A_3 chamados de baixa afinidade

devido ao padrão de ligação da adenosina aos mesmos (FREDHOLM et al., 2001; GÓMEZ E SITKOVISKY, 2003).

A primeira evidência do efeito imunomodulatório da inosina vem da observação de que esta promove degranulação de mastócitos em concentrações de 5-10 mM, através da ligação com o receptor A_3 *in vitro*. Em mastócitos sem o receptor A_3 não foi observado o mesmo efeito. Este fato implica a inosina como um agente indutor de inflamação e alergia mediante degranulação de mastócitos (JIN et al, 1997; HASKO´ et al, 2004).

Em contraste, outros receptores parecem mediar efeitos anti-inflamatórios da inosina. Na presença dos antagonistas para os receptores A_1 e A_2 , a ação inibitória da inosina sobre a liberação de TNF- α (Fator de necrose tumoral α) em macrófagos, foi revertida. Neste estudo, foi demonstrado ainda, que em macrófagos sem o receptor adenosinérgico A_{2A} , o efeito da inosina foi reduzido, entretanto não foi eliminado completamente sugerindo uma contribuição parcial deste receptor na ação da inosina (LIAUDET et al., 2001).

Além disso, através da aplicação tópica de CGS-21680 (agonista específico para os receptores A_{2A} da adenosina), foi demonstrado que a ativação do receptor A_{2A} está relacionada com aumento da cicatrização de lesões na pele, bem como da angiogênese (MONTESINOS et al., 2002).

Apesar da ação cicatrizante e anti-inflamatória da adenosina ser amplamente discutida na literatura, nenhum estudo abordando a ação anti-inflamatória do seu metabólito inosina em modelos tópicos é encontrado, apesar de alguns trabalhos mostrarem sua ação anti-inflamatória em outros modelos experimentais incluindo colite, choque séptico e lesão pulmonar aguda.

Desta forma, este trabalho buscou verificar o possível papel imunomodulatório e anti-inflamatório da inosina, administrada topicamente, em modelos de inflamação na pele induzida por mediadores pró-inflamatórios, admitindo-se a expressão destes receptores no tecido cutâneo. Este estudo pôde facilitar a compreensão do papel destes mediadores endógenos e abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de uma nova terapia anti-inflamatória para doenças inflamatórias na pele.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar o potencial da inosina como agente anti-inflamatório tópico na inflamação cutânea induzida por óleo de cróton.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-inflamatório da inosina em modelo de edema de orelha em camundongos induzido por óleo de cróton;
- Avaliar os parâmetros de inflamação: hiperproliferação celular, edema e infiltração leucocitária através da análise histológica das amostras de orelha nos modelos de aplicação tópica de óleo de cróton;
- Avaliar a ação da inosina na migração de leucócitos polimorfonucleares através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25-35g) do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, 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 à 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 foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos (μm), de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B), antes e após determinado tempo da indução do processo inflamatório, dependendo do agente flogístico utilizado. Os compostos foram dissolvidos em acetona e tween 80 e aplicados na orelha direita dos camundongos. Para minimizar variações concernentes 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 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; GÁBOR, 2000).

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 µl de acetona. A inosina (0,01-1 mg/orelha) foi diluída no veículo Tween 80 (10µl) e em acetona e aplicada logo após a administração tópica do agente flogístico. 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 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 coletadas 24 horas após a aplicação do óleo de cróton e submetidas à avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e a quantificação de espécies reativas.

3.4 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi 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) foram adicionadas a 200µl de tampão fosfato de sódio 80mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizadas por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi adicionado a 1300µL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtúbos e centrifugada a 11.400 xg a 4 °C por 20 minutos. Duplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foi 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 foi 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 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) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/tecido.

3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de orelha foram coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com o aumento de 200x e zoom digital de 2.1x.

