

Fernanda da Rocha Lapa

**Efeitos da adenosina e inosina sobre a pleurisia e asma:
envolvimento dos receptores para adenosina**

CURITIBA

2012

Fernanda da Rocha Lapa

**Efeitos da adenosina e inosina sobre a pleurisia e asma:
envolvimento dos receptores para adenosina**

Tese de doutorado desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia e apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientadora:

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

CURITIBA

2012



PARECER

Comissão Examinadora da Tese de Doutorado “EFEITOS DA ADENOSINA E INOSINA SOBRE A INFLAMAÇÃO PLEURAL E PULMONAR: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA ADENOSINA.”, de autoria da pós-graduanda **FERNANDA DA ROCHA LAPA**, sob orientação do Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a. Dr.^a. Carla Denise Bonan (PUC/RS); Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR); Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Farmacologia-UFPR); Dr.^a Yanna Dantas Rattmann (Bioquímica-UFPR) reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 24 de abril de 2012.


Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Presidente - Farmacologia - UFPR)


Prof.^a. Dr.^a. Carla Denise Bonan (PUC-RS)


Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR)


Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Farmacologia - UFPR)


Dr.^a Yanna Dantas Rattmann (Farmácia - UFPR)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por ter permitido a realização deste trabalho e por ter estado sempre presente em todos os momentos.

Agradeço a minha família, pelo apoio e conselhos que sempre vieram na hora certa. Sem vocês tudo ficaria mais difícil!

Ao meu namorado, Vinícius Scalco Costa, pelo amor e compreensão, por compartilhar comigo os momentos bons e ruins, e ter sido um grande incentivador e parceiro.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, por me ensinar a trilhar o caminho científico, mostrar que vale a pena arriscar e por ser um exemplo de dedicação à pesquisa, ao trabalho e ao sucesso!

A minha coorientadora, Profa. Daniela de Almeida Cabrini, por ser um exemplo de dedicação à ciência e por ter me proporcionado boas oportunidades, entre elas de realizar estágio PROCAD.

Ao Prof. Wothan Tavares de Lima, professor do departamento de farmacologia da USP – São Paulo, por ser um exemplo de ética em pesquisa científica e como professor pesquisador, que nunca vou esquecer. A realização de grande parte deste estudo só se tornou possível em virtude da colaboração estabelecida, abertura, compreensão e dos ótimos momentos vividos em seu laboratório.

Quero agradecer, a Ana Paula Ligeiro (atual professora pesquisadora da UNINOVE), que me auxiliou em todos os momentos em que estive no laboratório do Prof. Wothan, pelo conhecimento transmitido, momentos de descontração e concentração que foram imprescindíveis para meu aprendizado e desenvolvimento deste estudo.

Agradeço também aos demais orientandos do Prof. Wothan que me ajudaram de maneira incondicional neste trabalho: João (Jonny), Beatriz (Bia), Luana (Lulu), Isabelli (Belli), Adriana (Adri), além de serem exemplos como colaboradores, vocês são meus amigos, companheiros de experimentos e de viagens! Vocês sempre vão morar no meu coração!

Ao Gabriel Araújo, minha admiração e gratidão pela parceria e experimentos com HPLC... Sem você o metabolismo das purinas ainda seria um grande mistério!

Aos meus amigos: Haíssa de Oliveira Brito e Felipe Barbosa, foi difícil, but we are the champions!

Ao meu amigo Alex Sandro Simas, sua alegria estará sempre entre nós.

Aos demais amigos e colegas do laboratório de inflamação: Luíze, Priscila, Bruna, Bruno, Verlaine, Camila, Graziela, Cíntia, Daniel, Arthur, vocês foram importantes no meu amadurecimento pessoal e profissional e sempre serão lembrados por terem compartilhado comigo dias de alegria e outros não tão bons assim.

As meninas do laboratório de cardiovascular: Priscila, Sandra, Yanna (atual docente do Departamento de Ciências da Saúde) e Rita, agradeço pela amizade, horas descontraídas de bate-papo e desabafos.

Aos amigos do LANDI: Marina, Deise, Franciane, Nei, Fábio, Serginho, Bira, Ana, Murilo, Josiel e Morgana entre um experimento e outro, um café e outro e várias risadas, vocês me deram a amizade que gostaria de compartilhar e ter por perto, por mais tempo.

Por último, agradeço todos demais colegas e docentes do departamento de farmacologia da UFPR, que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Aos animais, meu respeito e gratidão.

À CAPES/PROCAD pelo suporte financeiro.

“O doutorado não é só aprendizado científico e pedagógico, é sobre tudo uma experiência de vida!”

ASSIM MESMO

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil, assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos
verdadeiros.
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto assim mesmo.
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para
outra.
Construa assim mesmo.
Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja Feliz assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.
Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.”

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	i
	LISTA DE TABELAS.....	iv
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
	Resumo.....	x
	Abstract.....	xi
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O processo inflamatório.....	1
1.2	A inflamação pleural aguda e o modelo de pleurisia induzido pela carragenina.....	5
1.3	A asma.....	7
1.4	O tratamento da asma.....	10
1.5	A adenosina e o processo inflamatório.....	12
1.6	Inosina e processo inflamatório.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Animais.....	22
3.2	Drogas utilizadas.....	22
3.3	Métodos.....	23
3.3.1	Avaliação dos efeitos da adenosina e inosina sobre a resposta inflamatória aguda através do modelo de pleurisia induzida pela carragenina.....	23
3.3.1.1	Indução da pleurisia.....	23
3.3.1.2	Contagem celular de leucócitos e quantificação indireta do extravasamento de proteínas plasmáticas.....	24

3.3.1.3	Determinação dos níveis de TNF- α e IL-1 β no lavado pleural.....	24
3.3.1.4	Estudo do efeito sinérgico entre adenosina e inosina.....	25
3.3.1.5	Estudo do metabolismo da adenosina, utilizando o EHNA, um inibidor da adenosina deaminase.....	25
3.3.1.6	Determinação da atividade da adenosina deaminase.....	26
3.3.1.7	Avaliação do metabolismo da adenosina em inosina, xantina e ácido úrico através da análise por cromatografia de alta performance com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD).....	26
	a) Preparo da amostra.....	27
	b) Análise em cromatógrafo de alta performance.....	27
	c) Curva de calibração.....	27
	d) Identificação dos picos nas amostras.....	28
3.3.2	Avaliação dos efeitos da adenosina e inosina sobre o modelo de asma induzida pela ovoalbumina e sistema imune adaptativo.....	28
3.3.2.1	Sensibilização e broncoprovocação “in vivo”.....	28
3.3.2.2	Contagem de leucócitos sanguíneos.....	29
3.3.2.3	Lavado femural (LF).....	29
3.3.2.4	Lavado broncoalveolar (LBA).....	30
3.3.2.5	Cultura de “explants” pulmonares.....	30
3.3.2.6	Determinação dos níveis de IL-4 e IL-5.....	30
3.3.2.7	Análise das amostras histológicas pulmonares.....	31
3.3.2.8	Análise da mecânica pulmonar, frente ao estímulo com metacolina.....	31
3.4	Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Efeitos da adenosina na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	33
4.2	Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da adenosina, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	34

4.3	Efeitos da inosina na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	36
4.4	Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da inosina sobre a inflamação pleural em camundongos.....	37
4.5	Participação dos receptores A_2 para adenosina e efeitos do CGS21680, um agonista seletivo A_{2A} , na inflamação pleural.....	39
4.6	Efeitos da adenosina e inosina sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no exsudato pleural.....	40
4.7	Avaliação do efeito sinérgico entre a adenosina e inosina.....	41
4.8	Estudo do metabolismo da adenosina em inosina.....	43
4.8.1	Avaliação do metabolismo da adenosina em inosina através da administração do EHNA e determinação da atividade da adenosina deaminase.....	43
4.8.2	Estudo do metabolismo da adenosina através da determinação dos níveis plasmáticos de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico, por cromatografia de alta performance, com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD).....	45
4.9	Efeitos da adenosina sobre a asma induzida pela ovoalbumina em camundongos.....	49
4.10	Efeitos da inosina sobre a asma induzida pela ovoalbumina em camundongos.....	50
4.11	Efeitos da inosina sobre a contagem de leucócitos sanguíneos e medula óssea.....	51
4.12	Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da inosina, sobre a inflamação alérgica pulmonar, induzida pela OVA em camundongos.....	52
4.12.1	Avaliação no LBA.....	52
4.12.2	Avaliação da participação dos receptores para adenosina através da histologia de pulmão de camundongos corados com hematoxilina e eosina.....	53

4.12.3	Avaliação da participação dos receptores para adenosina na migração de mastócitos através de cortes histológicos de pulmão, corados com azul de toluidina.....	55
4.12.4	Participação dos receptores da adenosina e efeitos da inosina na liberação, “ex vivo” de IL-4 e IL-5.....	57
4.12.5	Participação dos receptores A _{2A} e efeitos do tratamento com inosina sobre a responsividade das vias aéreas, avaliados no modelo de mecânica pulmonar, “in vivo”.....	57
5	DISCUSSÃO.....	59
5.1	Adenosina e inosina na inflamação aguda pleural e seu metabolismo.....	59
5.2	Efeitos da inosina sobre a asma induzida experimentalmente pela ovoalbumina.....	66
6	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS.....	76
8	ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Migração leucocitária.....	3
Figura 2	Metabolismo intracelular e extracelular da adenosina e inosina, e interação com receptores para adenosina.....	12
Figura 3	Vias de sinalização intracelulares ligadas à ativação dos receptores para adenosina.....	15
Figura 4	Efeitos da adenosina na contagem total de leucócitos e extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	34
Figura 5	Participação dos receptores para adenosina, nos efeitos da adenosina na contagem total de leucócitos, extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	35
Figura 6	Efeitos da inosina na contagem total de leucócitos e extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	37
Figura 7	Participação dos receptores para adenosina, nos efeitos da inosina na contagem total de leucócitos, extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	38
Figura 8	Participação dos receptores A_{2A} nos efeitos do CGS21680, na contagem total de leucócitos, extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	40
Figura 9	Níveis de TNF- α e IL-1 β em exsudato pleural de camundongos pré-tratados com os antagonistas de receptores para adenosina e tratados com adenosina ou inosina	41

Figura 10	Efeito sinérgico do pré-tratamento com adenosina e inosina, na contagem total de leucócitos, extravasamento plasmático e contagem diferencial de leucócitos, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	42
Figura 11	Efeito do pré-tratamento com EHNA sobre o metabolismo da adenosina em inosina, no modelo de pleurisia em camundongos.....	44
Figura 12	Cromatograma dos padrões para adenosina, inosina, xantina e ácido úrico.....	45
Figura 13	Curvas de calibração para detecção e quantificação sérica da adenosina, inosina, xantina e ácido úrico.....	46
Figura 14	Espectro de absorção UV, obtidos dos cromatogramas para adenosina; inosina; xantina; ácido úrico e cafeína.....	47
Figura 15	Concentrações séricas de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico durante a inflamação pleural aguda, em camundongos.....	48
Figura 16	Efeitos da adenosina na contagem total de células, macrófagos e linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, presentes no LBA de camundongos sensibilizados e broncoprovocados com OVA.....	49
Figura 17	Efeitos da inosina na contagem total de células, macrófagos e linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, presentes no LBA de camundongos sensibilizados e broncoprovocados com OVA.....	50
Figura 18	Efeitos do tratamento com inosina na contagem leucocitária sanguínea periférica e na medula óssea.....	51
Figura 19	Efeitos do pré-tratamento com os antagonistas da adenosina e com a inosina na contagem total de leucócitos, contagem diferencial de macrófagos e contagem diferencial de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, no LBA.....	53
Figura 20	Efeitos da inosina sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar de animais alérgicos.....	55
Figura 21	Efeitos da inosina sobre a migração de mastócitos para as vias aéreas de animais sensibilizados e broncoprovocados.....	56

Figura 22	Envolvimento dos receptores para adenosina nos efeitos da inosina sobre os níveis de IL-4 e IL-5, em cultura de tecido pulmonar.....	57
Figura 23	Envolvimento do receptor A_{2A} e efeitos da inosina sobre a responsividade das vias aéreas, “in vivo”.....	58
Figura 24	Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios da adenosina e inosina na pleurisia e da inosina na asma experimental, em camundongos.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos e não seletivos para os receptores de adenosina sobre a contagem celular e extravasamento plasmático na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	36
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
a.C.	Antes de Cristo
A ₁	Receptor para adenosina A ₁
A _{2A}	Receptor para adenosina A _{2A}
A _{2B}	Receptor para adenosina A _{2B}
A ₃	Receptor para adenosina A ₃
ADP	Adenosina - 5'- difosfato
AMP	Adenosina - 5'- monofosfato
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora – 1
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATL-313	4-{3-[6-amino-9-(5-ciclopropilcarbamoil-3,4-diidroxitetraidrofurano-2-il)-9H-purina-2-yl]prop- 2-inil}piperidina-1- ácido carboxílico metil ester
ATP	Adenosina - 5'-trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
C _{3a}	Fator C _{3a} do complemento
C _{5a}	Fator C _{5a} do complemento
Ca ⁺²	Cálcio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CGS21680	3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbamoil)-3,4-diidroxioxolan-2-il]purina-2-il]amino]etil]phenil]ácido propanoico
CLAE	Cromatografia de alta performance
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
ConA	Concanavalina A

COX - 2	Ciclooxigenase – 2
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc
CVT-6883	3-etil-1-propil-8-(1-(3-trifluorometilbenzil)-1H-pirazol-4-il)-3,7-diidropurina-2,6-diona.
DI ₅₀	Dose inibitória de 50 %
DMPX	3,7-Dimetil-1-(2-propinil)xantina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DSS	Dextran sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
ENT - 1	Transportador de equilíbrio de nucleosídeos – 1
ENT - 2	Transportador de equilíbrio de nucleosídeos – 2
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
GATA - 3	Fator de transcrição de trans-ativação específico de célula T – 3
GM - CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
i.v.	Intravenoso
IB-MECA	1-Deoxi-1-[6-[[[(3-iodofenil)metil]amino]-9H-purina-9-yl]-N-metil-β-D-ribofuranuronamida
ICAM -1	Molécula de adesão celular – 1
IgE	Imunoglobulina E
IL -13	Interleucina – 13
IL- 4	Interleucina – 4
IL- 5	Interleucina – 5
IL- 6	Interleucina – 6

IL- 8	Interleucina – 8
IL- 9	Interleucina – 9
IL-10	Interleucina – 10
IL-12	Interleucina – 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IM	Inibição máxima
INF	Interferon
INF - γ	Interferon – gamma
JNK	“Jun N-terminal kinase”
K ₂ CO ₃	Bicarbonato de potássio
K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
L-97-1	[3-[2-(4-Aminofenil)-etil]-8-benzil-7-{2-etil-(2-hidroxi-etil)-amino}-etil]-1-propil-3,7-dihidro-purina-2,6-diona]
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
Mch	Metacolina
MCP – 1	Proteína quimioatratora de macrófagos – 1
MCP – 2	Proteína quimioatratora de macrófagos – 2
MCP – 3	Proteína quimioatratora de macrófagos – 3
MCP – 4	Proteína quimioatratora de macrófagos – 4
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MIP -1	Proteína inibitória de macrófago – 1
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros quadrados

mm ³	Milímetros cúbicos
MRS1523	3-Propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2 fenil-4-propil-3-piridine carboxilate
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NFκB	Fator nuclear “kappa” B
Nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radial hidroxila
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP	Poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão salina fosfato
PCA	Ácido perclórico
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PEEP	Pressão positiva expiratória final
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C

PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoridro
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RANTES	Secretado, expresso e regulado por ativação em linfócitos T normais
RNA	Ácido ribonucleico
STAT - 6	Sinal de transdução e ativador da transcrição – 6
TGF – β	Fator de crescimento transformante
Th ₁	Linfócito T “helper” 1
Th ₂	Linfócito T “helper” 2
TLR	Receptor tipo “Toll”
TNBS	2,4,6-trinitrobenzeno
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UI	Unidade internacional
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
VCAM -1	Molécula de adesão celular vascular -1
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol

RESUMO

Evidências indicam que a adenosina e inosina participam do controle da inflamação e imunidade. Este controle parece estar relacionado à ativação dos receptores para adenosina por ambas as purinas. Além disso, assim que é produzida, a adenosina é rapidamente convertida à inosina, o que nos fez hipotetizar que talvez os efeitos da adenosina fossem na verdade os efeitos da inosina. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos destas purinas, bem como o envolvimento dos receptores para adenosina neste efeito, em dois modelos experimentais: um modelo de inflamação aguda pleural, induzida por carragenina e o outro de asma induzida pela ovoalbumina, onde ocorre a ativação da resposta adaptativa. Adicionalmente, o metabolismo da adenosina em inosina foi avaliado no modelo de pleurisia. Os resultados demonstraram que a adenosina e a inosina reduziram o extravasamento plasmático e número de leucócitos, principalmente neutrófilos e os níveis de citocinas em exsudatos pleurais. Os efeitos da adenosina envolveram a ativação dos receptores A_{2A} e A_{2B} , uma vez que foram revertidos pelo pré-tratamento com os antagonistas seletivos ZM241385 e aloxazina, respectivamente. O mesmo não foi observado para a quantificação de TNF- α e IL-1 β , sendo que nenhum dos antagonistas utilizados reverteu a ação inibitória da adenosina sobre os níveis destas citocinas. Os receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} por sua vez, estão envolvidos com os efeitos anti-inflamatórios da inosina sobre a migração e extravasamento, porém somente o tratamento com ZM241385 reverteu o efeito dessa purina sobre os níveis de TNF- α , indicando que somente o receptor A_{2A} estava envolvido. O tratamento com ZM241385 também reverteu os efeitos anti-inflamatórios do CGS21680, um agonista seletivo A_{2A} , confirmando a participação do receptor A_{2A} no mecanismo anti-inflamatório das purinas em questão na inflamação aguda pleural. Além disso, os dados obtidos permitem especular um possível sinergismo de efeitos entre a adenosina e inosina e ainda sugerem, que a inosina durante a inflamação pleural, foi convertida em adenosina, contribuindo com seu efeito. Os resultados demonstraram adicionalmente, que no modelo de asma, a administração de inosina, reduziu de forma dependente da dose a migração de monócitos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos para o pulmão. Em adição, o tratamento com inosina reduziu os níveis de IL-4 e IL-5 em "explants" pulmonares, um efeito revertido somente pelo tratamento com cafeína e reduziu a mobilização de leucócitos do sangue para os pulmões. Estes dados analisados em conjunto, reforçam a hipótese de que a inosina interfere com a migração celular para os pulmões. De forma complementar, resultados de mecânica pulmonar mostraram que com a redução da inflamação alérgica, a inosina consequentemente reduziu a elastância das vias aéreas melhorando a função pulmonar. Nossos resultados sugerem que a adenosina e inosina apresentam efeito anti-inflamatório na inflamação aguda e alérgica, reforçando a ideia de que ambas a purinas, bem como seus receptores, exercem um papel importante no controle da inflamação e podem ser um alvo terapêutico útil para do tratamento de doenças inflamatórias.

ABSTRACT

Evidence shows that adenosine and inosine participate in the regulation of inflammation and immune responses. This control might be related to activation of adenosine receptors. Moreover, when adenosine is generated in inflammatory sites, is quickly converted into inosine, what led us to hypothesize that adenosine effects were promoted by inosine. By this way, the aim of this study was to investigate the effects of both purines in two different models of inflammation: acute model of carrageenan-induced pleurisy and in experimental ovalbumin-induced asthma as well as the participation of adenosine receptors in this response. In addition, the adenosine metabolism into inosine was investigated in the pleurisy model. The results demonstrated that treatment with adenosine and inosine reduced significantly the cellular migration, represented mainly by neutrophils, pleural leakage and the levels of pro-inflammatory cytokines in pleural exudates. The adenosine effects were related to activation of A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors, since pretreatment with selective antagonists ZM241385 and alloxazine, respectively, reverted the anti-inflammatory effects of adenosine. The same was not observed with the levels of TNF- α and IL-1 β , since the pre-treatment with antagonists did not revert adenosine effects, showing that these receptors were not involved. Our results also demonstrated that inosine effects against leukocyte migration and pleural leakage might involve activation of adenosine A_1 , A_{2A} and A_{2B} receptors, but only the pretreatment with ZM241385 has reverted the inosine effects against TNF- α levels revealing the participation of A_{2A} receptors in this effect. The pretreatment with ZM241385 also reverted the anti-inflammatory effects of CGS21680, a selective A_{2A} agonist, confirming the participation of A_{2A} receptors in the purine mechanism during pleural inflammation. In addition, our data revealed a possible synergistic anti-inflammatory effect between both purines and suggests that inosine during pleural inflammation was converted into adenosine. Moreover, the results demonstrated that the treatment with inosine reduced, in a dose-dependent manner, the macrophages, lymphocytes, eosinophils and mast cell migration into the lungs. Moreover, the inosine administration reduced the levels of IL-4 and IL-5 in pulmonary explants, an effect reverted with caffeine treatment. Inosine also reduced leukocyte mobilization from the blood to the lungs, reinforcing the hypothesis that it interferes with cellular migration. Accordingly, the results about pulmonary mechanics revealed that reducing the inflammation in the airways, inosine reduces pulmonary elastance and improves pulmonary function, an effect related to A_{2A} receptors. Thus, our results showed that adenosine and inosine have interesting anti-inflammatory effects in acute and allergic inflammation, reinforcing the notion that both purines and their receptors play an important role in controlling inflammation and can serve as a therapeutic target to control inflammatory diseases.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O processo inflamatório

A inflamação é uma resposta do hospedeiro à infecção, lesão tecidual e antígenos, designada primariamente à erradicação do agente invasor (Lawrence *et al.*, 2002; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Contudo, quando esta resposta se torna exacerbada, pode lesionar severamente o tecido causando disfunção do órgão envolvido neste processo (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Os sinais cardinais da inflamação foram primeiramente descritos por Celsus por volta do ano 30 a.C. como: rubor, calor, edema e dor. Posteriormente, muitos eventos associados à resposta inflamatória foram demonstrados incluindo a migração celular, fagocitose, sendo que o quinto sinal cardinal da inflamação, a perda funcional do órgão envolvido, foi descrito por Rudolf Virchow, no século XIX (Gilroy *et al.*, 2004).

A inflamação pode ser dividida em duas categorias: aguda e crônica, tendo como base o tempo de duração dos eventos relacionados ao processo inflamatório e características patológicas (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A inflamação aguda possui curta duração, compreendendo algumas horas até dias e é caracterizada por vasodilatação, extravasamento de proteínas séricas, migração celular principalmente de neutrófilos e ativação da cascata de coagulação (Lawrence *et al.*, 2002; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Lawrence e Gilroy, 2007; Newton e Dixit, 2012).

Neste contexto, a vasodilatação local aumenta o fluxo sanguíneo regional e é responsável pelo aparecimento dos sinais clínicos como vermelhidão e calor. Tem como propósito facilitar a chegada de mediadores e células inflamatórias no tecido lesionado. Este evento é mediado primariamente pela liberação local de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas incluindo a prostaglandina (PG)_{I₂}, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α} (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Juntamente com a vasodilatação, ocorre a formação do edema devido ao aumento da permeabilidade vascular, como resultado da liberação local de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) (Denzlinger *et al.*, 1985; Friedl *et al.*, 1989; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Newton e Dixit, 2012). Estas

alterações permitem tanto o extravasamento plasmático de proteínas do compartimento intravascular para o interstício, quanto à distribuição de fatores solúveis como as imunoglobulinas, mediadores inflamatórios e facilitam a migração leucocitária (Newton e Dixit, 2012).

Os neutrófilos são as primeiras células de defesa sanguínea a chegarem ao local da lesão e as que estão em maior quantidade na inflamação aguda. Tanto os neutrófilos quanto os macrófagos, apresentam atividade fagocítica e no local da inflamação produzem várias espécies reativas de oxigênio incluindo, radicais hidroxila (OH^-), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), que são substâncias fortemente microbicidas e contribuem com a lesão tecidual (Malle *et al.*, 2007).

A migração celular ocorre a partir do contato entre leucócitos e células endoteliais através de moléculas de adesão como selectinas, integrinas e membros da família das imunoglobulinas como as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 - “intercellular adhesion molecule-1”) e molécula de adesão vascular (VCAM-1 - “vascular cell adhesion molecule-1”), que favorecem o rolamento, ativação e adesão ao endotélio (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kelly *et al.*, 2007). A migração dos leucócitos para o tecido envolve ainda a interação entre leucócitos e as moléculas de adesão endotelial plaquetária (PECAM-1- “platelet – endothelial cell adhesion molecule-1”), ocorrendo redução da aderência as ICAM-1 e transmigração para o local da lesão, como descrito na figura 1 (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kelly *et al.*, 2007).

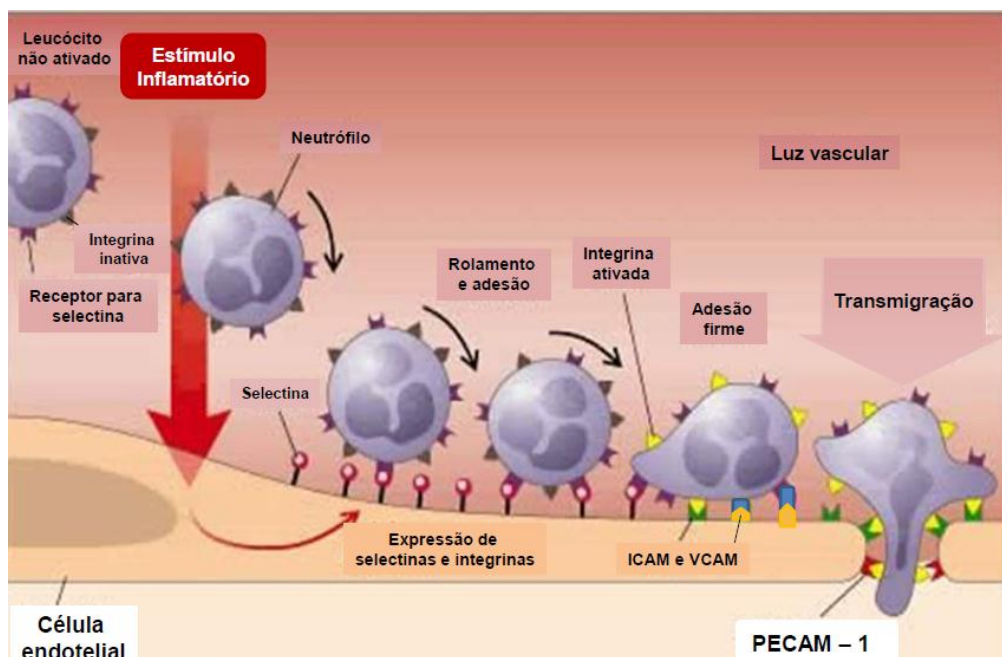


Fig. 1: Migração leucocitária. Frente a um estímulo inflamatório, os leucócitos e endotélio expressam moléculas de adesão como selectinas, integrinas e membros da família das imunoglobulinas como as ICAM - 1 e VCAM - 1, que favorecem o rolamento, ativação e adesão ao endotélio. Em adição, a PECAM - 1 favorece a transmigração do endotélio para o local da lesão. Adaptado de <http://www.ladinfo.org/>.

A expressão de moléculas de adesão e a quimiotaxia envolve a participação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF – “tumoral necrosis factor”)- α , IL- 6 (Dinarello, 2000) e quimiocinas como IL-8 (Luster, 1998) assim como outros mediadores, nos quais se incluem fragmentos C3a e C5a do complemento e leucotrienos como o leucotrieno (LT) B₄ (Levy *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2007).

Além dos eventos mencionados acima serem indispensáveis para o desenvolvimento do processo inflamatório agudo, eles também são parte da resposta imune inata conhecida por ser a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores (Lawrence *et al.*, 2002; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Schroder e Maurer, 2007).

O reconhecimento dos mesmos ocorre através de receptores expressos em macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, linfócitos “natural killer” entre outros (Medzhitov e Janeway, 1997; Schroder e Maurer, 2007), que apresentam a capacidade de reconhecer e responder a produtos microbianos através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - “pattern recognition receptors”). Entre os PRRs, a maior família descrita é a dos TLRs (“toll like receptors”).

