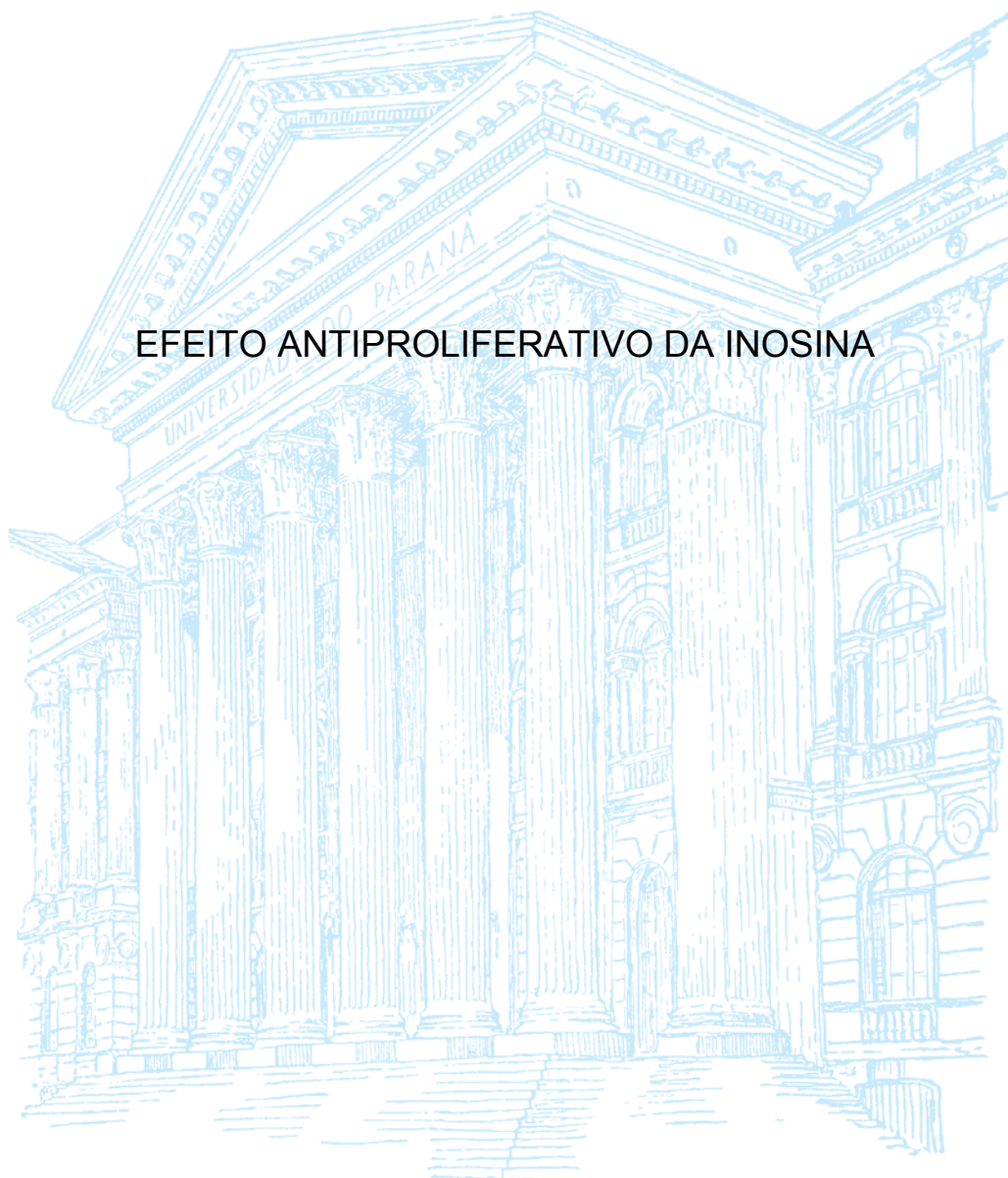


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE DADALT SILVA



EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA INOSINA

CURITIBA

2017

CAROLINE DADALT SILVA

## EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA INOSINA

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Almeida Cabrini

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Silva, Caroline Dadalt

Efeito antiproliferativo da inosina. / Caroline Dadalt Silva. – Curitiba, 2017.  
73 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Daniela de Almeida Cabrini  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Inosina. 2. Queratinócitos. 3. Pele. 4. Inflamação. I. Título II. Cabrini,  
Daniela de Almeida. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.5



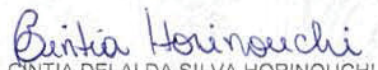
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA


## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINE DADALT SILVA** intitulada: **EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DA INOSINA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2017.

  
DANIELA DE ALMEIDA CABRINI  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCHE  
Avaliador Externo (ICC)

  
GUILHERME FERREIRA SILVEIRA  
Avaliador Externo (ICC)

Dedico este trabalho à dona Sebastiana, minha mãe, que me ensinou a sempre ver a vida com entusiasmo e coragem, não importando o tamanho do meu medo ou das minhas limitações.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela vida e todas as aventuras que vêm com ela.

À minha família pelo apoio e compreensão.

Aos orientadores Daniela e Michel, por terem me dado a oportunidade de conhecer melhor a ciência e a pesquisa, pelos ensinamentos e enorme paciência. Aprendi muito nesses dois anos, obrigada!

Aos amigos do LAFFPEL, que passaram e que ainda estão nele, foi um prazer imenso conviver e aprender com cada um. Amo todos vocês “LAFFBelos”!

Aos colegas Gabriela, Bruna, Priscila, Angélica e Felipe por dividirem comigo seu conhecimento, experiência técnica e tempo.

Aos professores da pós-graduação em Farmacologia e Biologia Celular por terem contribuído para minha formação científica.

Aos animais usados nesta pesquisa, meu profundo respeito.

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Farmacologia pelo apoio técnico e por proporcionar todas as condições para que este trabalho fosse realizado.

À Fundação Osvaldo Cruz, na pessoa do professor Juliano Bordignon e do pesquisador Guilherme Ferreira Silveira.

À CAPES, CNPq e UFPR pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A inosina é uma molécula endógena pertencente à família dos nucleósidos, que atua como uma molécula de sinalização extracelular. Sabe-se que durante processos inflamatórios ou lesões teciduais há um aumento na concentração desta purina, que é capaz de modular estes processos através da ativação de receptores purinérgicos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação da inosina na modulação da proliferação de queratinócitos *in vitro* e *in vivo*, investigando seu possível mecanismo de ação. Para isso, foram utilizados modelos *in vitro* em linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (HaCat), e *in vivo* em camundongos da variedade *Swiss*. Os resultados obtidos mostraram que a inosina é capaz de reduzir a proliferação de queratinócitos *in vitro*, sendo este efeito modulado pelos receptores de adenosina A1 e A3. Além disso, a aplicação tópica de inosina mostrou ação anti-inflamatória e antihiperproliferativa *in vivo*, reduzindo a formação de edema e proliferação de queratinócitos, sendo estes parâmetros modulados pelos receptores adenosinérgico A1 e A3. O tratamento tópico com inosina também mostrou ser capaz de reduzir a migração de células inflamatórias, sendo este parâmetro modulado pelo receptor adenosinérgico A2A. Esses resultados indicam que a inosina exógena possui atividade anti-inflamatória e antiproliferativa na pele, através, principalmente, da ativação dos receptores purinérgicos A1, A2A e A3. Além disso, a inosina demonstrou ter capacidade de modular a proliferação de queratinócitos de maneira direta através dos receptores adenosinérgico A1 e A3, como observado *in vitro*. Assim, a inosina, bem como agonistas dos receptores de adenosina, podem ser uma opção interessante para o tratamento tópico de doenças inflamatórias crônicas de pele com características hiperproliferativas, como a psoríase.

**Palavras-chave:** Inosina, Pele, inflamação, Hiperproliferação de Queratinócitos, Receptores Purinérgicos.

## ABSTRACT

Inosine is an endogenous molecule belonging to the nucleoside family, which acts as an extracellular signaling molecule. It is known that during inflammatory processes or tissue lesions there is increase in the concentration of this purine, which is able to modulate these processes through the activation of purinergic receptors. In this context, the present study aimed to evaluate the action of inosine in the modulation of keratinocyte proliferation in vitro and in vivo, investigating its possible mechanism of action. For this, in vitro models were used in immortalized human keratinocyte lineage (HaCat) and in vivo models in Swiss mice. The results showed that inosine is able to reduce the keratinocytes proliferation in vitro, being this effect modulated by A1 and A3 adenosine receptors. In addition, topical application of inosine has shown anti-inflammatory and antiproliferative action in vivo, reducing edema formation and keratinocyte proliferation, and these parameters are modulated by the A1 and A3 adenosinergic receptors. Topical treatment with inosine has also shown to be able to reduce the inflammatory cells migration, being this parameter modulated by A2A adenosinergic receptor. These results indicate that exogenous inosine has anti-inflammatory and antiproliferative activity in the skin, mainly through the activation of purinergic receptors A1, A2A and A3. In addition, inosine has been shown to be able to modulate keratinocyte proliferation directly through the A1 and A3 adenosinergic receptors, as observed in vitro. Thus, inosine as well as adenosine receptor agonists may be an interesting option for the topical treatment of chronic inflammatory skin diseases with hyperproliferative characteristics, such as psoriasis.

**Key Words:** Inosine, Skin, Inflammation, Keratinocytes Hyperproliferation, Purinergic receptors.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>FIGURA 01</b> - Avaliação do efeito da inosina sobre a viabilidade de queratinócito (HaCaT) <i>in vitro</i> .....	34
<b>FIGURA 02</b> - Avaliação do efeito da purina inosina sobre proliferação de queratinócitos <i>in vitro</i> .....	37
<b>FIGURA 03</b> - Análise do efeito de inosina sobre a proliferação celular de queratinócitos humanos <i>in vitro</i> através dos métodos de CyQUANT e PCNA.....	39
<b>FIGURA 04</b> - Análise do efeito da purina inosina sobre o ciclo celular de queratinócitos humanos <i>in vitro</i> .....	41
<b>FIGURA 05</b> - Representação do ciclo celular no <i>flowing software</i> 2.5.1.....	42
<b>FIGURA 06</b> - Avaliação da citotoxicidade de antagonistas purinérgicos sobre queratinócito humanos <i>in vitro</i> .....	44
<b>FIGURA 07</b> - Avaliação da participação dos diferentes receptores adenosinérgicos na atividade antiproliferativa da inosina <i>in vitro</i> ..	46
<b>FIGURA 08</b> - Avaliação do tratamento tópico com inosina no modelo de inflamação cutânea crônica.....	48
<b>FIGURA 09</b> - Efeito da inosina e dos antagonistas dos receptores para adenosina no modelo de inflamação crônica de induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton.....	50
<b>FIGURA 10</b> - Análise dos efeitos da inosina e dos antagonistas de receptores para adenosina sobre as alterações histopatológicas na inflamação de pele induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton.....	51
<b>FIGURA 11</b> - Análise do efeito antiproliferativo da inosina através da imunohistoquímica para PCNA.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ADA	Adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
ALFAC	Solução de Álcool, formaldeído e ácido acético.
AMP	Adenosina monofosfato
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
<i>ARRIVE</i>	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments Guidelines</i>
ATP	Adenosina desaminase
BSA	Albumina de soro de bovino
Cdks	Quinases dependentes de ciclinas
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Enzima ciclo-oxigenase
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPCPX	Dipropilciclopentilxantina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M	Média ± erro padrão da média
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleucina

IMP	Inosina monofosfato
iNOS	Óxido nítrico sintase
ITP	Inosina Trifosfato
LTB4	Leucotrieno B4
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Thiazolyl blue tetrazoliumbromide
NaCl	Cloreto de Sódio
NAG	n-acetil- $\beta$ -D glucosaminidase
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear-kappa B
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
PI	Iodeto de propídio
SFB	Soro fetal bovino
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
VN	Vermelho neutro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1. Drogas e Reagentes .....	25
4.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	25
4.2.1 Cultivo celular .....	25
4.2.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de <i>Thiazolyl Blue</i> <i>Tetrazoliumbromide</i> (MTT) .....	26
4.2.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Vermelho Neutro .....	26
4.2.4 Protocolo de Proliferação Celular .....	27
4.2.5 Quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por imunocitoquímica.....	27
4.2.6 Quantificação de DNA por <i>CyQuant</i> .....	28
4.2.7 Avaliação do ciclo celular por PI/RNase .....	28
4.3. Ensaio <i>in vivo</i> .....	29
4.3.1 Animais .....	29
4.3.2 Avaliação do edema de orelha.....	29
4.3.3 Modelo de inflamação cutânea crônica induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton .....	30
4.3.4 Avaliação histológica .....	30
4.3.5 Quantificação de PCNA por imunohistoquímica .....	31
4.4. Análise estatística .....	32

<b>5. RESULTADOS</b> .....	33
5.1. Avaliação da atividade citotóxica da inosina em queratinócitos.....	33
5.2. Avaliação da ação antiproliferativa da inosina sobre queratinócitos <i>in vitro</i> .....	35
5.3. Avaliação do efeito da inosina sobre o ciclo celular de queratinócitos.....	40
5.4. Avaliação da citotoxicidade dos antagonistas de receptores de adenosina em queratinócidos .....	43
5.5. Avaliação dos receptores adenosinérgicos envolvidos na atividade antiproliferativa da inosina sobre queratinócitos .....	45
5.6. Ação tópica da inosina em modelo de inflamação crônica induzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton .....	47
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1.1 Proliferação e diferenciação celular de queratinócitos

A proliferação e diferenciação celular são processos aos quais os queratinócitos estão sujeitos na epiderme. Esses processos iniciam-se no estrato basal e progridem até o estrato córneo, levando aproximadamente 30 dias para ser concluído. Em cada estrato, os queratinócitos sofrem alterações morfológicas, expressando diferentes queratinas (proteínas que compõem o citoesqueleto), que são marcadores específicos necessários para orientar esse tipo celular nas diferentes camadas que compõem o epitélio (LATAKOWSKI *et al.*, 1995; PROKSCH *et al.*, 2008; FREINKEL e WOODLEY, 2001; TOBIN *et al.*, 2006).

Aproximadamente 30 queratinas já foram identificadas, podendo ser divididas em duas famílias (I ou II), sendo proteínas básicas e neutras pertencentes à família ou tipo I, e as proteínas ácidas à família ou tipo II. (LATAKOWSKI *et al.*, 1995). As diferentes camadas da epiderme expressam diferentes quantidades de queratina, variando de 30% na camada basal, a 80% na camada córnea. Os queratinócitos expressam no mínimo um par de queratinas, sendo uma queratina pertencente ao Tipo I junto com uma queratina Tipo II. Desta forma, quando uma queratina é expressa seu par também é expresso. De maneira semelhante, caso ocorra inibição da expressão de uma queratina, a expressão do par também será inibida (TOBIN *et al.*, 2006).

A proliferação dos queratinócitos é regulada por diferentes marcadores celulares, sendo esse controle realizado na fase G1 do ciclo celular, principalmente, por quinases dependentes de ciclinas (cdks, por exemplo, cdk2, cdk4 e cdk6), que são ativadas pela ligação com ciclinas específicas. As ciclinas D (D1, D2 e D3) ativam as cdk4/6, enquanto que as ciclinas E e A ativam a cdk2 (GNIADOCKI *et al.*, 1998). A atividade das cdks é modulada pelos inibidores das quinases dependentes de ciclinas, Cip1 e Kip1. Assim, quando as quinases dependentes de ciclinas são ativadas, ocorre progressão do ciclo celular (GNIADOCKI *et al.*, 1998).

Os queratinócitos possuem capacidade proliferativa no estrato basal, a camada mais profunda da epiderme, porção da epiderme que contém queratinócitos basais indiferenciados, que se dividem frequentemente. Este estrato é composto por *stem cells* (células-tronco) e células transitórias. Essas células caracterizam-se pela presença da queratina 5 (K5) e 14 (K14), marcadores de proliferação. À medida que os queratinócitos migram da camada basal, adquirem gradualmente quantidades crescentes de queratina, e tornam-se gradativamente mais achatado (PROKSCH *et al.*, 2008; FREINKEL e WOODLEY, 2001). Quando os queratinócitos deixam o compartimento basal e param de proliferar, inicia-se, no estrato seguinte, o processo de diferenciação celular (DENNING *et al.*, 2004).