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 % as respostas dos grupos tratados em relação ao 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 version 3.00*, San Diego Califórnia, EUA.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA INOSINA EM MODELO DE EDEMA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON

Seis horas após a aplicação do óleo de cróton ocorreu um profuso aumento na espessura da orelha como apresentado na figura 3. A inosina, quando aplicada topicamente, inibiu significativamente o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, nas doses de 0,1 a 1 mg/orelha, com inibição máxima de $57 \pm 12\%$ para a dose de 1,0 mg/orelha, quando comparado ao grupo controle (C) e veículo (Tween) (Figura 3). O tratamento das orelhas com 0,5% de tween (veículo usado para dissolver a inosina) não alterou a resposta edematogênica causada pela aplicação do óleo de cróton (Figura 3). Além disso, para controle do ensaio, a aplicação tópica de dexametasona (0,05 mg/orelha), glicocorticoide usado como controle positivo, inibiu o edema de orelha causado pelo óleo de cróton em $83 \pm 3\%$ para a dose de 0,05 mg/orelha.

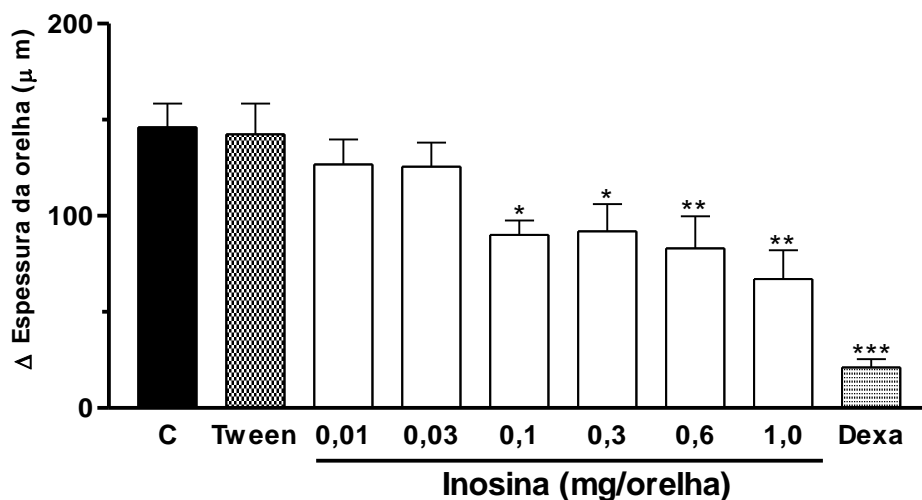


Figura 3: Efeito da inosina no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, em camundongos. Os animais foram tratados com aplicação tópica de óleo de cróton e avaliados 6 horas após. A barra fechada (C) corresponde ao grupo controle tratado somente com óleo de cróton (0,4 mg por orelha); a barra pontilhada (Dexta); grupo dexamentasona (0,05 mg/orelha); a barra xadrez (Tween), grupo veículo tween (0,5%); as barras abertas, grupo tratado com inosina nas doses indicadas. Cada grupo representa a média de 10 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado significante * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo veículo (Tween).

4.2 O EFEITO DA INOSINA NA ATIVIDADE DA MPO

Como esperado, 24 h após a aplicação de óleo de cróton na orelha de camundongos causou aumento na atividade da enzima MPO quando comparado com o tecido de animais não tratados (basal) (Figura 4). Os animais que receberam tween 0,5% e óleo de cróton na orelha não apresentaram alteração sobre o aumento da atividade da MPO tecidual quando comparado ao grupo que recebeu somente óleo de cróton. Já o tratamento tópico com inosina na orelha reduziu a atividade da enzima MPO nas doses de 0,3 a 1 mg/orelha quando comparado ao grupo Tween (0,5%, veículo usado para dissolver a inosina) e ao grupo Controle. O efeito inibitório máximo da inosina sobre a MPO foi de $84 \pm 6\%$ para a dose de 0,6 mg/orelha. A dexametasona usada como controle positivo também reduziu a atividade da MPO com inibição de $92 \pm 2\%$ para a dose de 0,05 mg/orelha.