Estes receptores são proteínas transmembrana, que pertencem à família do receptor para IL-1, capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – “pathogen-associated molecular patterns”) de origem bacteriana e viral do ambiente extracelular (Newton e Dixit, 2012). Aproximadamente 10 TLRs foram identificados em humanos (TLR 1 - 10) e 12 em roedores (TLR 1 - 12) (Schroder e Maurer, 2007). Alguns padrões moleculares associados a patógenos e os respectivos TLR, incluem: lipoproteínas de bactérias gram-positivas (TLR-1/2); lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (TLR-4); RNA viral (TLR-3/7/8); flagelina (TLR-5) e DNA bacteriano (TLR-9) (Kapetanovic e Cavillon, 2007; Olive, 2012).

O reconhecimento dos PAMPs por estes receptores promove a ativação de vias de sinalização intracelulares que terminam na ativação de fatores de transcrição como fator nuclear “kappa” B (NFkB – “nuclear factor kappa B”), proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CREB – “cAMP response element-binding protein”), proteína ativadora (AP – “activator protein”)-1 e consequente recrutamento celular, produção de citocinas, remodelamento de matrix extracelular e ativação da resposta imune adaptativa (Schroder e Maurer, 2007; Newton e Dixit, 2012).

As células efectoras da imunidade inata, como os macrófagos e células dendríticas, além de serem importantes para o início da mesma, também contribuem para a resposta imune adaptativa, através do reconhecimento e fagocitose do patógeno, migração para os linfonodos regionais com posterior apresentação dos peptídeos antigênicos para os linfócitos T “naive” (Schroder e Maurer, 2007). Posteriormente, seguem-se eventos ligados à resposta imune adaptativa como diferenciação de linfócitos Th1 e Th2, ativação de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas, citocinas pró-inflamatórias e ativação de células que participam da resposta imune inata (Baniyash, 2006).

Dessa forma, a resposta adaptativa culmina na ativação ou amplificação da resposta inata, assumindo as características desta última. Em ambos os casos, a resposta inflamatória é gerada com o mesmo propósito: eliminação do agente causador do processo inflamatório e tentativa de reparo tecidual (Baniyash, 2006).

A partir do início do processo inflamatório, uma quantidade gradativamente maior de monócitos migra para o local da inflamação (Lawrence *et al.*, 2002). Acredita-se que este evento esteja diretamente

relacionado à resolução do processo inflamatório. Alguns trabalhos descrevem os macrófagos como responsáveis pela fagocitose de células de defesa apoptóticas e debris celulares (“clerance”), o que contribuiria com a eliminação do agente causador da resposta inflamatória. De acordo com estes trabalhos, a resolução é uma resposta programada e iniciada pela liberação de mediadores lipídicos como a PGE₂ e PGD₂, ainda no começo do processo inflamatório agudo (Levy *et al.*, 2001). Estes mediadores promoveriam a expressão de enzimas necessárias para a geração de outros mediadores como lipoxinas, resolvinas, protectinas e de citocinas como fator de crescimento transformante (TGF – “transforming growth factor”)-β, IL-10, que levariam à resolução do processo inflamatório, reduzindo a migração celular e liberação de mediadores (Gilroy *et al.*, 2004; Serhan e Savill, 2005).

Quando ocorre uma falha na conclusão do processo de resolução, a resposta inflamatória pode se tornar crônica (Lawrence e Gilroy, 2007). Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada, estendendo-se de semanas a meses (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A inflamação crônica caracteriza-se por processo inflamatório ativo com tentativas seguidas de reparo tecidual e consequente destruição do tecido com formação de fibrose. Durante este processo, ocorre infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos e linfócitos ou granulócitos como eosinófilos, em processos alérgicos (Gilroy *et al.*, 2004).

1.2 A inflamação pleural aguda e o modelo de pleurisia induzido pela carragenina

A pleura é uma membrana que envolve a cavidade torácica e órgãos vitais como o pulmão e coração, sendo denominada respectivamente pleura parietal e visceral. A cavidade entre a pleura parietal e visceral é denominada cavidade pleural (Antony, 2003). As principais funções da pleura são de proteção dos órgãos contidos no tórax e secreção do líquido pleural para a cavidade, formando assim, uma superfície lubrificada e elástica com a finalidade de favorecer o movimento de inspiração e expiração (Antony, 2003).

Ela é composta por uma monocamada de células mesoteliais, membrana basal e tecido conectivo e apresenta íntima conexão com o parênquima pulmonar através de uma rede de capilares locais que permitem a difusão de

líquidos. No contexto do processo inflamatório, através desta rede de capilares se difundem alguns mediadores inflamatórios do pulmão para a pleura, sendo o contrário também possível (Kroegel e Antony, 1997; Antony, 2003; Jantz e Antony, 2008).

A presença de microrganismos, proteínas, sangue e ar, podem levar à ruptura mecânica da monocamada de células mesoteliais e inflamação (Jantz e Antony, 2008). As células mesoteliais tem um papel importante durante os processos patofisiológicos pleurais. É descrito que estas células apresentam diversos PPRs incluindo os TLR 1 - 9, especialmente o TLR4 e TLR2 ativados respectivamente por lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos de bactérias gram-positivas (Heine e Ulmer, 2005; Jantz e Antony, 2008).

Dessa forma, devido ao reconhecimento de patógenos invasores, ocorre a liberação de uma série de citocinas e quimocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, proteína inibitória de macrófagos (MIP – “macrophage inhibitory protein”)-1, proteína quimioatratadora de macrófagos (MCP – “Monocyte chemoattractant protein”)-1, -2, -3 e -4 e proteína secretada, expressa e regulada por ativação em linfócitos T normais (RANTES – “regulated upon activation, normal T- cell expressed and secreted”), que irão promover a migração maciça de neutrófilos para a cavidade pleural nas primeiras horas do processo inflamatório (Antony, 2003; Jantz e Antony, 2008).

Associada à migração de neutrófilos ocorre a formação de exsudato pleural rico em proteínas plasmáticas, uma das características clássicas do processo inflamatório em questão. Tal evento ocorre tanto pelo extravasamento plasmático dos vasos próximos à pleura, bem como pela contração do citoesqueleto das células mesoteliais, favorecendo a formação de espaços entre as mesmas (Antony, 2003; Jantz e Antony, 2008).

A inflamação pleural ou pleurisia pode ser reproduzida experimentalmente em roedores através da administração de agentes pró-inflamatórios na cavidade pleural, como por exemplo, cristais de urato ou pirofosfato de cálcio, a carragenina e albumina bovina metilada (Moore *et al.*, 2010).

A carragenina é um agente pró-inflamatório, extraído de algas marinhas, que uma vez administrado na cavidade pleural desencadeia eventos característicos do processo inflamatório agudo e a ativação da imunidade inata,

observados na clínica (Saleh *et al.*, 1996; Moore, 2003; Moore *et al.*, 2010). Vários estudos demonstram que após a injeção intrapleural deste agente, o processo inflamatório que se segue apresenta uma fase inicial com duração até 1 hora, que usualmente não é inibido pelo tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais e caracteriza-se pela liberação de mediadores como bradicinina, histamina e serotonina, seguida por uma fase tardia com duração de 1 à 6 horas, onde ocorre aumento da expressão da COX-2 e liberação de prostanoídes, principalmente PGE₂ (Tomlinson *et al.*, 1994; Nantel *et al.*, 1999; Menegazzi *et al.*, 2008; Impellizzeri *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que 4 horas após da administração intrapleural de carragenina ocorre um pico de exsudação plasmática, migração de neutrófilos e liberação de citocinas como TNF- α e IL - 1 β (Saleh *et al.*, 1996; Menegazzi *et al.*, 2008). O pico da migração neutrofílica pode durar até 12 horas e após este período, os neutrófilos vão sendo gradativamente substituídos por macrófagos, ocorrendo a resolução deste processo em 48 horas (Moore *et al.*, 2010).

Embora na clínica, a pleurisia seja resolvida somente com intervenção terapêutica, experimentalmente este modelo reproduz os eventos principais da inflamação aguda de forma similar à humana (Jantz e Antony, 2008; Moore *et al.*, 2010). Dessa forma, este modelo mostra sua importância sendo muito útil para investigar o papel dos mediadores e vias envolvidas na inflamação aguda e os efeitos anti-inflamatórios de novos agentes terapêuticos (Moore, 2003; Moore *et al.*, 2010).

1.3 A asma

Nos últimos anos, a incidência da asma está aumentando e tem se tornado uma das doenças crônicas mais comuns nos países industrializados (Barnes, 2006).

Estudos epidemiológicos indicam que esta doença apresenta abrangência mundial, atingindo aproximadamente 300 milhões de pessoas, com uma prevalência que varia entre 1 à 18 % da população em diferentes países (GINA, 2011). No Brasil, constitui-se na quarta causa de hospitalizações pelo sistema único de saúde, sendo a terceira entre crianças e jovens (Diretrizes brasileiras para o manejo da asma, 2006).

Embora a causa da asma não tenha sido bem determinada, sabe-se que a sua etiologia é multifatorial, envolvendo interações entre fatores ligados ao paciente como: fatores genéticos, sexo (principalmente masculino), obesidade, estímulos ambientais (pólen, ácaros, fungos entre outros), poluentes, tabaco, infecções virais prévias e dieta (Maddox e Schwartz, 2002 ; GINA 2011).

Atualmente, a asma é descrita como uma doença crônica pulmonar, caracterizada por obstrução reversível das vias aéreas, persistente hiperreatividade, broncoconstrição, remodelamento brônquico e inflamação pulmonar (Maddox e Schwartz, 2002; Holgate e Polosa, 2008).

O termo “asma” é derivado da palavra grega “ásthma” (ἀσθμα) que significa “respiração curta”, por muitos anos envolveu uma série de condições clínicas relacionadas ao coração e pulmão (Holgate, 2011). Em meados do século dezanove (1890) o médico Henry Hyde Salter em seu tratado “Asma e seu tratamento”, atribuiu o termo asma à doença pulmonar que envolvia obstrução variável de vias aéreas, dispnéia intercalada com intervalos de respiração normal. Reconheceu também que estes episódios eram causados por contração do músculo liso brônquico (Holgate, 2011).

A resposta alérgica na asma inicia-se pela captura e processamento do alérgeno por células apresentadoras de antígeno (APC – “antigen presenting cell”) que podem ser macrófagos ou células dendríticas. Após este processo, estas células mobilizam-se para os linfonodos, onde o antígeno é apresentado, através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – “major histocompatibility complex”) de classe II, para linfócitos T “naive”, iniciando-se uma resposta imune específica ao alérgeno, ocorrendo a diferenciação de células T “naive”, ou seja, que nunca entraram em contato com um antígeno, em linfócitos CD4⁺ ativados do tipo “helper” 2 (Th₂) (Kay, 2006; Holgate e Polosa, 2008).

Após apresentação do antígeno, os linfócitos Th₂ retornam para as vias aéreas, onde são liberadas citocinas como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF– “granulocyte-macrophage colony-stimulating fator”) (Kay, 2006; Holgate e Polosa, 2008). A asma é considerada uma reação mediada tipicamente por linfócitos Th₂ e de caráter eosinofílico. Apesar disso, estudos mostram sua relação com linfócitos do tipo T “helper” 1 (Th₁) que secretam um padrão distinto de citocinas como IL-12, IL-8 e INF que são importantes para defesa contra fungos e vírus em

contraste aos Th₂ que liberam citocinas típicas da inflamação alérgica (Maddox e Schwartz, 2002).

Estas citocinas estão envolvidas na ativação dos linfócitos B com subsequente produção de imunoglobulina E (IgE), recrutamento de mastócitos e maturação de eosinófilos, sendo estes leucócitos as principais células efetoras da resposta alérgica (Holgate, 2008).

Uma vez que um paciente é sensibilizado por um alérgeno em particular, novos encontros com o mesmo alérgeno promoverão a ativação dos receptores de alta (FcεRI) afinidade para a IgE, promovendo degranulação de mastócitos com liberação de mediadores pré-formados como: aminas vasoativas (histamina e serotonina), triptase e outras proteases, heparina, eicosanóides (PGD₂, tromboxano, cisteinil leucotrienos como o leucotrieno B₄ (LTB₄)) que são características típicas da reação de hipersensibilidade do tipo I (Bradding *et al.*, 2006; Galli *et al.*, 2008; Holgate e Polosa, 2008). Estes mediadores apresentam potente ação constritora da musculatura lisa das vias aéreas, além de promoverem aumento da permeabilidade microvascular e edema (Holgate, 2008). Os eventos citados constituem-se na fase aguda da asma, clinicamente representada pelos sintomas da crise asmática como sibilância, tosse e dispnéia (Maddox e Schwartz, 2002; Holgate e Polosa, 2008).

É importante mencionar que todos os eventos pulmonares presentes à fase imediata contribuem para o surgimento da fase tardia, representada por intenso infiltrado leucocitário pulmonar (Maddox e Schwartz, 2002; Holgate, 2008; Holgate e Polosa, 2008). A migração dos leucócitos circulantes para as vias aéreas é um evento importante, que contribui com a cronicidade do processo inflamatório, envolve muitos mediadores e expressão de moléculas de adesão (Maddox e Schwartz, 2002), favorecendo a ativação e migração de macrófagos, basófilos e eosinófilos para o espaço perivascular (Maddox e Schwartz, 2002; Kelly *et al.*, 2007; Holgate, 2008; Holgate e Polosa, 2008).

A fase tardia da asma também é marcada pelo aparecimento das mudanças estruturais nas vias aéreas, que levam a perda progressiva da função pulmonar. O remodelamento das vias aéreas corresponde a uma das mudanças estruturais e envolve deposição de colágeno, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas e proliferação de microvasos com conseqüente redução da capacidade de contração e relaxamento das vias aéreas pulmonares (Orihara *et al.*, 2010; Durrani *et al.*, 2011).

Em conjunto com as alterações na citoarquitetura das paredes broquiolares, ocorrem também alterações na regulação neural do tônus das vias aéreas. Estas pré-dispõem à hiperresponsividade brônquica (Durrani *et al.*, 2011), que pode estar ligada à hipersensibilidade a agonistas colinérgicos, como a acetilcolina e sensibilidade reduzida a agentes adrenérgicos (Galli *et al.*, 2008).

Apesar de todo conhecimento sobre a imunopatologia da asma, os eventos bioquímicos e celulares envolvidos, ainda não são compreendidos na sua totalidade. Neste contexto, modelos animais como a asma induzida experimentalmente pela administração de ovoalbumina (OVA), são uma boa alternativa para investigar os mecanismos e a progressão da doença. Estes modelos reproduzem características específicas da asma clínica como inflamação nas vias aéreas com elevados níveis de IgE, hiperplasia de células epiteliais produtoras de muco, hiper-responsividade das vias aéreas e broncoconstrição. Nos achados histológicos, é possível perceber influxo de leucócitos com aumento da contagem de eosinófilos (Nials e Uddin, 2008).

Os estudos com modelos animais de asma foram fundamentais para a formulação da hipótese que a asma é uma doença mediada por linfócitos Th2; para a compreensão do papel do linfócito T na resposta alérgica e envolvimento dos eosinófilos na hiper-reatividade. Desta forma, representam uma importante ferramenta para pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da asma (Nials e Uddin, 2008).

1.4 O tratamento da asma

Segundo o consenso para o manejo da asma, atualmente, os medicamentos utilizados para o tratamento desta podem ser divididos em duas categorias, conforme o objetivo da sua utilização: 1) fármacos para melhora dos sintomas agudos, ou seja, para prevenção das exacerbações agudas da asma; 2) fármacos para manutenção, ou seja, usados para prevenir os sintomas.

Durante as exacerbações agudas de asma, os medicamentos de escolha são os β 2-agonistas com ação broncodilatadora de curta duração como salbutamol, terbutalina e fenoterol, podendo ser utilizado o brometo de ipratrópio em associação ou em substituição, no caso de efeitos adversos dos

β 2-agonistas como, taquicardia e arritmia cardíaca (IV Diretrizes para o manejo da asma, 2006). Os β 2-agonistas de longa duração compreendem: o salmeterol, formoterol e bambuterol (IV Diretrizes para o manejo da asma, 2006; (Holgate, 2011). Os β 2-agonistas de longa duração podem ser utilizados em associação com corticóides inalatórios, como terapia inicial e preventiva da asma classificada como moderada ou grave (Orihara *et al.*, 2010).

Os corticóides inalatórios, como a beclometasona, constituem a terapia principal e mais efetiva para tratamento de manutenção, profilático e anti-inflamatório (Barnes, 2006 ; IV Diretrizes para o manejo da asma, 2006). Apesar dos efeitos benéficos, e administração tópica, seus efeitos colaterais sistêmicos são habitualmente observados com utilização de doses altas, por tempo prolongado e envolvem a Síndrome de Cushing, caracterizada por inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, déficit de crescimento, perda de massa óssea e retenção de sódio com aumento da pressão arterial. Os efeitos colaterais tópicos também compreendem a candidíase oral, disfonia e tosse crônica. Efeitos adversos semelhantes também são observados após a administração sistêmica de corticóides, utilizados nas crises de asma, em casos graves (IV Diretrizes para o manejo da asma, 2006; Barnes, 2006).

São também empregados para o tratamento de manutenção: os antileucotrienos como montelucaste e zafirlucaste, que são eficazes e apresentam efeitos colaterais raros; os estabilizadores de membrana de mastócitos, conhecidos como cromonas, como o cromoglicato de sódio; as xantinas broncodilatadoras como a aminofilina e teofilina que devem ser utilizadas preferencialmente em associação com corticóides inalatórios (IV Diretrizes para o manejo da asma, 2006; Holgate, 2011).

Alternativas englobam o uso da terapia anti-IgE (omalizumab) que parece reduzir a inflamação e melhorar a função pulmonar, porém seus efeitos, em longo prazo, necessitam ser investigados (Orihara *et al.*, 2010). Ainda estão sobre investigação clínica: a terapia anti-IL-5 (mepolizumab); anti-TNF (infliximab, etanercept, adalizumab); anti-IL-13 (anticorpo monoclonal anti-IL-13 – IMA-638) (Holgate, 2011).

Embora a terapêutica atual apresente alguma eficácia, nenhum dos tratamentos disponíveis apresentam efeitos em longo prazo, tanto no processo inflamatório quanto no remodelamento, dessa forma não modificando de fato o curso da doença ou sendo curativa (Barnes, 2006). Em adição, devido à

terapêutica não ser curativa, os sintomas da asma e o processo inflamatório retornam, seguindo a interrupção do tratamento. Isto vem instigando à busca de novos medicamentos, visando controlar a progressão e o aparecimento dos sintomas da asma, com o mínimo de efeitos colaterais (Barnes, 2006).

1.5 Adenosina e o processo inflamatório

Tem sido descrito que purinas endógenas como a adenosina e inosina apresentam um importante papel regulatório na inflamação e imunidade (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Mabley *et al.*, 2003; Hasko e Cronstein, 2004).

A adenosina e a inosina são formadas por uma ligação glicosídica entre uma base púrica adenina e uma D-ribose (Polosa, 2002; Polosa e Holgate, 2006). Ambas são geradas a partir do metabolismo do trifosfato de adenosina (ATP) pela ação de enzimas da família das ecto-nucleotidases, amplamente distribuídas pelo organismo e expressas em muitas células incluindo plaquetas, células epiteliais, endoteliais e leucócitos (Eltzschig, 2009).

Uma destas enzimas, a NTPDase -1 (ecto-apirase) também conhecida como CD39, converte o ATP ou adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) que por sua vez sofre a ação de uma ecto-5'-nucleotidase (CD73) gerando a adenosina, que é rapidamente convertida pela enzima adenosina desaminase à inosina. A degradação desta última pela purina nucleosídeo fosforilase gera xantina que será posteriormente metabolizada em hipoxantina e ácido úrico, como descrito na figura 2 (Polosa, 2002; Eltzschig *et al.*, 2003; Eltzschig *et al.*, 2006; Spicuzza *et al.*, 2006; Eltzschig, 2009).

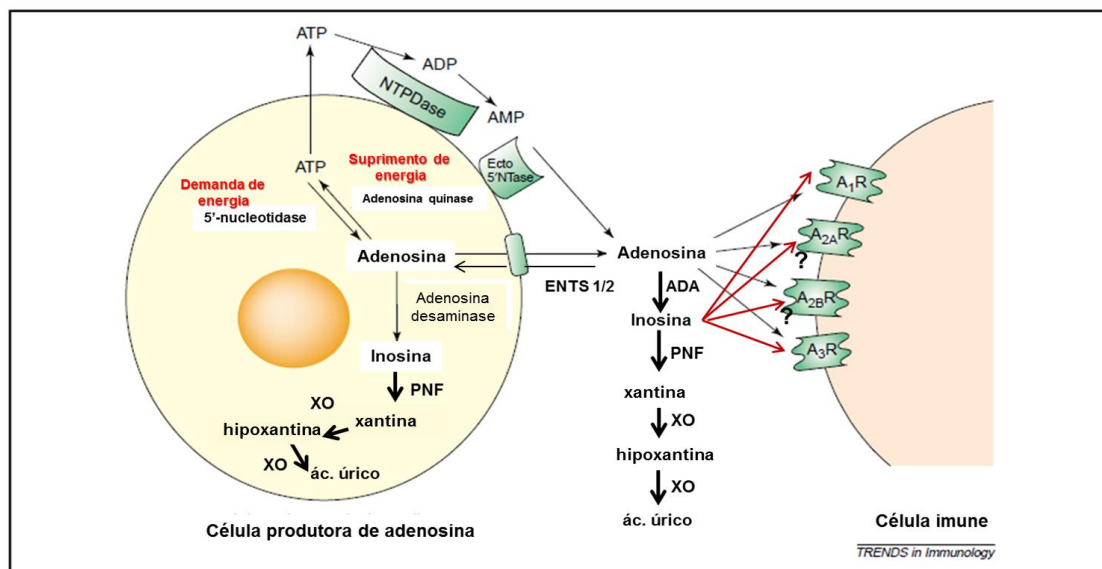


Fig. 2: Metabolismo intracelular e extracelular da adenosina e inosina e interação com receptores para adenosina. NTPDase: ecto – apirase; Ecto – 5'NTase: 5'-ecto-nucleotidase; ADA: adenosina deaminase; PNF: purina nucleosídeo fosforilase; XO: xantina oxidase. Adaptado de Haskó e Cronstein (2004).

Estudos descrevem que concentrações extracelulares elevadas de adenosina são encontradas em situações como isquemia, hipóxia, inflamação e trauma (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Linden, 2001; Hasko e Cronstein, 2004; Hasko *et al.*, 2008). Ainda, acredita-se que este aumento tenha a função de proteção tecidual (Hasko *et al.*, 2008).

O papel fisiológico da adenosina foi inicialmente investigado por Drury e Szent-Györgyi, que demonstraram que a mesma apresentava efeitos biológicos pronunciados como redução da pressão arterial, efeito inotrópico negativo e vasodilatação coronariana (Hasko e Cronstein, 2004). Baseando-se nestes estudos iniciais, na atualidade, a adenosina é empregada na clínica para o tratamento de arritmias cardíacas, principalmente taquicardias supraventriculares (Wilbur e Marchlinski, 1997).

Até o momento, tem sido descrito que a adenosina exerce seu papel fisiológico e imunomodulatório, ligando-se aos 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.*, 2011). De acordo, 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 (Ralevic e Burnstock,

1998; Polosa, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002; Sawynok e Liu, 2003; Fredholm *et al.*, 2011).

Assim que é gerada, a adenosina se difunde e liga-se aos receptores para adenosina (Fig. 3) (Hasko e Cronstein, 2004). Quatro subtipos de receptores de membrana para a adenosina já foram identificados, são eles: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Os receptores A₁ e A_{2A} são chamados receptores de alta afinidade e os receptores A_{2B} e A₃ são chamados de baixa afinidade devido ao padrão de ligação da adenosina aos mesmos (Fredholm *et al.*, 2011). Segundo descrito na figura 3, os receptores A₁ inibem a adenilato ciclase através da ativação da proteína Gi/o, o que também resulta na ativação da fosfolipase C (PLC). Os receptores A₁ em músculos e neurônios ativam canais de K⁺, resultando em inibição dos canais de Ca²⁺ do tipo Q, P e N. No músculo cardíaco, a ativação destes receptores pela adenosina causa bradicardia, o que explica o seu uso no tratamento de taquiarritmias (Jacobson e Gao, 2006).

A ativação do receptor A_{2A} estimula a adenilato ciclase, através da ativação da proteína Gs (estimulatória). Um dos efeitos biológicos mais descritos acerca da ativação deste receptor é o controle da resposta imune, o qual talvez envolva a ativação de proteína quinase A (PKA), proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), resultando em inibição da ativação do NFκB (Bours *et al.*, 2006; Fredholm *et al.*, 2007; Fredholm *et al.*, 2011). Além disso, foi descrito em células tipo COS-7, que a via do inositol fosfato pode ser também ativada (Offermanns e Simon, 1995).

Assim como o receptor A_{2A}, o A_{2B} ativa a adenilato ciclase, através da ativação da proteína Gs. Além disso, este receptor pode ativar a PLC, o que estaria ligado ao aumento de cálcio intracelular e degranulação de mastócitos (Polosa, 2002; Jacobson e Gao, 2006). O receptor A₃, da mesma forma que o receptor A₁, ativa uma proteína Gi/o (inibitória) e inibe a adenilato ciclase, reduzindo o AMPc intracelular. A ativação da PLC, também foi descrita e especula-se que através dela ocorra a degranulação de mastócitos (Tilley *et al.*, 2000). A ativação da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) estaria relacionada à inibição da proliferação de células A375 de melanoma humano (Merighi *et al.*, 2005; Jacobson e Gao, 2006). Todos os receptores para adenosina podem se acoplar às proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs – “mitogen-activated protein kinase”), justificando o papel da

adenosina no controle do crescimento, sobrevivência, morte e diferenciação celular (Jacobson e Gao, 2006).

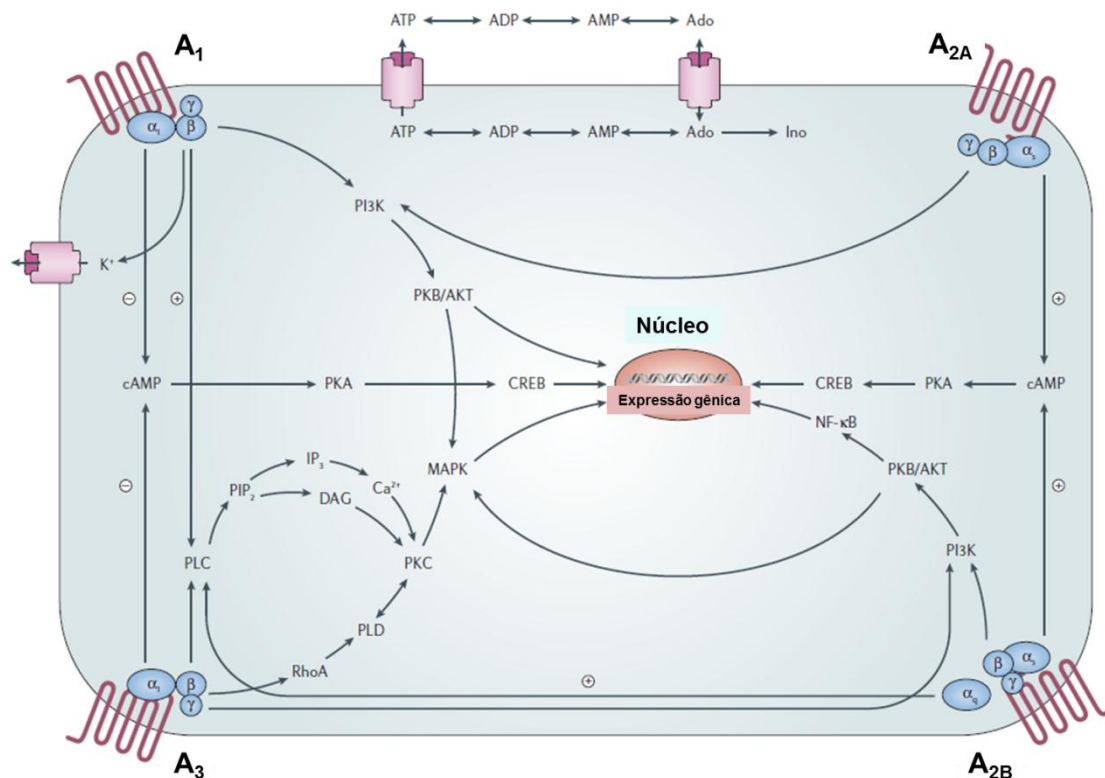


Fig. 3: Vias de sinalização intracelulares ligadas à ativação dos receptores para adenosina. Adaptado de Jacobson e Gao (2006).