No estrato espinhoso, devido ao grande número de desmossomos, os queratinócitos mudam da forma colunar para a poligonal. Nesta camada, os queratinócitos começam a sintetizar queratinas distintas das encontradas em células do estrato basal, ou seja, passam a expressar marcadores bioquímicos do processo de diferenciação celular (PROKSCH *et al.*, 2008). Desta forma, as células do estrato espinhoso expressam citoqueratina 1 (K1) e 10 (K10). Em seguida, essas células migram para o estrato granuloso, onde são caracterizadas por aglomerados no compartimento citoplasmáticos. Nos queratinócitos do estrato granuloso são expressas proteínas associadas a estágios posteriores da diferenciação celular, como, por exemplo, a profilagrina, filagrina, transglutaminase-I e precursores do envelope de cornificação, como a involucrina e loricrina (TU *et al.*, 2004; PROKSCH *et al.*, 2008).

Ao final do processo de diferenciação, os queratinócitos migram para o estrato córneo, camada da epiderme onde são encontrados os queratinócitos maduros. Este é o estrato mais externo da epiderme e o grande responsável pela função de barreira protetora da pele, capaz de prevenir a desidratação e proteger o organismo contra possíveis patógenos ou substâncias tóxicas (PROKSCH *et al.*, 2008; TOBIN *et al.*, 2006). As células nesta camada, conhecidas como corneócitos, são queratinócitos mortos, desprovidos de organelas e núcleo. Estas células anucleadas contêm em seu interior filamentos de queratina, e são circundadas por um envelope celular composto de proteínas com ligações cruzadas, o envelope cornificado (PROKSCH *et al.*, 2008; TOBIN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o balanço entre a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos é essencial para que ocorra a construção de uma barreira funcional apropriada (ECKERT *et al.*, 1997). Porém quando o balanço entre a proliferação e diferenciação celular está perturbado, pode haver o desenvolvimento de estados patológicos, como por exemplo, os distúrbios hiperproliferativos observados em doenças inflamatórias, como, por exemplo, a psoríase (ECKERT *et al.*, 1997).

### **1.1.2 Psoríase**

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, que afeta cerca de 1 a 3% da população mundial (JACOBSON *et al.*, 2011), sendo esses valores variáveis conforme raça e localização geográfica (BHALERAO e BOWCOCK, 1998). Além disso, as lesões psoriáticas podem ser desencadeadas em qualquer idade, porém durante dois períodos da vida há maior incidências, sendo estes, entre os 15 e 25 anos e entre os 50 e 60 anos de idade (FEINGOLD e GRUNFELD, 2012).

Inicialmente, acreditava-se que esta doença era uma variante da lepra (DE JONG *et al.*, 1997), e apenas em 1841 que *Von Hebra* identificou-a como uma doença única (SCHON e BOEHNCKE, 2005). Nesse contexto, uma das características desta doença é a formação de placas eritematosas e descamativas, bem demarcadas e que ocorrem, principalmente, em locais de grande tensão mecânica, por exemplo, onde a pele é esticada ou apresenta dobras. Desta forma, os cotovelos, joelhos e couro cabeludo são áreas amplamente afetadas na maioria dos pacientes (GRIFFITHS e BARKER, 2007). A formação das placas psoriáticas promove ruptura da barreira protetora, sendo causada pela proliferação e diferenciação anormal dos queratinócitos (LOWES *et al.*, 2007). As manifestações cutâneas levam a considerável morbidade, e em muitos casos as alterações psicológicas observadas em portadores de psoríase severa mostram-se similares àquelas vistas em pacientes com câncer ou diabetes (FEINGOLD e GRUNFELD, 2012).

Apesar das lesões psoriáticas exibirem características específicas, elas podem manifestar-se de diferentes formas, o que permitiu classificá-las em diferentes tipos. Podendo as placas psoriáticas se desenvolverem de maneira localizada ou dispersa, além de desenvolverem-se em curso variável, apresentando-se como agudas ou crônicas (LANGLEY *et al.*, 2005). A psoríase vulgar é o tipo

mais comum, sendo responsável por 90% dos casos da doença, e caracterizando-se pelo desenvolvimento de placas clássicas bem delimitadas, principalmente, em regiões de grande estresse mecânico (GRIFFITHS e BARKER, 2007). Quando surgem lesões brilhantes, avermelhadas, úmidas e normalmente desprovidas de escamas, nas regiões de flexão (como as axilas e joelhos) a psoríase é definida como flexural ou inversa (VAN DE KERKHOF *et al.*, 2007).

A psoríase gutata normalmente é associada a processos infecciosos prévios, e acomete principalmente crianças e adolescentes. Esta forma da doença manifesta-se com pequenas lesões, de aproximadamente um centímetro, em forma de gotas espalhadas por todo o tronco (POTOK *et al.*, 2011). Outra forma de manifestação clínica é a psoríase pustular, que geralmente surge como evolução da psoríase vulgar, desencadeada pelo uso de determinados medicamentos ou pela interrupção abrupta do tratamento. Nas suas lesões aparecem pústulas dolorosas, especialmente nas mãos e nos pés (IRLA *et al.*, 2012). A forma eritematosa é a mais severa da psoríase, onde a maior parte da superfície corporal é acometida por lesões eritemato-escamosas, e pode estar associada a comorbidades como a insuficiência cardíaca, representando risco de morte ao paciente (ZATTRA *et al.*, 2012).

Quando a psoríase atinge as unhas é chamada psoríase ungueal, onde aparecem depressões puntiformes ou manchas amareladas, principalmente, nas unhas das mãos (GRIFFITHS e BARKER, 2007). Além disso, um grande número de pacientes com psoríase desenvolvem a artrite psoriática (LEBWOHL *et al.*, 2003). Sendo esta, uma doença articular inflamatória progressiva, na qual ocorrem, além das manifestações cutâneas, lesões articulares dolorosas e debilitantes, entesite e dactilite. A incidência de artrite psoriática entre os pacientes com psoríase varia entre 7 a 42% (HAROON *et al.*, 2012). Assim, psoríase não acomete apenas a pele, ou as articulações dos pacientes, mas tem também um impacto sistêmico. Nesse contexto, evidências indicam que portadores de lesões psoriáticas apresentam maior risco de comorbidades, incluindo patologias cardiovasculares, metabólicas, gastrointestinais e psiquiátricas (KIMBALL *et al.*, 2008). Assim, como a psoríase é uma doença crônica e desfigurativa, os pacientes apresentam prejuízo na qualidade de vida (VAN VOORHEES e FRIED, 2009).

Diversos são os fatores que têm sido associados à manifestação da psoríase, como, por exemplo, estresse físico e psicológico, distúrbios metabólicos, tabagismo, administração de algumas drogas, como: lítio (BAKKER e PEPPLINKHUIZEN, 1976), betabloqueadores (ABEL *et al.*, 1986) e antiinflamatórios não esteroidais (TSANKOV *et al.*, 2000), assim como, infecções e traumas (CASSANO *et al.*, 2011). Acredita-se que fatores ambientais também possam desencadear, em indivíduos geneticamente predispostos, promovendo alterações imunológicas capazes de dar origem à doença. Portanto, a psoríase é uma doença com perfil de ocorrência multifatorial (GLADMAN *et al.*, 1998).

Com relação à pré-disposição genética, aproximadamente 20 regiões cromossômicas foram associadas à psoríase (LOWES *et al.*, 2007), incluindo o locus PSORS1 (GRIFFITHS e BARKER, 2007). Esse locus é o mais amplamente estudado, e localiza-se na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6p21, que contém genes que codificam proteínas relacionadas à função do sistema imune, entre eles, os genes do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) (KRUEGER AND ELLIS, 2005). HLA-Cw6 é considerado o maior determinante genético da psoríase. Porém, outros estudos mostram diversos genes de risco não relacionados com HLA, como por exemplo, IL-12B e IL-23R (LI e BEGOVICH, 2009).

Ao longo dos últimos 20 anos se têm discutido continuamente se as lesões psoriáticas surgem de uma alteração primária nos queratinócitos ou no sistema imune (KRUEGER, 2002). Acredita-se que as células T infiltrantes sejam um dos principais tipos celulares responsáveis por iniciar e, posteriormente, promover a manutenção do processo inflamatório crônico observado na psoríase. Desta forma, citocinas liberadas pelas células T, assim como, por outros componentes inflamatórios (como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) provocariam a hiperproliferação dos queratinócitos (KRUEGER *et al.*, 2002).

Assim, a imunopatogênese da psoríase está diretamente associada à resposta de células T helper 1 (Th1) e Th17, com superprodução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL) IL-2, IL-12, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (CASSANO *et al.*, 2011). Esses mediadores são capazes de produzir nocicepção, aumentar a

permeabilidade vascular e o influxo de leucócitos, três características importantes do processo inflamatório (LUCENA *et al.*, 2007; SMIDERLE *et al.*, 2008; ZEASHAN *et al.*, 2009). Desta forma, interações celulares complexas entre queratinócitos, leucócitos mononucleares, neutrófilos, células dendríticas e células T ativadas, juntamente com fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, estão envolvidas no desenvolvimento da psoríase (NICKOLOFF *et al.*, 2007; LOWES *et al.*, 2007).

Cada vez mais, sugere-se que a psoríase é causada por uma interação entre queratinócitos e o sistema imune e que um possível candidato ligando o sistema imune aos queratinócitos é a IL-22, uma citocina produzida pelas células Th17, que age nos queratinócitos induzindo acantose e diferenciação para um fenótipo psoriático (DANILENKO *et al.*, 2008).

Além disso, estímulos externos podem desencadear o início da psoríase em indivíduos geneticamente predispostos à doença, promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) pelos queratinócitos, que ativam células dendríticas mielóides. Esses estímulos também promovem a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como o LL-37, ocorrendo a formação de um complexo LL-37-DNA que ativa as células dendríticas plasmocitóides (presentes em grande quantidade na psoríase), o que leva a síntese e liberação de INF- $\alpha$  por estes tipos celulares. O INF- $\alpha$  também ativa células dendríticas mielóides (NESTLE *et al.*, 2009). Essas células são responsáveis pela captura, internalização e processamento de antígenos, apresentando-os na sua superfície celular. Durante este processo, há alteração da expressão de receptores de superfície e de moléculas de adesão, posteriormente, estas células dendríticas mielóides migram para os linfonodos, onde liberam IL-23 e IL-12 e induzem a diferenciação de células T *naïve* em células T efectoras (DE RIE *et al.*, 2004).

Uma vez ativadas, as células T migram dos linfonodos e infiltram a derme e epiderme através de diapedese, processo este facilitados pelo aumento da expressão de selectinas e integrinas (BOWCOCK e KRUEGER, 2005). Em seguida, os linfócitos T liberam citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a proliferação dos queratinócitos, promovendo mudanças epidermais, como a formação de placas psoriáticas (BOWCOCK e KRUEGER, 2005).

Como é possível observar, na psoríase o balanço entre a proliferação e diferenciação celular está prejudicado (BATA-CSORGO *et al.*, 1993). As mudanças histopatológicas mais específicas que distinguem a psoríase de outras doenças inflamatórias são: hiperplasia (aumento do número de queratinócitos), acantose (espessamento da camada espinhosa da epiderme), hiperqueratose (engrossamento do estrato córneo) e disfunção do processo de cornificação, com queratinócitos contendo núcleo no estrato córneo (paraqueratose), além disso, é observado o infiltrado de leucócitos na derme e epiderme (KRUEGER e BOWCOCK, 2005; LOWES *et al.*, 2007).

Assim, a hiperproliferação dos queratinócitos é resultado da expressão aberrante de diversas moléculas regulatórias associadas à proliferação celular. Outro processo relacionado com a patogênese da psoríase é o desequilíbrio entre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas (TOMKOVA *et al.*, 1997). Ocorrendo diferenças na expressão de proteínas envolvidas com a apoptose, entre a pele normal e a psoriática. Sendo a expressão aumentada dessas proteínas associada à resistência dos queratinócitos à apoptose, através do bloqueio do processo apoptótico normal envolvido no programa de diferenciação terminal dos queratinócitos (LERMAN *et al.*, 2011).

### **1.1.3 Inosina**

A psoríase é, provavelmente, a desordem cutânea hiperproliferativa imunomediada mais prevalente, e não possui cura. Seu tratamento tem como objetivo diminuir as lesões e prolongar o tempo de recidivas, melhorando desta forma a qualidade de vida dos pacientes e o seu convívio social. Devido sua natureza complexa, muitos regimes terapêuticos não produzem resultados satisfatórios, em grande parte devido à tolerância desenvolvida, além de diversas classes de medicamentos estarem diretamente associadas a efeitos adversos indesejáveis (LINDEN e WEINSTEIN, 1999), toxicidade (no caso de tratamentos sistêmicos) e inconveniência (terapia tópica e fototerapia, por exemplo) (GOTTLIEB, 2005a).

A escolha da terapia a ser utilizada vai depender da extensão e severidade da doença, dos agentes terapêuticos disponíveis, da acessibilidade ao tratamento, viabilidade econômica, qualidade de vida e vontade do paciente em relação ao tipo

de terapia (GALADARI *et al.*, 2005). Atualmente, muitos tratamentos estão disponíveis para aliviar as lesões psoriáticas. As opções de tratamento tradicionais para a psoríase incluem, para os casos mais leves, terapias tópicas (corticosteróides, análogos da vitamina D e retinóides) e fototerapia (ultravioleta B, PUVA e climatoterapia); e para casos mais severos, terapias sistêmicas (metotrexato, retinóides e ciclosporina A). A maioria desses agentes terapêuticos tem um papel importante no tratamento da psoríase, porém, sua toxicidade pode limitar seu uso por tempo prolongado (TONEL e CONRAD, 2009).

Devido a isso, surgiu o interesse no estudo da inosina, sendo ela uma molécula endógena que pode exercer potentes efeitos moduladores no sistema imune (HASKO *et al.*, 2004; MABLEY *et al.*, 2003). A inosina, assim como outros nucleosídeos, funciona como uma molécula de sinalização extracelular, e embora esteja presente em baixas concentrações no espaço extracelular, condições de estresse metabólico geradas por inflamação, lesões, hipóxia, isquemia/reperfusão e outros estados patológicos, tendem a aumentar drasticamente a concentração desta purina (BURNSTOCK *et al.*, 2012; MABLEY *et al.*, 2009).

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

Vários análogos da inosina, assim como, agonistas dos receptores purinérgico P1, têm demonstrado efeito em modelos de doenças inflamatórias, que incluem asma (EL-HASHIM *et al.*, 2009), inflamação crônica do intestino (ANTONIOLI *et al.*, 2007), artrite reumatóide (SZABO *et al.*, 1998) e sepse (LAW *et al.*, 2006; HASKO *et al.*, 1998). Estes estudos recentes têm reforçado a hipótese de que nucleosídeos púricos podem exercer importante papel modulador na homeostase da pele. Foi descrito que, através de um mecanismo adenosina-dependente (provavelmente pelo envolvimento do receptor A1), as células T

regulatórias podem suprimir hipersensibilidade de contato (RING *et al.*, 2011; RING *et al.*, 2009; OLIVER *et al.*, 2011). Além disso, a ativação dos receptores A1, A2A e A2B está envolvida com o processo de cicatrização cutânea, o que sugere que as purinas tem atividade importante na regulação da homeostase da pele (MONTESINOS *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 1999; VALLS *et al.*, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que a inosina também apresenta um efeito anti-inflamatório relacionado com a ativação dos receptores P1, principalmente os receptores A2A e A3, que incluem a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (GOMEZ *et al.*, 2003; HASKO *et al.*, 2000; RAHIMIAN *et al.*; 2010). Recentemente, em nosso laboratório demonstramos que o tratamento com inosina promoveu a redução da migração de neutrófilos e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em exsudado pleural, durante a inflamação pleural aguda, um efeito que envolveu os receptores A2A e A2B (DA ROCHA LAPA *et al.*, 2012).

Ainda hoje existe a necessidade de identificação de moléculas endógenas capazes de inibir a atividade exacerbada ou inapropriada do sistema imune na pele e o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias que possam regular ao processo inflamatório com menos efeitos adversos (DA ROCHA LAPA *et al.*, 2012). Nesse contexto, apesar das evidências da ação da adenosina na pele, não há registros na literatura sobre o efeito do tratamento tópico com inosina em modelos de inflamação cutânea. Tendo em conta que: (1) a inosina é conhecida por exercer efeitos anti-inflamatórios, (2) é gerada rapidamente no local da inflamação, e (3) pode ser considerada por alguns autores como um ligante natural dos receptores P1 (GOMEZ *et al.*, 2003), houve o interesse de investigar a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa da inosina em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro*.