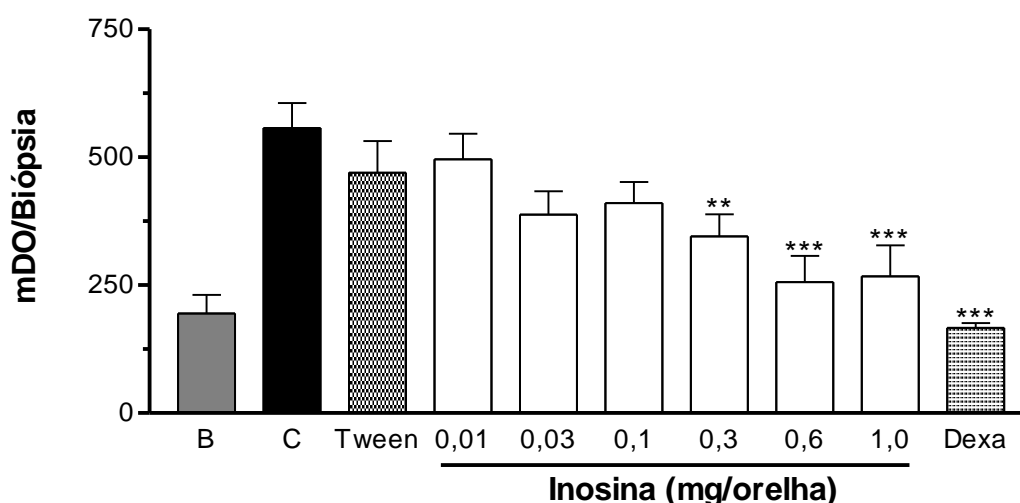


Figura 4 – Efeito da inosina sobre a atividade da mieloperoxidase. Os animais foram tratados com aplicação tópica de óleo de cróton e avaliados 24 horas após. A barra cinza (B) representa o grupo basal ou branco, não tratado; a barra fechada (C) corresponde ao grupo controle tratado somente com óleo de cróton (0,4 mg/orelha); a barra xadrez (Tween), grupo veículo tween (0,5 %); as barras abertas, grupo tratado com inosina nas doses indicadas a barra pontilhada (Dexta), grupo dexametasona (0,05 mg/orelha). Cada grupo representa a média de 10 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 (Tween).

4.3 HISTOLOGIA

A análise histológica foi realizada em amostras colhidas 24 horas após a aplicação da inosina na concentração de 1,0 mg/orelha, sendo esta a dose que apresentou maior efeito na redução do edema e efeito significativo na redução da atividade da MPO. Os resultados apresentados na figura 5 mostram que a aplicação de óleo de cróton causa aumento na espessura total da orelha (**A**) e é possível notar o aumento na concentração de neutrófilos (pontos mais escuros). O tratamento com o veículo não causou alteração significativa na resposta inflamatória do óleo de cróton (**B**). Ainda na figura 5 imagens **C** e **D**, a aplicação de inosina (1,0 mg/orelha) ou de dexametasona (0,05 mg/orelha) foram capazes de reduzir expressivamente o edema e a quantidade de células no tecido das orelhas causados pelo óleo de cróton.