Até o momento, a adenosina foi o nucleosídeo mais estudado e caracterizado, sendo que diversos estudos “in vivo” e “in vitro” relatam seus efeitos anti-inflamatórios (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Mabley *et al.*, 2003; Fredholm *et al.*, 2011). Dados da literatura relatam os efeitos inibitórios e estimulatórios da adenosina sobre a liberação de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 e IL-10, em culturas de macrófagos (Bouma *et al.*, 1994), inibição da migração de neutrófilos e produção de espécies reativas do oxigênio (Revan *et al.*, 1996; Wakai *et al.*, 2001). Os efeitos da adenosina, bem como de agonistas específicos de seus receptores, foram observados em modelos experimentais de asma (El-Hashim *et al.*, 2009), doença inflamatória intestinal (Antonioli *et al.*, 2007), choque séptico (Hasko *et al.*, 1998), artrite reumatóide (Szabo *et al.*, 1998) e cicatrização (Montesinos *et al.*, 1997).

É notável que em grande parte dos modelos de inflamação, os efeitos da adenosina foram mediados pelos seus receptores, principalmente os do tipo A_{2A}. Assim, o interesse pelos receptores para adenosina tem crescido dramaticamente desde que foi demonstrado que drogas anti-inflamatórias

como o metotrexato apresentam, como um dos mecanismos, o aumento da sua concentração endógena (Hasko e Cronstein, 2004; Fredholm *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de animais “knockout” para o receptor A_{2A} forneceu a primeira evidência conclusiva “in vivo”, que estes receptores estão envolvidos no efeito anti-inflamatório da adenosina (Sitkovsky, 2003). Neste estudo, foi observado que a administração de sub-doses de concanavalina A (ConA) lesionaram o fígado de animais $Adora2a^{-/-}$ com aumento nos níveis sanguíneos de TNF- α , IL-4 e INF- γ , o que não foi observado em animais que apresentavam este receptor. Da mesma forma, a presença do receptor A_{2A} reduziu o choque endotóxico induzido por LPS, com redução dos níveis sistêmicos das citocinas IL-6, INF- γ e TNF- α (Ohta e Sitkovsky, 2001).

No contexto da inflamação pulmonar, foi demonstrado que agonistas seletivos do receptor A_{2A} , como o ATL313 e CGS21680, respectivamente, apresentam efeitos anti-inflamatórios em modelos de isquemia-reperfusão (Sharma *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010) e pleurisia induzida por carragenina (Impellizzeri *et al.*, 2011).

O sub-tipo de receptor para adenosina A_{2B} também parece mediar efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Estudos demonstraram que o tratamento com CVT-6883, um antagonista seletivo A_{2B} , foi capaz de reverter tanto a inflamação pulmonar, que ocorre espontaneamente em animais deficientes para adenosina desaminase, quanto a inflamação alérgica observada na asma (Sun *et al.*, 2006; Mustafa *et al.*, 2007), levantando indícios sobre o papel protetor da adenosina e do receptor A_{2B} com relação à patogênese das doenças inflamatórias, principalmente pulmonares. Contraditoriamente, um estudo com animais “knockout” para este receptor demonstrou que a administração de LPS promoveu maior expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, assim como altos níveis de TNF- α e IL-6 (Yang *et al.*, 2006).

De encontro com estas informações, recentemente foi descrito que a adenosina pode promover aumento da função da barreira endotelial através da ativação dos receptores A_{2B} e desta forma interferir com a permeabilidade vascular (Eltzschig *et al.*, 2003). Dentro deste contexto, o receptor A_{2B} parece estar envolvido com a redução do edema pulmonar característico da lesão pulmonar aguda induzida por ventilação, hipóxia e LPS (Eckle *et al.*, 2008; Eckle *et al.*, 2008).

Outro receptor que também parece mediar um papel dual da adenosina na inflamação é o receptor A_1 . Estudos demonstraram que na lesão pulmonar aguda induzida por LPS, a ausência deste receptor promoveu o aumento do processo inflamatório (Ngamsri *et al.*, 2010). Apesar deste dado, acredita-se que os receptores A_1 , juntamente com os receptores A_{2B} e A_3 sejam responsáveis em parte pela hiper-reatividade brônquica evocada pela adenosina (Polosa, 2002). De acordo, o papel pró-inflamatório do receptor A_1 , foi observado em um modelo experimental de hiperresponsividade brônquica à histamina, induzida em coelhos, onde o L-97-1, um antagonista seletivo para o receptor A_1 reduziu a contagem de leucócitos no lavado brônquio alveolar (Nadeem *et al.*, 2006).

A ativação de receptores A_3 parece estar diretamente ligada à degranulação de mastócitos, contribuindo com a patogenia de alguns processos alérgicos (Hannon *et al.*, 1995; Gessi *et al.*, 2008). Este evento está ligado ao aumento de permeabilidade vascular cutânea, que ocorre após administração intradérmica de adenosina, em camundongos (Tilley *et al.*, 2000). O receptor A_3 também é encontrado em eosinófilos e o tratamento com MRS 1523, um antagonista seletivo para este receptor reduziu a produção de muco e da eosinofilia em camundongos deficientes para adenosina deaminase (Young *et al.*, 2004). Apesar destes dados, em animais endotoxêmicos foi demonstrado que o tratamento com IB-MECA, um agonista seletivo do receptor A_3 reduziu a liberação de citocinas como INF- γ , IL-12 e de NO e a letalidade (Hasko *et al.*, 1998).

Considerando o descrito acima, a literatura descreve que a adenosina apresenta um papel dual na inflamação. Acredita-se que tal fato dependa do estímulo que promoveu a resposta inflamatória, do tipo celular envolvido e dos receptores que foram expressos, determinando seu efeito modulatório final.

1.6 Inosina e o processo inflamatório

Evidências indicam que assim como a adenosina, a inosina também apresenta um papel modulatório sobre a inflamação (Rahimian *et al.*, 2010). A inosina é formada pelo metabolismo da adenosina pela adenosina deaminase (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Liaudet *et al.*, 2002; Eltzhig *et al.*, 2006; Fredholm *et al.*, 2011) em situações de inflamação, hipóxia e lesão tecidual

(Garcia Soriano *et al.*, 2001; Gomez e Sitkovsky, 2003).

A inosina foi considerada até pouco tempo, uma molécula inerte e só recentemente, ficou reconhecido que esta é capaz de se ligar nos receptores para adenosina (Jin *et al.*, 1997; Hasko e Cronstein, 2004; Fredholm *et al.*, 2011). Enquanto a adenosina apresenta um efeito de agonista total dos seus receptores, estudos de “binding” indicam que a inosina parece se comportar como um agonista parcial dos receptores A₁ e A₃ (Jin *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2011).

Estudos específicos de ligação ao receptor A_{2A} não foram ainda realizados, porém este receptor juntamente com receptor A₃, parece mediar os efeitos da inosina. Um estudo conduzido por Gomez e Sitkovsky (2003) demonstrou que estes receptores estão envolvidos no efeito anti-inflamatório da inosina que inclui redução dos níveis séricos de TNF- α e efeito protetor contra inflamação induzida por endotoxina e ConA.

Muitos outros trabalhos também demonstram o efeito anti-inflamatório da inosina e seus análogos como a INO-2002, em modelos de lesão pulmonar aguda (Liaudet *et al.*, 2002; Mabley *et al.*, 2009), colite induzida por 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) e dextran sulfato de sódio (DSS) (Mabley *et al.*, 2003; Rahimian *et al.*, 2010), modelo de choque séptico induzido por ligadura cecal e LPS (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Liaudet *et al.*, 2001).

Nestes trabalhos, entre os efeitos anti-inflamatórios da inosina estão a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, o qual parece envolver um mecanismo pós-transcricional, ou seja, sem interferir na degradação do fator inibitório I κ B e na ativação de proteínas quinases como a p38, p42/44 e c-Jun. (Hasko *et al.*, 2000) Este efeito foi revertido pelo bloqueio dos receptores A₁ e A₂, respectivamente pelos antagonistas seletivos DPCPX e DMPX (Hasko *et al.*, 2000).

Evidências indicam que os receptores A₁ e A₂ medeiam não só os efeitos anti-inflamatórios da inosina, mas também os efeitos antinociceptivos da mesma. Foi demonstrado recentemente que a inosina reduz a dor em modelos de nocicepção aguda e crônica, sendo este efeito revertido pela administração de antagonistas seletivos e não seletivos do receptor A₁ como o DPCPX e o 8-PT e antagonistas seletivos para o receptor A_{2A} como o ZM241385, sendo relatado ainda o bloqueio da via da proteína quinase C (PKC), o que contribuiria com o efeito antinociceptivo da inosina (Nascimento *et al.*, 2010).

Dados de experimentos “in vivo”, acerca da atividade da inosina descrevem que a mesma não apresenta o efeito broncoconstrictor da adenosina administrada por via inalatória em ratos e humanos (Livingston *et al.*, 2004), suspeitando-se que a inosina não promova ativação de mastócitos nos pulmões. Contraditoriamente, foi demonstrado que assim como a adenosina, a inosina liga-se “in vitro” aos receptores A_3 , promovendo degranulação de mastócitos (Jin *et al.*, 1997). Dessa forma, embora a inosina tenha sido descrita como agonista parcial do receptor A_3 , os dados da literatura relacionados à função e expressão deste receptor em células teciduais ainda são escassos e pouco se sabe sobre estes efeitos. Com relação à escassez de dados na literatura, o mesmo se estende aos outros receptores, sendo que pouca informação está disponível sobre a importância dos mesmos para o efeito da inosina.

Existe um interesse crescente em desvendar os mecanismos pelos quais a adenosina e a inosina são capazes de controlar o sistema imune e o processo inflamatório, tanto para compreender as vias envolvidas nestes processos, quanto para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que os receptores para adenosina têm sido descritos como alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a possível atividade anti-inflamatória da adenosina e inosina na inflamação pleural aguda induzida pela carragenina e no modelo de asma induzida pela OVA em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

1) Utilizando o modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina, objetivou-se verificar:

a) A possível ação anti-inflamatória da adenosina e inosina sobre a migração leucocitária total e diferencial para a cavidade pleural e extravasamento plasmático;

b) O envolvimento dos receptores para adenosina no possível efeito anti-inflamatório da adenosina e inosina, na cavidade pleural, através do uso de antagonistas seletivos A_1 (DPCPX), A_{2A} (ZM 241385), A_{2B} (aloxazina), e não seletivo cafeína, bem como, do agonista específico para o receptor A_{2A} , o CGS21680;

c) O metabolismo da adenosina utilizando o EHNA, um inibidor da sua conversão em inosina e dessa forma, a possível contribuição da inosina no efeito anti-inflamatório da adenosina.

d) Quantificação dos níveis de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico no plasma sanguíneo, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

e) A influência do tratamento com adenosina e inosina, sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , em amostras de exsudato pleural, bem como a participação dos receptores para adenosina neste efeito.

2) Através do modelo de inflamação alérgica pulmonar, induzida pela OVA, buscou-se avaliar:

- a) Os efeitos da inosina sobre a asma experimental induzida pela OVA;
- b) O envolvimento dos receptores para adenosina no possível efeito anti-inflamatório da inosina, na asma experimental, através do uso de antagonistas seletivos A₁ (DCPX), A_{2A} (ZM 241385), A_{2B} (aloxazina), e não seletivo cafeína;
- c) A possível interferência da inosina sobre a mobilização leucocitária para os pulmões através da contagem leucocitária no lavado broncoalveolar, sanguínea e na medula óssea;
- d) Quantificação das citocinas IL-4 e IL-5;
- e) Análise histológica de seguimentos pulmonares para avaliação morfológica e de migração leucocitária, deposição de colágeno e remodelamento e produção de muco;
- f) Avaliar os efeitos do tratamento com inosina na mecânica pulmonar, frente a um estímulo com metacolina, utilizando o aparelho “flexivent”.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss e balb/c adultos (18 a 35 g), provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em temperatura constante (22 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração “ad libitum”. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 8 e 12 horas à temperatura de 22 ± 2 °C. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “The Guide for the care and use of experimental animals (Canadian Council on Animal Care)”. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPR e da USP, sob protocolos nº 320/2008 e 58/2009, respectivamente.

3.2 Drogas utilizadas

Usaram-se as seguintes drogas: Adenosina, inosina, aloxazina, CGS 21680, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA), azul de evans, cafeína, xantina, ácido úrico, carragenina lambda, ovoalbumina grau V (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA), 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 4-{2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-il-amino]etil}fenol (ZM241385) (Tocris Bioscience, Park Ellisville, MO, EUA), DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Cultilab, Campinas, Brasil), hidróxido de alumínio (Sanofi-Synthélabo, São Paulo, Brasil), quetamina e xilazina (Vetbrands Saúde Animal, Brasil).

3.3 Métodos

3.3.1 Avaliação dos efeitos da adenosina e inosina sobre a resposta inflamatória aguda através do modelo de pleurisia induzida pela carragenina.

3.3.1.1 Indução da pleurisia

O modelo de pleurisia é um modelo útil para caracterizar ou examinar a possível atividade anti-inflamatória de novas drogas, tendo em vista que esse modelo caracteriza-se por apresentar todos os eventos da reação inflamatória (Frode *et al.*, 2001). Este modelo foi realizado conforme descrito anteriormente (Henriques *et al.*, 1992; Saleh *et al.*, 1996; Frode *et al.*, 2001) com algumas modificações.

Neste modelo, inicialmente, diferentes grupos de animais foram tratados por via endovenosa com uma solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.), para posterior determinação do extravasamento de proteínas plasmáticas para a cavidade pleural. Decorridos 30 min, grupos de animais foram tratados com o veículo (tween, 5 %), adenosina (0,3 -100 mg/kg, i.p.) ou inosina (1,0 - 300 mg/kg, i.p.). Para avaliar o envolvimento dos receptores para adenosina, foram administrados, por via intraperitoneal, o agonista seletivo A_{2A} CGS21680 (0,1 mg/kg, i.p.) ou os antagonistas seletivos para os receptores da adenosina, incluindo, o antagonista seletivo A₁ (DPCPX, 2,5 mg/kg); antagonista seletivo A_{2A} (ZM241385, 1,5 mg/kg), antagonista seletivo A_{2B} (Aloxazina, 5 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg), 30 min antes da administração de adenosina, inosina ou CGS21680. Após 30 min destes tratamentos, foi realizada através do espaço intercostal, a administração intrapleural de 0,1 ml de carragenina (1 %), diluída em solução fisiológica estéril (NaCl, 0,9%) e 4 horas depois, os animais foram mortos com uma overdose de éter etílico. A cavidade pleural foi acessada e lavada com 1,0 ml de salina estéril heparinizada (20 UI/ml) e o líquido pleural foi coletado com auxílio de pipeta automática e processado para contagem total e diferencial de leucócitos e do extravasamento de proteínas.

3.3.1.2 Contagem celular de leucócitos e quantificação indireta do extravasamento de proteínas plasmáticas

A contagem celular, bem como a quantificação indireta de Azul de Evans foi realizada de acordo com o descrito previamente (Henriques *et al.*, 1992; Saleh *et al.*, 1996; Frode *et al.*, 2001), com algumas adaptações.

A contagem total de leucócitos foi realizada, utilizando-se a câmara de Neubauer e microscópio óptico (aumento de 400 vezes). Para tanto, as amostras foram previamente diluídas em líquido de Türk (2% de ácido acético) na proporção de 1:20. Para a contagem diferencial, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e o depósito de leucócitos formado foi ressuscitado em 200 µl de albumina bovina à 3 %, sendo secados à temperatura ambiente e corados com auxílio do “kit” para coloração hematológica Instant Prov (Newprov LTDA, Pinhais, PR, Brasil). A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

Após centrifugação das amostras de exsudato, uma alíquota de 300 µl foi separada do sobrenadante e congelada em freezer (- 20 °C) para posterior determinação dos níveis de Azul de Evans, em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000), por leitura de densidade óptica, em comprimento de onda de 620 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em µg/ml com auxílio de equação da reta.

3.3.1.3 Determinação dos níveis de TNF-α e IL-1β no lavado pleural

Para a quantificação das citocinas TNF-α e IL-1β, amostras de exsudato pleural foram obtidas, utilizando uma solução de PBS, contendo aprotinina (2 µg/ml), tween 20 (0,05 %), PMSF (fenilmetilsulfonilfluoridro, 0,1 mM), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, 10 mM), BSA (albumina de soro bovino, 0,5 %). No dia dos experimentos, não foi realizado o tratamento com o corante fisiológico Azul de Evans. A coleta foi realizada 4 h após a injeção intrapleural de carragenina. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm a 4°C, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi rapidamente congelado e estocado a - 80

°C, para posterior quantificação. A determinação dos níveis de citocinas foi realizada pelo método imunoenzimático de ELISA, utilizando “kits” comercialmente disponíveis (BioLegend Inc., San diego, CA, EUA e R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

3.3.1.4 Estudo do efeito sinérgico entre adenosina e inosina

Para avaliar se a adenosina e inosina apresentam um possível efeito sinérgico, realizou-se uma coadministração por via intraperitoneal de adenosina (0,3 mg/ml) e em seguida, no lado contralateral, foi administrada a inosina (1,0 mg/ml) e 30 min. após, ocorreu a indução da pleurisia. Estas doses foram escolhidas por não apresentarem efeitos sobre os parâmetros inflamatórios avaliados no modelo de pleurisia.

3.3.1.5 Estudo do metabolismo da adenosina, utilizando o EHNA, um inibidor da adenosina deaminase

Este estudo foi realizado com a finalidade de inibir o metabolismo da adenosina através da administração do EHNA, um inibidor da adenosina deaminase, que é a enzima responsável pelo metabolismo da adenosina em inosina. Com esta inibição enzimática, é possível prevenir a formação da inosina e assim verificar se parte dos efeitos atribuídos à adenosina são, na verdade, os efeitos da inosina. Nesta série de experimentos, o modelo experimental escolhido foi o de pleurisia e para avaliar a atividade da adenosina deaminase foi realizado o ensaio enzimático para determinação da atividade da mesma.

Para tanto, inicialmente, foi realizado o tratamento com EHNA, nas doses de 1, 5, 10 e 50 mg/kg, com o intuito de definir a dose que apresentaria inibição da atividade da enzima adenosina deaminase, sem interferir com a resposta inflamatória. Após os ensaios a dose escolhida foi a de 5 mg/kg e em seguida foram realizados os experimentos para avaliar o metabolismo da adenosina. O EHNA (5 mg/kg, i.p.) foi administrado 30 min antes da adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou da inosina (10 mg/kg, i.p.) e após 30 min, ocorreu a indução

da pleurisia com posterior contagem celular e coleta de amostra de exsudato pleural para a determinação da atividade enzimática da adenosina deaminase.

3.3.1.6 Determinação da atividade da adenosina deaminase

O ensaio de atividade enzimática foi realizado de acordo com o descrito por Fröde e Medeiros (2001). Para determinação da atividade enzimática, soluções com diferentes concentrações de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e de NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas para obter uma curva padrão com concentrações entre 10 - 50 U/l. A reação foi iniciada, acrescentando 10 μl de exsudato pleural a 250 μl de solução fosfato tamponada de adenosina a pH 6,5 (composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0.5 mM)). Após incubação por 1 h a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 500 μl da solução de fenol (1 mM) e nitroprussiato de sódio (0,17 mM) em 500 μl de tampão alcalino NaOCl (11 mM). Esta solução, com volume final de 1000 μl , também foi utilizada para confeccionar a curva padrão. As densidades ópticas da curva-padrão e amostras foram obtidas por leitura da absorbância em 620 nm e os valores experimentais em UI/L foram estimados com auxílio de equação da reta (Fröde e Medeiros, 2001).

3.3.1.7 Avaliação do metabolismo da adenosina em inosina, xantina e ácido úrico através da análise por cromatografia de alta performance com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD)

O estudo do metabolismo da adenosina por HPLC foi realizado de acordo com o descrito previamente (Mei *et al.*, 1996; Coolen *et al.*, 2008) com algumas modificações. Inicialmente, amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo ocular de camundongos anestesiados, com auxílio de pipetas de Pasteur contendo EDTA 10%, após 1 e 4 horas da indução da pleurisia. Este grupo foi considerado o grupo controle inflamado. Em adição, diferentes grupos de animais foram tratados com adenosina (100 mg/kg, i.p.) e 30 min. após o tratamento ocorreu a injeção intrapleural de carragenina. No momento desta injeção, amostras de sangue foram colhidas com a finalidade de verificar quais metabólitos estariam circulantes neste momento. Além disso, após 1, 2, 4

e 6 hs da indução da pleurisia amostras também foram colhidas e processadas para a identificação e quantificação da adenosina e seus metabólitos.

a) Preparo da amostra

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.500 r.p.m. por 5 min. à 4°C, para obtenção do plasma sanguíneo. Cerca de 100 µl de ácido perclórico (PCA) 8%, foi adicionado a 100 µl de plasma, para retirar as proteínas da mesma, agitado em vortex por 5 s e centrifugado a 4.500 r.p.m., por 10 min. a 4°C. Em seguida, 130 µl do sobrenadante foi adicionado a 8 µl de uma solução contendo K₂CO₃ (2 M) e KOH (6 M). Novamente as amostras foram centrifugadas a 4.500 r.p.m., por 10 min. a 4°C e 100 µl do sobrenadante foi adicionado a uma solução tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) e em seguida estocadas em freezer – 80 °C.

b) Análise em Cromatógrafo de alta performance

Para a identificação e quantificação dos padrões e da adenosina e seus metabólitos nas amostras processadas, as mesmas foram filtradas por meio de seringa de filtro (0,22 µm, Allcrom) e alíquotas de 25 µl, foram injetadas e um sistema CLAE Varian ProStar, com bomba quaternária (modelo ProStar 240), acoplado a um detector arranjo de diodo de comprimento de onda variável (modelo ProStar 335).

A separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna de fase reversa Phenomenex C18 (Phenomenex, 4.6 X 100 mm, 2.6 µm), em temperatura ambiente e monitorada a 250 nm. O sistema eluente consistiu de 50 mM de fosfato de potássio (fase A) e metanol (Fase B) (v/v), iniciando com 100 % (0 – 2 min. – fase A); com aumento linear de 88 % (2 – 10 min. – fase A); 88% (10 -12 min. – fase A); 100% (12 – 17 min. – fase A) com estabilização de 2 min entre as corridas e fluxo de 1,0 ml/min.

c) Curva de calibração

Foram realizadas curvas de calibração de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico nas amostras, com concentrações crescentes dos padrões (1,125 pM à 40 pM, para adenosina e inosina; e de 3,125 pmol à 100 pmol, para a xantina e ácido úrico). As curvas foram confeccionadas com a finalidade de determinar a concentração da adenosina e metabólitos por interpolação. Por se

tratar de um método de avaliação do metabolismo, utilizou-se a cafeína, uma xantina metoxilada, como padrão interno.

d) Identificação dos picos nas amostras

A quantificação da adenosina e seus metabólitos foi realizada considerando a similaridade entre o espectro de UV e tempo de retenção. Os resultados foram expressos como pmol de padrão, levando em consideração o volume inicial de amostra.

3.3.2 Avaliação dos efeitos da adenosina e inosina no modelo de asma induzida pela ovoalbumina e sobre sistema imune adaptativo

3.3.2.1 Sensibilização e broncoprovocação “in vivo”

Grupos de animais foram imunizados por via subcutânea no dia 0 e 7 com 10 µg de ovoalbumina (OVA, grau V), dissolvidas em 0,4 ml de uma solução saturada de hidróxido de alumínio (2,5 mg/kg), por via subcutânea. A broncoprovocação foi desencadeada a partir do 14º dia, após a sensibilização primária pela exposição dos animais à inalação de 10 mg/ml (1 %) de OVA, grau V, diluída em PBS (2 x por dia, por 2 dias consecutivos). A sessão de inalação foi realizada, por 15 min, em caixa plástica (18,5 cm X 18,5 cm X 13,5 cm), acoplada a um nebulizador ultrassônico com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 µm³. Para avaliação dos efeitos da inosina (0,001 – 100 mg/kg, i.p.) sobre a inflamação nas vias aéreas, induzida pela OVA, diferentes grupos de animais foram tratados com as mesmas ou com o veículo (tween, 5 %) 30 min antes de cada desafio. Para avaliar o envolvimento dos receptores para adenosina, foi realizado um pré-tratamento com antagonistas seletivos como DPCPX (o antagonista seletivo A₁, 2,5 mg/kg); ZM241385 (antagonista seletivo A_{2A}, 1,5 mg/kg); aloxazina (antagonista seletivo A_{2B}, 5 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg), 30 min antes do tratamento com as purinas.

3.3.2.2 Contagem de leucócitos sanguíneos

Decorridas 24 horas da broncoprovocação, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.), e a cavidade peritoneal foi exposta, a artéria aorta foi identificada para coleta das amostras de sangue. Em seguida, alíquotas de 10 µl de sangue foram diluídas em 190 µl de líquido de Türk, para contagem total de leucócitos, com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para a contagem diferencial, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo que foram coradas com auxílio do “kit” para coloração hematológica Instant Prov (Newprov LTDA, Pinhais, PR, Brasil). A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

3.3.2.3 Lavado femural (LF)

O lavado femural foi obtido por lavagem da cavidade femural, logo após a coleta das amostras de sangue. O fêmur esquerdo foi retirado e, com auxílio de uma pinça, foi mantido sobre um tubo Falcon[®] (10 ml). Em seguida, o canal medular foi perfundido com PBS estéril, utilizando uma seringa plástica. A suspensão medular foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática e duas diluições sucessivas, na proporção de 1:10, foram realizadas, sendo que a primeira diluição foi realizada em líquido de Türk e a segunda em PBS. Após este procedimento, a leitura total da medula óssea foi realizada, utilizando-se a câmara de Neubauer, com auxílio do microscópio óptico.

3.3.2.4 Lavado broncoalveolar (LBA)

A contagem total e diferencial de leucócitos no LBA foi realizada de acordo com o descrito por Riffo-Vasquez e col. (2007), com algumas modificações.

Logo após a coleta do lavado femural, a traquéia foi exposta e a seguir inseriu-se uma cânula de polietileno acoplada a uma seringa de plástico contendo PBS, e o LBA foi colhido e processado para contagem total de leucócitos com auxílio de uma câmara de Neubauer. A contagem diferencial de

leucócitos foi realizada após centrifugação das amostras de LBA a 8.000 rpm, a 4°C, por 10 min. Posteriormente, as lâminas foram coradas com auxílio do “kit” para coloração hematológica Instant Prov (Newprov LTDA, Pinhais, PR, Brasil). A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

3.3.2.5 Cultura de “explants” pulmonares

Fragmentos pulmonares, dos diferentes grupos de animais, foram coletados e preparados como descrito por Proust e cols. (2003). Após 24 h do último desafio, os pulmões foram perfundidos, removidos e em seguida 4 fragmentos, com peso aproximado, foram separados e cultivados em meio DMEM, suplementado com penicilina (0,5 %)/estreptomicina (10 mg/ml), aprotinina (2 µg/ml) a 37 °C em 5 % de CO₂, por 24 h. Passado este período, o meio foi coletado e estocado a -80 °C para a determinação de citocinas.

3.3.2.6 Determinação dos níveis de IL-4 e IL-5

Os níveis de IL-4 e IL-5 foram determinados no meio obtido da cultura de tecido pulmonar, através da utilização de “kits” de ELISA disponíveis comercialmente, de acordo com as especificações do fabricante. Para as quantificações realizadas no explante, os resultados foram expressos em pg de citocina produzida por mg de tecido pulmonar seco.