## 2. JUSTIFICATIVA

Uma imensa quantidade de doenças de pele apresentam em seu desenvolvimento um estágio inflamatório, o qual pode evoluir para uma desregulação crônica das funções fisiológicas da pele, como ocorre, por exemplo, na psoríase, na dermatite, no vitiligo e no pênfigo. As opções de tratamento disponíveis podem estar associadas ao desenvolvimento de efeitos adversos, assim como, com a redução do efeito responsivo ao tratamento convencional, devido principalmente à utilização prolongada destes tratamentos. Com isso, é de grande interesse a investigação de possíveis alternativas para serem aliadas ou substituir os tratamentos convencionais. Neste contexto, a inosina aponta como uma forte opção, por ser uma molécula endógena capaz de exercer efeitos moduladores sobre o sistema imunitário.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade da inosina sobre a proliferação de queratinócitos em modelos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da inosina sobre a viabilidade de queratinócitos humanos (HaCat) *in vitro*;
- Avaliar a ação antiproliferativa da inosina em queratinócitos (HaCat) *in vitro*;
- Verificar o efeito da inosina sobre o ciclo celular de queratinócitos (HaCat) *in vitro*;
- Analisar o possível mecanismo de ação da inosina, através da utilização de antagonistas para os receptores de adenosina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da inosina em modelo animal de inflamação crônica;
- Analisar o efeito do tratamento tópico com inosina sobre a proliferação de queratinócitos, através de modelo animal de inflamação crônica;
- Avaliar o possível mecanismo de ação do tratamento tópico com inosina, através da administração de antagonistas para os receptores purinérgicos;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DROGAS E REAGENTES

2-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA), óleo de cróton, dexametasona, 3-(4,5-dimetylihiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), Vermelho Neutro (todos da Sigma Chemical Co), acetona, formaldeído, paraformaldeído, tampão fosfato salino (PBS), parafina (todos da Biosciences Merck, Alemanha), albumina de soro de bovino (BSA) (Inlab), peróxido de hidrogênio, etanol absoluto, metanol, eosina, glicina, hematoxilina e xileno, paraformaldeído (todos da Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Meio de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) da (Cultilab), *kit* CyQUANT e PIRNase (*Invitrogen Molecular Probes*).

### 4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 4.2.1 Cultivo celular

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/ml de estreptomicina e penicilina (10 U/ml), em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para manutenção das células, o meio foi trocado a cada 48 horas. No momento em que a monocamada celular se tornava confluenta, as células eram lavadas com PBS e incubadas durante 10 min com EDTA 2 mM, em seguida as células eram incubadas com 1 ml de tripsina 0,25% durante 10 min à 37°C. Após o desprendimento do tapete celular, as células eram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB e a suspensão celular obtida era dividida em várias garrafas para subcultivo (GEORGE *et al.*, 2010).

#### **4.2.2 Avaliação da Viabilidade celular pelo ensaio de Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide (MTT)**

Com o intuito de verificar a viabilidade celular, o método de MTT foi utilizado. Este é um método em que o anel tetrazólio do MTT é reduzido a cristais de formazan púrpura, pela ação de redutases mitocondriais de células vivas. A solubilização dos cristais pelo etanol gera uma solução colorimétrica, sendo a intensidade da coloração proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; REILLY *et al.*, 1998).

As células HaCaT foram semeadas em placa de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200  $\mu$ l de meio contendo diferentes concentrações de inosina (1 - 30  $\mu$ M). Após 24 horas de exposição, o meio foi substituído por solução de MTT (0,5 mg/mL), e a placa incubada durante 3 horas a 37 °C. Ao final, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan dissolvidos com o acréscimo de 200  $\mu$ L de etanol. Posteriormente, a absorbância foi verificada em leitor de placas a 570 nm (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808).

#### **4.2.3 Avaliação da Viabilidade celular pelo ensaio de Vermelho Neutro**

O ensaio de vermelho neutro é um método que permite avaliar a presença de células viáveis através do acúmulo de corante em lisossomos. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra na membrana celular e se acumula nos lisossomos, onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (GRIFFON *et al.*, 1995). Após a lise celular, por solução de extração, o corante pode ser quantificado por absorbância, e assim avaliar a capacidade de fagocitose celular (BORENFREUND; PUERNER, 1985; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

As células HaCaT foram semeadas em placa de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 200  $\mu$ l de meio contendo diferentes concentrações de inosina (1 - 30  $\mu$ M). Após 24 h de exposição à purina, o meio foi substituído por solução de Vermelho Neutro (100  $\mu$ g/ml), e incubado por 3h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, o volume da placa foi

retirado, lavado com Solução de Lavagem (CaCl<sub>2</sub>/formaldeído, 1%/0,5%), adicionado 100 µl de Solução de Extração (etanol/ácido acético, 50%/1%), e então realizada a leitura da absorbância a 540 nm (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*).

#### **4.2.4 Protocolo de Proliferação Celular**

Para avaliar a proliferação celular dos queratinócitos (HaCat), as células foram cultivadas à  $3,5 \times 10^3$  células/poço com meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 16 horas do plaqueamento (semeadura), com as células aderidas e estabilizadas na placa de cultura, o meio foi retirado e substituído por meio DMEM sem adição de SFB, 8 horas antes da incubação com substâncias teste. Sendo este período de carência importante para que todas as células entrem na mesma fase do ciclo celular (G<sub>0</sub>). Após esta etapa, as células são tratadas com meio contendo 0,1% e 10% de SFB, os quais possibilitam a análise da proliferação basal e na presença de estímulo que promove o aumento significativo da proliferação, respectivamente. As células foram incubadas com diferentes concentrações de inosina (0,1 - 30 µM) diluídas em meio 10% de SFB, por 48 ou 72 horas, e em seguida foram procedidos os ensaios para avaliar a proliferação celular: MTT, *CyQuant*, PCNA e PI/RNase.

#### **4.2.5 Quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por imunocitoquímica**

A imunomarcção através do método de imunocitoquímica permite quantificar a expressão de PCNA, um marcador celular de atividade proliferativa (MIAYACHI, 1978; EINSPHR, XU *et al.*, 2006). Após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de inosina (1 - 30 µM) as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2%. Em seguida, as células foram incubadas com glicina 0,1M por 3 minutos, lavadas com PBS, incubadas com peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 15 minutos, e novamente lavagem com PBS. Em sequência, as células foram incubadas com PBS + BSA (1%) por uma hora. Após esse período, as células foram incubadas com anticorpo

primário anti-PCNA (1:300) por uma hora, seguido de 5 lavagens com PBS, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:300) por 40 minutos. Após banho com PBS, as células foram incubadas com kit contendo o cromógeno DAB por 1 minuto e meio. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, e coradas com hematoxilina, lavadas e montadas em lâminas para microscopia.

#### **4.2.6 Quantificação de DNA por *CyQuant***

Com o intuito de avaliar a atividade antiproliferativa, as células expostas as diferentes concentrações de inosina (0,1 - 30  $\mu$ M), diluídas em meio contendo 10% de SFB, foram submetidas à processamento para análise do conteúdo de ácidos nucleicos pós 72 horas de incubação. Para isso, o meio foi retirado dos poços, e estes lavados com PBS, posteriormente a placa foi congelada à -70°C para lise celular.

A proliferação celular foi avaliada utilizando o *kit* de ensaio de fluorescência de ácido nucleico *CyQuant* (*Invitrogen*). A base do *kit CyQuant* é o corante verde fluorescente *CyQuant GR*, que exibe forte fluorescência quando ligado a ácidos nucleicos celulares, permitindo mensurar a quantidade de DNA e RNA na amostra. No momento do uso, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e foram adicionados 200 $\mu$ L de tampão de lise celular/corante *CyQuant GR* em cada poço. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. A fluorescência foi mensurada utilizando leitor de placa de fluorescência (480 nm de excitação e 520 de emissão). (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*).

#### **4.2.7 Avaliação do ciclo celular por PI/RNase**

Após 72 horas de expostas as diferentes concentrações de inosina (0,1 - 30  $\mu$ M), diluídas em meio contendo 10% de SFB, as células foram desaderidas das placas, lavadas com PBS e fixadas em álcool 70% a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com a solução PI/RNase (1:1) (*BD Bioscience*) por 10 minutos, em temperatura ambiente. As células foram analisadas através de

citometria de fluxo, e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi avaliada através do programa *Flowing Software 2* (FACS Canto II, BD Biosciences).

### **4.3 ENSAIOS *IN VIVO***

#### **4.3.1 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da variedade *Swiss* (Fêmeas), pesando entre 25 e 30g. Os animais foram usados apenas uma vez em cada teste e os experimentos conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios, considerações e princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Também foram levadas em consideração as diretrizes experimentais subscritas em *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments Guidelines)*, objetivando reduzir variações nos resultados e permitir posteriores replicações dos mesmos (KILKENNY *et al.*, 2010). A aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná esta sob o protocolo de número 531.

#### **4.3.2 Avaliação do edema de orelha**

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura ( $\mu\text{m}$ ) da orelha dos camundongos ( $\Delta$  Espessura da orelha = espessura final – espessura inicial). A espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (MT-045B, Shangai Metal Great Tools Co., Ltd., Shangai, China). A inosina foi diluída e aplicada na orelha direita de cada camundongo (20 $\mu\text{l}$ /orelha). Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador.

### 4.3.3 Modelo de inflamação cutânea crônica induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton

Com o intuito de avaliar o efeito da inosina em um processo inflamatório estabelecido foi utilizado o modelo de inflamação crônica induzida por aplicações múltiplas de óleo de cróton, como descrito por Stanley *et al.* (1991). O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha, em 20ml de acetona) em dias alternados (dias: 1; 3; 5; 7; 9) durante 9 dias. A inosina (0,6 mg/orelha), a dexametasona (0,05 mg/orelha, controle positivo) e o veículo (*Tween* 80, 0,05%), foram dissolvidas em 20 µl de acetona e posteriormente administrados por via tópica durante 5 dias (dias: 5; 6; 7; 8; 9), sendo o tratamento realizado duas vezes ao dia. Sendo o edema avaliado diariamente. No nono dia do protocolo experimental os animais foram eutanasiados e biópsias (6mm) das orelhas foram coletados e submetidas à análise histológica e Imunohistoquímica (STANLEY *et al.*, 1991).

### 4.3.4 Avaliação histológica

Amostras das orelhas (6 mm) foram fixadas em solução ALFAC (85% de etanol 80%, 10% de formaldeído 40% e 5% de ácido acético glacial) por 16h, e então armazenadas em etanol 70%. As biópsias fixadas foram desidratadas em sequência crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e (3x) 100%) por 30 min cada, diafanizadas em etanol 100%/xilol (1:1) e em (3x) xilol 100% (30, 15 e 5 min), e então imersas em parafina a 60°C durante 3 h, e emblocadas. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 µm com o auxílio de um micrótomo (RM2135, *Leica Biosystems*, Alemanha), e esticados em lâminas contendo albumina de Meyer 1,5%. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol, durante 5 min cada, etanol 100% / xilol (1:1) por 5 min, seguido por hidratação sequencial decrescente em etanol ((2x) 100%, 95%, 90%, 80% e 70%) durante 5 min cada, lavadas em água corrente por 10 min e submetidas a dois banhos de dH<sub>2</sub>O. A coloração foi realizada com imersão dos cortes em hematoxilina de Harris durante 2 min, em seguida lavados em água corrente por 10 min, seguido de dois banhos em dH<sub>2</sub>O, e na sequência, imersos em eosina

por 2 min, seguido de dois banhos em dH<sub>2</sub>O. Os cortes foram desidratados em sequencia crescente de etanol (70%, 80% e 90%) por 30 segundos cada, (3x) etanol 100% por 3 min cada, etanol 100% / xilol (1:1) por 5 min e (2x) xilol por 5 min cada. Então as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. A avaliação dos cortes histológicos foi realizada a partir de áreas representativas, utilizando imagens capturadas em microscopia óptica, com aumento de 400x. A quantificação da celularidade e a mensuração da espessura da epiderme foram realizadas através da análise de 5 campos de 3 cortes histológicos distintos por lâmina, e três lâminas por animal, havendo 5 animais por grupo. As fotografias foram analisadas com o auxílio do programa *ImageJ*® versão 1,48 (*National Institutes of Health*, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

#### **4.3.5 Quantificação de PCNA por imunohistoquímica**

Para analisar o efeito antiproliferativo da inosina sobre a epiderme foi realizada a análise de imunohistoquímica para verificar a expressão de marcadores de proliferação celular. Desta forma, para verificar expressão de PCNA, foram utilizadas amostras de orelhas de animais submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas gelatinizadas (gelatina tipo A e cromo alúmem) contendo uma solução de albumina 1%. As lâminas foram reidratadas em uma bateria seriada de concentrações de xilol-álcool hidratado e seguidas de banho de PBS. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina (0,1 M) para o bloqueio dos radicais aldeídos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) em metanol para bloqueio da peroxidase endógena e PBS/BSA (1%) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA (1:100) durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram incubadas, com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase (1:100), durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e desidratadas em uma bateria seriada de álcool hidratado-xilol, seguidas da

montagem com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e fotografadas em aumento de 400x. A avaliação do número de células da epiderme em proliferação foi realizada através da contagem do número de células imunomarcadas para PCNA, utilizando o programa *ImageJ*® versão 1,48 (*National Institutes of Health*, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

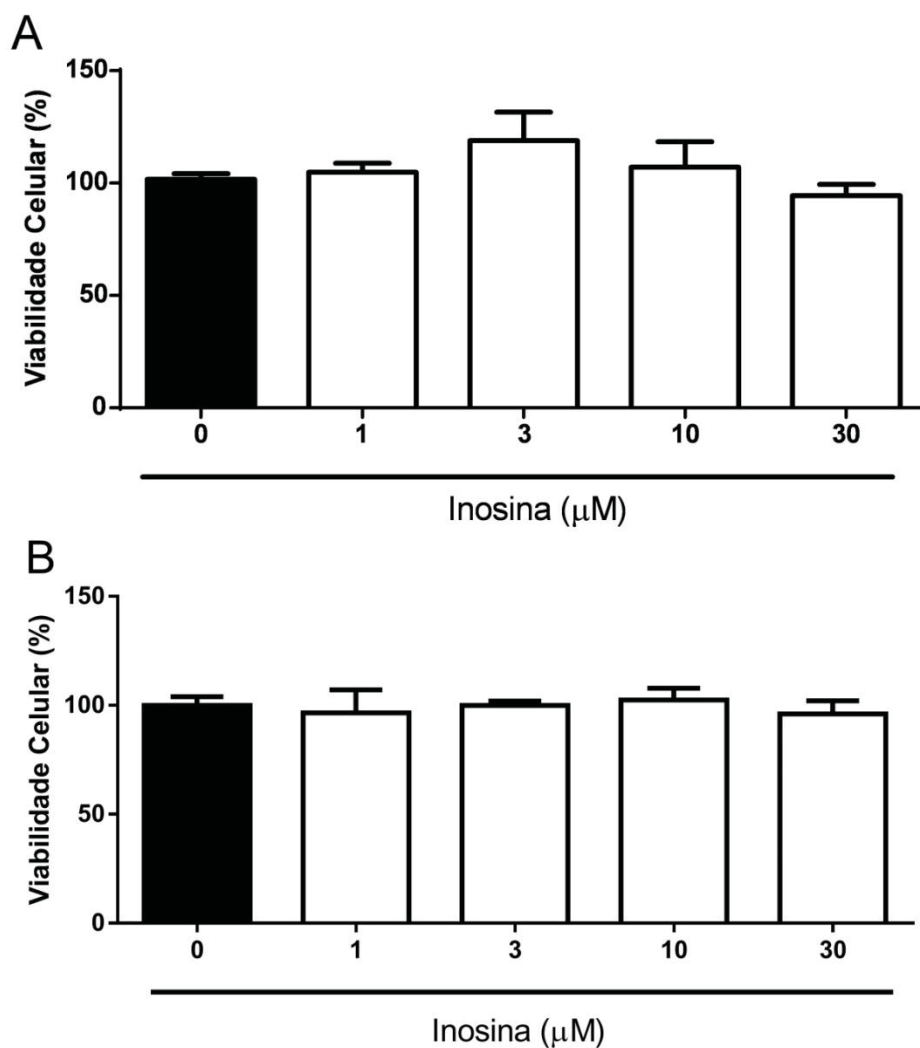
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* ou análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de *Dunnett's*. O nível de significância aceito para os testes foi de  $P < 0,05$ . Todos os testes foram realizados utilizando o *software* estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0c, São Diego, EUA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA INOSINA EM QUERATINÓCITOS

Inicialmente, queratinócitos humanos (HaCat) foram expostos a diferentes concentrações de inosina (1 - 30  $\mu\text{M}$ ), e posteriormente realizada a avaliação da citotoxicidade desse composto, como apresentado na Figura 1.

Os resultados obtidos através dos métodos de MTT e Vermelho Neutro mostraram que nenhuma das concentrações avaliadas de inosina foram capazes de promover alterações estatisticamente significativas na viabilidade dos queratinócitos humanos *in vitro*, após 24h de incubação (Figura 1A e 1B).