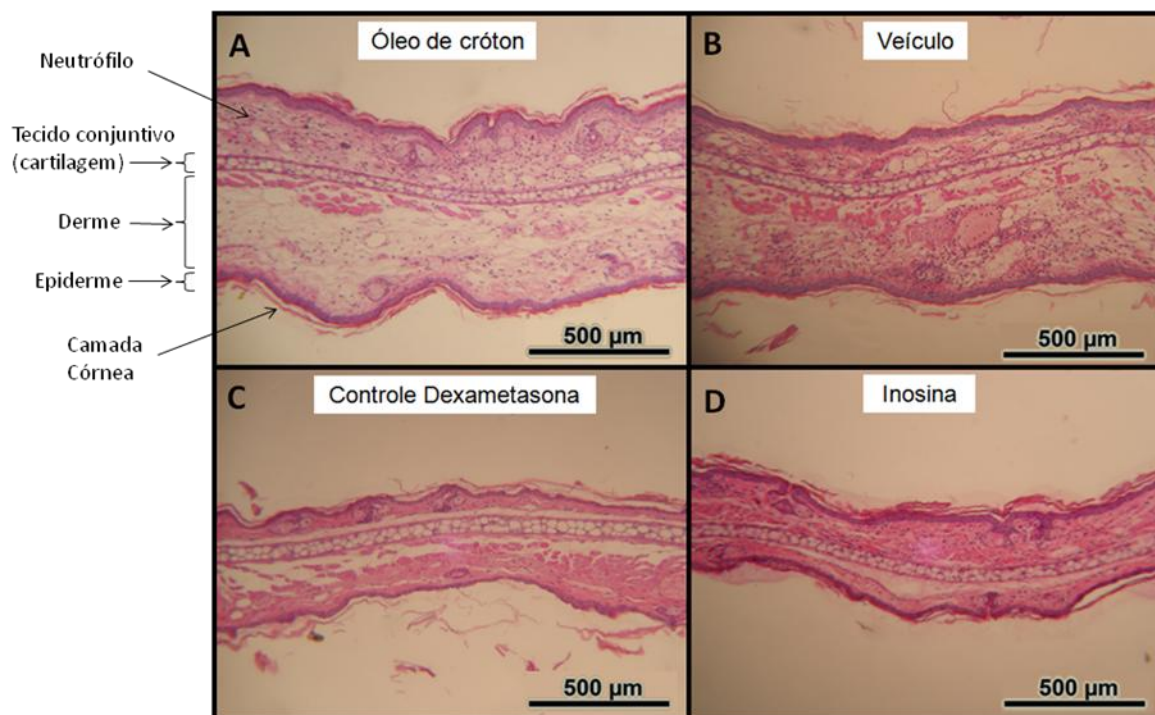


Figura 5: Avaliação da análise histológica 24 horas após a aplicação tópica de óleo de cróton. As fotos representam 5 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina em aumento de 200x. Nas imagens podemos ver a diferença na espessura dos cortes entre os diferentes grupos tratados. A imagem (a) corresponde ao grupo controle inflamado óleo de cróton (0,4 mg/orelha); (b) representa o grupo tratado com óleo de cróton e veículo (tween 80; 0,5 %); (c) representa o grupo tratado com óleo de cróton e dexametasona (0,05 mg/orelha); (d) corresponde ao grupo tratado com óleo de cróton e inosina (1,0 mg/orelha).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o potencial da inosina como um possível agente anti-inflamatório, utilizando o modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Após administração tópica da mesma, os parâmetros utilizados para a avaliação do seu possível efeito foram: avaliação do efeito anti-edematogênico, através da medida do edema de orelha, a análise da atividade da mieloperoxidase e histologia.

A aplicação tópica do óleo de cróton é um método usado para identificação de substâncias com possível atividade anti-inflamatória cutânea. O óleo é obtido a partir das sementes de cróton (*Croton tiglium* L.), é considerado um forte promotor tumoral, resultado atribuído a um éster de forbol, seu componente majoritário, o TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato) (SLOAN et al, 1989). Este é capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (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 compostos naturais que se ligam e ativam proteínas quinases chamadas de PKC, mimetizando a ação dos diacilgliceróis (SLOAN et al, 1989). Até o momento foram caracterizadas 12 isoenzimas que fazem parte da família das PKC e têm papel importante na regulação de processos fisiológicos como proliferação celular, diferenciação e apoptose. As PKCs, podem ser 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: as Raf-MEK (proteína quinase ativada por mitogênio) - ERK 1 e 2 (quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2); vias das IKKs (I κ B quinases) que ativam o NF- κ B (fator nuclear- κ B); outras vias como as que envolvem 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 et al, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a inosina, quando aplicada topicamente reduziu significativamente, o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. De acordo, em trabalho anterior nosso grupo mostrou que a adenosina, o precursor da inosina, foi capaz de reduzir o edema de orelha e a infiltração de neutrófilos na pele, utilizando mesmo modelo experimental que foi utilizado neste trabalho (DAMÁSIO, 2009).