3.3.2.7 Análise das amostras histológicas pulmonares

Os pulmões foram perfundidos com PBS estéril, removidos após a coleta do LBA, fixados em solução de formaldeído à 10 % e emblocados em parafina. Os blocos foram cortados na espessura de 5 µm e os cortes teciduais corados para análise: (1) morfológica e de migração celular com hematoxilina e eosina (HE); (2) da produção de muco pela coloração com ácido periódico de Schiff (PAS); (3) dos depósitos de colágeno através da coloração de picrossírius e (4) migração de mastócitos, com auxílio da coloração com azul de toluidina. A área das vias aéreas corada com HE e intensidade da coloração com PAS foi

avaliada entre a membrana basal e células epiteliais. A intensidade do azul de toluidina foi analisada ao redor da via aérea e a intensidade da coloração de picrossírius, avaliada no músculo liso brônquico, utilizando o programa ImagePro Plus (Media Cybernetics Inc, Bertheda, MD, USA). Os resultados expressos por $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ para as análises dos segmentos corados em HE, em porcentagem nas amostras coradas com PAS e picrossírius (resultados não apresentados) e em células/ mm^2 para as análises de azul de toluidina. Foram analisados em torno de 5 a 8 brônquios por lâmina.

3.3.2.8 Análise da mecânica pulmonar, frente ao estímulo com metacolina

A avaliação dos efeitos da inosina, sobre a mecânica pulmonar, foi realizada com auxílio do aparelho FlexiVent 5.2, Scireq[®], Quebec, Canadá. A metodologia foi realizada de acordo com McGraw e cols. (2007).

Para verificar os efeitos da inosina, diferentes grupos de animais foram tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.), 30 min antes de cada desafio. Para avaliar o envolvimento do receptor A_{2A} , o ZM241385 (antagonista seletivo A_{2A} , 1,5 mg/kg, i.p.) foi administrado 30 min antes da inosina. A responsividade das vias aéreas foi medida, decorridas 24 hs do último desafio. Para tanto, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e a traquéia exposta e canulada com o auxílio de uma cânula metálica, de 20 Gauge. Por meio da cânula, os animais foram conectados ao aparelho de ventilação mecânica e ventilados com volume corrente a 10 ml/kg e frequência respiratória de 450 ciclos/minuto. A pressão positiva expiratória final (PEEP) foi ajustada para 3 cmH_2O por conexão à uma válvula expiratória no ventilador. Antes de coletar os dados da mecânica ventilatória, os pulmões foram insuflados com uma pressão de 30 cmH_2O , a fim de homogeneizar todo o pulmão e aerar possíveis regiões atelectasiadas. Posteriormente, a responsividade pulmonar foi avaliada frente a duas diferentes concentrações de metacolina (Mch), 50 e 100 mg/ml (diluídas em solução fisiológica) que foram oferecidas na forma de aerossol (nebulização), através da traquéia, durante 10 segundos.

Como controle, um grupo de animais recebeu, por via inalatória, salina apirogênica, antes de iniciar as doses de Mch. A coleta dos dados foi realizada, 30 segundos após o término da nebulização de cada concentração de Mch,

ocorrendo um intervalo de 5 minutos entre uma inalação e outra. Para a obtenção dos dados de resistência (R) e elastância (E) do sistema respiratório, foi utilizado o modelo unicompartmental (equação do movimento).

3.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50} s (dose ou concentração das drogas ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Newman Keuls, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. As DI_{50} s foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad”.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da adenosina na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

A figura 4 demonstra que o tratamento por via intraperitoneal com adenosina (0,1 – 100 mg/kg), administrado 30 min antes da carragenina, promoveu a redução do processo inflamatório agudo quando avaliado 4 horas após a injeção intrapleural deste agente pró-inflamatório. Os resultados mostram que a adenosina reduziu a contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos, no exsudato pleural, com inibições de $87 \pm 5 \%$ e $89 \pm 4 \%$ para a dose de 100 mg/kg e valores médios de DI_{50s} de 12,2 (6,7 - 22,8) mg/kg e 3,9 (2,6 - 5,7) mg/kg, respectivamente (Fig. 4 A e B). O tratamento com adenosina, na mesma dose, reduziu significativamente a contagem de mononucleares e o extravasamento plasmáticos com inibições de $55 \pm 5 \%$ e $54 \pm 6 \%$, respectivamente (Fig. 4 A e B).

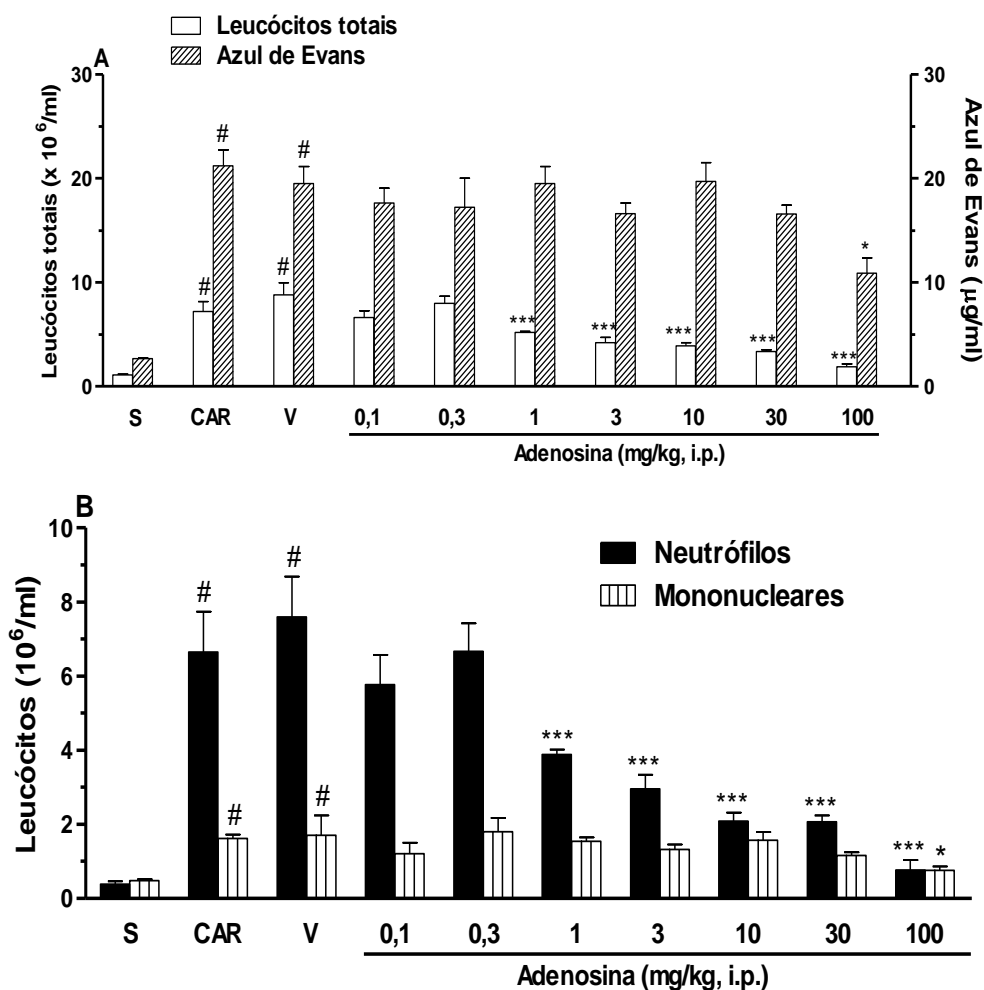


Figura 4: Efeitos da adenosina na contagem total de leucócitos e extravasamento plasmático (A) e contagem diferencial de leucócitos (B), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %), usado para diluir a adenosina; as doses de 0,1 - 100 mg/kg, correspondem aos grupos tratados com adenosina. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais, o E.P.M. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle veículo e [#] $P < 0,001$ quando comparado com o grupo salina (S).

4.2 Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da adenosina na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

Inicialmente, para avaliar o envolvimento dos receptores para adenosina nos efeitos da mesma ou da inosina, as doses dos antagonistas utilizados foi determinada. O efeito do tratamento com os antagonistas foi avaliado na contagem celular total, diferencial e com relação à exsudação pleural, sendo escolhidas as doses que não alteraram estes parâmetros, como descrito na tabela 1.

Os resultados apresentados na figura 5 mostram que o tratamento com ZM241385, um antagonista seletivo para o receptor A_{2A} e com aloxazina um antagonista seletivo para o receptor A_{2B} , administrados 30 min antes do tratamento com adenosina (100 mg/kg), bloqueou completamente (100 %) os efeitos da adenosina na contagem total, diferencial de neutrófilos e no extravasamento plasmático. Além disso, o tratamento com o DPCPX (2,5 mg/kg), um antagonista seletivo para o receptor A_1 , reverteu em $85 \pm 6 \%$ o extravasamento plasmático (Fig. 5 B). No entanto, assim como a cafeína, o DPCPX, não reverteu o efeito da adenosina em nenhum outro parâmetro avaliado.

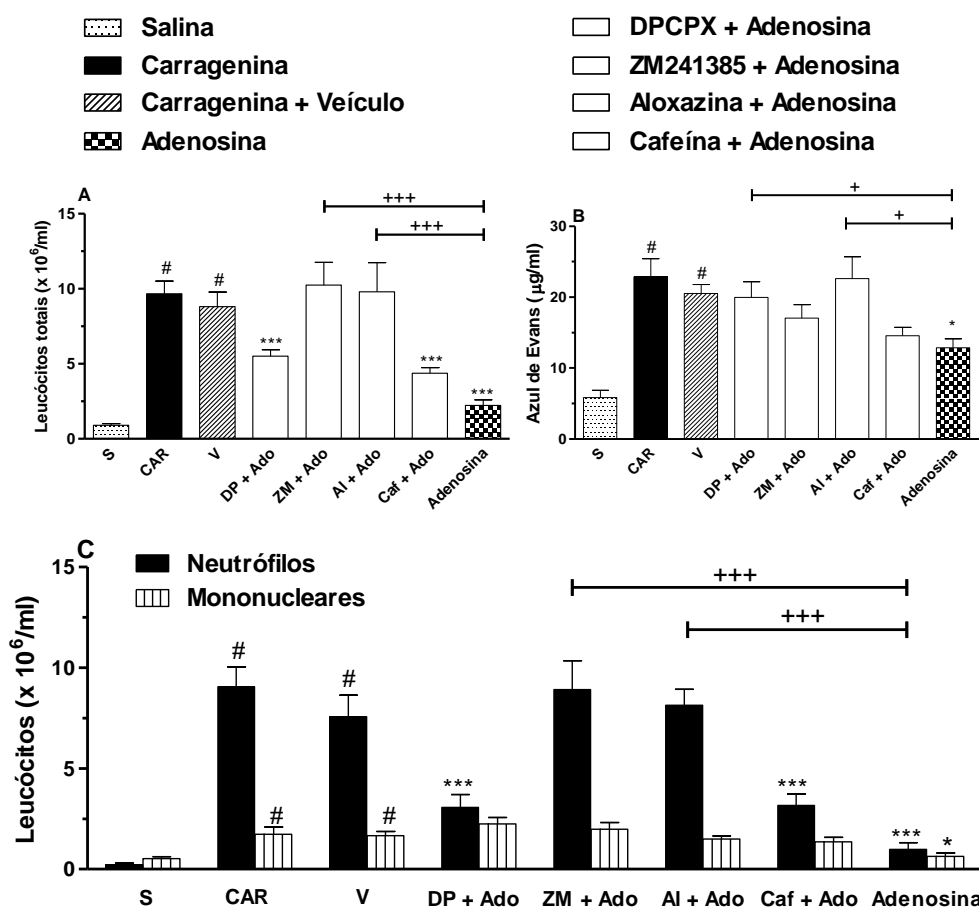


Figura 5: Participação dos receptores para adenosina, nos efeitos da adenosina na contagem total de leucócitos (A); extravasamento plasmático (B) e contagem diferencial de leucócitos (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %) usado para diluir a adenosina (100 mg/kg, i.p.) e antagonistas. DPCPX: antagonista do receptor A_1 ; ZM241385: antagonista do receptor A_{2A} ; Aloxazina: antagonista do receptor A_{2B} ; Cafeína: antagonista não seletivo para os receptores de adenosina. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais, a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle veículo e [#] $P < 0,001$ quando comparado com o grupo salina (S). + $P < 0,05$, +++ $P < 0,001$ quando o grupo adenosina foi comparado com os grupos tratados com antagonistas.

Em adição, observou-se que o pré-tratamento com todos antagonistas utilizados foi capaz de bloquear completamente os efeitos da adenosina sobre a contagem de mononucleares (Fig. 5 C).

Tabela 1: Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos e não seletivos para os receptores de adenosina sobre a contagem celular e extravasamento plasmático, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

	Totais (x 10 ⁶ /ml)	Neutrófilos (x 10 ⁶ /ml)	Mononucleares (x 10 ⁶ /ml)	Azul de Evans (µg/ml)
Grupos controle				
Salina	0,82 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,70 ± 0,09	1,05 ± 0,25
Carragenina (1 %)	4,97 ± 0,24 [#]	3,48 ± 0,21 [#]	1,47 ± 0,10 [#]	9,85 ± 0,92 [#]
Veículo (tween 5%)	4,96 ± 0,26 [#]	3,57 ± 0,28 [#]	1,45 ± 0,07 [#]	9,83 ± 0,81 [#]
Tratamento com antagonistas				
DPCPX (2,5 mg/kg, i.p.)	4,40 ± 0,12	2,96 ± 0,16	1,43 ± 0,16	8,32 ± 1,21
ZM241385 (1,5 mg/kg, i.p.)	4,96 ± 0,22	3,13 ± 0,15	1,68 ± 0,09	8,89 ± 1,12
Alloxazine (5,0 mg/kg, i.p.)	4,53 ± 0,42	3,13 ± 0,36	1,65 ± 0,30	8,58 ± 0,78
Caffeine (2,5 mg/kg, i.p.)	4,90 ± 0,25	3,40 ± 0,10	1,46 ± 0,12	11,20 ± 0,31

A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA seguida pelo teste de múltipla comparação de Newman Keuls (n=6). #P<0.001, quando comparado com o grupo salina.

4.3 Efeitos da inosina na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

O tratamento com inosina (0,3 - 300 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente a contagem de células totais no lavado pleural, na primeira fase da inflamação aguda, induzida pela carragenina, com inibição de 58 ± 9 % para dose de 100 mg/kg (Fig. 6 A). Em adição, a inosina também foi capaz de reduzir a contagem diferencial de neutrófilos e a exsudação pleural com inibições de 70 ± 5% e 66 ± 6% para a dose de 300 mg/kg e com valores médios de DI_{50s} de 6,4 (3,3 - 12,6) mg/kg e 38,1 (17,4 - 83,5) mg/kg, respectivamente (Fig. 6 A e B). Em contraste, o tratamento com inosina não interferiu na contagem diferencial de mononucleares (Fig. 6 B).

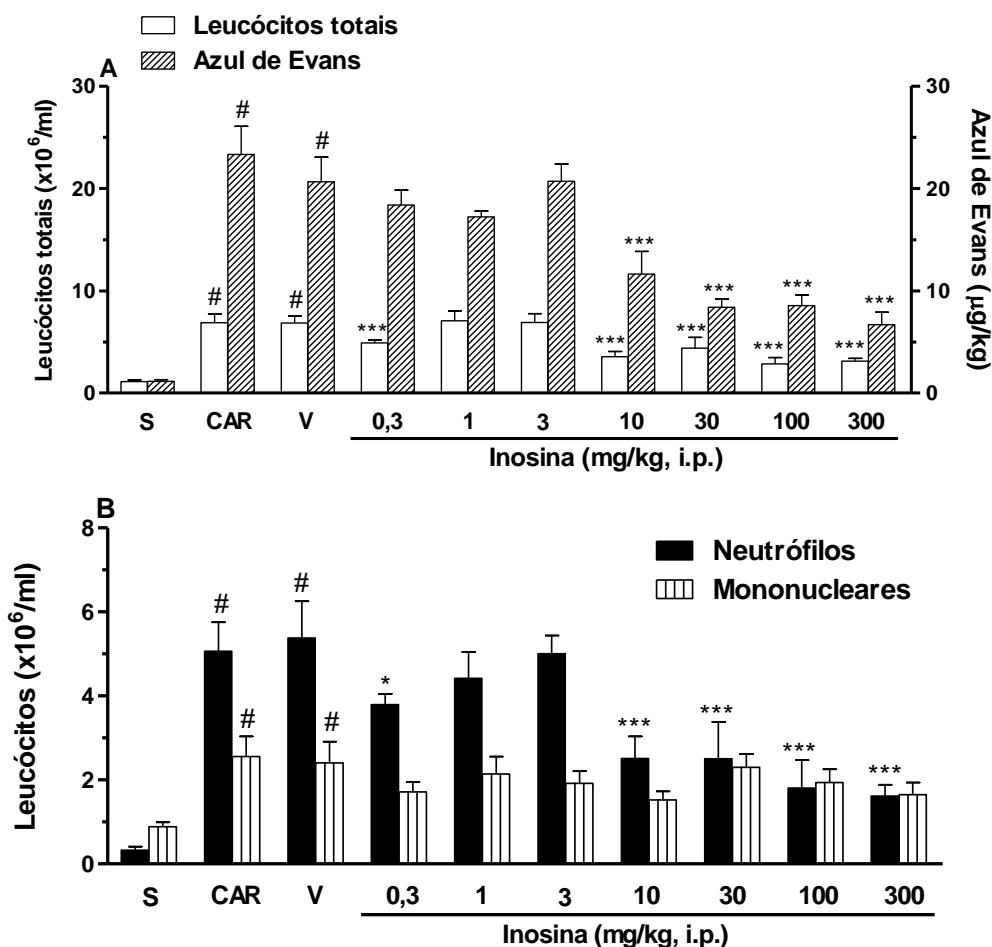


Figura 6: Efeitos da inosina na contagem total de leucócitos e extravasamento plasmático (A) e contagem diferencial de leucócitos (B), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %), usado para diluir a adenosina; as doses de 0,3 - 300 mg/kg, correspondem aos grupos tratados com inosina. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais, o E.P.M. *P < 0,05, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e [#]P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S).

4.4 Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da inosina sobre a inflamação pleural em camundongos

A figura 7 demonstra que o pré-tratamento com todos os antagonistas seletivos utilizados, entre eles o DPCPX (antagonista seletivo A_1); ZM241385 (antagonista seletivo A_{2A}); aloxazina (antagonista seletivo A_{2B}) e com o antagonista não-seletivo, cafeína bloquearam os efeitos da inosina (10 mg/kg i.p.) sobre a contagem total de leucócitos, na cavidade pleural, com reversões de 67 ± 6 %, 70 ± 4 %, 73 ± 9 % e 69 ± 12 %. Além disso, os efeitos da inosina sobre a contagem diferencial de neutrófilos também foi bloqueado pelo

tratamento com os mesmos antagonistas, com reversões de $64 \pm 6 \%$ (DPCPX), $63 \pm 6 \%$ (ZM241385), $85 \pm 13 \%$ (Aloxazina), e $70 \pm 13 \%$ (cafeína) (Fig. 7 A e C). O efeito da inosina sobre a exsudação pleural também foi completamente (100 %) bloqueado pelo tratamento com os antagonistas (Fig. 7 B).

Para a série de experimentos em que foi verificada a contribuição dos receptores para adenosina, no efeito da inosina, foi escolhida a dose de 10 mg/kg desta, devido os efeitos observados para esta dose não diferirem estatisticamente dos observados para as doses maiores e em virtude do tratamento com inosina não apresentar um efeito dependente da dose utilizada.

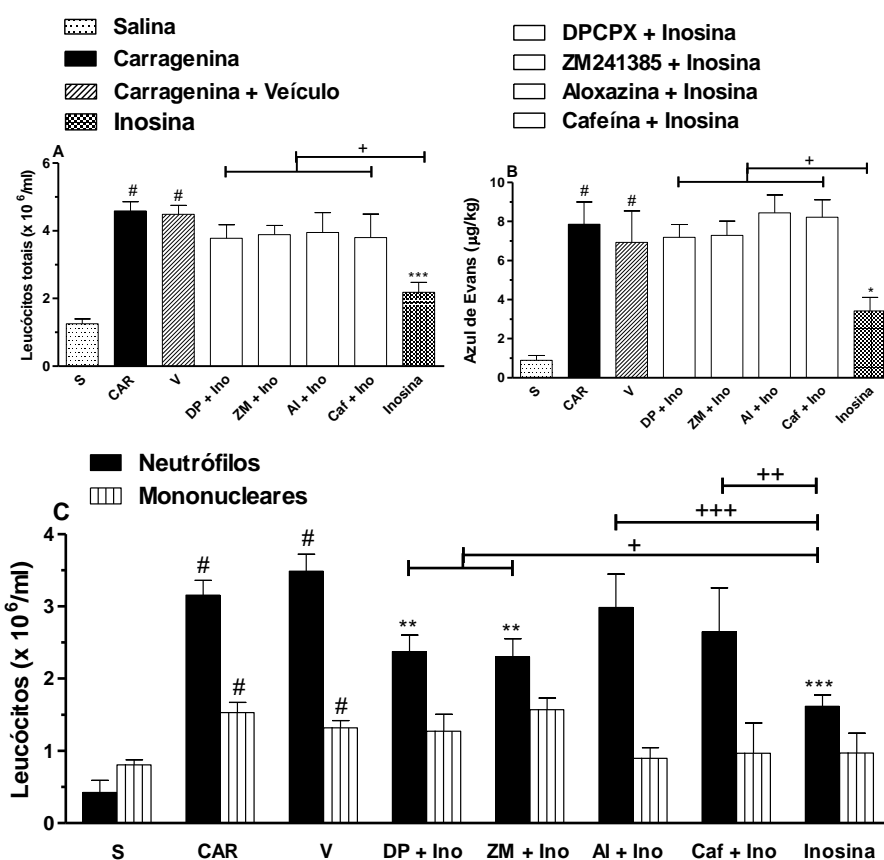


Figura 7: Participação dos receptores para adenosina, nos efeitos da inosina na contagem total de leucócitos (A); extravasamento plasmático (B) e contagem diferencial de leucócitos (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %) usado para diluir a inosina (10 mg/kg, i.p.) e antagonistas. DPCPX: antagonista do receptor A_1 ; ZM241385: antagonista do receptor A_{2A} ; Aloxazina: antagonista do receptor A_{2B} ; Cafeína: antagonista não seletivo para os receptores de inosina. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais. As linhas verticais, a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle veículo e [#] $P < 0,001$ quando comparado com o grupo salina (S). ⁺ $P < 0,05$, ⁺⁺ $P < 0,01$, ⁺⁺⁺ $P < 0,001$ quando se comparou o grupo inosina e os grupos tratados com antagonistas.

4.5 Participação dos receptores A₂ para adenosina e efeitos do CGS21680, um agonista seletivo A_{2A}, na inflamação pleural

Os dados apresentados na figura 8 demonstraram que o tratamento com CGS21680 (0,1 mg/kg, i.p.), um agonista com seletividade para o receptor A_{2A}, reduziu completamente (100 %) a contagem total de leucócitos no lavado pleural; a diferencial de neutrófilos e extravasamento plasmático com inibições de 85 ± 9 % e 91 ± 4 %, respectivamente. O pré-tratamento com o ZM241385, o antagonista seletivo A_{2A} bloqueou os efeitos do CGS21680 sobre o extravasamento plasmático em 90 ± 6 % e aboliu completamente os efeitos deste agonista sobre a contagem total e diferencial de neutrófilos (Fig. 8 A e C). O pré-tratamento com aloxazina, o antagonista seletivo A_{2B}, reverteu em 45 ± 6 % e 43 ± 6 %, a contagem total de leucócitos e a exsudação pleural, respectivamente (Fig. 8 A e B). A dose utilizada de CGS21680, foi escolhida de acordo com o descrito na literatura (Impellizzeri *et al.*, 2011). Estes resultados reforçam as evidências de que os receptores A_{2A} e A_{2B} medeiam os efeitos da adenosina e inosina e apresentam um papel importante na modulação da inflamação aguda.

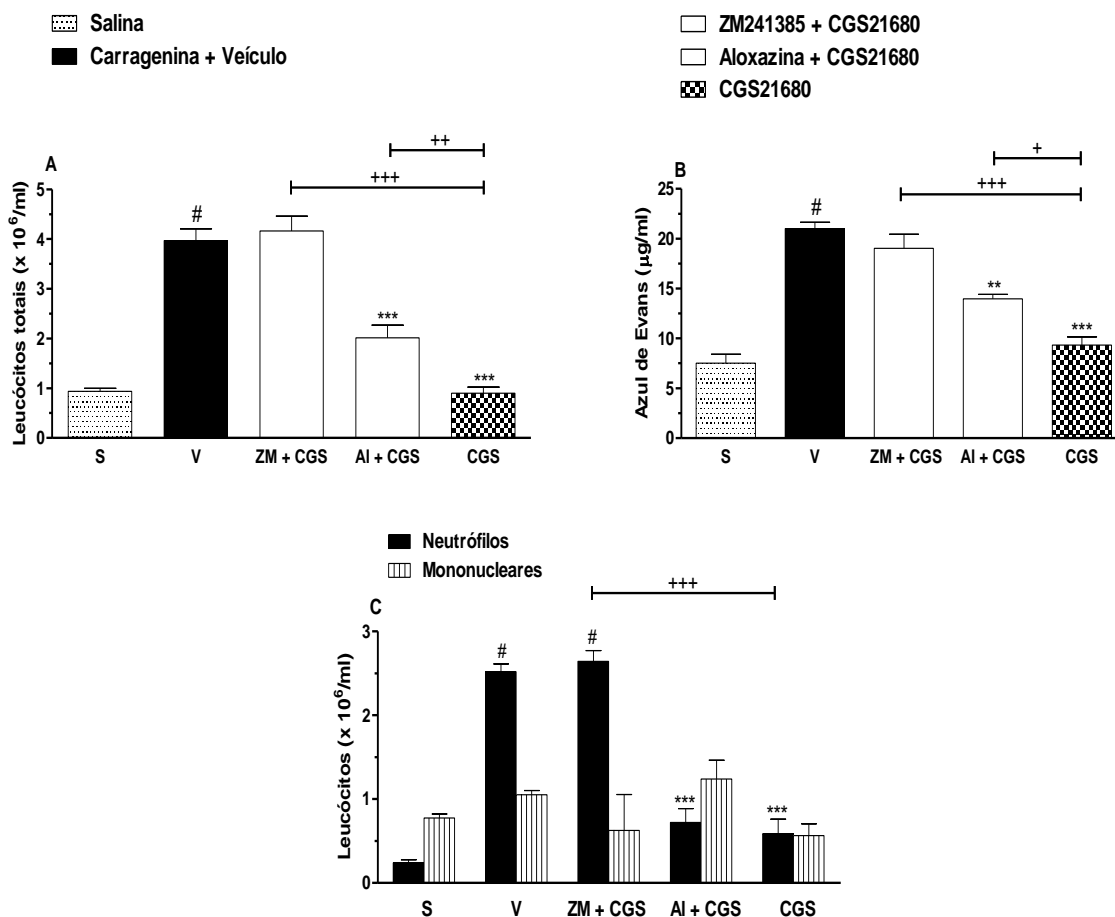


Figura 8: Participação dos receptores A_{2A} nos efeitos do CGS21680, na contagem total de leucócitos (A); extravasamento plasmático (B) e contagem diferencial de leucócitos (C), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %), usado para diluir o CGS21680 e os antagonistas. ZM241385: antagonista do receptor A_{2A} ; Aloxazina: antagonista do receptor A_{2B} . Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais, a média \pm E.P.M. **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 quando o grupo CGS21680 foi comparado com os grupos tratados com antagonistas.

4.6 Efeitos da adenosina e inosina sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no exsudato pleural de camundongos

O tratamento com adenosina (100 mg/kg, i.p.) reduziu 50 ± 2 % e 38 ± 6 %, os níveis de TNF- α e IL-1 β , respectivamente, no exsudato pleural. O pré-tratamento com DPCPX, ZM241385, aloxazina e cafeína, não foi capaz de reverter os efeitos da adenosina (Fig. 9 A e C).

Os resultados apresentados na figura 9 C e D ainda demonstram que a inosina (10 mg/kg, i.p.), administrada por via intraperitoneal, reduziu em 77 ± 7

% os níveis de TNF- α , sem interferir com os níveis de IL-1 β . Os efeitos da inosina sobre os níveis de TNF- α foi bloqueado pelo pré-tratamento com ZM241385 e cafeína em 93 ± 7 e 90 ± 10 %, respectivamente.