**FIGURA 1 – Avaliação do efeito da inosina sobre a viabilidade de queratinócito (HaCaT) *in vitro*.** Queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placa de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço), após 24h as células foram expostas à Inosina (0-30  $\mu\text{M}$ ), e incubados por 24 h. Com o intuito de avaliar a viabilidade celular, as HaCat foram submetidas aos métodos de MTT (A) e Vermelho Neutro (B). Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle (0- células incubadas a apenas meio DMEM, contendo 1% de SFB). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DA INOSINA SOBRE QUERATINÓCITOS *IN VITRO*

Uma vez que, os resultados mostraram que as concentrações de inosina avaliadas não apresentaram atividade citotóxica, os ensaios seguintes tiveram como objetivo investigar a ação deste nucleosídeo sobre a proliferação de queratinócitos humanos *in vitro*. Para isso, os ensaios de MTT e Vermelho Neutro (VN) foram realizados após 48 e 72 horas da exposição à inosina (1 - 30  $\mu\text{M}$ ), em meio acrescido de 10% de SFB, sendo este último utilizado como indutor de proliferação celular (Figura 2).

Os resultados obtidos através do método de MTT mostraram que a incubação com 10% de SFB promoveu aumento da taxa de proliferação dos queratinócitos em  $52,07 \pm 6,33\%$  e  $78,55 \pm 6,50\%$ , após 48h e 72h de incubação, respectivamente, quando comparado ao grupo que apresenta níveis basais de proliferação deste tipo celular ( $47,92 \pm 2,78\%$  e  $31,44 \pm 2,31\%$ , respectivamente) (Figura 2A e C).

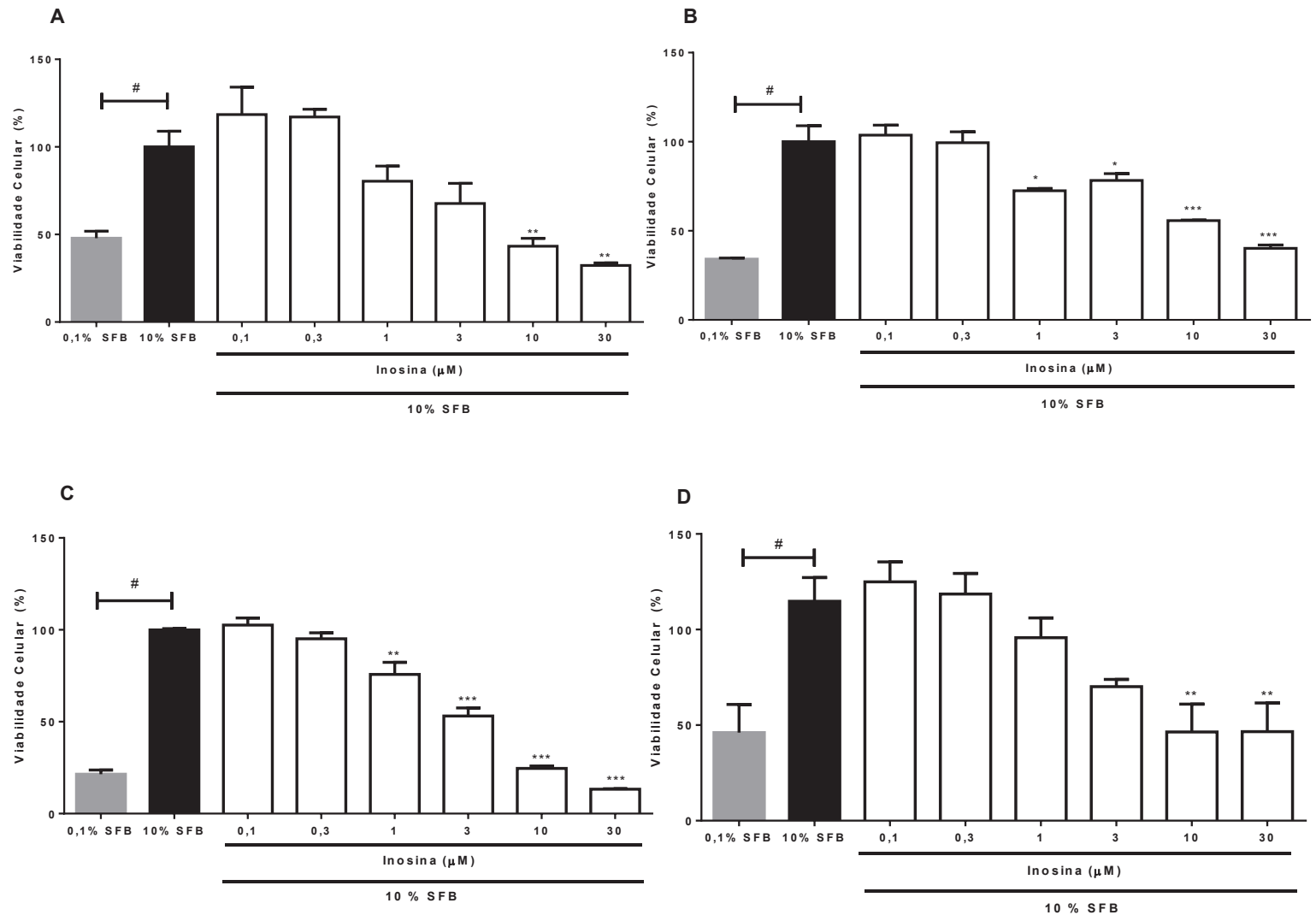
A incubação com as concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$  de inosina foram capazes de reduzir a proliferação celular dos queratinócitos a níveis basais ( $43,27 \pm 3,16\%$  e  $32,29 \pm 1,03\%$ , respectivamente), após 48h de incubação. No entanto, não foram observadas alterações significativas nas demais concentrações analisadas (Figura 2A).

Após 72h de exposição às diferentes concentrações de inosina, foram observadas reduções na proliferação de queratinócitos igual a  $45,69 \pm 6,54\%$  (1  $\mu\text{M}$ ),  $53,13 \pm 4,39\%$  (3  $\mu\text{M}$ ),  $96,86 \pm 1,31\%$  (10  $\mu\text{M}$ ), e a concentração de 30 $\mu\text{M}$  foi capaz de levar a proliferação deste tipo celular a níveis basais ( $13,29 \pm 0,24\%$ ) (Figura 2C).

De maneira semelhante, as análises realizadas a partir do ensaio de VN mostraram que houve aumento de  $65,89 \pm 8,9\%$  e  $68,69 \pm 12,4\%$  na proliferação de queratinócitos incubados com meio contendo 10% de SFB durante 48h e 72h, respectivamente. Sendo ambos os resultados obtidos a partir da comparação com o grupo exposto e incubado a 0,1% de SFB ( $34,11 \pm 0,62\%$  e  $46,11 \pm 1,46\%$ , respectivamente) (Figura 2B e D).

Após 48h de incubação com inosina, este nucleosídeo foi capaz de reduzir a proliferação dos queratinócitos em  $41,75 \pm 3,82\%$  (1  $\mu\text{M}$ ),  $32,97 \pm$

3,82% (3  $\mu$ M),  $67,16 \pm 3,5\%$  (10  $\mu$ M) e  $90,81 \pm 1,87\%$  (30  $\mu$ M), quando comparado ao grupo que contém 0,1% de SFB (Figura 2B). Quando incubado durante 72h, as concentrações de 10  $\mu$ M e 30  $\mu$ M de inosina foram capazes de reduzir a proliferação celular dos queratinócitos a níveis basais ( $46,42 \pm 1,45\%$  e  $46,60 \pm 1,53\%$ , respectivamente), não sendo observadas alterações nas demais concentrações avaliadas (Figura 2D).

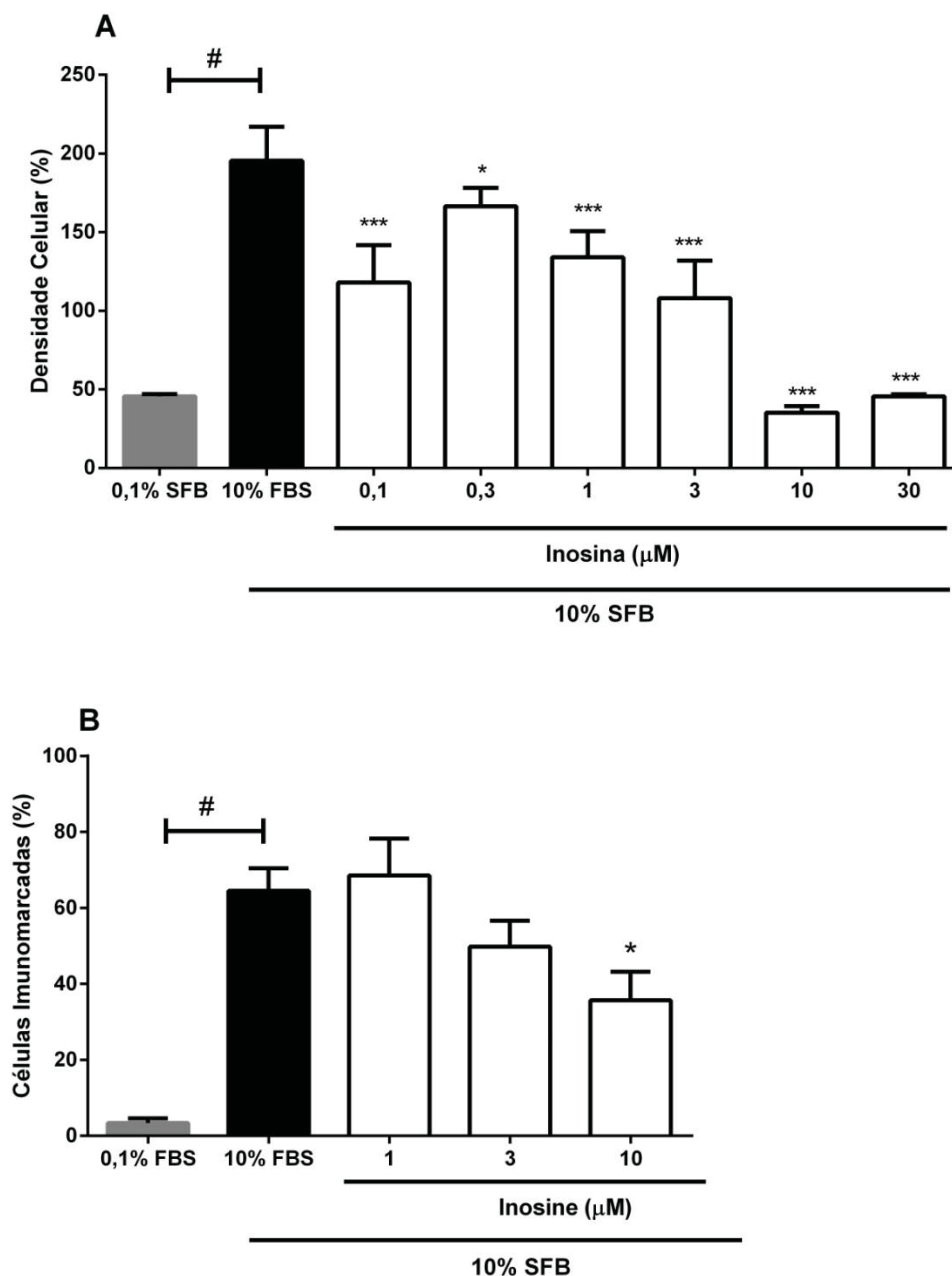


**FIGURA 2 – Avaliação do efeito da purina inosina sobre proliferação de queratinócitos *in vitro*.** Com o intuito de avaliar a proliferação celular, as HaCaT foram cultivadas à  $3,5 \times 10^3$  células/poço com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 16 horas do plaqueamento (semeadura), o meio foi substituído por DMEM sem adição de SFB, por 6 horas. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações de inosina (0-30  $\mu\text{M}$ ), diluídas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, e incubadas por 48 h ou 72 h. Após estes períodos as células viáveis foram quantificadas pelos ensaios de MTT em 48h (A) e 72 horas (C), e através do ensaio de vermelho neutro em 48h (B) e 72 horas (D). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao 10% SFB, \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001. # representa indicativo de diferença estatística entre o grupos 0,1% SFB e 10% SFB.

Objetivando confirmar a atividade antiproliferativa apresentada pela inosina, foram realizadas as quantificações de DNA, através do ensaio de *CyQuant*, e a quantificação da expressão de PCNA por imunomarcação (Figura 3A e B).

Como representado na Figura 3A, a incubação por 72h com 10% de SFB promoveu aumento de  $328,41 \pm 15,36\%$  na proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro*, quando comparado ao grupo exposto a 0,1% de SFB (Figura 3A). As avaliações da densidade celular pelo método de *CyQuant* mostraram que a inosina foi capaz de reduzir, significativamente, a proliferação dos queratinócitos induzida pela incubação com meio de cultura suplementado com 10% de SFB. As quantificações demonstraram reduções iguais a  $51,65 \pm 13,70\%$  (0,1  $\mu\text{M}$ ),  $19,31 \pm 6,78\%$  (0,3  $\mu\text{M}$ ),  $40,98 \pm 9,55\%$  (1  $\mu\text{M}$ ) e  $58,35 \pm 13,82\%$  (3  $\mu\text{M}$ ), quando comparado ao grupo controle (SFB 10%). Sendo que as concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$  reduziram a atividade proliferativa dos queratinócitos a níveis basais (Figura 3A).

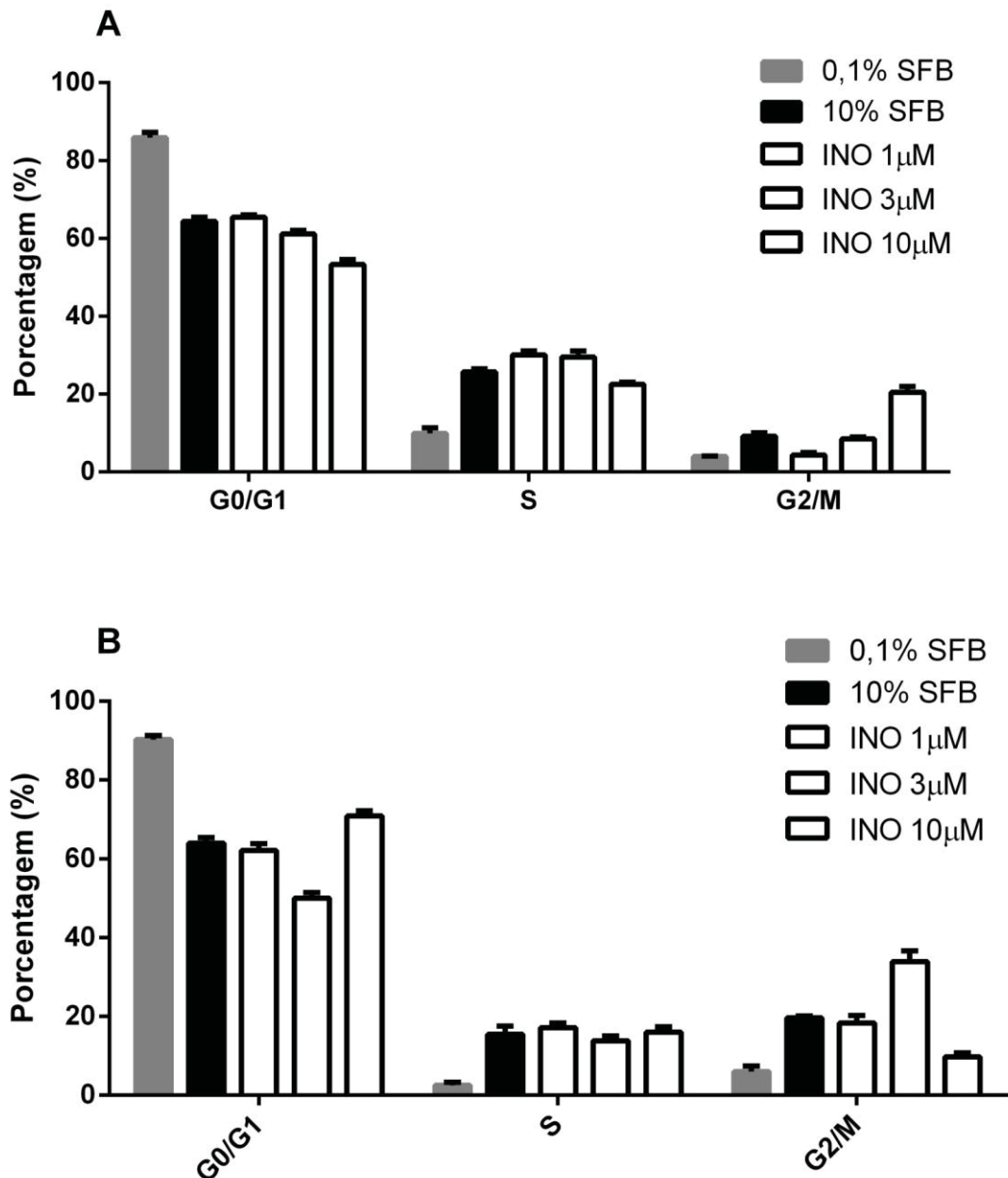
Corroborando com estes resultados, foi observado que a incubação por 24h com 10% de SFB é capaz de aumentar o número de células imunomarcadas para PCNA em  $94,72 \pm 5,89\%$ , quando comparado ao grupo exposto a 0,1% de SFB (Figura 5B). Os resultados mostraram que após 24h de incubação com inosina, houve redução de  $47,23 \pm 7,55\%$  (10  $\mu\text{M}$ ) na taxa de proliferação dos queratinócitos, quando comparado ao grupo controle (SFB 10%) (Figura 3B).