Em modelos de cicatrização na pele estudos demonstraram que a aplicação tópica de agonistas seletivos para os receptores A₁ e A_{2A} da adenosina, promove a cicatrização de feridas, 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., 2002). Também 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, os quais apresentavam dificuldade de cicatrização (VICTOR-VEGA et al. 2002; VALLS et al, 2009).

Dentro deste contexto, trabalhos já descreveram que durante processos inflamatórios na pele, como o observado na cicatrização de feridas, os receptores para adenosina podem ser expressos em diferentes tipos celulares 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 o mesmo não foi bem estabelecido (FEOKTISTOV et al., 2002; VALLS et al., 2009). A inosina é considerada um ligante natural dos receptores de adenosina denominados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e tem sido proposto que a inosina exerce seus efeitos anti-inflamatórios através da ativação dos mesmos (GOMES e SITKOVSKY, 2003).

A inosina foi protagonista de inúmeros estudos científicos e apresenta efeitos contraditórios e aplicações nas mais diversas áreas. A inosina é vendida como um suplemento alimentar disponível na maioria das lojas de alimentos saudáveis e para atletas, que consomem inosina para melhorar seu desempenho. Nenhum efeito

colateral é observado após consumo da inosina, embora não exista comprovação científica deste efeito (MARKOWITZ et al, 2009).

Atualmente existem muitos trabalhos mostrando os efeitos da inosina em modelos experimentais diversos de inflamação, como por exemplo, em trabalhos com esclerose múltipla. Neste estudo a inosina reduziu predominantemente as lesões inflamatórias na bainha de mielina, causadas pela destruição das células de Schwann por células imunes nos dendritos e axônios das regiões internas do sistema nervoso central (massa branca), a principal característica da esclerose múltipla. A inosina quando administrada via oral eleva os níveis de ácido úrico no plasma o que é benéfica para pacientes com esclerose múltipla (MARKOWITZ et al, 2009).

Outro modelo experimental de inflamação envolvendo a inosina é o de colite (MABLE et al, 2009). Foi demonstrado que a inosina suprime efetivamente o desenvolvimento de colite *in vivo*. A inosina tem efeito anti-inflamatório, desde que administrada junto com o agente causador de colite, o dextran sulfato de sódio (DSS) ou administrada após o desenvolvimento da doença. Também aumenta dramaticamente a sobrevivência em modelos de colite crônica. A inosina mudou o perfil de citocinas presentes na colite de forma que reduziu as quimiocinas MIP-1 e MIP-2 que são envolvidas na resposta inata e adaptativa, uma vez que recrutam e ativam células T e monócitos.

O tratamento com inosina reduziu a infiltração de leucócitos no espaço alveolar em modelos de inflamação pulmonar, tanto na contagem de células como na atividade da MPO (LIAUDET et al 2002). Os autores também verificaram que a inosina diminuiu os níveis de IL-8 e suprimiu a expressão de TNF- α , IL-1 e IL-6 significativamente. Em análises histológicas o dano causado pela inflamação foi menos pronunciado uma vez que o tratamento com inosina reduziu os eritrócitos e leucócitos nos alvéolos.

Em ambos os estudos citados (LIAUDET et al., 2002), no modelo de colite e no modelo de inflamação pulmonar, os efeitos apresentados pela inosina foram atribuídos à ativação dos receptores A₃ da adenosina. Além disso, a participação do receptor A_{2A} e A₃ parece mediar os efeitos anti-inflamatórios da inosina num modelo de lesão hepática induzida por ConA e em modelo de endotoxemia induzida por LPS (GOMEZ e SITKOVSKY, 2003).