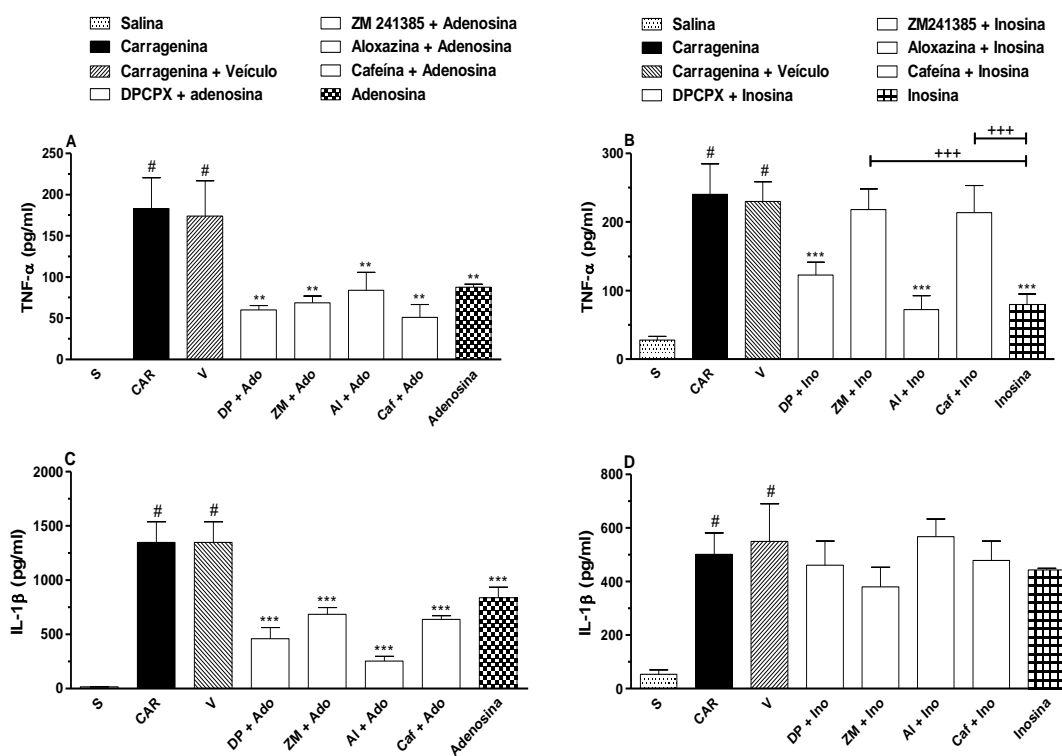


Figura 9: Níveis de TNF- α (A e B) e IL-1 β (C e D) em exsudato pleural de camundongos pré-tratados com os antagonistas de receptores para adenosina e tratados com adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou inosina (10 mg/kg, i.p.). S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %) usado para diluir a adenosina, inosina e antagonistas. DPCPX: antagonista do receptor A₁; ZM241385: antagonista do receptor A_{2A}; Aloxadina: antagonista do receptor A_{2B}; Cafeína: antagonista não seletivo para os receptores de adenosina. Cada coluna representa a média de 3 - 5 animais e as linhas verticais, a média \pm E.P.M. **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S). +++P < 0,001 quando o grupo inosina ou adenosina foi comparado aos grupos tratados com antagonistas.

4.7 Avaliação do efeito sinérgico entre a adenosina e inosina

Para verificar se a inosina contribui com os efeitos da adenosina observados neste trabalho, foi realizado um cotratamento com adenosina (0,3 mg/kg, i.p.) e inosina (1,0 mg/kg, i.p.). Estas doses foram escolhidas, pois não apresentaram efeitos sobre a inflamação induzida pela carragenina. Os resultados demonstraram que o cotratamento reduziu a contagem total de

leucócitos e diferencial de neutrófilos em $56 \pm 6 \%$ e $56 \pm 4 \%$, respectivamente, sem interferir com a contagem de mononucleares (Fig. 10 A e B). Estes resultados sugerem que há um efeito sinérgico entre as duas purinas.

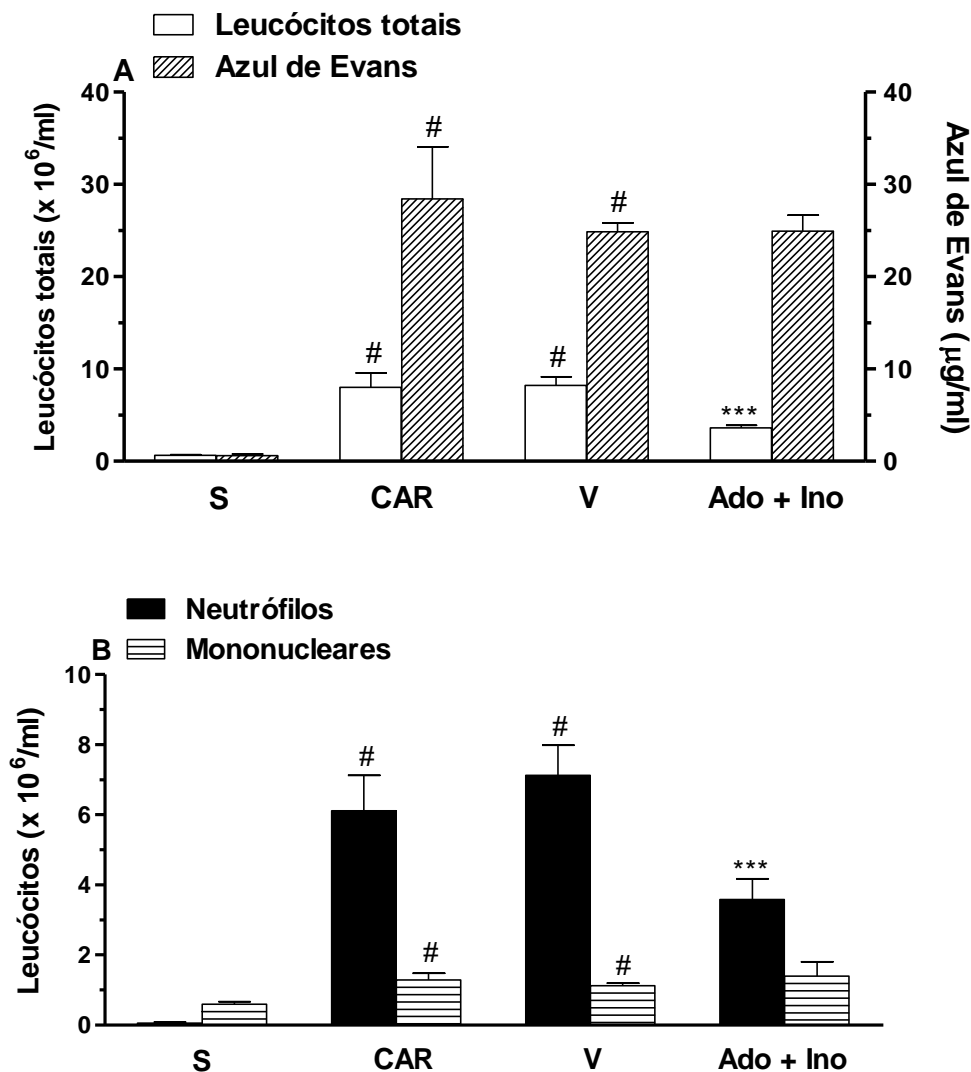


Figura 10: Efeito sinérgico do pré-tratamento com adenosina e inosina, na contagem total de leucócitos, extravasamento plasmático (A) e contagem diferencial de leucócitos (B), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. S: representa os animais tratados com salina (0,9 %); CAR: representa o grupo tratado somente com carragenina (1 %); V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %), usado para diluir as purinas; Ino + Ado: representa o grupo que recebeu o cotratamento. Cada coluna representa a média de 6 -10 animais e as linhas verticais, o E.P.M. ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e [#]P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S).

4.8 Estudo do metabolismo da adenosina em inosina

4.8.1 Avaliação do metabolismo da adenosina em inosina através da administração do EHNA e determinação da atividade da adenosina deaminase

Para este estudo foi utilizado um inibidor da adenosina deaminase, o EHNA (5 mg/kg, i.p.). O tratamento somente com EHNA reduziu a atividade da enzima adenosina deaminase com inibição de 63 ± 1 %, em comparação com o grupo controle, sem apresentar efeitos significativos sobre a contagem de leucócitos (Fig. 11 A e B).

Com a finalidade de estudar o metabolismo da adenosina em inosina, o EHNA foi administrado 30 min antes da adenosina ou inosina. Observou-se que em animais tratados com adenosina (10 mg/kg, i.p.), o EHNA inibiu a adenosina deaminase em 61 ± 1 %. Com esta inibição é possível sugerir que a formação de inosina foi reduzida. Apesar desta redução, não houve inibição no efeito da adenosina sobre a contagem leucocitária, que permaneceu idêntica ao do grupo tratado somente com adenosina, com inibições de 60 ± 2 % (para o grupo que recebeu o tratamento com EHNA e adenosina) e 50 ± 3 % (para o grupo que tratado somente com adenosina). Se o efeito da adenosina fosse dependente do seu metabolismo em inosina, ao menos parcialmente, o efeito da adenosina seria reduzido, o que não foi observado (Fig. 11 A).

Em adição, o pré-tratamento com EHNA e posteriormente com inosina inibiu a atividade enzimática em 63 ± 3 % e bloqueou em 63 ± 7 % o efeito da inosina (10 mg/kg, i.p.) sobre a contagem leucocitária, em comparação ao grupo tratado somente com inosina. Este dado sugere que, nos experimentos realizados, parece estar ocorrendo uma conversão de inosina em adenosina e que aparentemente, ao contrário do que se esperava, neste modelo experimental os efeitos da inosina são dependentes da adenosina (Fig. 11 A e B).

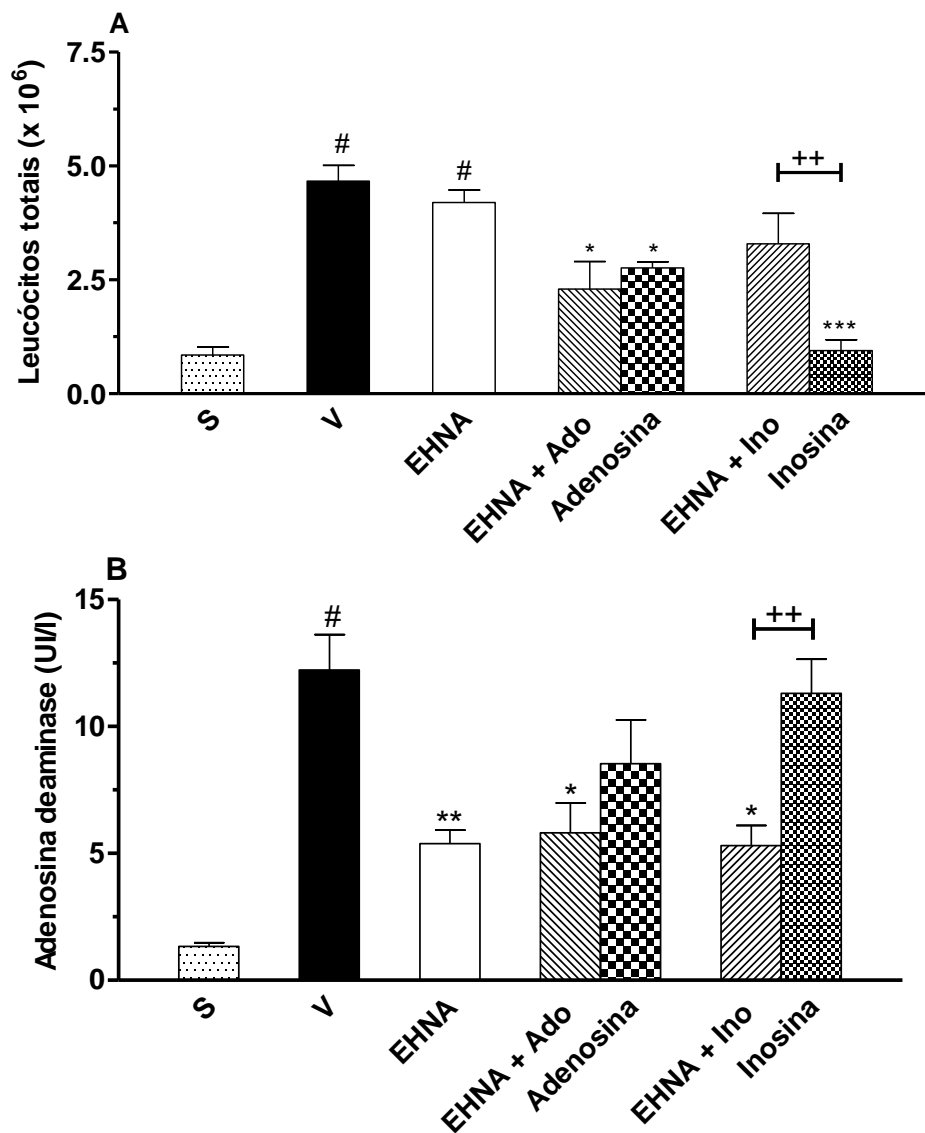


Figura 11: Efeito do pré-tratamento com EHNA sobre o metabolismo da adenosina em inosina, no modelo de pleurisia em camundongos (A) contagem total de leucócitos e (B) atividade da enzima adenosina deaminase. S: representa os animais tratados com salina 0,9 %; V: corresponde ao grupo tratado com carragenina e com veículo (tween, 5 %), usado para diluir o EHNA, adenosina e inosina; EHNA: corresponde ao grupo tratado com EHNA (5 mg/kg, i.p.); EHNA + Ado ou EHNA + Ino: correspondem aos grupos pré-tratados com EHNA e purinas; Adenosina ou Inosina: representa o grupo tratado somente com adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou inosina (10 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais, o E.P.M. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S) e ++P < 0,01, quando comparado ao grupo tratado com EHNA e adenosina ou inosina.

4.8.2 Estudo do metabolismo da adenosina através da determinação dos níveis plasmáticos de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico, por cromatografia de alta performance com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD)

A figura 12 demonstra o cromatograma com identificação dos picos referentes aos padrões de ácido úrico, xantina, inosina, adenosina e cafeína (utilizada como padrão interno do método) (Fig. 12 A). Todos os padrões foram separados em uma corrida de 16 min e a identificação dos picos de cada um, bem como a sua pureza, foi confirmada comparando o tempo de retenção e espectro de absorção ultravioleta (UV) dos mesmos.

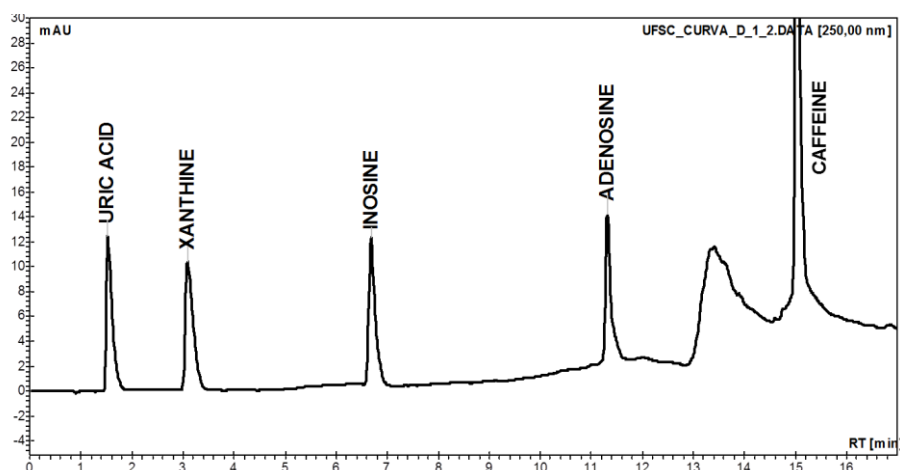


Figura.12: Cromatograma dos padrões para adenosina, inosina, xantina e ácido úrico. A cafeína foi utilizada como controle interno do método. Os cromatogramas foram obtidos em 250 nm e registrados em mili unidade de absorbância por segundo (mAU).

Os resultados descritos na figura 13 demonstraram que as curvas de calibração apresentaram uma linearidade (R^2 em torno de 0,99) entre os diferentes pontos. Estas curvas apresentam pontos que correspondem as diferentes concentrações de adenosina e inosina que variaram de 1,125 pM à 40 pM. Em adição, para a xantina e ácido úrico estas concentrações variaram de 3,125 pM à 100 pM. Estas curvas foram utilizadas para interpolação dos dados obtidos no cromatograma, para posterior determinação das concentrações da adenosina e seus metabólitos no plasma sanguíneo de camundongos controles (inflamados), tratados somente com carragenina e do grupo tratado com adenosina.

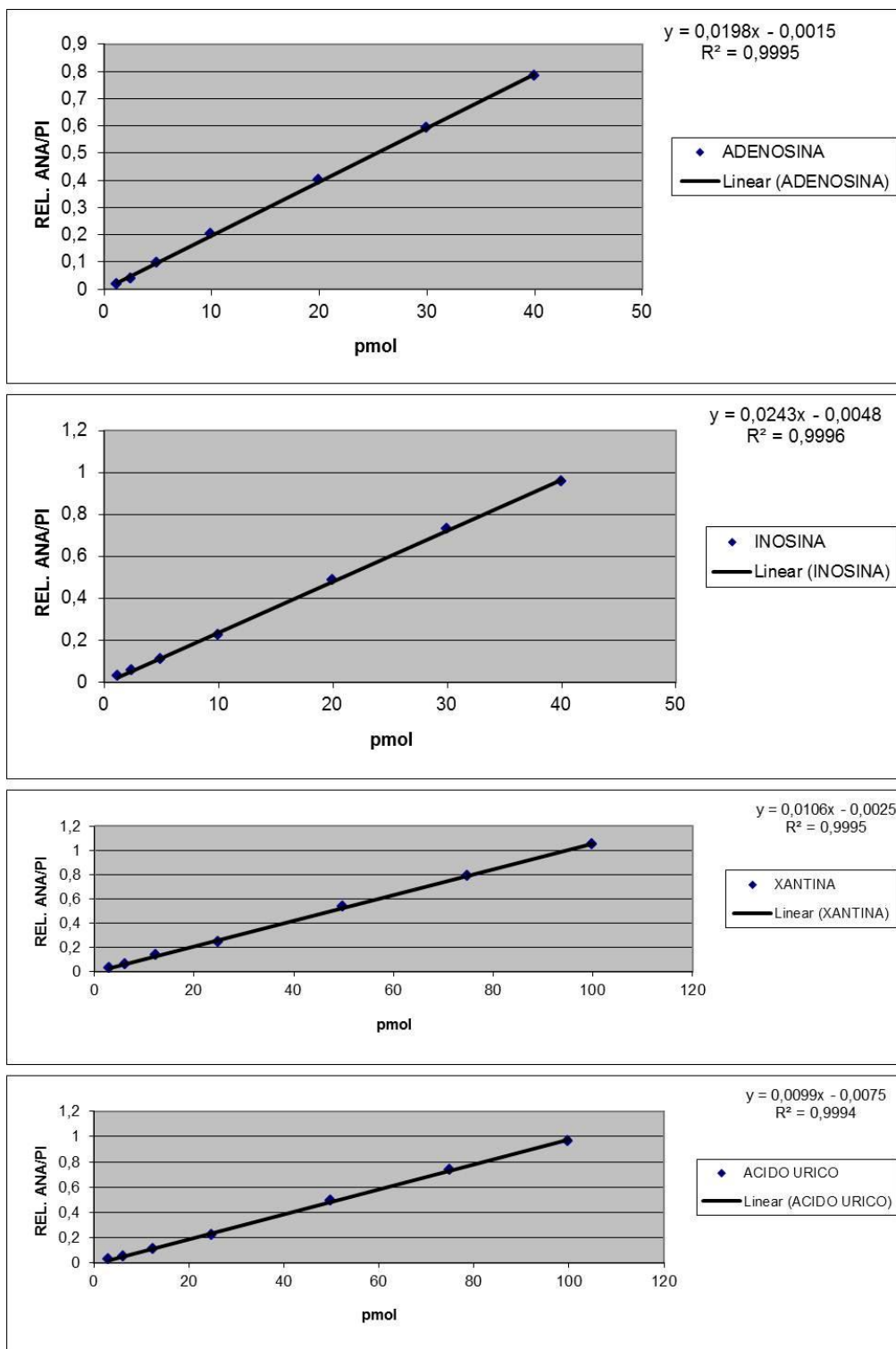


Figura 13: Curvas de calibração para detecção e quantificação sérica da adenosina, inosina, xantina e ácido úrico.

A figura 14 demonstra que os espectros de UV para a adenosina, inosina, xantina, ácido úrico e cafeína, são característicos para cada nucleosídeo e confirmam os picos e pureza dos padrões identificados nos cromatogramas.

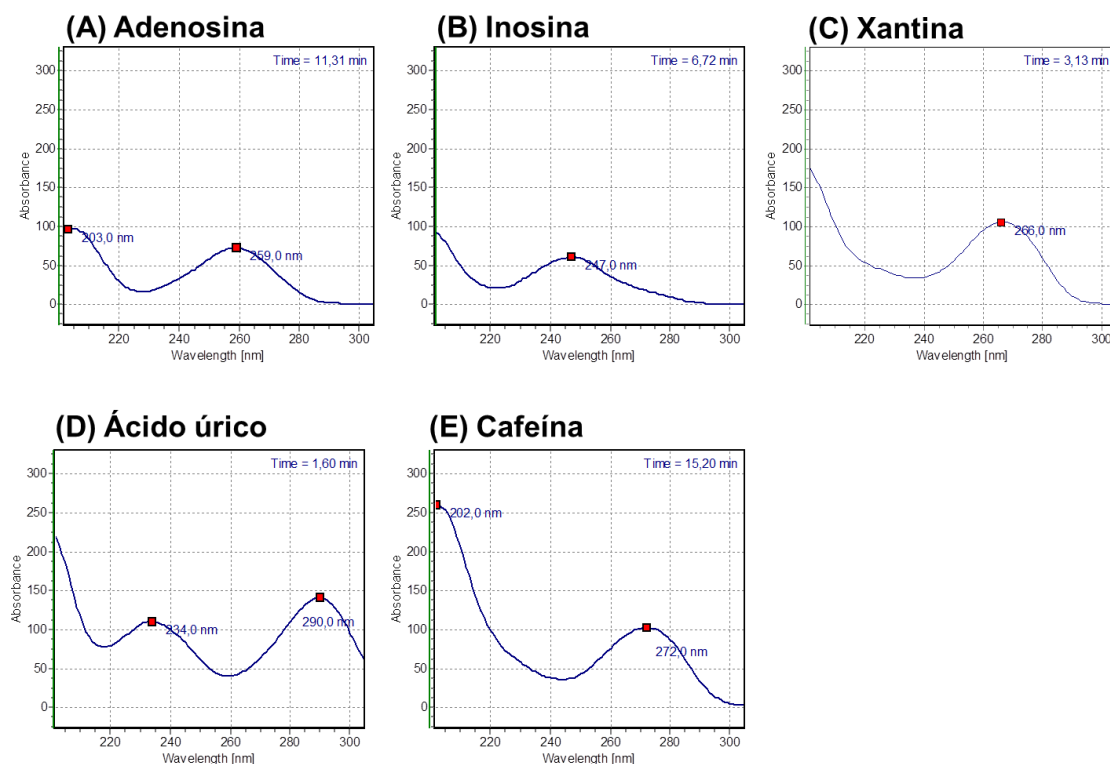


Figura 14: Espectro de absorção UV, obtidos dos cromatogramas para (A) adenosina; (B) inosina; (C) xantina; (D) ácido úrico e (E) cafeína.

As figuras 15 (A - D) mostram as concentrações plasmáticas de adenosina e seus metabólitos de acordo com o tempo. Foi possível observar que a administração de carragenina promoveu uma elevação nos níveis de adenosina e seus metabólitos que atingiu um pico em 1 hora e manteve-se elevada até a quarta hora. Além disso, o resultado nos mostra claramente que houve um aumento significativo dos níveis de ácido úrico e xantina em relação aos níveis de adenosina e inosina, que não diferiram entre si (Fig. 15 A e C).

As figuras 15 B e D, demonstraram que 30 min após o tratamento com adenosina (100 mg/kg, i.p.) ocorreu um aumento nas concentrações de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico, observando-se que a concentração de xantina atingiu seu pico neste momento (6,23 pM) e foi reduzida até sexta hora. As concentrações de adenosina, inosina e ácido úrico atingiram o pico em 1 h e ficaram respectivamente em 0,72, 0,56 e 13,98 pM. Estas concentrações foram reduzidas gradativamente com o passar do tempo, em até 6 horas, o que estaria provavelmente envolvendo o metabolismo e excreção das mesmas. É importante ressaltar que após o tratamento com adenosina, concentrações plasmáticas de adenosina e inosina não diferiram entre si durante o período avaliado.

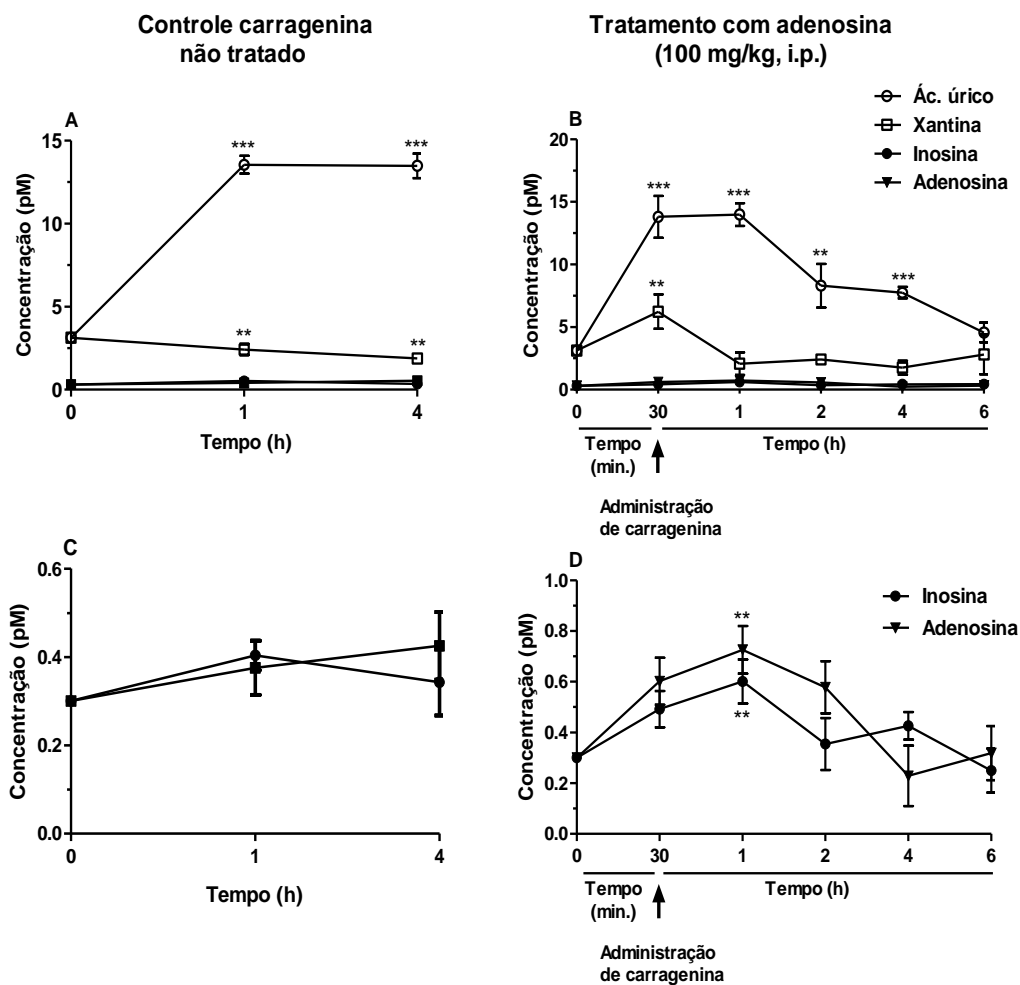


Figura 15: Concentrações séricas de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico durante a inflamação pleural aguda. Os gráficos A e C correspondem ao grupo controle inflamado não tratado com adenosina; os gráficos B e D correspondem aos grupos pré-tratados com adenosina e posteriormente (30 min. após) com carragenina. Cada ponto representa a média \pm E.P.M de 3 – 5 animais. **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo adenosina.

4.9 Efeitos da adenosina sobre a asma induzida pela ovalbumina, em camundongos

Os resultados apresentados na figura 16 demonstram que tratamento com adenosina (1,0 – 100 mg/kg, i.p.), não alterou a contagem total ou diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar dos animais desafiados com OVA.