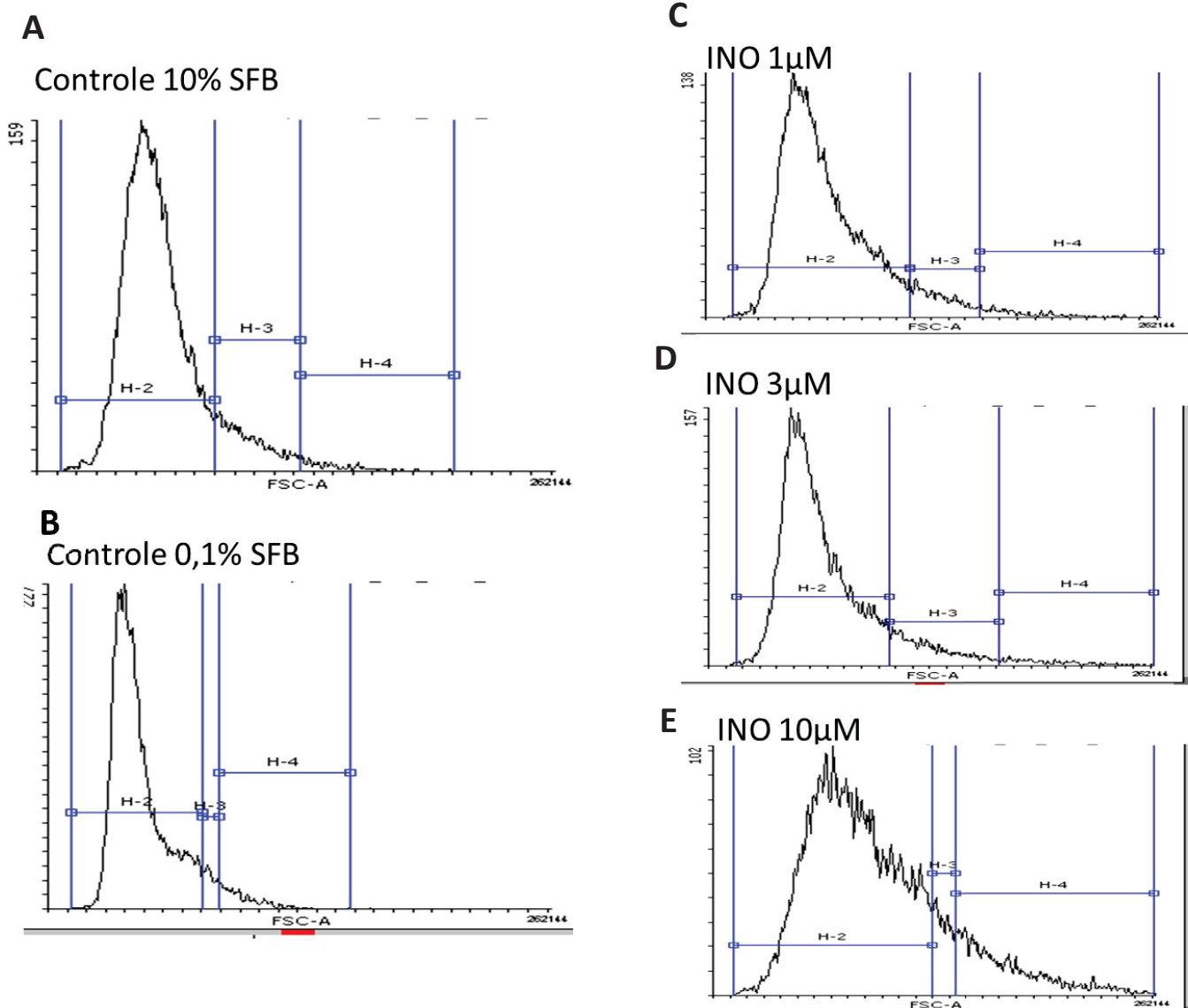
**FIGURA 3 – Análise do efeito de inosina sobre a proliferação celular de queratinócitos humanos *in vitro* através dos métodos de CyQUANT e PCNA.** Objetivando avaliar o efeito da purina inosina sobre a taxa de proliferação de queratinócitos humanos *in vitro*, as células HaCaT foram expostas a diferentes concentrações de inosina (0-30  $\mu\text{M}$ ) em meio contendo 10% de SFB. Após 72h de incubação, densidade celular foi medida através do método de CyQUANT (A). A quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi mensurado por imunocitoquímica, após 24 h de incubação dos queratinócitos com as diferentes concentrações de inosina (B). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao 10% SFB, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ . # representa indicativo de diferença estatística entre o grupos 0,1% SFB e 10% SFB.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INOSINA SOBRE O CICLO CELULAR DE QUERATINÓCITOS

Objetivando avaliar o efeito do tratamento com inosina no ciclo celular dos queratinócitos *in vitro*, foi realizado o ensaio de PI/RNAse (Figura 4). De maneira semelhante às descritas anteriormente, as células tiveram o acréscimo de 10% de SFB no meio de cultura, com o intuito de estimular a proliferação deste tipo celular. Simultaneamente, as células foram incubadas por 48h e 72h com diferentes concentrações de inosina (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4 A e B). Os resultados obtidos mostraram que a inosina não foi capaz de promover alterações significativas no ciclo celular dos queratinócitos em nenhuma das concentrações testadas (Figura 4 e 5).



**FIGURA 4 – Análise do efeito da purina inosina sobre o ciclo celular de queratinócitos humanos *in vitro*.** As células HaCaT foram cultivadas à  $3,5 \times 10^3$  células/poço com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 16 horas do plaqueamento (semeadura), o meio foi substituído por DMEM sem adição de SFB, por 6 horas. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações de inosina (0-30  $\mu$ M), diluídas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, e incubadas por 48h (A) e 72 h (B). Posteriormente, as células foram fixadas e incubadas com PI/RNase (*BD Bioscience*). As células foram analisadas em citômetro de fluxo e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi analisado com auxílio do programa *Flowing Software 2*. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

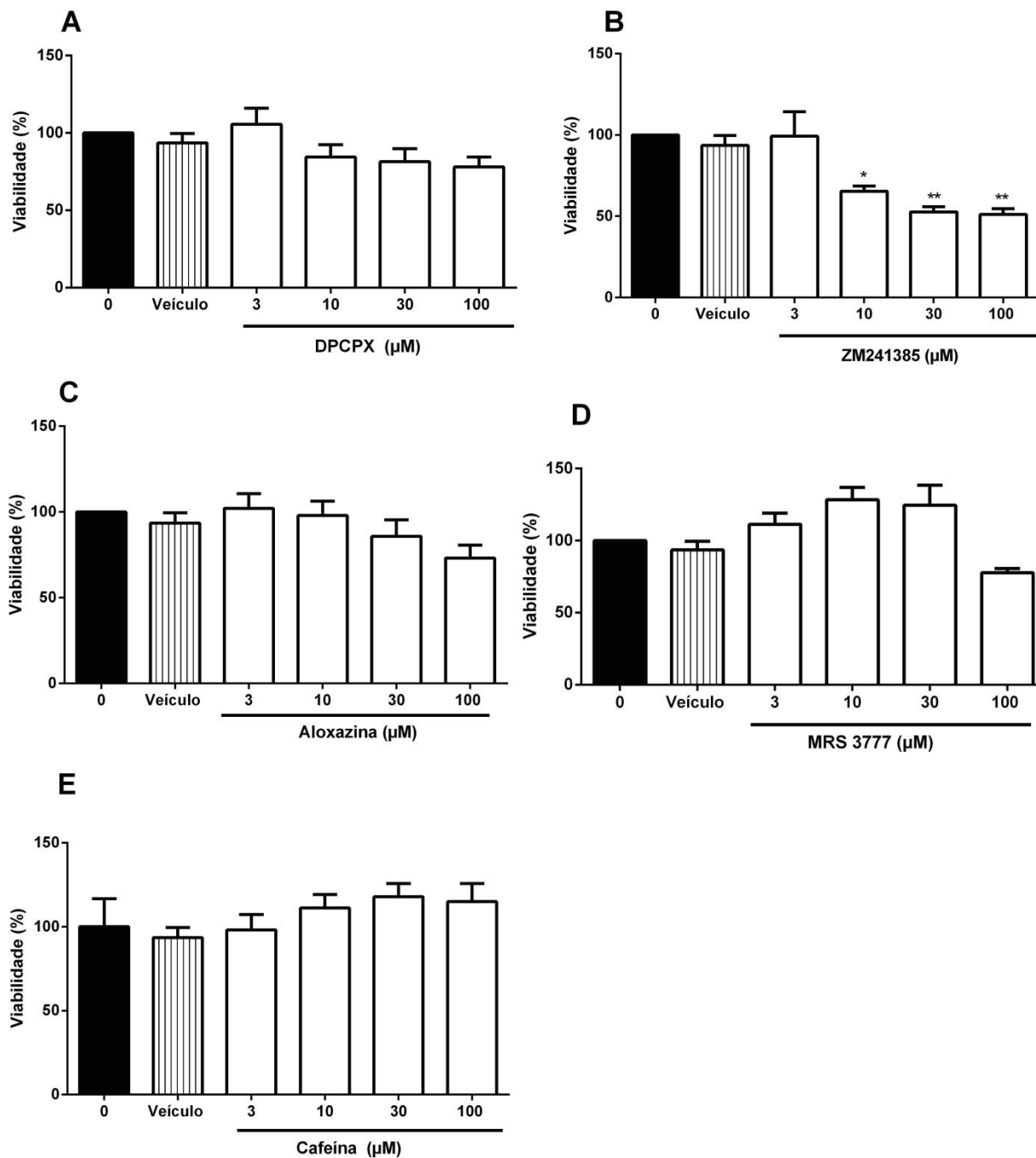


**FIGURA 5 – Representação do ciclo celular no *flowing software 2.5.1*.** As células HaCaT foram cultivadas à  $3,5 \times 10^3$  células/poço com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 16 horas do plaqueamento (semeadura), o meio foi substituído por DMEM sem adição de SFB, por 6 horas. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações de inosina (0-30  $\mu\text{M}$ ), diluídas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, as células foram fixadas e incubadas com PI/RNase (*BD Bioscience*). As células foram analisadas em citômetro de fluxo e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi analisado com auxílio do programa *Flowing Software 2*. Representação gráfica da distribuição do ciclo celular de queratinócitos humanos expostos a (A) 10% de SFB, (B) 0,1% de SFB ou inosina nas concentrações de (C) 1  $\mu\text{M}$ , (D) 3  $\mu\text{M}$  e (E) 10  $\mu\text{M}$ . H-2 corresponde a células em fase G0 do ciclo celular, H-3 células em fase S e H-4 fases G1/G2.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE ADENOSINA EM QUERATINÓCIDOS

Foi realizada a avaliação da viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) expostos a diferentes concentrações dos antagonistas seletivos para os diferentes subtipos de receptores de adenosina: DPCPX (A1), ZM241385 (A2A), Aloxazina (A2B), MRS 3777 (A3) e cafeína (antagonista não específica) (Figura 6).

Os resultados do ensaio de MTT mostraram que, após 24h de incubação, as diferentes concentrações de antagonistas purinérgicos avaliadas, assim como, a cafeína, não promoveram alterações significativas na viabilidade celular de queratinócitos humanos *in vitro* (Figura 6). Exceção foram as concentrações de 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$  do antagonista ZM241385, as quais promoveram reduções de  $35,67 \pm 5,02\%$  (10  $\mu\text{M}$ ),  $48,41 \pm 6,81\%$  (30  $\mu\text{M}$ ),  $49,86 \pm 7,02\%$  (100  $\mu\text{M}$ ) na viabilidade deste tipo celular, quando comparado ao grupo veículo (DMSO 0,2%) (Figura 6B).



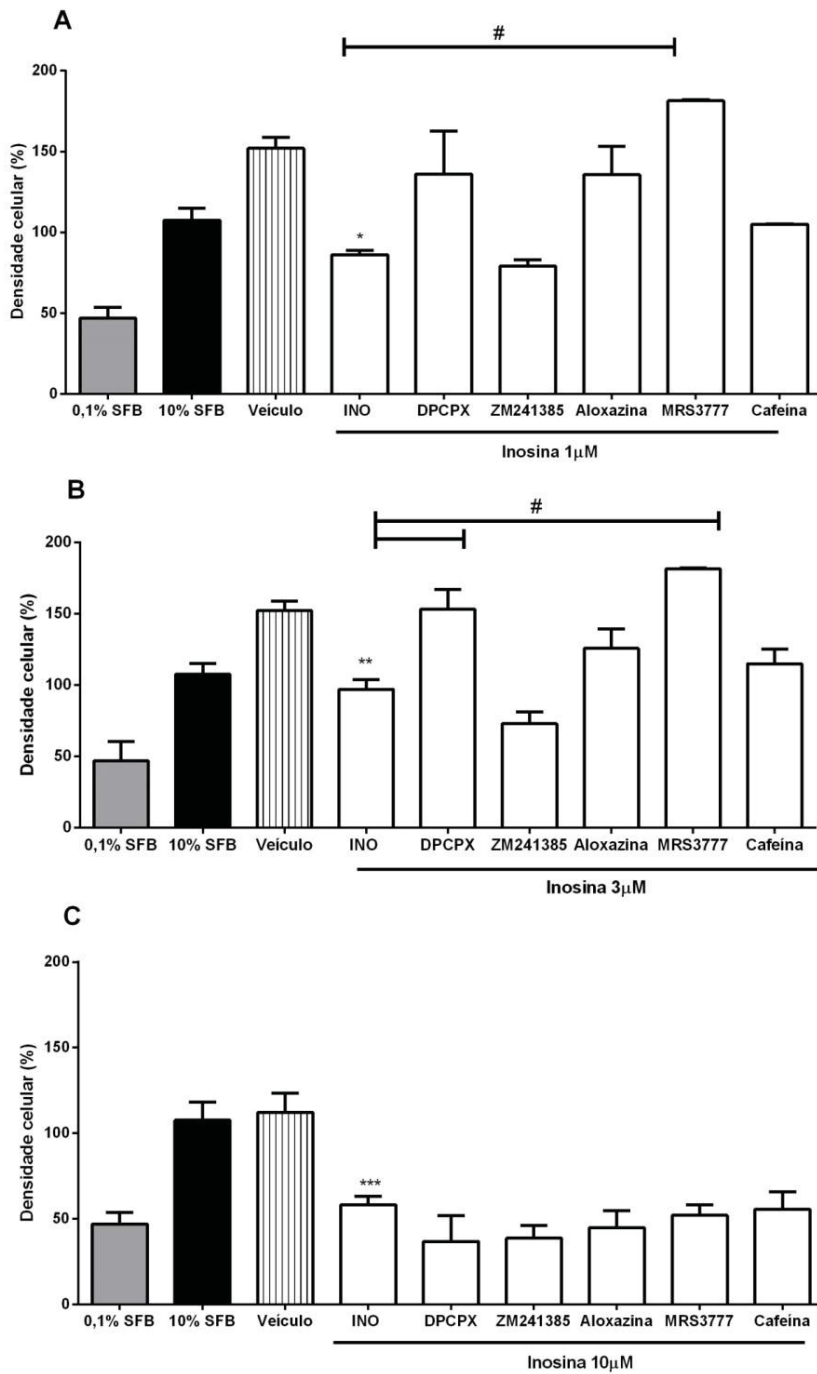
**FIGURA 6 – Avaliação da citotoxicidade de antagonistas purinérgicos sobre queratinócito humanos *in vitro*.** Queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placa de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço), após 24h as células foram expostas a diferentes concentrações (3-100 μM) de (A) DPCPX, (B) ZM241385, (C) Aloxazina, (D) MRS 3777, (E) cafeína ou (DMSO 0,2%). Posteriormente, com o intuito de avaliar a viabilidade celular, as HaCat foram submetidas aos métodos de MTT. Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle (0- células incubadas a apenas meio DMEM, contendo 1% de SFB). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância de \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001.