Por último podemos citar o estudo de MABLE e colaboradores (2009) que utilizou o análogo da inosina INO-2002, o qual possui meia-vida mais longa. O análogo INO-2002 reduziu a migração de leucócitos e os níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6 no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

De acordo com os resultados apresentados por esses trabalhos citados, em nosso estudo observamos uma significativa redução da atividade da MPO causada pelo tratamento com inosina no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. De maneira complementar, a análise histológica subsequente demonstrou redução na migração de leucócitos e também da espessura de orelhas tratadas com inosina. Os mecanismos responsáveis pelos efeitos das purinas, assim como a inosina, na inflamação não são completamente entendidos. Entretanto, três mecanismos foram identificados como possíveis principais moduladores do efeito anti-inflamatório (MABLE et al, 2009). Podemos citar o primeiro mecanismo como a capacidade funcional da inosina de ativar os receptores para adenosina, como já mencionado anteriormente. Um segundo mecanismo de ação da inosina ocorre pela modulação da ativação da enzima nuclear poli ADP-ribose polimerase (PARP). As purinas adenosina, inosina e hipoxantina, que têm similaridades estruturais com a NAD, o substrato da PARP, provocam sua ativação *in vitro*. O terceiro mecanismo de ação da inosina ocorre pela ação do seu metabolito ácido úrico, que mostrou degradar radicais óxidos e peroxinitratos. Dessa forma podemos atribuir o efeito da inosina a várias vias de ação não relacionadas (LIAUDET et al 2002).

Apesar de existirem três mecanismos propostos, o mais estudado na literatura é àquele relacionado com a ativação dos receptores para adenosina. Dessa forma, há uma grande probabilidade de a inosina tópica estar ativando receptores para adenosina. A inosina, no tecido inflamado, é formada rapidamente a partir da adenosina, pela ação da adenosina deaminase. Este dado, associado ao fato de ambos, adenosina e inosina, apresentarem grande semelhança estrutural e finidade pelos mesmos receptores (LIAUDET et al., 2002; GÓMEZ e SITKOVSKY, 2003), reforça ainda mais a hipótese de que a inosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores para adenosina. Ainda, experimentos adicionais utilizando antagonistas para os receptores da adenosina são necessários para verificar o envolvimento dos

mesmos nos efeitos anti-inflamatórios da inosina na pele. Sem uma maior investigação, esta e outras possibilidades não podem ser comprovadas ou descartadas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a aplicação tópica de inosina é capaz de reduzir o edema e a migração leucocitária no modelo de inflamação da pele induzida por óleo de cróton. Este efeito foi dependente da dose com relação à inibição do edema e da atividade da enzima MPO.

Logo, foi verificado que a inosina aplicada na pele tem efeito anti-inflamatório, reduzindo edema e migração de neutrófilos, e estendem os dados da literatura acerca da ação da inosina como modulador inflamatório. No entanto, para poder sugerir a inosina ou análogos para o tratamento de doenças de pele, é necessário aprofundar esta investigação quanto à eficácia, segurança e efeitos a longo prazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, 188: 431-420, 2008

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.

CEEA, 2003

DAMASIO, G.A.C. Análise da ação anti-inflamatória da adenosina no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas. **Universidade Federal Do Paraná**. 2009.

DE YOUNG, L. M., KHEIFETS, J. B., BALLARON, S. J., YOUNG, J. M. 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: 335-341, 1989.

DIAZ-BORJON, A., WEYAND, C.M., GORONZY, J.J. Treatment of chronic inflammatory disease with biologic agents: Opportunities and risks for the elderly. **Experimental Gerontology**, 41: 1250–1255, 2006.

FIRESTEIN, G.S., GOLDMAN, L.E., ANSIELLO, D. Mechanisms of inflammation and tissue repair. **Textbook of Medicine**, 22: 277, 2004.

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 A_{2B} receptors in angiogenic factor regulation. **Circ Res.**, 90(5):531–8, 2002.

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

GABOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation Protocols**, New Jersey: Humana Press., 129-131, 2003.

GABOR. M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

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.