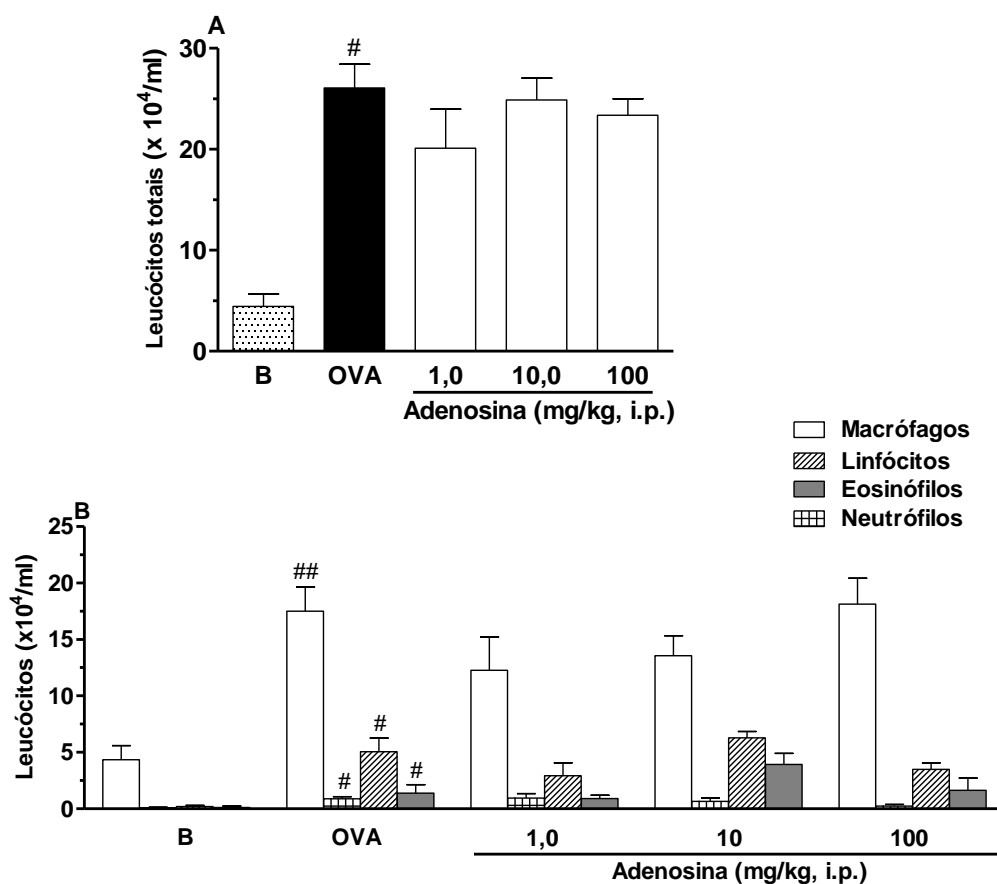


Figura 16: Efeitos da adenosina na contagem total (A) e diferencial de ,macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (A), presentes no LBA de camundongos sensibilizados e broncoprovocados com OVA. O grupo B, representa o grupo basal não sensibilizado ou desafiado; o grupo OVA corresponde ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA; as doses de 1,0 – 100 mg/kg correspondem ao grupo tratado com adenosina. Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais, o E.P.M. ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle OVA, tratado com veículo (tween 5%) e [#]P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S).

4.10 Efeitos da inosina sobre a asma induzida pela ovoalbumina em camundongos

Os resultados apresentados na figura 17 demonstram que tratamento com inosina (0,001 – 100 mg/kg, i.p.), reduziu completamente a contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar dos animais desafiados com OVA, com na dose de 1 mg/kg e DI_{50} de 0,094 (0,023 - 0,37) mg/kg. Além disso, a administração de inosina também reduziu completamente a contagem de macrófagos no BALF e a contagem de linfócitos e eosinófilos com inibições de $92 \pm 3\%$ e $97 \pm 2\%$, respectivamente. A quantidade de neutrófilos foi equivalente a menos de 6 % dos leucócitos encontrados no LBA e o tratamento com inosina não alterou sua contagem.

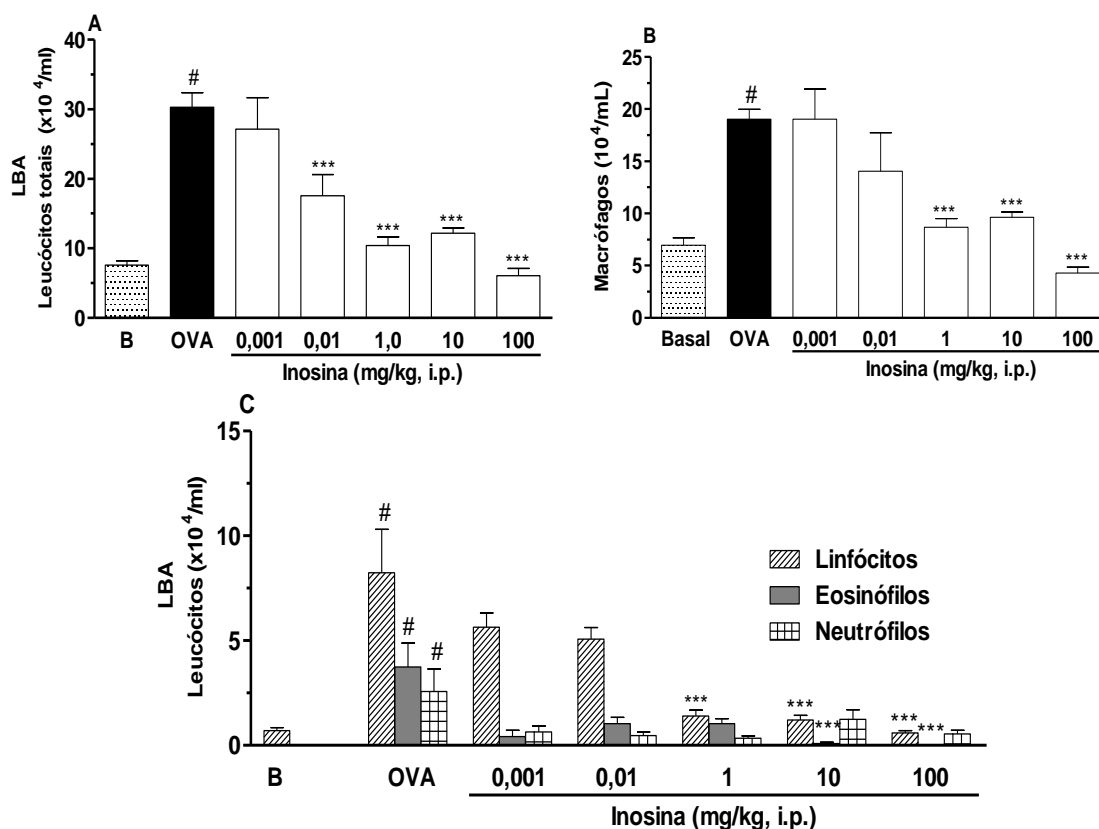


Figure 17: Efeitos da inosina na contagem total de células (A); macrófagos (B) e linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (C), presentes no LBA de camundongos sensibilizados e broncoprovocados com OVA. O grupo B, representa o grupo basal não sensibilizado ou desafiado; o grupo OVA corresponde ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA; as doses de 0,001 – 100 mg/kg correspondem ao grupo tratado com inosina. Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais, o E.P.M. ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle OVA, tratado com veículo (tween 5%) e #P < 0,001 quando comparado com o grupo salina (S).

4.11 Efeitos da inosina sobre a contagem de leucócitos sanguíneos e medula óssea

Os resultados apresentados na figura 18 revelam que nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, houve um aumento no número de leucócitos sanguíneos que foi reduzido pelo tratamento com inosina em 32 ± 12 %, somente na dose de 1 mg/kg. A administração de inosina, na dose de 1 mg/kg não só reduziu a contagem sanguínea de leucócitos, como também promoveu um aumento na contagem leucocitária da medula óssea (Fig. 18 A e B). A inosina administrada nas demais doses (0,001; 0,01, 10 e 100 mg/kg, i.p.) não alterou a contagem leucocitária circulante ou na medula óssea.

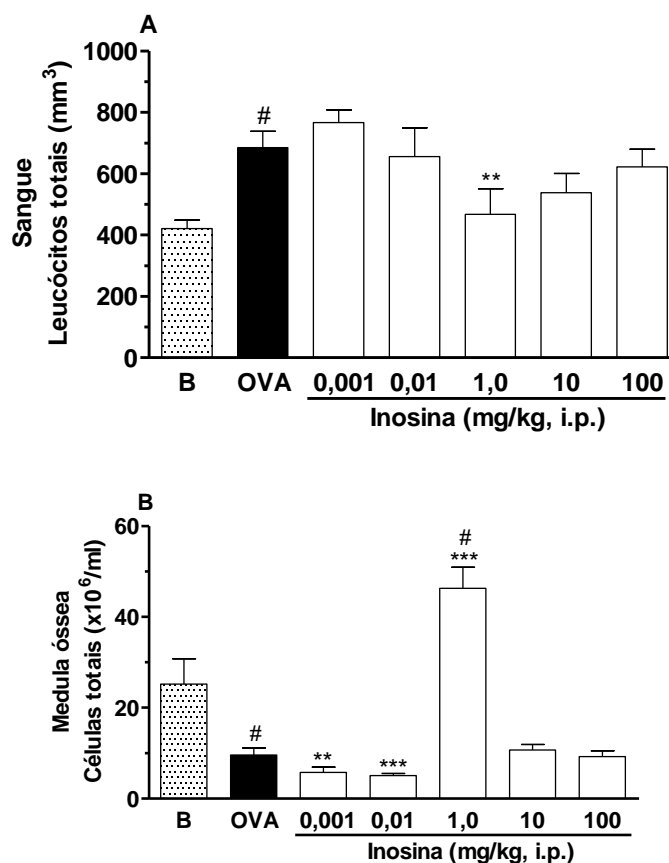


Figura 18: Efeitos do tratamento com inosina na contagem leucocitária sanguínea periférica (A) e na medula óssea (B). O grupo B, representa o grupo basal não sensibilizado ou desafiado; o grupo OVA corresponde ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA; as doses de 0,001 – 100 mg/kg correspondem ao grupo tratado com inosina. Cada coluna representa a média de 5 animais e as barras verticais, o E.P.M. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle OVA, tratado com veículo (tween 5%) e [#]P < 0,001 quando comparado com o grupo basal (B).

4.12 Envolvimento dos receptores para adenosina no efeito da inosina, sobre a inflamação alérgica pulmonar, induzida pela OVA, em camundongos

4.12.1 Avaliação no LBA

A figura 19 demonstra que de acordo com experimentos anteriores, a inosina na dose de 10 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, reduziu completamente a contagem de leucócitos no LBA. O pré-tratamento com ZM241385 ou com cafeína, 30 min antes da administração de inosina (10 mg/kg, i.p.), bloquearam o seu efeito sobre a contagem de leucócitos no LBA em $66 \pm 8\%$ e $86 \pm 8\%$, respectivamente. Além disso, o pré-tratamento com DPCPX (2,5 mg/kg, i.p.) e com aloxazina (5 mg/kg, i.p.), não interferiu no efeito da inosina nas contagens total e diferencial no LBA (Fig. 19 A - C).

Em relação à contagem diferencial de leucócitos, foi observado que o ZM241385 e a cafeína reverteram o efeito inibitório da inosina sobre a contagem de macrófagos no LBA. A contagem de linfócitos foi adicionalmente revertida pela cafeína (Fig. 19 B e C).

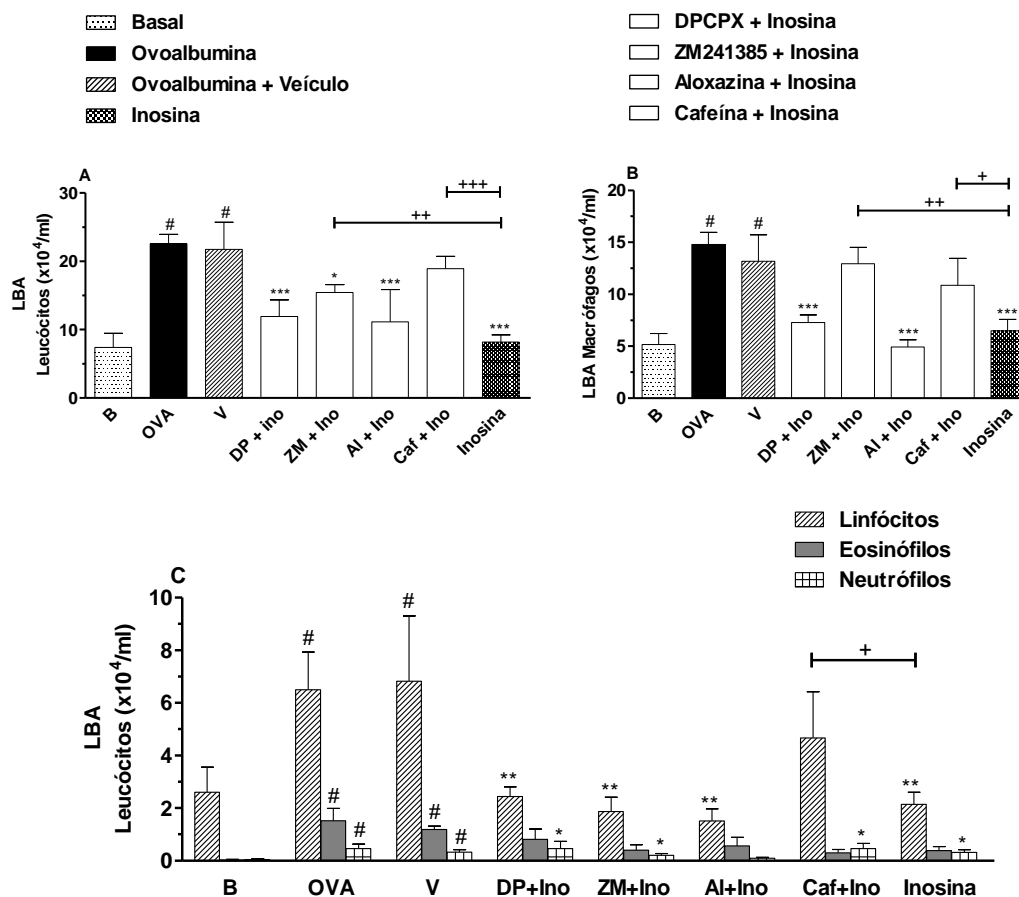


Figura. 19: Efeitos do pré-tratamento com os antagonistas da adenosina e com a inosina na contagem total de leucócitos (A); contagem diferencial de macrófagos (B) e contagem diferencial de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos (C), no LBA. O grupo B representa o grupo basal não desafiado ou broncoprovocado; o grupo OVA corresponde ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA; o grupo veículo corresponde ao grupo veículo (tween, 5 %) usado para diluir a inosina e antagonistas. DPCPX: antagonista do receptor A₁; ZM241385: antagonista do receptor A_{2A}; Aloxazina: antagonista do receptor A_{2B}; Cafeína: antagonista não seletivo para os receptores de inosina. Cada coluna representa a média de 6 -10 animais e as linhas verticais, o E.P.M. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,001 quando comparado com o grupo basal (B). +P < 0,05, ++P < 0,01, +++P < 0,001 quando o grupo inosina for comparado aos grupos tratados com antagonistas.

4.12.2 Avaliação da participação dos receptores para adenosina através da histologia de pulmão de camundongos corados com hematoxilina e eosina

A análise do tecido pulmonar corado com hematoxilina e eosina (Fig. 20) revelou que as áreas peribronquial e perivascular, dos animais alérgicos, ou seja, sensibilizados e desafiados com OVA ou tratados com o veículo, apresentaram um grande número de leucócitos (Fig. 20 B). O tratamento com inosina reduziu significativamente a infiltração leucocitária nestas regiões, de forma similar ao grupo basal (Fig. 20 A e H). Como o descrito na análise do

LBA, o pré-tratamento com ZM241385 ou cafeína reverteram completamente o efeito da inosina sobre a migração de leucócitos para os pulmões, enquanto o pré-tratamento com DPCPX ou aloxazina não interferiu com os efeitos da mesma. Outro parâmetro observado nos cortes histológicos foi a hipertrofia do epitélio brônquico nos animais alérgicos (Fig. 20 B) que foi reduzida com a administração de inosina. Este efeito também foi revertido com o pré-tratamento com ZM241385, cafeína e adicionalmente com DPCPX (Fig. 20 D, E, G e I).

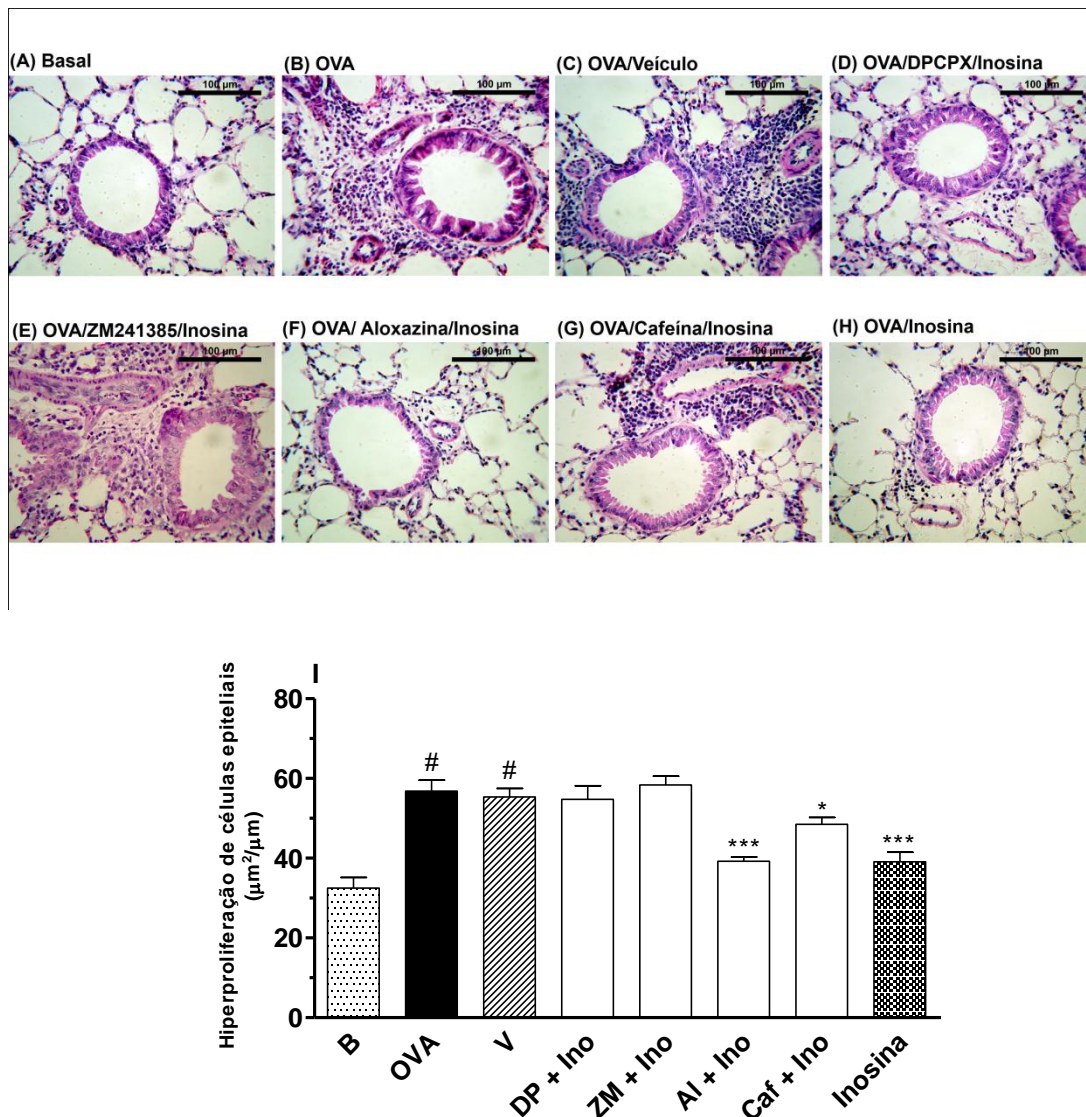


Figura 20: Efeitos da inosina sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar de animais alérgicos. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. (A) grupo basal não sensibilizado ou desafiado com OVA; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA; (C) grupo alérgico desafiado e tratado com veículo (tween, 5%), utilizado para diluir a inosina e antagonistas; (D à G) grupo alérgico pré-tratado com os antagonistas DPCPX, ZM241385, aloxazina, cafeína e tratados com inosina (10 mg/kg); (H) grupo alérgico tratado com inosina; (I) hiperproliferação epitelial. Os dados estão representados por média \pm E.P.M. Em cada grupo foi utilizado 5 animais. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle veículo e # $P < 0,001$ quando comparado com o grupo basal (B).

4.12.3 Avaliação da participação dos receptores para adenosina na migração de mastócitos através de cortes histológicos de pulmão, corados com azul de toluidina

As análises dos cortes histológicos de tecido pulmonares, corados com azul de toluidina, demonstraram a presença de mastócitos nas áreas

peribroquial e perivascular, no grupo sensibilizado e desafiado com OVA, o que não foi observado no grupo basal (Fig. 21 A e B). O tratamento com inosina reduziu significativamente a contagem de mastócitos (Fig. 21 H). Este efeito foi revertido pelo pré-tratamento com ZM241385, aloxazina e cafeína, porém não foi alterada pela administração com DPCPX (Fig. 21 D,E, F e G).

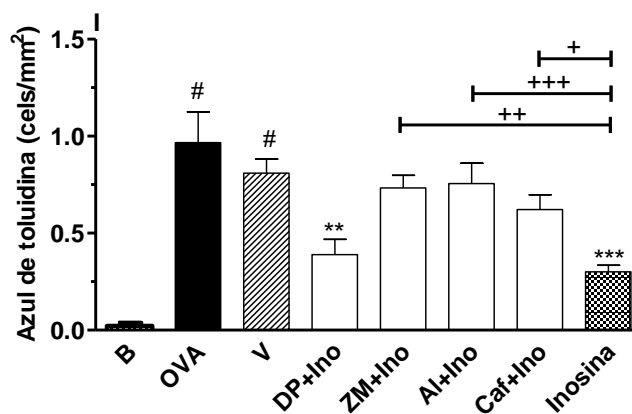
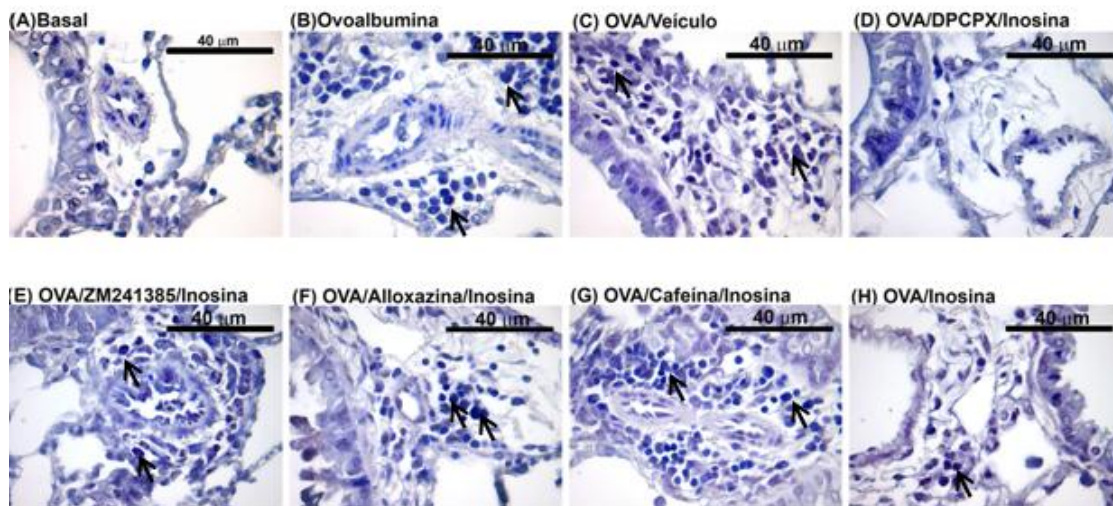


Figura 21: Efeitos da inosina sobre a migração de mastócitos para as vias aéreas de animais sensibilizados e broncoprovocados. Os tecidos foram corados com azul de toluidina. (A) grupo basal não sensibilizado ou desafiado com OVA; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA; (C) grupo alérgico desafiado e tratado com veículo (tween, 5%), utilizado para diluir a inosina e antagonistas; (D a G) grupo alérgico pré-tratado com os antagonistas DPCPX, ZM241385, aloxazina, cafeína e tratados com inosina (10 mg/kg); (H) grupo alérgico tratado com inosina; (I) contagem de mastócitos. As imagens foram obtidas com aumento de 100x. Os dados estão representados por média \pm E.P.M. Em cada grupo foi utilizado 5 animais. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle veículo; # $P < 0,001$ quando comparado com o grupo basal (B) e + $P < 0,05$, ++ $P < 0,01$, +++ $P < 0,001$ quando o grupo inosina foi comparado com os grupos pré-tratados com antagonistas.

4.12.4 Participação dos receptores para adenosina e efeitos da inosina na liberação “ex vivo” de IL-4 e IL-5

A figura 22 demonstra um aumento significativo nos níveis de IL-4 e IL-5, nos sobrenadantes de cultura de tecido pulmonar dos animais alérgicos. O tratamento com inosina reduziu os níveis de IL-4 em $81 \pm 8\%$ e totalmente os níveis de IL-5. Os resultados mostraram ainda, que somente o pré-tratamento com cafeína, um antagonista não-seletivo, reverteu de forma significativa os efeitos da inosina com relação aos níveis de IL- 4 e IL- 5 em $96 \pm 3\%$ e $78 \pm 8\%$, respectivamente.

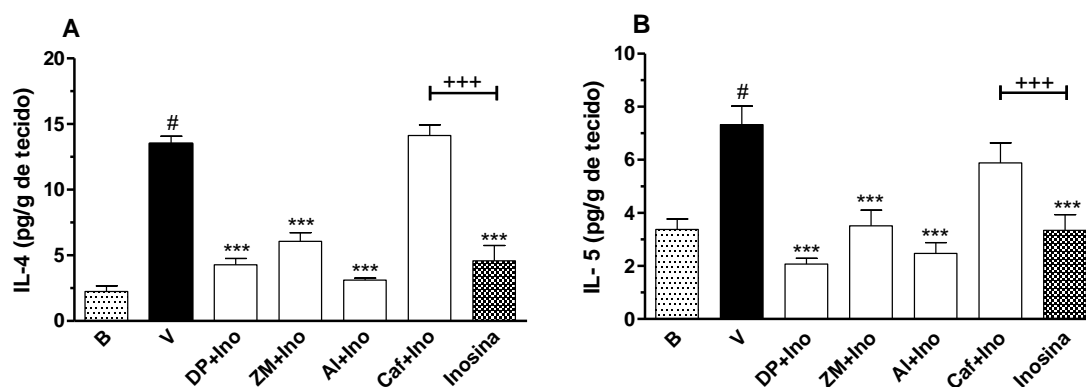


Figura 22: Envolvimento dos receptores para adenosina nos efeitos da inosina sobre os níveis de IL-4 e IL-5, em cultura de tecido pulmonar. O grupo B, representa o grupo basal não desafiado ou broncoprovocado; o grupo OVA corresponde ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA; o grupo V corresponde ao grupo veículo (tween, 5 %) usado para diluir a inosina e antagonistas. DPCPX: antagonista do receptor A_1 ; ZM241385: antagonista do receptor A_{2A} ; Aloxazina: antagonista do receptor A_{2B} ; Cafeína: antagonista não seletivo para os receptores de inosina. Cada coluna representa a média de 4-5 animais e as linhas verticais, o E.P.M. ***P < 0,001 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,001 quando comparado com o grupo basal (B). +++P < 0,001 quando o grupo inosina for comparado aos grupos tratados com antagonistas.

4.12.5 Participação dos receptores A_{2A} no efeito da inosina sobre a responsividade das vias aéreas, avaliados no modelo de mecânica pulmonar, “in vivo”.