## 5.5 AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA INOSINA SOBRE QUERATINÓCITOS

Objetivando determinar quais receptores purinérgicos poderiam estar envolvidos na modulação da proliferação de queratinócitos exercida pela inosina, antagonistas seletivos para o receptor purinérgico A1 (DPCPX); A2A (ZM241385); A2B (aloxazina) e A3 (MRS3777), bem como o antagonista não seletivo - cafeína, foram aplicados 30 minutos antes da incubação com meio suplementado com 10% de SFB, e concentrações variáveis de inosina (Figura 9). As concentrações dos antagonistas utilizadas foram: DPCPX (10 $\mu$ M), Aloxazina (10 $\mu$ M), MRS3777(10 $\mu$ M), cafeína (3 $\mu$ M) e ZM241385 (3 $\mu$ M), sendo estas baseadas em avaliações realizadas anteriormente.

Os resultados mostraram que após 72 h de incubação, as diferentes concentrações de inosina (1, 3 e 10  $\mu$ M) foram capazes de reduzir significativamente a proliferação de queratinócitos induzida por SFB a 10%, como visto anteriormente (Figura 7). Sendo estas reduções iguais a 21,58  $\pm$  3,41% (1  $\mu$ M), 26, 74  $\pm$  4,27% (3  $\mu$ M) e 42, 19  $\pm$  9,49% (10  $\mu$ M) (Figura 7).

Além disso, a pré-incubação com os antagonistas MRS3777 e DPCPX revertem o efeito antiproliferativo da inosina (Figura 7). Sendo esta reversão igual a 52,5  $\pm$  0,65% (MRS3777), quando a concentração de inosina foi de 1  $\mu$ M (Figura 9A). Na concentração de 3  $\mu$ M de inosina, a incubação com DPCPX e MRS3777 revertem a atividade antiproliferativa em 36,64  $\pm$  13,77% e 46,55  $\pm$  0,65%, respectivamente (Figura 9B). A pré-incubação com os demais antagonistas seletivos não foram capazes de reverter significativamente o efeito antiproliferativo da inosina (10  $\mu$ M) (Figura 7C).



**FIGURA 7 – Avaliação da participação dos diferentes receptores adenosinérgicos na atividade antiproliferativa da inosina *in vitro*.** Células HaCaT foram pré-incubadas, por 30 min, com diferentes antagonistas purinérgicos: DPCPX (10 μM), ZM241385 (3 μM), alofazina (10 μM), MRS 3777 (10 μM) ou cafeína (10 μM). Posteriormente, as células foram incubadas com concentrações variáveis de inosina (A) 1 μM, (B) 3 μM e (C) 10 μM, em meio DMEN com 10% de SFB. Após 72 h de incubação a proliferação celular foi verificada por ensaio de MTT. As barras verticais representam a média ± EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao grupo 10% de SFB, \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001. # Representa indicativo de diferença estatística entre o grupos.

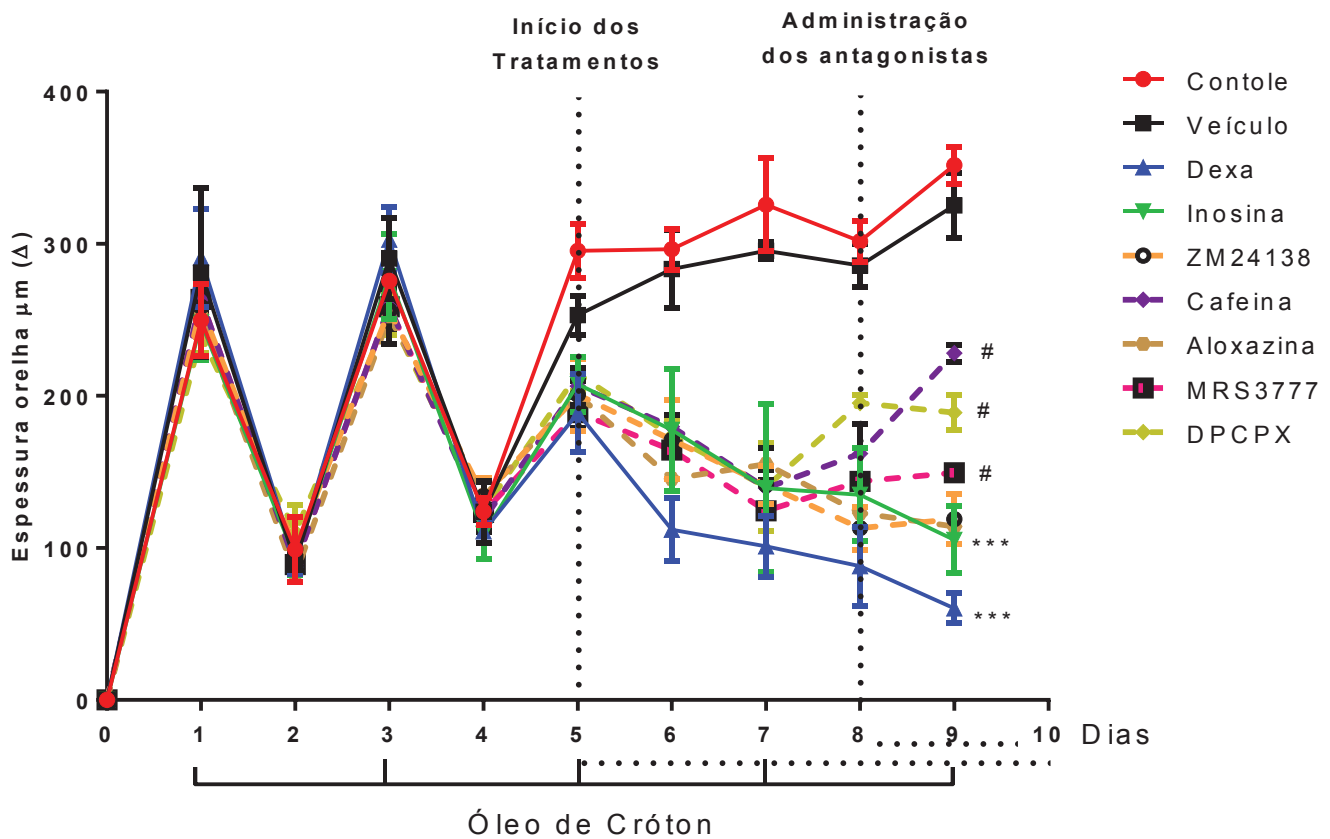
## 5.6 AÇÃO TÓPICA DA INOSINA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDO POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE ÓLEO DE CRÓTON

Como ilustrado na Figura 8, a inflamação crônica de pele induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) promoveu aumento significativo da espessura da orelha dos animais (351,67 $\mu$ m). Assim como, o tratamento com veículo da inosina (*tween* 80, 0,5%) não alterou a formação do edema (Figura 8).

A partir do dia 5 do protocolo experimental, os animais passaram a receber seus respectivos tratamentos. Os resultados mostraram que os grupos que receberam tratamento tópico com inosina (0,6 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha) apresentaram reduções significativas do edema de orelha desde o primeiro dia de tratamento (Figura 9).

A partir de análises realizadas no último dia do protocolo experimental (dia 9), é possível observar que os grupos que receberam múltiplos tratamentos com inosina e dexametasona apresentaram reduções na formação do edema iguais a  $67,6 \pm 7,0\%$  e  $81,45 \pm 5,8\%$ , respectivamente (Figura 8).

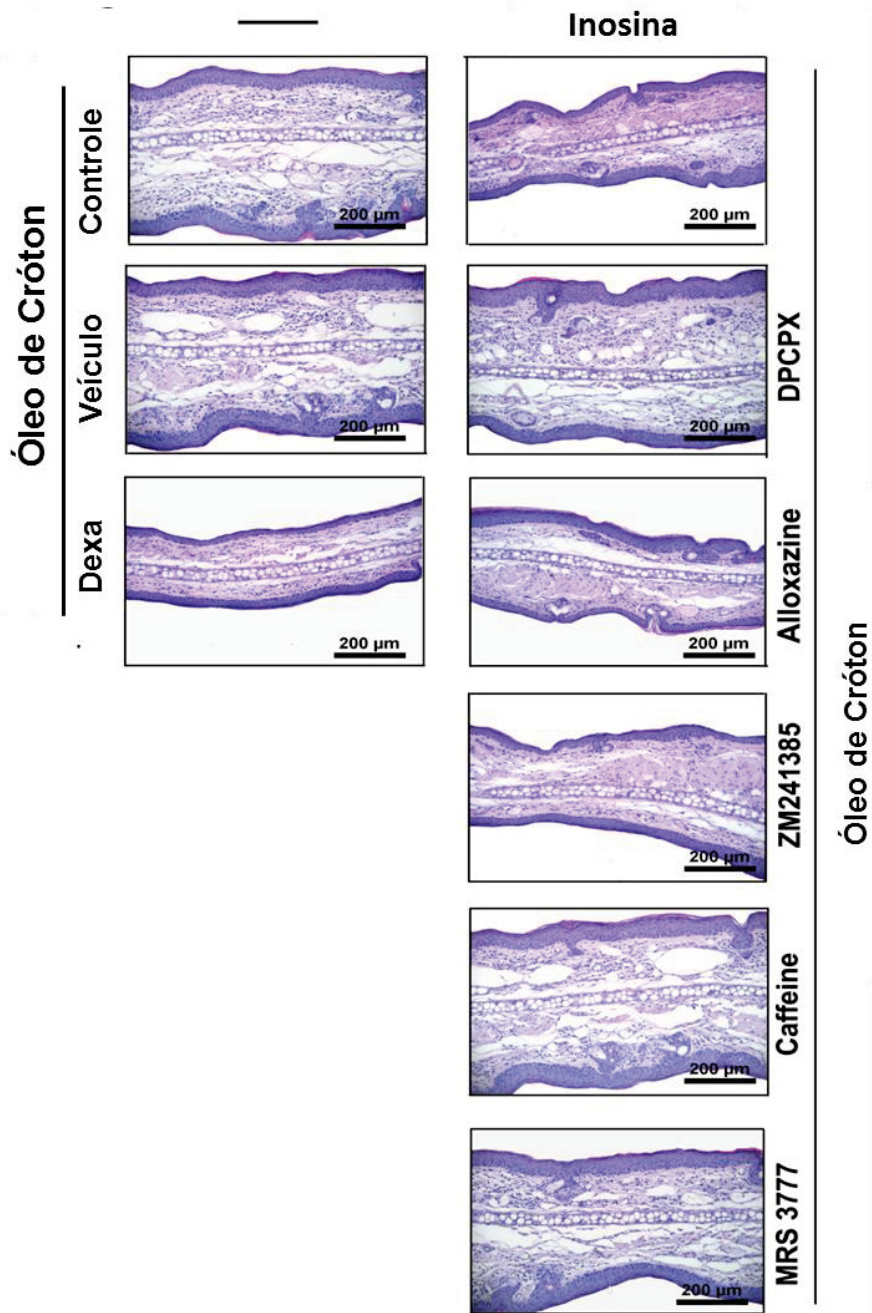
Objetivando determinar quais receptores purinérgicos estariam relacionados com a atividade anti-inflamatória tópica da inosina, foram administrados antagonistas seletivos para os diferentes receptores de adenosina, e cafeína (antagonista não seletivo), nos últimos 2 dias do protocolo experimental (8 e 9 dias), 30 min antes do tratamento com inosina. Os resultados mostraram que os antagonistas seletivos para os receptores A1 (DPCPX) e A3 (MRS3777), bem como a cafeína, foram capazes de reverter significativamente a atividade antiedematogênica da inosina. Sendo esta reversão igual a  $25,71 \pm 1,53\%$ ,  $13,52 \pm 4,9$  e  $37,70 \pm 3,5\%$ , respectivamente (Figura 8).



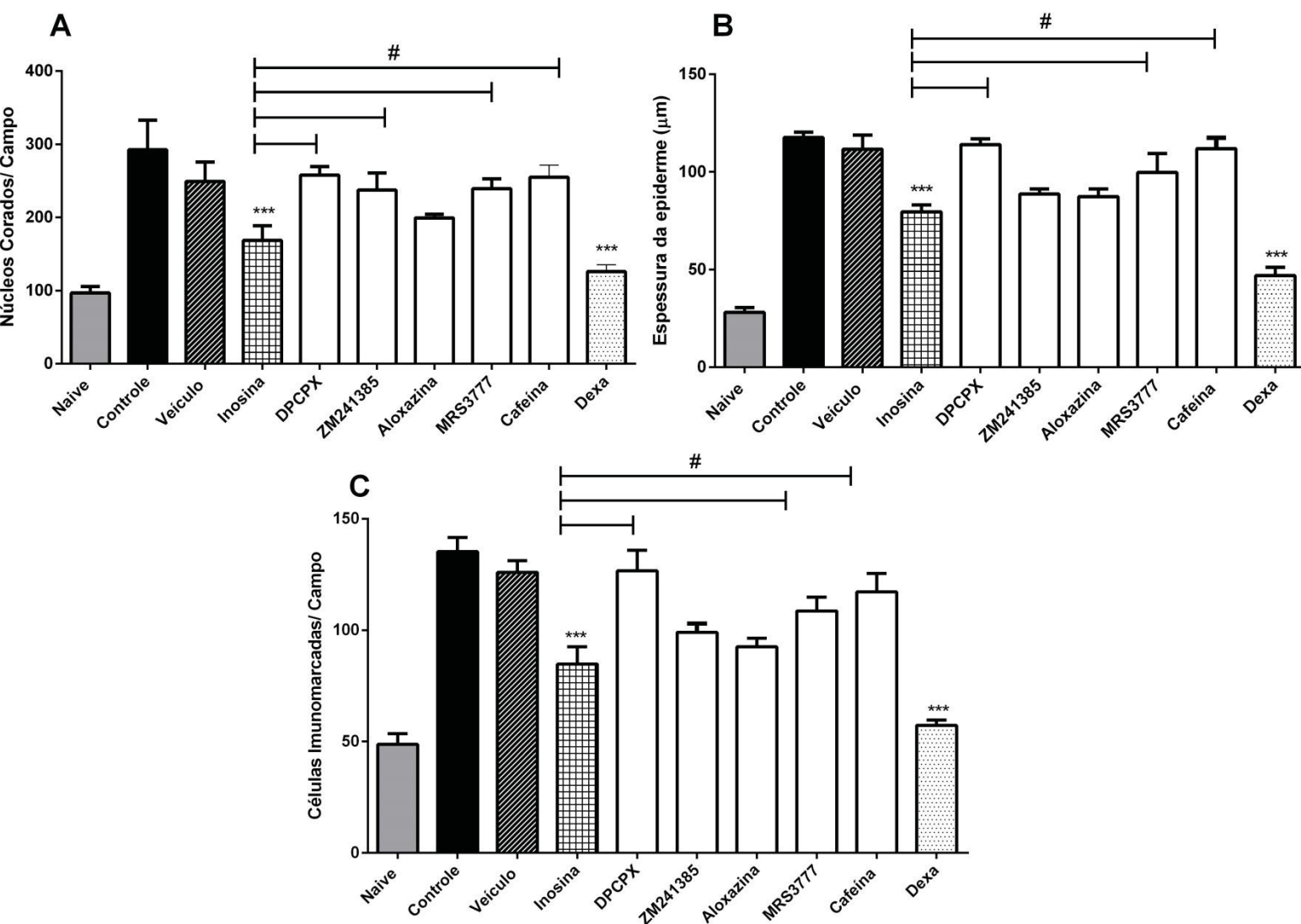
**FIGURA 8 – Avaliação do tratamento tópico com inosina no modelo de inflamação cutânea crônica.** Objetivando avaliar a atividade *in vivo* da purina inosina, camundongos *Swiss* foram submetidos ao modelo de inflamação cutânea crônica induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton. Neste modelo, o agente flogístico é aplicado em dias alternados, durante 9 dias. Os tratamentos com veículo (DMSO 0,5%), inosina (0,6 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha), iniciam-se no quinto dia do protocolo experimental (linha pontilhada), duas vezes ao dia. O edema de orelha foi medido diariamente. Nos últimos dias (dias 8 e 9), 30 minutos antes do óleo de croton e da inosina, foi feito o tratamento (I.P) com antagonistas seletivos de receptores purinérgicos (DPCPX 2,5 mg/kg, ZM241385 1,5 mg/kg, Aloxazina 5,0 mg/kg e MRS3777 5,0 mg/kg), assim como, o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg). Os pontos representam a média das avaliações dos animais de cada grupo (n = 5 – 6 animais) ao longo do protocolo experimental. Os asteriscos (\*\*\*) representam diferenças estatísticas de \*\*\* p < 0,001, quando comparado com o grupo Veículo. #Representa indicativo de diferença estatística entre o grupos que receberam os diferentes antagonistas purinérgicos e o grupo inosina.