HASKO', G., SITKOVSKY, M.V., SZABO', C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends in pharmacological sciences**. 25: 152-157, 2004.

JIN, X.; SHEPHERD, R.K.; DULING, B.R.; LINDEN, J. Inosine binds to A₃ adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **J. Clin. Invest.**, 100(11): 2849-2857, 1997.

KUPPER, T.S., FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, 4: 211-222, 2004.

LAWRENCE, T., WHILLOUGHBY, D.A., GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature reviews immunology**. 2: 787-795. 2002.

LEUG, D.Y.M., BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D., NOMURA, I. HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, 133: 651-657, 2004.

LIAUDET, L., MABLEY, J.G., PACHER, P.I., VIRA', L., SORIANO, F.G., MARTON, A., HASKO', G., DEITCH, E.A.D., SZABO', C. Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. **Annals Of Surgery**. 235: 568-578, 2002.

LIAUDET, L., MABLEY, J.G., SORIANO, F.S., PACHER, P., MARTON, A., HASKO', G., SZABO', C. 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, 2001.

LJUBOJEVIC, S., LIPOZENELE, J., BRENNER, S., BUDIMELE, D. Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19 year period. **Journal European Academy of Dermatology Venereology**, 16: 599-603, 2002.

MABLEY, J.G., PACHER, P., LIAUDET, L., SORIANO, F.G., HASKO', G., MARTON, A., SZABO' C., SALZMAN A.L. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 284: 138-144, 2003.

MABLE, J.G., PACHER, P., MURTHY, K.G.K., WILLIAMS, W., SOUTHAN, G.J., SALZMAN, A.L., SZABO, C. The novel inosine analogue, INO-2002, exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. **Shock**, 2003.

MARKOWITZ, C.E., SPITSIN, S., ZIMMERMAN, V., JACOBS, D., UDUPA, J.K., HOOPER, C., KOPROWSKI, H. The treatment of multiple sclerosis with inosine. **The journal of alternative and complementary medicine**. 15: 619-625, 2009

MONTESINOS, M.C., 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 A_{2A} receptors. **American Journal of Pathology**, 160(6): 2009-2017, 2002.

NESTLE, F.O., MEGLIO, P., QIN, Z.J., NICKOLOFF, B.J., Skin immune sentinels in health and disease. **Nature reviews Immunology**. 9: 679-691. 2009

NESTLE, F.O., KAPLAN, D.H., BARKER, J. Mechanisms of Disease: Psoriasis. **The new england journal of medicine**. 361: 496-509, 2009

NIKOLOFF, B.J., NESTLÉ, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, 13: 1664-1675, 2004.

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 -amyrin pentacyclic triterpene. **Eur. J. Pharmacol.**, 507:253–259, 2005.

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

PROKSCH, E., BRANDNER, J.M., JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, 17: 1063–1072. 2008

RANG, H. P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MÁÑEZ, S. RIOS, J.L. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 89: 131-137, 2003.

RUSSEL-JONES, R., POWELL, A.M., ACLAND, K., CALONJE, E., O'DOHERTY, M., HEALY, C. The changes of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **European Journal of Surgery Oncology**, 31: 210-211, 2005.

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

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

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, 8: 22-33, 2005.

SLOAN, A.P., PRIZE J. Studies and Prospectives of the Protein Kinase C Family for Cellular Regulation. **Cancer**, 63: 892-903, 1989.

SOARES, M. A. Medicamentos não prescritos. **Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa**, 1995.

Soriano, F.G., Liaudet, L., Marton, A., Haskó, G., Lorigados, C.B., Deitch, E.A., Szabó, C. Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. **Crit. Care. Med.**, 29: 703-708, 2001.

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.

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.

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.

WILLIAMS, I.R., KUPPER, T.S., Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, 58: 1485-1507, 1996

YANG, C.F., KAZANIETZ, M.G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. **Trends in pharmacological sciences**, 24:602-608, 2003.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J. Invest Dermatol.**, 82: 367-371, 1984.