A figura 23 demonstra o efeito da inosina sobre responsividade pulmonar à metacolina, “in vivo”. Os dados revelaram que, com relação à resistência pulmonar, não houve diferença significativa entre os grupos naive e OVA frente ao desafio com metacolina, na concentração de 100 mg/ml (Fig. 23 A). Contudo, o desafio com metacolina, na mesma dose, promoveu um aumento

significativo da elastância pulmonar no grupo alérgico (Fig. 23 B). O tratamento com inosina reduziu a elastância em 100 %, sendo que o pré-tratamento com ZM241385 reverteu em 79 ± 4 % este efeito inibitório. Além disso, é importante mencionar que o tratamento somente com ZM241385, na mesma dose utilizada para o pré-tratamento com inosina, não apresentou efeito “per se”.

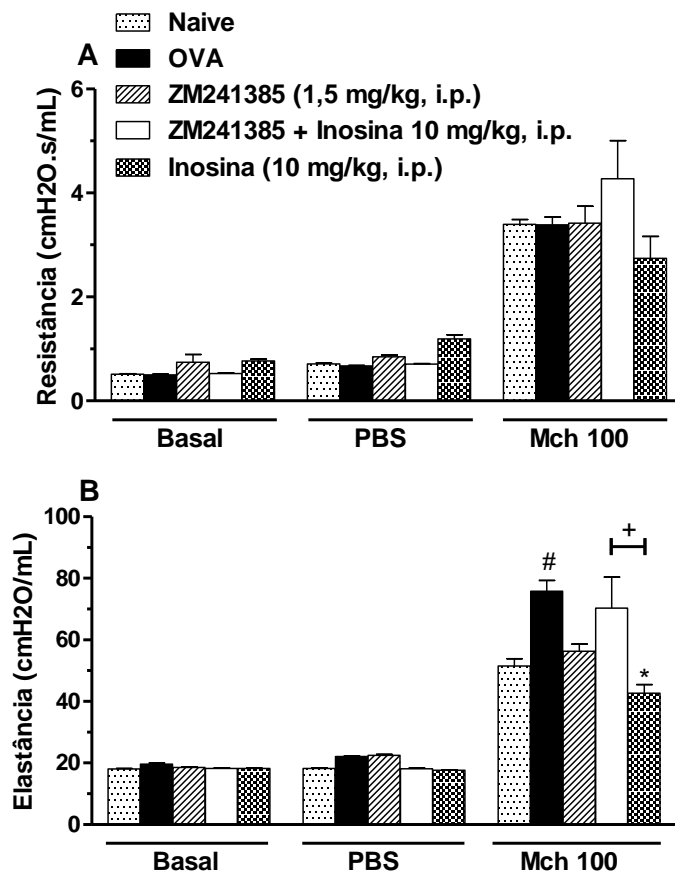


Figura 23: Envolvimento do receptor A_{2A} no efeito da inosina sobre a responsividade das vias aéreas, “in vivo”. O grupo basal corresponde ao grupo não sensibilizado ou desafiado para avaliação da mecânica pulmonar; o grupo PBS corresponde a um grupo não alérgico, desafiado por via inalatória somente com PBS, para avaliação da mecânica pulmonar; o grupo Mch 100, corresponde ao grupo desafiado por via inalatória com metacolina 100 mg/ml, para avaliação da mecânica pulmonar. Cada coluna representa a média de 4-5 animais e as linhas verticais, o E.P.M. *P < 0,05 quando comparado ao grupo controle veículo e #P < 0,01 quando comparado com o grupo basal (B). +P < 0,05 quando o grupo inosina for comparado ao grupo tratado com ZM241385.

5 DISCUSSÃO

5.1 Adenosina e inosina na inflamação aguda pleural e seu metabolismo

A inflamação é um processo complexo, que envolve vários eventos entre eles a vasodilatação, extravasamento plasmático, a migração de leucócitos que inicialmente é caracterizada por neutrófilos e posteriormente por mononucleares, além da liberação de mediadores pró-inflamatórios que orquestram as mudanças temporais deste processo e podem conduzir à sua resolução (Moore, 2003; Gilroy *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2010).

Existem vários modelos experimentais que possuem a função de investigar as diferentes vias de sinalização que participam do processo inflamatório e também novas terapias para o tratamento das doenças inflamatórias (Moore *et al.*, 2010). Neste contexto, estão os modelos de inflamação em que a mesma é induzida em uma cavidade, como os modelos de bolsa de ar, peritonite e pleurisia (Moore *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos demonstram que a injeção intrapleural de carragenina promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a histamina, bradicinina, substância P, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Estes mediadores promovem o extravasamento plasmático que contribui com a formação do exsudato pleural e migração de leucócitos, que atingem um pico, 4 h após a administração do agente flogístico (Tomlinson *et al.*, 1994; Saleh *et al.*, 1996; Frode e Medeiros, 2001; Menegazzi *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam os dados da literatura e demonstram que a administração de adenosina e inosina inibiu, de forma significativa, os principais eventos do processo inflamatório agudo, incluindo influxo de leucócitos (migração), principalmente de neutrófilos, a formação do exsudato pleural e reduziu os níveis de TNF- α . Estes dados indicam que a adenosina e inosina possuem um papel importante no controle do processo inflamatório agudo.

De acordo, alguns estudos mostram que ambas as purinas possuem uma ação anti-inflamatória, muitas vezes descrita como protetora tecidual, representada por redução da migração leucocitária e formação do edema, em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda, doença inflamatória intestinal (Liudet *et al.*, 2002; Eltzschig e Carmeliet, 2011), isquemia e reperfusão

intestinal e renal (Modis *et al.*, 2009; Eltzschig e Eckle, 2011), entre outros.

No contexto do processo inflamatório, os efeitos da adenosina e inosina parecem depender principalmente da ativação dos receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 para adenosina (Hasko *et al.*, 2008).

Especula-se que o receptor A_{2A} seja o mais envolvido nos efeitos anti-inflamatórios de ambas as purinas. Estudos mostraram que a adenosina através do receptor A_{2A} , promoveu efeitos inibitórios sobre a função neutrofílica (Kaufmann *et al.*, 2007), incluindo redução da formação de espécies reativas de oxigênio (Revan *et al.*, 1996), produção de citocinas pró-inflamatórias e quemoquinas, incluindo TNF- α , proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 α , MIP-1 β , MIP-2 α e MIP-3 α (Mccoll *et al.*, 2006) e redução da adesão neutrofílica ao endotélio vascular (Sullivan *et al.*, 2004).

Nossos resultados estão de acordo com o proposto na literatura e sugerem fortemente a participação do receptor A_{2A} , nos efeitos anti-inflamatórios da adenosina na inflamação pleural, induzida pela carragenina, uma vez que o seu efeito foi revertido totalmente pelo pré-tratamento com ZM241385, um antagonista específico deste receptor. Em adição, os resultados demonstraram que o mesmo ocorreu com a inosina, sendo que os dados obtidos evidenciam que a ação desta purina foi mediada adicionalmente pelos receptores A_1 e A_{2B} .

De fato, alguns trabalhos descrevem que a ativação do receptor A_{2A} está possivelmente envolvida nos efeitos da inosina. Recentemente, foi descrito que a deleção dos receptores A_{2A} e A_3 aboliu o efeito inibitório da inosina sobre a apoptose de hepatócitos e dano tecidual, no modelo de lesão hepática, induzida por ConA. Ainda, no modelo de endotoxemia induzida por LPS, o efeito inibitório da inosina sobre a liberação sistêmica de TNF- α foi dependente destes dois receptores (Gomez e Sitkovsky, 2003).

No presente trabalho, o tratamento com inosina também reduziu de forma significativa os níveis de TNF- α em exsudatos pleurais, na inflamação aguda, com envolvimento do receptor A_{2A} . Apesar de a adenosina apresentar uma ação similar, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-1 β , na cavidade pleural, nenhum dos antagonistas utilizados reverteu o seu efeito inibitório, permitindo-nos sugerir que os receptores para adenosina, ao contrário do que é descrito, parecem não estarem envolvidos neste efeito.

Os mecanismos envolvidos no efeito inibitório das purinas sobre a

liberação das citocinas em questão não foi realizado, porém um estudo realizado por Haskó e cols. (2000) descreve que este efeito envolve um mecanismo pós-transcricional, acionado após a ativação dos receptores A_1 e A_{2A} , pela inosina, em macrófagos estimulados por LPS, uma vez que apesar da inibição da produção de TNF- α , IL-1, IL-12, MIP -1 α e INF- γ , o tratamento com inosina não modificou a expressão dos RNAm destas citocinas, nem inibiu as quinases envolvidas na sua expressão, incluindo a p38, JNK (“Jun N-terminal kinase”) e p42/44.

Os dados obtidos neste trabalho ainda revelam que o pré-tratamento, com ZM241385, reverteu a ação do CGS21680, um agonista seletivo para o receptor A_{2A} , sobre a migração neutrofílica para a cavidade pleural e nos permitiu confirmar o envolvimento do receptor A_{2A} , nos efeitos anti-inflamatórios descritos para a adenosina e inosina, no modelo de pleurisia. Em adição, estudos mostram que apesar da alta seletividade pelo receptor A_{2A} , o CGS21680 possui baixa afinidade pelo receptor A_{2B} (Ralevic e Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2011). Dessa forma, atribuímos a este fato a reversão parcial de efeitos, observada após o tratamento com aloxazina, um antagonista seletivo A_{2B} .

Recentemente, foi demonstrado que em situações onde há queda da disponibilidade de oxigênio tecidual, como na hipóxia, ocorre um aumento na expressão dos receptores A_{2B} , dependente do fator induzido por hipóxia (HIF) - 1 (Eckle *et al.*, 2008).

Especula-se que este aumento de expressão esteja relacionado com o controle do processo inflamatório. Foi descrito que a ausência deste receptor aumentou o extravasamento plasmático em animais submetidos à hipóxia e promoveu aumento dos níveis sistêmicos de TNF- α e expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e P-selectina, em animais endotoxêmicos (Eckle *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que a ativação do receptor A_{2B} , reduziu a inflamação, edema pulmonar e o “clearance” do fluido alveolar, em modelos de lesão pulmonar induzida por ventilação e lesão pulmonar aguda induzida por LPS (Eckle *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos corroboram com o descrito acima e mostram que o pré-tratamento com aloxazina reverteu os efeitos da adenosina e inosina sobre a migração de neutrófilos para a cavidade pleural. Em adição, foi observado que os receptores A_{2B} estão claramente envolvidos na ação

inibitória de ambas as purinas sobre a formação do exsudato pleural, sendo a aloxazina, o antagonista que mais reverteu o extravasamento plasmático.

De fato, estudos recentes mostraram que os receptores A_{2B} foram responsáveis pelo aumento da barreira endotelial. Especula-se que tal mecanismo envolva após a ativação do receptor A_{2B} , elevação intracelular dos níveis de AMPc, ativação de PKA e consequente fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP – “vasodilator-stimulated phosphoprotein”); uma proteína responsável pelo controle da geometria dos filamentos de actina e miosina. A ativação da VASP, promoveria alterações na conformação do complexo juncional entre as células endoteliais e consequente elevação da coesão entre as células, reduzindo o extravasamento plasmático (Comerford *et al.*, 2002; Eltzschig *et al.*, 2003). Analisando em conjunto estas afirmações e nossos dados, podemos sugerir que a ativação dos receptores A_{2B} pela adenosina e inosina, com posterior ativação da VASP, foram capazes de aumentar a barreira endotelial, reduzindo o extravasamento plasmático e consequentemente a formação do exsudato pleural.

Os receptores A_1 parecem possuir pouco envolvimento no controle do processo inflamatório em comparação aos receptores A_{2A} e A_{2B} . A este receptor estão atribuídos os efeitos da adenosina e em menor grau, da inosina, sobre a ativação neural e sistema cardiovascular, devido sua grande expressão nestes sistemas (Polosa, 2002; Livingston *et al.*, 2004). Dessa forma, o receptor A_1 está envolvido na modulação da nocicepção (Nascimento *et al.*, 2010), memória (Lu *et al.*), regulação do sono (Methippara *et al.*, 2005) e eventos cardiovasculares (Wilbur e Marchlinski, 1997; Albrecht-Kupper *et al.*; Fieger e Wong; 2012; Tendra *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o DPCPX, um antagonista seletivo A_1 , reverteu parcialmente os efeitos da inosina sobre a contagem de leucócitos e sobre a exsudação, porém o mesmo não foi observado para a adenosina. Tal efeito pode estar relacionado ao fato da inosina ser considerada um agonista parcial deste receptor (Jin *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2011). Evidências adicionais ainda relacionam a ativação do receptor A_1 com a redução da transmigração de leucócitos em um modelo de lesão aguda pulmonar, induzida por LPS (Ngamsri *et al.*, 2010) e no controle da inflamação pleural, induzida por carragenina em ratos, reduzindo migração de neutrófilos e exsudação pleural (Schrier *et al.*, 1990).

Tem sido descrito que os receptores A₃, estão ligado ao controle da resposta inflamatória alérgica, na ativação de eosinófilos e principalmente mastócitos (Livingston *et al.*, 2004; Hasko *et al.*, 2008). Levando-se em consideração que na inflamação aguda pleural, ocorre uma migração considerável de neutrófilos, 4 h após a injeção de carragenina, não acreditamos que ocorra o envolvimento deste receptor nos efeitos observados para a adenosina e inosina, na inflamação pleural.

Em algumas situações, onde há estresse metabólico, devido à intensa atividade celular ou dano tecidual, como ocorre na isquemia, hipóxia, inflamação e trauma, foi observado que tanto os níveis de adenosina quanto de inosina estão elevados (Linden, 2001; Eltzschig *et al.*, 2003; Hasko *et al.*, 2008; Eltzschig, 2009). Acredita-se que, em tecidos normais, a concentração extracelular de adenosina fique em torno de 1 µM, enquanto em tecidos isquêmicos esta concentração pode ser maior que 100 µM (Hasko e Cronstein, 2004). O mesmo ocorre com a inosina, cuja concentração em tecidos isquêmicos pode ficar entre 1 - 3 mM (Garcia Soriano *et al.*, 2001).

De acordo, no presente estudo foi possível observar através da análise do CLAE, que após a administração de carragenina, ocorreu uma elevação nos níveis séricos de adenosina e inosina, que atingiu o pico 1 hora após a injeção do agente flogístico com concentrações descritas anteriormente, de 0,41 e 0,40 pM, o mesmo foi verificado com relação aos metabólitos xantina e ácido úrico. Além disso, após o tratamento com adenosina e inosina, níveis ainda maiores foram detectados principalmente para ambas as purinas.

Estas elevações, nos níveis das purinas, podem supostamente, estar relacionadas ao aumento de expressão da NTPase (CD 39) e ectonucleotidase (CD73), que são as enzimas responsáveis pela degradação do ATP em adenosina (Eltzschig *et al.*, 2003). Assim que é gerada, a adenosina pode ser degradada à inosina ou ser recaptada para o meio intracelular pelos transportadores de equilíbrio (ENT – “equilibrative nucleoside transporter”) -1 e ENT-2 (Loffler *et al.*, 2007; Eltzschig, 2009). Na hipóxia ou durante o processo inflamatório, foi demonstrado que o ENT-2 e a adenosina quinase, que converte a adenosina em AMP, apresentaram sua expressão reduzida, promovendo um acúmulo de adenosina tecidual (Loffler *et al.*, 2007). Nestas situações, a adenosina é rapidamente convertida à inosina, pela enzima adenosina deaminase, que durante a inflamação possui expressão aumentada

em leucócitos ativados e no endotélio vascular (Eltzschig *et al.*, 2006; Spicuzza *et al.*, 2006).

Devido diversas evidências indicarem que a inosina apresenta efeitos modulatórios sobre o processo inflamatório de maneira semelhante à adenosina, inclusive ligando-se nos mesmos receptores, e tendo em vista que esta última apresenta um rápido metabolismo, supomos que poderia haver um efeito sinérgico entre as duas purinas.

Analisando em conjunto os resultados que demonstraram que a adenosina e inosina, quando coadministradas em doses sub-efetivas (que não interferiram sobre o processo inflamatório agudo pleural), foram capazes de reduzir significativamente a inflamação pleural e os dados obtidos através do CLAE, podemos admitir um sinergismo de efeitos entre as duas purinas. Esta evidência é ainda sustentada, pelo fato de nossos resultados mostrarem que ambas interagem com os mesmos receptores.

Os resultados obtidos através da análise por CLAE reforçaram a hipótese de sinergismo, tendo em vista que 30 min após o tratamento com adenosina, ou seja, no momento em que a pleurisia foi induzida, as concentrações de ambas as purinas estavam elevadas e muito semelhantes. Em adição, foi possível observar que assim como no grupo inflamado, nos tratados com adenosina, as concentrações de adenosina e inosina atingiram o pico 1 hora após a injeção de carragenina e retornando aos níveis basais 6 horas após.

Considerando os dados que indicam o sinergismo entre as purinas, o metabolismo da adenosina em inosina foi avaliado adicionalmente através da administração de EHNA, um inibidor da adenosina deaminase, a enzima que converte adenosina em inosina (Fig. 11).

Observando-se que a adenosina apresenta um rápido metabolismo, é racional consideramos que talvez a inosina seja a grande responsável pelos seus efeitos. Porém, nossos resultados mostraram que mesmo ocorrendo a inibição da adenosina desaminase, não houve a reversão dos efeitos anti-inflamatórios da adenosina, sugerindo que a ação anti-inflamatória da adenosina não foi dependente da inosina. Estes dados foram confirmados adicionalmente, pelos obtidos com as análises por CLAE, que nos mostraram que durante todo período do processo inflamatório, ambas as purinas estavam presentes.

Em adição, os resultados demonstraram que o pré-tratamento com EHNA reverteu o efeito da inosina sobre a contagem leucocitária, levando-nos a considerar que talvez o efeito da inosina administrada farmacologicamente, seja dependente da sua conversão em adenosina, o que não está claramente descrito na literatura.

Acreditamos que os resultados obtidos refletiram o que foi demonstrado em alguns estudos, que enfatizam a intensa ativação celular, produção e quebra do ATP, devido aumento da expressão das nucleotidasas durante a inflamação (Polosa, 2002; Eltzschig *et al.*, 2003; Eltzschig *et al.*, 2006; Eltzschig, 2009). A adenosina e inosina geradas, competem pelos mesmos transportadores, os ENTs 1 e 2, que possuem a expressão reduzida no processo inflamatório e dessa forma, não são recaptadas para o meio intracelular, ocorrendo aumento da concentração extracelular das mesmas e conseqüentemente, da produção dos metabólitos identificados neste trabalho pelo método de CLAE, como a xantina e ácido úrico.

De modo complementar, levando-se em conta que a xantina e o ácido úrico apresentam-se em elevadas concentrações no plasma dos animais com pleurisia e tratados com adenosina, podemos sugerir que principalmente o ácido úrico esteja contribuindo com os efeitos anti-inflamatórios da adenosina e inosina. Alguns trabalhos descrevem que o ácido úrico contribuiu com os efeitos da inosina e apresentou um efeito antioxidante em um modelo de colite induzida por TNBS e na esclerose múltipla em humanos (Becker *et al.*, 1991; Spitsin *et al.*, 2001; Rahimian *et al.*, 2010). A hipoxantina também parece exercer atividade antioxidante e protetora celular (Virag e Szabo, 2001).

Em síntese, tendo com base nossos resultados, a figura 24, mostra de forma ilustrativa, indícios importantes acerca do papel da adenosina e inosina, na inflamação aguda. A adenosina foi capaz de ativar os seus receptores, reduzindo migração leucocitária, extravasamento de plasma para a cavidade pleural e produção de mediadores pró-inflamatórios. A inosina, por sua vez, parece interagir com os mesmos receptores e dessa forma, também exercendo a mesma influência inibitória sobre a inflamação pleural. Apesar de metabólito e precursor apresentarem mecanismos semelhantes e mesmos efeitos, a inosina parece contribuir com o efeito da adenosina, fazendo-nos acreditar que, durante a inflamação aguda, a adenosina e inosina apresentam efeitos

sinérgicos. Esta ideia é reforçada pelos resultados obtidos no presente trabalho.

5.2 Efeitos da inosina sobre a asma induzida experimentalmente pela ovoalbumina

Além dos efeitos da adenosina e inosina serem investigados no processo inflamatório agudo, foram avaliados frente a um estímulo inflamatório alérgico, onde ocorre a ativação da resposta imune adaptativa.

Durante a inflamação aguda, a adenosina parece exercer um papel relacionado ao seu controle e à proteção tecidual. Porém, em processos alérgicos, ela está ligada ao aumento da reatividade das vias aéreas (Livingston *et al.*, 2004). A adenosina, administrada por via inalatória, em pacientes alérgicos, promove broncoconstrição, sendo que o mesmo foi observado em animais sensibilizados (Fozard e Hannon, 2000). Além disso, evidências indicam que esta purina, quando administrada diretamente nas vias aéreas, promove a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina, serotonina, triptase, leucotrienos C₄ e D₄ e prostaglandina D₂. Acredita-se que este efeito envolva a ativação de receptores A₃ (Livingston *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2008).

No presente estudo, os efeitos da adenosina administrada, por via inalatória, ou seja, topicamente, não foram investigados. A ação da adenosina foi avaliada por via sistêmica, através da sua administração intraperitoneal, antes de cada desafio, em animais sensibilizados. Os resultados demonstraram que esta purina não foi capaz de alterar, de forma significativa, a inflamação pulmonar desencadeada pela inalação de OVA (Fig.16). Já o tratamento dos animais sensibilizados, com inosina, antes dos desafios, reduziu, de forma dose-dependente, a contagem de leucócitos, no lavado broncoalveolar, principalmente de macrófagos, linfócitos e eosinófilos, sem interferir significativamente com a contagem de neutrófilos (Fig. 17). De acordo, a inosina apresentou ação anti-inflamatória em um modelo não alérgico de inflamação pulmonar, induzida por LPS, reduzindo contagem leucocitária no LBA e pulmão, edema pulmonar e citocinas pró-inflamatórias (Liudet *et al.*, 2002). O mesmo perfil de resposta foi observado para o análogo da inosina chamado INO-2002, em um modelo de angústia respiratória aguda, induzida por LPS (Mabley *et al.*, 2009).

A inosina, já foi utilizada como suplemento alimentar (Starling *et al.*, 1996) e até pouco tempo foi considerada um metabólito inerte da adenosina (Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko e Cronstein, 2004; Fredholm *et al.*, 2011). A observação que a inosina apresentava suas concentrações aumentadas no local da inflamação e que estava envolvida na regulação de respostas imunes (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Gomez e Sitkovsky, 2003), despertaram o nosso interesse no estudo do seu papel sobre o processo inflamatório e neste contexto, da asma. Além disso, neste trabalho, especulou-se o envolvimento dos receptores para a adenosina, nos efeitos da inosina, observados em nosso modelo experimental. Esta abordagem foi baseada em evidências que demonstraram que a inosina é capaz de se ligar com receptores para adenosina (Jin *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2011) e que os receptores A_{2A} e A_3 , estariam envolvidos na ação da inosina sobre a redução do dano hepático causado pela ConA e da sepse induzida por endotoxina (Gomez e Sitkovsky, 2003).

O presente estudo mostrou que o tratamento com ZM241385, um antagonista seletivo do receptor A_{2A} , reverteu os efeitos da inosina (10 mg/kg, i.p.), sobre a contagem de células para o LBA, principalmente de macrófagos. Além disso, o tratamento com cafeína, um antagonista não seletivo, reduziu a contagem de macrófagos e adicionalmente de linfócitos (Fig. 19). O contrário foi observado quando se realizou o pré-tratamento com DPCPX, o antagonista seletivo A_1 e com aloxazina, o antagonista seletivo A_{2B} , o qual não modificou a ação inibitória da inosina sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão.

Os dados histológicos obtidos confirmam os achados relacionados à contagem celular no LBA e reforçam a nossa hipótese de que o receptor A_{2A} seria principal receptor envolvido no efeito da inosina sobre a inflamação pulmonar induzida pela OVA.

Os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios, demonstrados após a ativação do receptor A_{2A} , já estão bem descritos na literatura e anteriormente neste estudo. Embora esteja descrito que este receptor reduziu a ativação e migração de linfócitos T para o pulmão (Huang *et al.*, 1997; Koshiba *et al.*, 1999), não foi possível demonstrar o mesmo em nossos resultados, uma vez que o antagonista ZM241385, não reverteu o efeito da inosina sobre a contagem celular de linfócitos no LBA. Porém, foi descrito que o receptor A_{2A} participou da ação inibitória da inosina sobre a liberação de TNF- α , IL-1, IL-12,

MIP -1 α e INF- γ , em macrófagos estimulados (Hasko *et al.*, 2000).

De acordo, podemos observar, pelos nossos resultados, que a inosina, através de um mecanismo que envolve o receptor A_{2A}, foi capaz de reduzir a migração de macrófagos para o pulmão e sua ativação. Em adição, demonstrou-se que durante o processo inflamatório, ocorreu um aumento na expressão do receptor A_{2A} em macrófagos e que este evento estaria relacionado com a redução da atividade deste leucócito e da resposta inflamatória (Garcia *et al.*, 2008).

Nossos dados não foram capazes de reproduzir, o descrito na literatura à respeito da participação do receptor A₁ sobre a inibição da transmigração leucocitária para os pulmões (Ngamsri *et al.*, 2010) e demonstraram claramente, através do pré-tratamento com DPCPX, que os receptores A₁ não estão envolvidos na ação anti-inflamatória da inosina. Porém, o bloqueio deste receptor, reverteu os efeitos da inosina sobre a hiperproliferação das células epiteliais brônquicas, sugerindo que a inosina através dos receptores A₁ pode reduzir a hipertrofia de células epiteliais brônquicas, induzida pelos desafios com OVA.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, o efeito da inosina foi adicionalmente testado em um modelo, onde foram avaliados parâmetros relacionados à mecânica pulmonar, frente a um estímulo de hiper-reatividade, induzido pela metacolina aerolizada, “in vivo”. Nesta abordagem, foi avaliada a resistência e de elastância das vias aéreas, que são considerados parâmetros clássicos para determinar não só a reatividade, mas também a mecânica pulmonar, em camundongos (Glaab *et al.*, 2007).

Dessa forma, a resistência do sistema respiratório é constituída por uma parcela de resistência proveniente do atrito causado pela movimentação dos tecidos da parede torácica e do pulmão, e pela resistência resultante da passagem de ar pelas vias aéreas, refletindo assim, o estreitamento das vias aéreas (Glaab *et al.*, 2007). A complacência reflete primariamente elasticidade do parênquima pulmonar, a tensão superficial e contração muscular (Glaab *et al.*, 2007). A elastância é o inverso da complacência, ou seja, quanto maior for a elasticidade do parênquima, entrada de ar nos pulmões, menor é a elastância e melhor é a função pulmonar (Fig. 23).

Através de nossos resultados, podemos observar que nos grupos desafiados com OVA e estimulados por metacolina, houve um aumento na

resistência e elastância pulmonar, quando comparado com o grupo basal e PBS. Embora o tratamento com inosina não tenha interferido com a resistência, reduziu de forma significativa a elastância, um efeito revertido pelo ZM241385, o antagonista A_{2A} , demonstrando a participação dos receptores A_{2A} neste efeito. Vale ainda mencionar que o tratamento com ZM241385, isoladamente, não apresentou nenhum efeito “per se”.

Estes dados sugerem que a inosina, via receptor A_{2A} , promove uma melhora na função pulmonar, reduzindo a migração leucocitária para o pulmão, produção de mediadores e a reatividade do tecido pulmonar.

Esta hipótese foi reforçada pelos resultados obtidos, após a análise histológica das vias aéreas, onde foi avaliada a migração de mastócitos, através da coloração de azul de toluidina. Os resultados demonstraram que a inosina reduz a migração de mastócitos de forma significativa, um efeito revertido pela aloxazina e pelo ZM241385, indicando a participação dos receptores A_{2A} e A_{2B} , neste efeito.

Dessa forma, os dados de mecânica pulmonar e os achados histológicos, referentes à migração leucocitária e de mastócitos, são dados complementares que nos permitem especular que a ação inibitória da inosina sobre o aumento da elastância, pode estar relacionada também à redução da migração de mastócitos para o pulmão.