Com base nas análises histológicas, é possível observar que o tratamento tópico com inosina foi capaz de reduzir o infiltrado celular em  $52,84 \pm 8,1\%$ , e o tratamento com dexametasona promoveu redução de  $80,81 \pm 5,29\%$  (Figura 9 e 10A). A análise histológica também mostrou que os grupos que receberam antagonistas para os receptores A1 (DPCPX), A2A (ZM241385), A3 (MRS3777) e cafeína apresentaram aumento no infiltrado celular, quando comparado ao grupo inosina, indicando que o pré- tratamento com estes antagonistas reverteu o efeito anti-inflamatório da inosina (Figura 10A). Sendo o aumento deste influxo celular de  $35,84 \pm 1,3\%$ ,  $27,54 \pm 0,66\%$ ,  $28,35 \pm 0,78\%$  e  $34,63 \pm 1,95\%$ , respectivamente. A administração de aloxazina (antagonista de receptor adenosinérgico A2B) não interferiu na atividade da anti-inflamatória da inosina (Figura 9 e 10A).

A análise da espessura da epiderme mostrou que o grupo tratado com inosina apresentou redução deste parâmetro igual a  $38,36 \pm 2,03\%$ , enquanto o grupo tratado com dexametasona exibiu redução de  $77,49 \pm 2,07\%$ , quando comparado aos seus respectivos controles (Figura 9 e 10B).



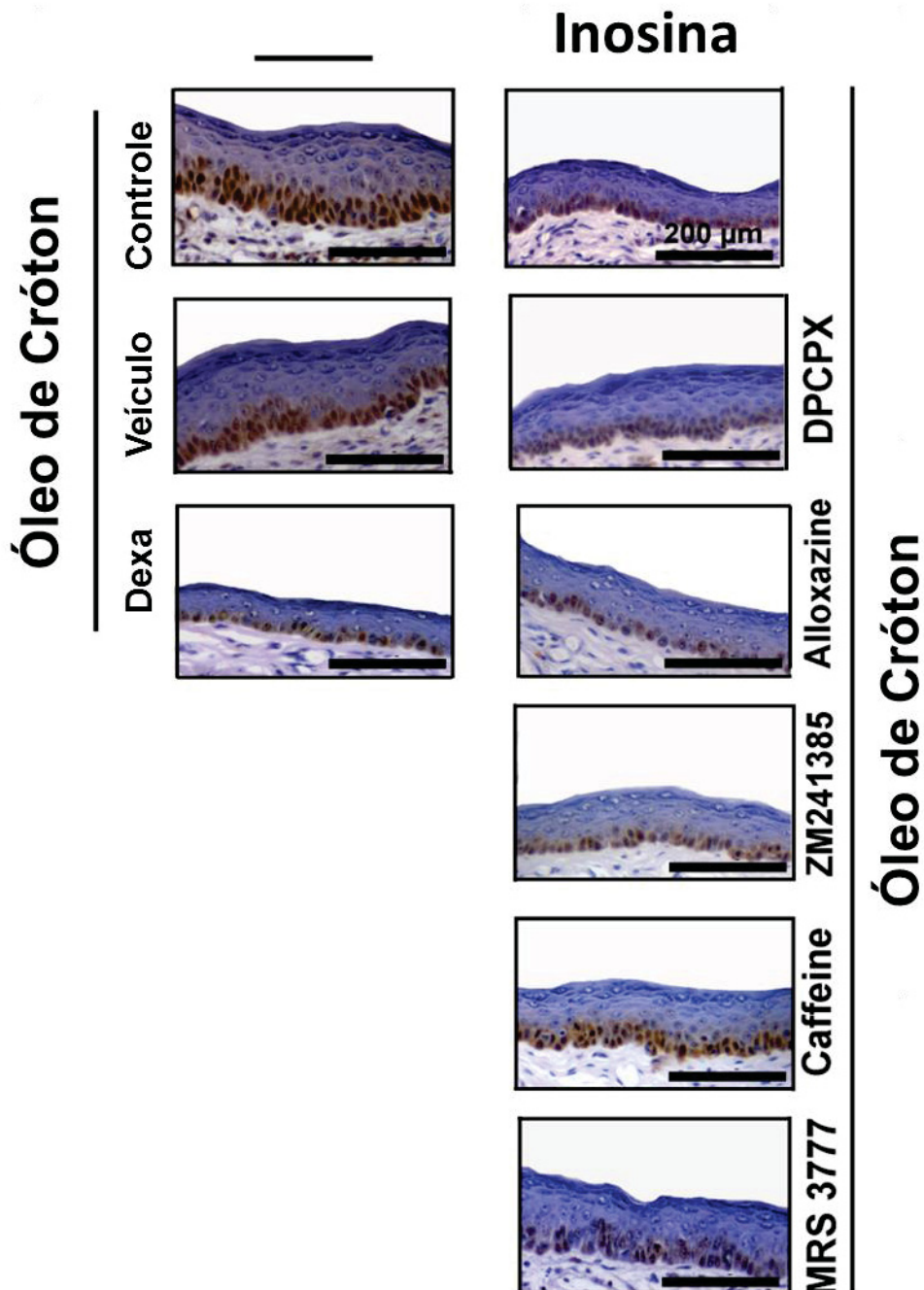
**Figura 9 – Efeito da inosina e dos antagonistas dos receptores para adenosina no modelo de inflamação crônica induzida por múltiplas aplicações de óleo de cróton.** As amostras foram colhidas no nono dia do experimento e processadas de acordo com o procedimento para coloração histológica com hematoxilina e eosina. As colunas contêm imagens representativas da espessura da orelha (aumento 20X/escala 200 µm). As linhas representam os grupos: veículo de controle (óleo de croton: 0,4 mg/orelha), veículo (Tween 80: 0,5%), inosina (0,6 mg/orelha), dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha), antagonistas seletivos de receptores purinérgicos (DPCPX 2,5 mg/kg, ZM241385 1,5 mg/kg, Alloxazina 5,0 mg/kg e MRS3777 5,0 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg).receptores purinérgicos (DPCPX 2,5 mg/kg, ZM241385 1,5 mg/kg, Alloxazina 5,0 mg/kg e MRS3777 5,0 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg).



**FIGURA 10 – Análise dos efeitos da inosina e dos antagonistas de receptores para adenosina sobre as alterações histopatológicas na inflamação de pele induzida por múltiplas aplicações de óleo de croton.** As amostras foram colhidas no nono dia, foram realizadas histologia (hematoxilina-eosina) e PCNA por imuno-histoquímica. As imagens foram retiradas de cortes (aumento 20-40X/escala 100-50 μm) e analisadas. (A) Avaliação do número total de células coradas na derme e Espessura da epiderme avaliada em imagens coradas com HE. (B) Células coradas imunopositivas para análise de PCNA na epiderme, com base em imagens contra-coradas com hematoxilina (C). As barras verticais representam a média ± EPM. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao grupo veículo, \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001. #Representa indicativo de diferença estatística entre o grupos que receberam os diferentes antagonistas purinérgicos e o grupo inosina.

A análise da imunohistoquímica para PCNA demonstrou redução de  $53,39 \pm 3,9\%$  no número de queratinócitos proliferativos na amostra tecidual dos animais tratados com inosina, e  $88,88 \pm 2,4\%$  para o grupo dexametasona, em relação ao veículo (Figura 10C e 11).

A espessura da epiderme e a análise imunohistoquímica PCNA mostraram que o tratamento com antagonistas do receptor A1 (DPCPX) e A3 (MRS3777), bem como a cafeína, reverteram significativamente a atividade antiproliferativa do tratamento com inosina. Assim, o aumento da espessura epidérmica pelos antagonistas foi de  $30,79 \pm 1,7\%$ ,  $18,03 \pm 0,37$  e  $28,90 \pm 0,48$ , respectivamente, quando comparado ao efeito máximo obtido previamente com a inosina. De forma semelhante, observou-se aumento nas células em proliferação (células PCNA positivas) para os antagonistas dos receptores de adenosina iguais a  $33,26 \pm 0,94\%$  (DPCPX),  $18,98 \pm 0,62\%$  (MRS3777) e  $25,79 \pm 0,81$  (cafeína). O tratamento com antagonistas de ZM241385 (antagonista de A2A) e aloxazina (antagonista de A2B) não interferiu com o efeito de inosina na proliferação de queratinócitos na epiderme (Figura 10C e 11).



**FIGURA 11 – Análise do efeito antiproliferativo da inosina através da imunohistoquímica para PCNA.** As imagens foram retiradas de cortes (aumento 20-40X/escala 100-50  $\mu\text{m}$ ) e analisadas. As colunas mostram a imunomarcação epidermica de PCNA (queratinócitos). As linhas representam os grupos: controle ( leo de croton: 0,4 mg/orelha), veículo (Tween 80: 0,5%), inosina (0,6 mg/orelha), dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha), antagonistas selectivos de receptores purinérgicos (DPCPX 2,5 mg/Kg, ZM241385 1,5 mg/kg, Alxazina 5,0 mg/kg e MRS3777 5,0 mg/kg) e o antagonista não seletivo cafeína (1,5 mg/kg).

## 6. DISCUSSÃO

A inosina, um metabólito do sistema purinérgico, é um nucleosídeo endógeno presente tanto no meio intra como no meio extracelular (GARCIA SORIANO *et al.*, 2001).

Sabe-se que estímulos nocivos aos tecidos promovem como resposta uma rápida liberação de adenosina, que tem dois papéis na modulação da homeostase: primeiro, a adenosina extracelular representa uma molécula de “alarme” que reporta lesão do tecido, de maneira autócrina ou parácrina, para tecidos circundantes. Em segundo lugar, a adenosina extracelular tem a capacidade de gerar uma variedade de respostas no tecido que podem ser consideradas, de forma generalizada, protetoras, levando ao reestabelecimento da homeostase (SHAFY *et al.* 2012). A conversão da adenosina para inosina pode ocorrer nos meios intra e extracelular. Intracelularmente, a inosina é formada pela quebra da adenosina devido a ação da enzima adenosina desaminase. No meio extracelular, a ecto-adenosina desaminase é responsável pela biossíntese da inosina a partir da adenosina (SHAFY *et al.* 2012).

A partir da sua formação, a ação da inosina ocorre principalmente através da ativação de receptores purinérgicos do tipo P1, e apesar desses receptores serem denominados genericamente como “receptores de adenosina”, a inosina é considerada um ativador natural desse sistema (MERIGHI *et al.*, 2017). Os receptores P1 são divididos em quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3, todos pertencentes à grande família de receptores associados à proteína G. Estes receptores são capazes de modular a enzima adenilato ciclase, sendo que a ativação dos receptores A1 e A3 é capaz de gerar uma resposta com características inibitórias à atividade enzimática da adenilato ciclase, enquanto que a ativação dos receptores A2A e A2B são estimuladores desta enzima, sendo estas respostas decorrentes das interações com as proteínas Gi e Gs, respectivamente (MERIGHI *et al.*, 2017). Além disso, a ativação dos receptores purinérgicos A2B e A3, receptores acoplados à proteína Gq, podem promover a ativação da enzima fosfolipase C, levando ao aumentando dos níveis intracelulares de cálcio (BOREA *et al.*, 2015).

Sabe-se que através da modulação de proteínas quinases os receptores purinérgico P1 podem exercer importantes efeitos sobre a modulação da proliferação celular em diferentes tipos celulares (BOREA *et al.*, 2016).

Os efeitos da adenosina sobre queratinócitos também têm sido investigados, com achados conflitantes. Segundo informações presentes na literatura, essas moléculas podem apresentar resposta estimuladoras (BRAUN *et al.*, 2006) ou inibitórias (BROWN *et al.*, 2000), sendo essa variação atribuída aos ligantes avaliados (adenosina vs. agonistas sintéticos), bem como as concentrações analisadas (BRAUN *et al.*, 2006.; BROWN *et al.*, 2000).

Recentemente, Andrés e colaboradores (2017) observaram que os receptores A2A e A2B atuam de maneiras diferentes sobre a proliferação de queratinócitos, sendo que o receptor A2B teria a capacidade de inibir o crescimento celular de queratinócitos, enquanto o receptor A2A apresentaria efeito inibitório (ANDRÉS *et al.*, 2017).

Neste contexto, surgiu o interesse de avaliar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos da inosina sobre a pele, através de modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de inosina (1 - 30  $\mu$ M) avaliadas *in vitro* não apresentam atividade citotóxica em queratinócitos humanos (HaCaT) (Figura 1).

A partir do estabelecimento da segurança das concentrações avaliadas, foram realizadas análises da possível atividade antiproliferativa da inosina exógena. Os dados obtidos mostraram que a inosina mostrou ter efeito direto sobre a proliferação de queratinócitos, uma vez que, foi capaz de reduzir de maneira significativa a proliferação deste tipo celular *in vitro* (Figura 2 e 3). Assim, conforme observado através de diferentes métodos de avaliação, nossos resultados sugerem que a inosina tem ação direta sobre queratinócitos, sendo capaz de modular a proliferação deste tipo celular (Figura 2 e 3).

Uma vez que, a inosina possui seus efeitos biológicos associados à ativação de receptores purinérgicos, houve o interesse de verificar como a inosina estaria exercendo seu efeito antiproliferativo nos queratinócitos. Para isso, foram utilizados antagonistas seletivos para os diferentes subtipos de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3). A partir dos resultados obtidos é possível observar que a efeito da inosina envolve a ativação dos receptores A1 e A3 (Figura 7). Esses resultados diferem de informações presentes na literatura,

uma vez que, há estudos que indicam a participação de receptores A2A e A2B na modulação da proliferação celular exercida pela inosina (ANDRÉS *et al.*, 2017).

Como publicado recentemente por Andrés *et al.* (2017), os queratinócitos epidérmicos humanos expressam os receptores de adenosina do subtipo A2B e A2A, embora este último em menor quantidade. Sendo que o uso de agonistas seletivos para os receptores de adenosina são capazes reduzir a proliferação de queratinócitos através da ativação do receptor A2B. Em contraste, a ativação seletiva de receptores A2A induz a proliferação de queratinócitos via ativação da proteína quinase ativada por mitogénio (P38) (ANDRÉS *et al.*, 2017).

Assim, os resultados referentes a modulação da proliferação celular da inosina exógena em cultura de queratinócitos humanos (HaCaT), através dos receptores A1 e A3 podem ser complementares às informações disponíveis na literatura.

Conforme presente na Figura 4 e 5, a avaliação do ciclo celular não detectou efeito significativo da inosina sobre esses eventos celulares. Entretanto, algumas concentrações de inosina mostram tendência em reduzir o número de células na fase S do ciclo celular, e aumentar o número de células na fase G0. Na literatura é possível encontrar trabalhos que demonstram que a adenosina e outros nucleotídeos são capazes de parar o ciclo celular, diminuindo assim a proliferação de queratinócitos em cultura (BROWN *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 1995). Desta forma, a ocorrência de resultados diferentes em nosso estudo pode ser em decorrência das concentrações de inosina avaliadas, que poderiam ser insuficientes para promover o bloqueio total do ciclo celular, ou decorrente de efeitos biológicos distintos exercidos pela inosina e adenosina em queratinócitos.

Na literatura apresenta vários modelos de inflamação em que a inosina exerce efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (BUCKERLEY *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2001; LIAUDET, 2001; LIAUDET *et al.*, 2002; MABLEY *et al.*, 2003; SORIANO *et al.*, 2001) e *ex vivo* (GOLDHABER *et al.*, 1982). Em adição a isso, ela também tem efeitos modulatórios sobre monócitos humanos e neutrófilos *in vitro*, demonstrando ter efeito sobre o sistema imunológico (SORIANO *et al.*, 2001).

Desta forma, agonistas de adenosina sintéticos têm potenciais aplicações terapêuticas baseadas nos seus efeitos anti-inflamatórios (A2A e A3) (COHEN;

DOWNEY, 2008) e propriedades antinociceptivas (A1) (JOHANSSON *et al.*, 2001). Os agonistas do receptor A3, por exemplo, foram propostos para o tratamento de uma vasta gama de estados inflamatórios auto-imunes, tais como artrite reumatóide, doenças inflamatórias do intestino, psoríase, entre outros (GUZMAN *et al.*, 2006; KOLACHALA *et al.*, 2008; MADI *et al.* 2007). Os agonistas A1 são úteis em modelos pré-clínicos de arritmia cardíaca e isquemia e na dor. Os agonistas de adenosina são também de interesse para o tratamento de distúrbios do sono (PORKKA-HEISKANEN *et al.*, 1997). A ativação do A2B protege contra a lesão vascular (YANG *et al.*, 2008).