Foi descrito que a ativação do receptor A_{2A} para adenosina reduziu a inflamação alérgica em ratos, induzida por OVA e suprimiu a liberação de histamina e triptase de mastócitos humanos “in vitro” (Suzuki *et al.*, 1998; Fozard *et al.*, 2002; Van Schoor *et al.*, 2005). Como já mencionado nesta discussão, a ativação do receptor A_{2B} foi relacionada à redução da expressão de moléculas de adesão e da inflamação pulmonar (Eckle *et al.*, 2008; Eckle *et al.*, 2008). Ambos os receptores A_{2A} e A_{2B} estão expressos na membrana dos mastócitos, durante o processo inflamatório e parecem participar da modulação da ativação dos mastócitos, através da ação da adenosina (Polosa, 2002), porém não há relatos na literatura que a inosina interfira na função dos mastócitos através destes receptores.

Com relação à mecânica pulmonar, ainda foi possível constatar que não ocorreu aumento significativo da resistência pulmonar, quando comparados grupo naive (não sensibilizado ou desafiado) e grupo OVA. Este achado pode estar relacionado ao fato de que nossas análises histológicas, com as

colorações de PAS (para avaliação dos efeitos da inosina sobre a produção de muco) e picrossírius (para verificação da interferência sobre o remodelamento), revelaram que no grupo OVA, foi observado aumento do remodelamento e produção de muco em somente 60 % dos animais. Levando-se em consideração que estas são alterações patológicas que contribuem com o aumento da resistência. Os dados obtidos sugerem que o protocolo adotado, talvez não seja o melhor para avaliação da resistência pulmonar.

Os resultados ainda demonstraram que a inosina reduziu os níveis de IL-4 e IL-5 em explantes pulmonares, um efeito revertido pela cafeína. Levando-se em consideração que as citocinas Th₂, estão relacionadas à produção de IgE, maturação e migração de eosinófilos e outros leucócitos (Orihara *et al.*, 2010) e que os níveis de inosina estão elevados nos tecidos, durante a inflamação (Garcia Soriano *et al.*, 2001; Gomez e Sitkovsky, 2003), podemos inferir que a inosina esteja controlando a liberação de citocinas através de um mecanismo que envolve a ativação de receptores A₃. Esta suposição está ligada ao fato de que a cafeína, um antagonista não seletivo, foi o único antagonista que reverteu o efeito da inosina sobre os níveis de IL-4 e IL-5 e também a migração de linfócitos, o que poderia estar diretamente relacionado à redução dos níveis destas citocinas.

No presente estudo, o efeito da inosina não foi avaliado frente ao tratamento com um antagonista seletivo do receptor A₃, dessa forma, estudos adicionais deverão ser realizados para investigar melhor o envolvimento deste receptor sobre a liberação ou produção de citocinas Th₂, bem como na migração linfocitária, durante a inflamação alérgica pulmonar.

O papel funcional do receptor A₃, nos pulmões, não está claro, levando-se em consideração que parecem mediar eventos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios. Neste sentido, já foi descrito que a adenosina e a inosina se ligam em receptores A₃ e promovem a degranulação de mastócitos (Jin *et al.*, 1997; Hasko *et al.*, 2004). Contraditoriamente, este receptor está envolvido com a inibição da migração de eosinófilos (Hasko *et al.*, 2004). Ainda, evidências indicam que a ativação do receptor A₃ em monócitos periféricos, estimula a liberação de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que induz proliferação celular da medula óssea (Bar-Yehuda *et al.*, 2002). Os resultados obtidos, no presente estudo, demonstraram que a inosina foi capaz de induzir proliferação leucocitária na medula óssea,

somente na dose de 1 mg/kg. Levando em consideração que estudos mostram que a inosina é capaz de se ligar em receptores A₃, os resultados obtidos nos sugerem que a proliferação celular observada pode estar relacionada à ativação do receptor A₃.

Ainda, com relação à avaliação dos efeitos da inosina sobre a mobilização de leucócitos da medula para o sangue, podemos observar que as outras doses de inosina utilizadas, em animais alérgicos, não promoveram proliferação celular. Nesses grupos, a contagem de leucócitos da medula óssea foi menor que o grupo basal e semelhante ao do grupo OVA, indicando que nestes animais ocorreu uma mobilização celular para o sangue.

Os resultados obtidos demonstraram que a contagem de leucócitos totais no sangue estava significativamente aumentada no grupo OVA, em relação ao grupo basal, refletindo a mobilização medular nos animais alérgicos. O mesmo foi observado nos grupos tratados com inosina, com exceção para a dose de 1 mg/kg, onde foi constatado uma redução da contagem leucocitária sanguínea. Neste grupo, além da proliferação leucocitária, houve também uma retenção destas células na medula, o que justificaria a redução da contagem de leucócitos na corrente circulatória.

Estes dados são de extrema importância, tendo em vista que quando analisados em conjunto com os resultados do LBA e histologia, reforçam a hipótese de que a inosina produz uma redução da migração leucocitária para o pulmão.

Além de especular-se que a inosina produza seus efeitos através da ativação dos receptores para adenosina, outros mecanismos adicionais são descritos. Alguns trabalhos relatam que a inosina pode inibir a enzima nuclear poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase (PARP), que é responsável pela identificação de quebras na cadeia de DNA e posterior reparo do mesmo (Jagtap e Szabo, 2005; Mabley *et al.*, 2009). Após a identificação do dano, a PARP cliva em nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) em nicotinamida e em ADP-ribose, a qual é polimerizada e utilizada para o reparo (Virag e Szabo, 2001; Mabley *et al.*, 2009), a superativação da PARP depleta o NAD⁺ e ATP intracelulares, levando à necrose e morte celular (Virag e Szabo, 2001; Mabley *et al.*, 2009). Neste contexto, foi descrito que a inosina parece interferir com a ativação desta enzima, reduzindo a morte celular (Virag e Szabo, 2001). Tem sido descrito que a PARP está envolvida na patogênese de muitas doenças,

incluindo colite, artrite, choque endotoxêmico, isquemia-reperfusão, diabetes e hipertensão (Jagtap e Szabo, 2005). Em adição, evidências indicam que, na asma, a PARP está envolvida na regulação expressão da AP-1, NFκB, fator de transcrição de trans-ativação específico de célula T (GATA-3 – “Trans-acting T-cell-specific transcription fator”) - 3 e sinal de transdução e ativador da transcrição (STAT – “signal transducer and activator of transcription”) - 6 em linfócitos T e dessa forma na liberação de mediadores pró-inflamatórios (Szabo *et al.*, 2011).

Como na pleurisia, na inflamação alérgica pulmonar, a inosina ainda pode reduzir o processo inflamatório através de uma atividade antioxidante que pode ser direta, inibindo a produção de superóxido em neutrófilos humanos (Marton *et al.*, 2001) ou indireta através do seu metabolismo à hipoxantina e ácido úrico que apresentam igualmente atividade antioxidante, por serem sequestradores de peroxinitritos e oxiradicais (Becker *et al.*, 1991; Virag e Szabo, 2001; Mabley *et al.*, 2009).

Tendo em vista que estes mecanismos adicionais foram descritos, não podemos descartar que os mesmos possam estar envolvidos e contribuam com os resultados obtidos.

Os resultados demonstram que a inosina possui um efeito importante sobre a inflamação alérgica pulmonar, relacionado à inibição do recrutamento de macrófagos, linfócitos e mastócitos para as vias aéreas e inibição da produção ou liberação de citocinas do tipo Th₂ como a IL-4 e IL-5, resultando na redução da elastância pulmonar induzida pela OVA. Este efeito parece envolver a ativação, principalmente dos receptores A_{2A}. Estes dados demonstram experimentalmente o papel da inosina na inflamação alérgica e estendem os dados da literatura à respeito da compreensão na sinalização purinérgica nas vias aéreas.

Finalizando, a figura 24 ilustra os mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória da inosina, na asma experimental, induzida pela ovoalbumina.

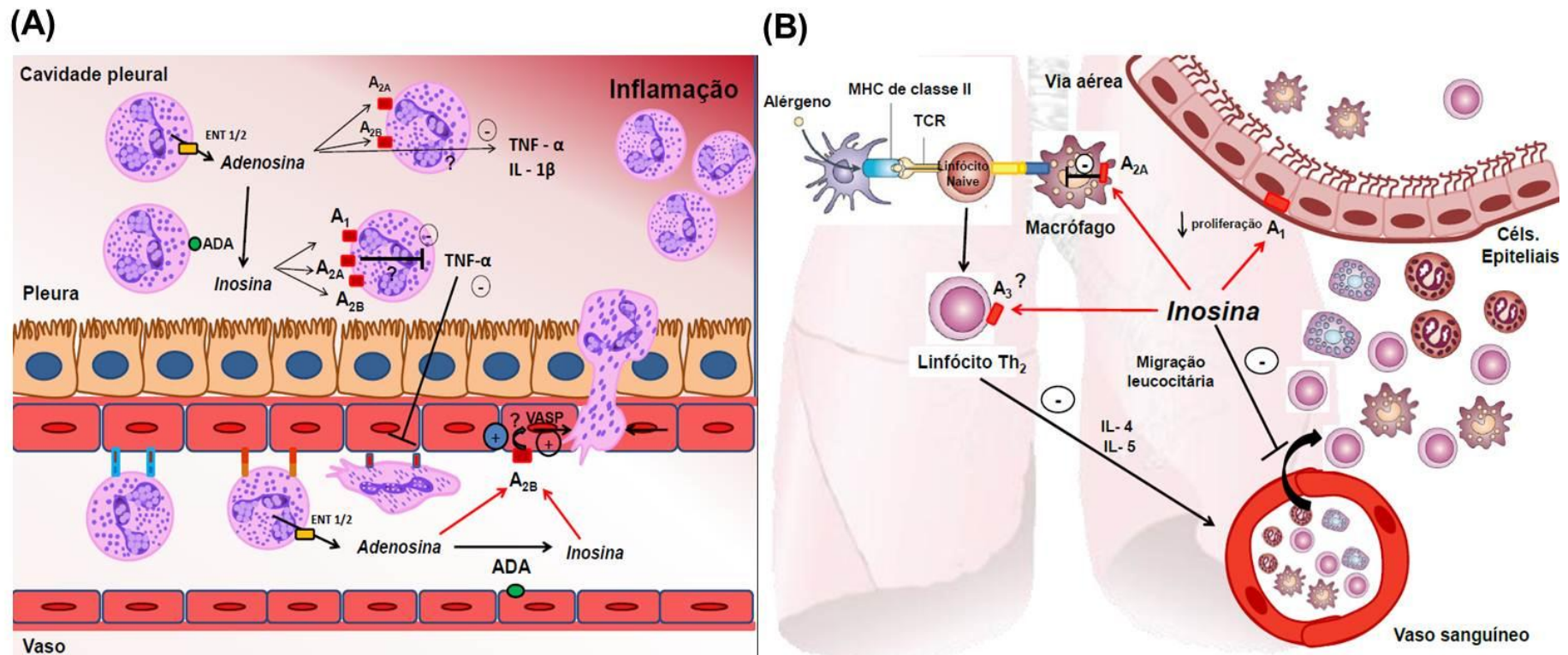


Figura 24: Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios da adenosina e inosina na pleurisia e da inosina na asma experimental em camundongos. **(A)** Durante o processo inflamatório pleural, devido à ativação celular, a adenosina é gerada e transportada para o meio extracelular através das ENTs 1 e 2, e em seguida convertida em inosina pela adenosina deaminase, expressa na membrana das células endoteliais e leucócitos. A adenosina pode interagir com os receptores A_{2A} e A_{2B} , reduzindo a ativação celular e liberação/produção de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ e migração celular. A inosina, por sua vez, parece ativar os mesmos receptores e em adição o receptor A_1 . Através do receptor A_{2A} a inosina reduz a liberação/produção de $TNF-\alpha$. Ambas as purinas, através do receptor A_{2B} , parecem reduzir o extravasamento plasmático, por uma ação sobre o endotélio. **(B)** A inosina liga-se nos receptores A_{2A} em macrófagos ou mastócitos, em A_3 em linfócitos, inibindo a migração leucocitária para os pulmões, bem como a liberação de $IL-4$ e $IL-5$, o que contribui com a mesma. Ativando receptores A_1 reduz a hiperproliferação de células epiteliais. Estes efeitos anti-inflamatórios contribuem com o efeito da inosina sobre a elastância pulmonar, melhorando a função dos pulmões.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, buscou-se avaliar os efeitos da adenosina e inosina sobre o processo inflamatório agudo, utilizando o modelo de pleurisia, induzida por carragenina e sobre a inflamação alérgica pulmonar, induzida por OVA, onde ocorre a ativação do sistema imune adaptativo. Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

- Na inflamação pleural aguda, a adenosina reduziu migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o local da inflamação, extravasamento plasmático, através de um mecanismo, envolvendo ativação dos receptores A_{2A} e A_{2B} para adenosina.
- Os efeitos da adenosina sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) não envolveu a ativação dos receptores para adenosina.
- A inosina, metabólito da adenosina, também reduziu a migração leucocitária, principalmente de neutrófilos e extravasamento do plasma, porém por um mecanismo que envolveu a ativação de receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} para adenosina. Em adição, através de mecanismo envolvendo o receptor A_{2A} , a inosina reduziu os níveis de TNF- α , em exsudatos pleurais.
- A participação dos receptores A_{2A} foi confirmada, uma vez que o ZM241385 reverteu o efeito do CGS21680, um agonista seletivo A_{2A} , sobre a migração leucocitária e extravasamento plasmático.
- De acordo com os dados obtidos por HPLC, podemos afirmar que na inflamação aguda, ocorreu um sinergismo de efeitos entre adenosina e inosina. Além disso, os dados obtidos após o tratamento com EHNA, nos revelaram que houve a probabilidade da inosina ter sido convertida em adenosina, durante a resposta inflamatória aguda.
- Apesar da adenosina apresentar um efeito anti-inflamatório no modelo de pleurisia, na inflamação alérgica, a adenosina não interferiu com nenhum dos parâmetros avaliados.
- O tratamento com inosina mostrou claramente uma redução na migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos para as vias aéreas, um efeito que envolveu a participação dos receptores A_{2A} . Em adição, estes receptores estão

relacionados à inibição da migração de mastócitos com uma menor participação dos receptores A_{2B} .

- A inosina reduziu liberação de citocinas pró-inflamatórias possivelmente através da ativação de receptores A_3 .

- Os efeitos inibitórios da inosina, sobre a inflamação alérgica, contribuiu com a redução da elastância pulmonar, melhorando a função e desempenho dos pulmões.

- Em conjunto, estes dados permitem-nos uma melhor compreensão acerca do papel do sistema purinérgico e em adição do metabolismo das purinas, na inflamação aguda e asma, comprovando que estas atuam sobre células do sistema imune, através da ativação dos receptores para adenosina. Ainda, os resultados evidenciam que a adenosina e inosina, assim como análogos das mesmas ou agonistas e antagonistas específicos dos seus receptores, podem ser utilizados futuramente para o tratamento de condições patológicas que envolvam o processo inflamatório. Vale a pena ressaltar, que a inosina em particular apresenta um grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares alérgicas, como a asma.

7 REFERÊNCIAS

ALBRECHT-KUPPER, B. E. *et al.* Partial adenosine A1 receptor agonists for cardiovascular therapies. **Purinergic Signal**, v. 8, n. Suppl 1, p. 91-9, 2012.

ANTONIOLI, L. *et al.* Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 2, p. 435-42, 2007.

ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **Eur Respir J**, v. 21, n. 3, p. 539-44, 2003.

BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. **Semin Cancer Biol**, v. 16, n. 1, p. 80-8, 2006.

BAR-YEHUDA, S. *et al.* Agonists to the A3 adenosine receptor induce G-CSF production via NF-kappaB activation: a new class of myeloprotective agents. **Exp Hematol**, v. 30, n. 12, p. 1390-8, 2002.

BARNES, P. J. Drugs for asthma. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S297-303, 2006.

BECKER, B. F. *et al.* Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. **Chest**, v. 100, n. 3 Suppl, p. 176S-181S, 1991.

BOUMA, M. G. *et al.* Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. **J Immunol**, v. 153, n. 9, p. 4159-68, 1994.

BOURS, M. J. *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BRADDING, P. *et al.* The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 6, p. 1277-84, 2006.

III Consenso brasileiro no manejo de asma. **Rev. AMRIGS.**, 28 (3,4): 151-172, 2002.

COMERFORD, K. M. *et al.* Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. **FASEB J**, v. 16, n. 6, p. 583-5, 2002.

COOLEN, E. J. *et al.* Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 864, n. 1-2, p. 43-51, 2008.

IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. **J. Bras. Pneumol.**, 32(S7):S 447-S 474, 2006.

DENZLINGER, C. *et al.* Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, v. 230, n. 4723, p. 330-2, 1985.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-8, 2000.

DURRANI, S. R. *et al.* What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 3, p. 439-48; quiz 449-50, 2011.

ECKLE, T. *et al.* A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2024-35, 2008.

_____. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 10, p. 3301-15, 2008.

EL-HASHIM, A. Z. *et al.* Intranasal administration of NECA can induce both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects in BALB/c mice: evidence for A2A receptor sub-type mediation of NECA-induced anti-inflammatory effects. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 22, n. 3, p. 243-52, 2009.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904-15, 2009.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **N Engl J Med**, v. 364, n. 7, p. 656-65, 2011.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1391-401, 2011.

ELTZSCHIG, H. K. *et al.* Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1602-10, 2006.

_____. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **J Exp Med**, v. 198, n. 5, p. 783-96, 2003.

FIEGER, S. M.; WONG, B. J. No direct role for A1/A2 Adenosine Receptor Activation to reflex cutaneous vasodilatation during whole body heat stress in humans. **Acta Physiol (Oxf)**, 2012.

FOZARD, J. R. *et al.* Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 438, n. 3, p. 183-8, 2002.

FOZARD, J. R.; HANNON, J. P. Species differences in adenosine receptor-mediated bronchoconstrictor responses. **Clin Exp Allergy**, v. 30, n. 9, p. 1213-20, 2000.

FREDHOLM, B. B. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

_____. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Prog Neurobiol**, v. 83, n. 5, p. 263-76, 2007.

FRIEDL, H. P. *et al.* Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am J Pathol**, v. 135, n. 1, p. 203-17, 1989.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 4, p. 223-7, 2001.

FRODE, T. S. *et al.* The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, 2001.

GALLI, S. J. *et al.* The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-54, 2008.

GARCIA, G. E. *et al.* Adenosine A2A receptor activation and macrophage-mediated experimental glomerulonephritis. **FASEB J**, v. 22, n. 2, p. 445-54, 2008.

GARCIA SORIANO, F. *et al.* Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. **Crit Care Med**, v. 29, n. 4, p. 703-8, 2001.

GESSI, S. *et al.* The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. **Pharmacol Ther**, v. 117, n. 1, p. 123-40, 2008.

GINA report: Global strategy for asthma management and prevention. Disponível em: www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2011.pdf> Acesso em: 09 fev. 2012.

GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 401-16, 2004.

GLAAB, T. *et al.* Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. **Respir Res**, v. 8, p. 63, 2007.

GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M. V. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4472-8, 2003.

HANNON, J. P. *et al.* A role for mast cells in adenosine A3 receptor-mediated hypotension in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 6, p. 945-52, 1995.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 1, p. 33-9, 2004.

HASKO, G. *et al.* Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. **J Immunol**, v. 164, n. 2, p. 1013-9, 2000.

_____. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 9, p. 759-70, 2008.

_____. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. **Eur J Pharmacol**, v. 358, n. 3, p. 261-8, 1998.

_____. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 3, p. 152-7, 2004.

HEINE, H.; ULMER, A. J. Recognition of bacterial products by toll-like receptors. **Chem Immunol Allergy**, v. 86, p. 99-119, 2005.

HENRIQUES, M. G. *et al.* Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw oedema and pleurisy in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 106, n. 3, p. 579-82, 1992.

HOLGATE, S. T. Pathogenesis of asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-97, 2008.

_____. Asthma: a simple concept but in reality a complex disease. **Eur J Clin Invest**, v. 41, n. 12, p. 1339-52, 2011.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 3, p. 218-30, 2008.

HUA, X. *et al.* Adenosine induces airway hyperresponsiveness through activation of A3 receptors on mast cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, n. 1, p. 107-13, 113 e1-7, 2008.

HUANG, S. *et al.* Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. **Blood**, v. 90, n. 4, p. 1600-10, 1997.

IMPELLIZZERI, D. *et al.* CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, decreases acute lung inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 305-16, 2011.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 247-64, 2006.

JAGTAP, P.; SZABO, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 5, p. 421-40, 2005.

JANTZ, M. A.; ANTONY, V. B. Pathophysiology of the pleura. **Respiration**, v. 75, n. 2, p. 121-33, 2008.

JIN, X. *et al.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2849-57, 1997.

KAPETANOVIC, R.; CAVAILLON, J. M. Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. **Expert Opin Biol Ther**, v. 7, n. 6, p. 907-18, 2007.

KAUFMANN, I. *et al.* Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from patients with septic shock. **Shock**, v. 27, n. 1, p. 25-31, 2007.

KAY, A. B. The role of T lymphocytes in asthma. **Chem Immunol Allergy**, v. 91, p. 59-75, 2006.

KELLY, M. *et al.* Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KOSHIBA, M. *et al.* Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. **Mol Pharmacol**, v. 55, n. 3, p. 614-24, 1999.

KROEGEL, C.; ANTONY, V. B. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. **Eur Respir J**, v. 10, n. 10, p. 2411-8, 1997.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LAWRENCE, T. *et al.* Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 787-95, 2002.

LEVY, B. D. *et al.* Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat Immunol**, v. 2, n. 7, p. 612-9, 2001.

LIAUDET, L. *et al.* Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. **Ann Surg**, v. 235, n. 4, p. 568-78, 2002.

_____. Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 7, p. 1213-20, 2001.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 775-87, 2001.

LIVINGSTON, M. *et al.* Adenosine, inflammation and asthma--a review. **Inflamm Res**, v. 53, n. 5, p. 171-8, 2004.

LOFFLER, M. *et al.* Physiological roles of vascular nucleoside transporters. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 5, p. 1004-13, 2007.

LU, G. *et al.* Chronic morphine treatment impaired hippocampal long-term potentiation and spatial memory via accumulation of extracellular adenosine acting on adenosine A1 receptors. **J Neurosci**, v. 30, n. 14, p. 5058-70,

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, n. 7, p. 436-45, 1998.

MABLEY, J. G. *et al.* Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, n. 1, p. G138-44, 2003.

_____. The novel inosine analogue INO-2002 exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. **Shock**, v. 32, n. 3, p. 258-62, 2009.

MADDOX, L.; SCHWARTZ, D. A. The pathophysiology of asthma. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 477-98, 2002.

MALLE, E. *et al.* Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 6, p. 838-54, 2007.

MARTON, A. *et al.* Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. **Int J Mol Med**, v. 8, n. 6, p. 617-21, 2001.

MCCOLL, S. R. *et al.* Immunomodulatory impact of the A2A adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils. **FASEB J**, v. 20, n. 1, p. 187-9, 2006.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-8, 1997.

MEI, D. A. *et al.* Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector. **Anal Biochem**, v. 238, n. 1, p. 34-9, 1996.

MENEGAZZI, M. *et al.* Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 1, p. 22-31, 2008.

MERIGHI, S. *et al.* A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 20, p. 19516-26, 2005.

METHIPPARA, M. M. *et al.* Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, n. 6, p. R1715-23, 2005.

MODIS, K. *et al.* Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 6, p. 1565-78, 2009.

MONTESINOS, M. C. *et al.* Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. **J Exp Med**, v. 186, n. 9, p. 1615-20, 1997.

MOORE, A. R. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 123-8, 2003.

MOORE, A. R. *et al.* Cyclooxygenase enzymes and their products in the carrageenan-induced pleurisy in rats. **Methods Mol Biol**, v. 644, p. 201-5, 2010.

MUSTAFA, S. J. *et al.* Effect of a specific and selective A(2B) adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 3, p. 1246-51, 2007.

NADEEM, A. *et al.* Adenosine A1 receptor antagonist versus montelukast on airway reactivity and inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 551, n. 1-3, p. 116-24, 2006.

NANTEL, F. *et al.* Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 4, p. 853-9, 1999.

NASCIMENTO, F. P. *et al.* Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, n. 2, p. 590-8, 2010.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2012.

NGAMSRI, K. C. *et al.* Adenosine receptor A1 regulates polymorphonuclear cell trafficking and microvascular permeability in lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4374-84, 2010.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Dis Model Mech**, v. 1, n. 4-5, p. 213-20, 2008.

OFFERMANN, S.; SIMON, M. I. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. **J Biol Chem**, v. 270, n. 25, p. 15175-80, 1995.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 916-20, 2001.

OLIVE, C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 237-56, 2012.

ORIHARA, K. *et al.* What's new in asthma pathophysiology and immunopathology? **Expert Rev Respir Med**, v. 4, n. 5, p. 605-29, 2010.

POLOSA, R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v. 20, n. 2, p. 488-96, 2002.

POLOSA, R.; HOLGATE, S. T. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 6, p. 699-706, 2006.

RAHIMIAN, R. *et al.* Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 649, n. 1-3, p. 376-81, 2010.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-92, 1998.

REVAN, S. *et al.* Adenosine A2 receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 29, p. 17114-8, 1996.

RIBEIRO, J. A. *et al.* Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 6, p. 377-92, 2002.

SALEH, T. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 3, p. 811-9, 1996.

SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 313-40, 2003.

SCHRIER, D. J. *et al.* The antiinflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenan-induced pleural inflammatory response in rats. **J Immunol**, v. 145, n. 6, p. 1874-9, 1990.

SCHRODER, N. W.; MAURER, M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**, v. 62, n. 6, p. 579-90, 2007.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1191-7, 2005.

SHARMA, A. K. *et al.* Adenosine A2A receptor activation on CD4+ T lymphocytes and neutrophils attenuates lung ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 139, n. 2, p. 474-82, 2010.

_____. Protection from pulmonary ischemia-reperfusion injury by adenosine A2A receptor activation. **Respir Res**, v. 10, p. 58, 2009.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SITKOVSKY, M. V. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 4, p. 493-501, 2003.

SPICUZZA, L. *et al.* Adenosine in the airways: implications and applications. **Eur J Pharmacol**, v. 533, n. 1-3, p. 77-88, 2006.

SPITSIN, S. *et al.* Inactivation of peroxynitrite in multiple sclerosis patients after oral administration of inosine may suggest possible approaches to therapy of the disease. **Mult Scler**, v. 7, n. 5, p. 313-9, 2001.

STARLING, R. D. *et al.* Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 9, p. 1193-8, 1996.

SULLIVAN, G. W. *et al.* Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 1, p. 127-34, 2004.

SUN, C. X. *et al.* Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2173-2182, 2006.

SUZUKI, H. *et al.* Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of Fc epsilon RI. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 242, n. 3, p. 697-702, 1998.

SZABO, C. *et al.* Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. **Br J Pharmacol**, v. 125, n. 2, p. 379-87, 1998.

SZABO, E. *et al.* PARP-1: a new player in the asthma field? **Allergy**, v. 66, n. 7, p. 811-4, 2011.

TENDERA, M. *et al.* The new oral adenosine A1 receptor agonist capadenoson in male patients with stable angina. **Clin Res Cardiol**, 2012.

TILLEY, S. L. *et al.* Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. **J Clin Invest**, v. 105, n. 3, p. 361-7, 2000.

TOMLINSON, A. *et al.* Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 3, p. 693-8, 1994.

VAN SCHOOR, J. *et al.* Indirect bronchial hyper-responsiveness: the coming of age of a specific group of bronchial challenges. **Clin Exp Allergy**, v. 35, n. 3, p. 250-61, 2005.

VIRAG, L.; SZABO, C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. **FASEB J**, v. 15, n. 1, p. 99-107, 2001.

WAKAI, A. *et al.* Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A2B receptor activation. **Shock**, v. 15, n. 4, p. 297-301, 2001.

WILBUR, S. L.; MARCHLINSKI, F. E. Adenosine as an antiarrhythmic agent. **Am J Cardiol**, v. 79, n. 12A, p. 30-7, 1997.

YANG, D. *et al.* The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1913-23, 2006.

YOUNG, H. W. *et al.* A3 adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1380-9, 2004.

8 ANEXOS

Purinergic Signalling
DOI 10.1007/s11302-012-9299-2

ORIGINAL ARTICLE

Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A₂ receptors

Fernanda da Rocha Lapa · Morgana Duarte da Silva ·
Daniela de Almeida Cabrini · Adair R. S. Santos