Em 2012, Lapa e colaboradores (2012) demonstraram a atividade anti-inflamatória da inosina em modelo de pleurisia e asma. Nele foi descrita a redução da migração leucocitária e exsudatos pleurais exercidos pelo tratamento com inosina, por um mecanismo que envolveu a ativação dos receptores purinérgicos A2A, A2B e A3 (DA ROCHA LAPA F *et al.*, 2012). Em 2013, outro estudo do nosso grupo de pesquisa, relatou que a inosina apresenta efeito anti-inflamatório quando aplicada diretamente na pele em modelo animal de inflamação aguda (OLIVEIRA, 2013). Além disso, parte do mecanismo de ação envolvia a inibição de IL-1 $\beta$  e da migração de neutrófilos. Logo em seguida, um estudo conduzido por ARASA e colaboradores (2014) demonstrou que o pré-tratamento com o agonista seletivo do receptor A2A da adenosina (CGS-21680) causou a prevenção da hiperplasia epidérmica e infiltrado de células inflamatórias induzidas pela aplicação tópica de TPA. O tratamento com CGS-21680 também reduziu os níveis de LTB<sub>4</sub>, CXCL-1 e TNF- $\alpha$ , através da supressão da fosforilação de NF $\kappa$ B, destacando um possível efeito modulador de A2A na inflamação da pele (ARASA J, *et al.*, 2014).

As primeiras observações indicaram que o aumento da quantidade de inosina em vários estados inflamatórios é atribuído à diminuição da produção de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-12, a proteína intrínseca principal 1 $\alpha$  MIP-1 $\alpha$ ) e interferon- $\delta$  (IFN- $\delta$ ), mediadores pró-inflamatórios (HASKO *et al.*, 2000). Essas informações embasam o presente estudo, que teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório e antiproliferativo do tratamento tópico com inosina exógena em modelo animal de inflamação cutânea crônica.

Com o intuito de avaliar a ação da inosina sobre a inflamação de pele, o modelo experimental escolhido foi o edema de orelha induzido por 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). O TPA é um éster de forbol e um dos principais constituintes ativos presentes no óleo de cróton, que é uma mistura de lipídios extraídos da espécie vegetal *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), frequentemente utilizado como agente flogístico, uma vez que, é capaz de promover resposta inflamatória bastante intensa, assemelhando-se a algumas doenças cutâneas (GABOR *et al.*, 2000). O TPA quando aplicado topicamente induz uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da espessura da orelha, como resultado do extravasamento celular, cujo pico máximo é em seis horas após a sua administração. Diversas evidências experimentais demonstram que a exposição da pele ao TPA induz uma reação inflamatória forte no tecido, semelhante à várias doenças de pele (VERMA *et al.*, 2006; HVID *et al.*, 2008).

As características da resposta inflamatória induzida pela aplicação do TPA são justificadas pelo seu mecanismo, que estimula a ativação de uma ampla variedade de vias de sinalização intracelular, através da ativação direta da PKC, e em sequência quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que por sua vez ativa a síntese e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; MURAKAWA *et al.*, 2006). Alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, são ativados com a ativação da via da MAPK pela PKC. Esses fatores de transcrição nuclear tem a função de regular a produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (GLASS; OGAWA, 2006; PASCUAL; GLASS, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007). Nos tecidos ocorre aumento dos metabólitos do ácido araquidônico (AA), o que parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após a aplicação de TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006). Os produtos do metabolismo do AA aumentam a permeabilidade vascular, resultando na formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY *et al.*, 2007) e estão associados ao desencadeamento de vias inflamatórias dependentes das enzimas COX e LOX. Além disso, contribuem para o aumento

da permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento plasmático e a formação do edema (IKUTA *et al.*, 2008). Vinte e quatro horas após a aplicação do TPA a infiltração celular atinge seu pico mais elevado (BRADLEY *et al.*, 1982).

Nesse contexto, a administração tópica de TPA é considerada um modelo válido para a identificação de compostos com atividade anti-inflamatória, pois é capaz de estimular parâmetros inflamatórios como a formação de edema e migração celular. As múltiplas aplicações tópicas de TPA em orelha produzem uma reação inflamatória prolongada, caracterizada por aumento no peso da orelha, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia epidérmica. Este modelo de inflamação crônica da pele é mais relevante para a avaliação de compostos anti-inflamatórios do que o modelo agudo de TPA, tendo em vista que compostos em teste normalmente são aplicados depois da lesão inflamatória estar estabelecida, o que reflete o uso de fármacos anti-inflamatórios clínicos. Este modelo pode também ser mais seletivo do que o modelo agudo para compostos que afetam a produção de leucotrienos, uma vez que outros agentes farmacológicos ativos no modelo agudo não são ativos no modelo de múltiplas aplicações (STANLEY *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento tópico com inosina apresenta efeito anti-inflamatório, sendo capaz de reduzir parâmetros inflamatórios em modelo animal de inflamatório crônica (Figura 8). Conforme observado na Figura 8 e 9, a inosina foi capaz de reduzir a formação do edema, a migração de células inflamatórias e a espessura da epiderme, de animais submetidos ao modelo de inflamação cutânea (Figura 8 e 9). Com relação a atividade antiproliferativa, foi observado que o tratamento tópico com inosina foi capaz de reduzir a hiperproliferação de queratinócitos *in vivo* (Figura 10 e 11).

Objetivando avaliar qual o possível mecanismo de ação pelo qual a inosina exerce seus efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos, foram utilizados antagonista seletivos para os receptores purinérgicos. Com base nos resultados, foi possível observar que esses efeitos da inosina *in vivo* podem ser atribuídos à ativação dos receptores A1, A2A e A3 (Figura 10). Sendo que o receptor A2A parece estar relacionado principalmente à capacidade da inosina em reduzir o infiltração celular, enquanto A1 e A3 participam de todos os eventos avaliados: redução da migração celular, hiperproliferação de queratinócitos e formação de

edema (Figura 10). Esta é a primeira vez que estes receptores estão associados com inflamação crônica da pele.

Apesar de muitos estudos demonstrarem que A2A e A2B são os principais receptores expressos em queratinócitos, detectamos farmacologicamente o envolvimento do receptor A2A na migração celular. Estes receptores são todos encontrados em células endoteliais, mas A2A é encontrado principalmente em fibroblastos e neutrófilos, enquanto A2B principalmente em queratinócitos (MABLEI *et al.*, 2012)

Já a ativação dos receptores A1 e A3 estão relacionados com a atividade antiproliferativa da inosina tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Sabe-se que os estes receptores são expressos na pele, contudo o receptor A3 parece ter uma expressão menos significativa (GESSI *et al.*, 2014). Contudo, deve-se levar em consideração que estas avaliação de expressão dos receptores purinérgicos na pele foram realizados em condições homeostáticas, sendo que, a expressão destes receptores pode ser alteradas em condições inflamatórias.

FISHMAN e colaboradores (2012) salientaram que os agonistas A3 possuem um forte efeito anti-inflamatório mediado pela inibição de citocinas pró-inflamatórias, exercendo efeitos anti-inflamatórios em modelos animais experimentais de doença inflamatória intestinal, toxemia sistêmica, inflamação pulmonar, artrite reumatóide, osteoartrite e inflamação hepática. O mecanismo molecular envolvido com a atividade anti-inflamatória implica na desregulação da via de sinalização NF- $\kappa$ B, conduzindo à inibição de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, MIP-1a, MIP-2 e RANKL, resultando em apoptose de células inflamatórias. Curiosamente, o CF101 (agonista do receptor A3) entrou em ensaios clínicos de Fase II/III em doentes com psoríase em placas moderada a grave e o tratamento promoveu melhorias significativas (FISHMAN *et al.*, 2012). Assim, nossos dados corroboram com os relatados, onde o receptor A3 parece estar envolvido diretamente com a atividade anti-inflamatória da inosina no modelo de inflamação crônica na pele, relacionado à migração celular e hiperproliferação da epiderme, além de participar diretamente no efeito antiproliferativo da inosina diretamente nos queratinócitos.

Os efeitos aqui relatados para a inosina poderiam ser não apenas para a ativação dos receptores purínicos, mas também o efeito da elevada

concentração exógena de inosina como sugerido antes por MABLEY *et al.* (2003), PETTENGILL *et al.* (2013), ABD-ELFATTAH *et al.* (2012). Essa via alternativa pode ser adicionada à lista de ações da inosina. Neste caso, a inosina apresenta mecanismos moduladores na restauração de fontes celulares de energia, resultando em efeito protetor celular pela prevenção da hipóxia, apoptose e amplificação da inflamação crônica pela liberação de citocinas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento tópico com inosina foi capaz de reduzir significativamente a infiltração celular no modelo crônico de inflamação cutânea, com participação dos receptores A1, A2A e A3. Do mesmo modo, em modelo de melanoma foi verificado o envolvimento dos mesmos receptores de adenosina na infiltração tumoral de macrófagos (KOSZALKA *et al.*, 2016). A síntese de supressão mediada por inosina de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos, linfócitos e principalmente em neutrófilos *in vitro* é mediada por receptores A2A e a ausência deste receptor bloqueia a infiltração de linfócitos no modelo de encefalomielite auto-imune (EAE) (JUNQUEIRA *et al.*, 2016). Assim, os agonistas dos receptores A2A promovem a inibição da migração celular inflamatória (ARASA *et al.*, 2014; BOROS *et al.*, 2016), enquanto o receptor A3 parece ter um maior papel inibitório na migração de macrófagos e monócitos em comparação com os neutrófilos (BOROS *et al.*, 2016). De modo semelhante, observou-se que um agonista do receptor A1 era capaz de reduzir a síntese de quimiocinas e os infiltrados de leucócitos no modelo de inflamação bacteriana (NAVAK *et al.*, 2008).

Uma vez que os receptores purinérgicos parecem influenciar diretamente as células que compõem a modulação do sistema imunitário, os agonistas para estes receptores estão sendo estudados como tratamentos alternativos. Assim, os receptores A3 são encontrados sub expressos em células inflamatórias e o agonista para este receptor foi desenvolvido como uma alternativa para o tratamento de algumas doenças crônicas como artrite reumatóide e psoríase (BOROS *et al.*, 2016; FISHMAN *et al.*, 2016; MONTINARO *et al.*, 2014). Merighi e colaboradores (2002) deixa clara a relação entre a desregulação dos receptores de adenosina e a psoríase, mas ainda existem poucos estudos relacionados com a aplicação terapêutica de sinalização adenosinérgica na pele, e os efeitos da regulação da adenosina de células epidérmicas não estão bem estudados. ANDREAS *et al.* (2017), demonstrou essa desregulação de

receptores purinérgicos na pele psoriática relacionando os receptores de adenosina na modulação da proliferação de queratinócitos e o desencadeamento da doença com a expressão alterada dos receptores de adenosina na epiderme psoriática.

Dentre as doenças hiperproliferativas da pele, a psoríase é uma das mais incidentes, atingindo de 2 a 3% da população mundial (ALWAN; NESTLE, 2015; GOTTILIEB *et al.* 2005). É uma doença inflamatória crônica de pele, caracterizada por hiperproliferação e diferenciação aberrante de queratinócitos, com o desenvolvimento generalizado de placas eritematosas descamativas (MIYAGAKI *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2006).

O tratamento da psoríase pode ser dividido em três categorias principais de intervenção farmacológica: terapia tópica, fototerapia e farmacoterapia com fármacos imunomoduladores, tais como agentes orais tradicionais (metotrexato, retinóides e ciclosporina) e/ou agentes biológicos (MIYAGAKI *et al.*, 2015). Os tratamentos biológicos demonstraram ser eficazes para psoríase moderada a grave e costumam ser inseridos normalmente após falha dos outros tratamentos sistêmicos. Atualmente, a primeira linha de tratamento sistêmico da psoríase é representada pelo metotrexato, um inibidor da dihidrofolato redutase que bloqueia a síntese de DNA e mitose celular, diminuindo a hiperproliferação e modulando a diferenciação de células. Possui um perfil de segurança bem estabelecido e sabe-se que muitos dos seus efeitos são mediados pela ativação de um receptor de adenosina. O metotrexato induz liberação da adenosina "*in vitro*" e "*in vivo*", tanto em modelos animais de inflamação como em doentes com artrite reumatóide (CRONSTEIN *et al.*, 2010; MERIGHI *et al.*, 2017; MIYAGAKI *et al.*, 2015). No entanto, a busca de agentes moduladores antiproliferativos e de diferenciação mais seguros, eficazes e eficientes, continua sendo uma área de intensa pesquisa (LEE *et al.*, 2006).

Estudos comprovando a eficácia da inosina em outros modelos experimentais são encontrados na literatura, corroborando com os resultados aqui apresentados, que acrescentam de maneira promissora dados da ação da inosina utilizada topicamente.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- A inosina exógena não apresenta atividade citotóxica sobre queratinócitos humanos *in vitro*;
- A inosina possui efeito modulatório sobre a proliferação celular de queratinócitos, uma vez que, foi capaz de reduzir a proliferação de células HaCaT *in vitro*;
- Avaliações, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que os receptores purinérgicos A1 e A3 estão diretamente envolvidos com a modulação da proliferação celular exercida pelo tratamento com inosina;
- A inosina é capaz de reduzir o influxo de células para o tecido inflamado através da ativação dos receptores purinérgicos A1, A2A e A3;

Esse estudo contribuiu para aprofundar os conhecimentos sobre o papel anti-inflamatório tópico da inosina, bem como a participação dos receptores de adenosina em doenças hiperproliferativas da pele. A literatura inclui poucos estudos relacionados com a aplicação terapêutica de sinalização adenosinérgica na pele, e os efeitos da regulação da adenosina e da inosina em células epidérmicas não estão bem estudados (MERIGHI *et al.*, 2002)..

De fato, os resultados aqui demonstrados, no que se refere ao efeito anti-inflamatório da inosina na pele, destacam a sinalização purinérgica de enorme impacto sobre a resposta inflamatória, realçando o envolvimento dos receptores A1, A2A e A3 nos processos inflamatórios cutâneos e, assim, a inosina ou agonistas desses receptores como uma possibilidade para tratamento de distúrbios inflamatórios da pele.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELFATTAH, A. S., DING, M., JESSEN, M. E., & WECHSLER, A. S. (2012). On-pump inhibition of es-ENT1 nucleoside transporter and adenosine deaminase during aortic crossclamping entraps intracellular adenosine and protects against reperfusion injury: role of adenosine A1 receptor. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 144(1), 243-249.
- ALWAN, W., & NESTLE, F. O. (2015). Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clin Exp Rheumatol*, 33(2), 2-6.
- ANDRÉS, R. M., TERCENIO, M. C., ARASA, J., PAYÁ, M., VALCUENDE-CAVERO, F., NAVALÓN, P., & MONTESINOS, M. C. (2017). Adenosine A 2A and A 2B Receptors Differentially Modulate Keratinocyte Proliferation: *Possible Deregulation in Psoriatic Epidermis*. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), 123-131.
- ANTONIOLI L., FORNAI M., COLUCCI R., GHISU N., DA SETTIMO F., NATALE G., KASTSIUCHENKA O., DURANTI E., VIRDIS A., VASSALLE C., LA MOTTA C., MUGNAINI L., BRESCHI M.C., BLANDIZZI C., DEL TACA M. (2007). Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(2), 435-442.
- ARASA J., MARTOS P., TERCENIO M.C., VALCUENDE-CAVERO F., MONTESINOS M.C. (2014) Topical application of the adenosine A2A receptor agonist CGS-21680 prevents phorbol-induced epidermal hyperplasia and inflammation in mice. *Exp Dermatol*, 23(8), 555-560.
- ARRUDA, L., YPIRANGA, S., & MARTINS, G. A. (2004). Tratamento sistêmico da psoríase-Parte II: imunomoduladores biológicos Systemic treatment of psoriasis-Part II: Biologic immunomodulator agents. *An Bras Dermatol*, 79(4), 393-408.
- BAYLIFFE, A. I., BRIGANDI, R. A., WILKINS, H. J., & LEVICK, M. P. (2004). Emerging therapeutic targets in psoriasis. *Current Opinion In Pharmacology*, 4(3), 306-310.

BHAGWAT, S.S.; MANNING, A.M.; HOEKSTRA, M.F.; LEWIS, A. (1999). Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. *Drug Discov Today*, 4(10), 472-79.

BOROS D., THOMPSON J., LARSON D.F. (2016). Adenosine regulation of the immune response initiated by ischemia reperfusion injury. *Perfusion*, 31(2), 103-110.

BRADLEY P.P., PRIEBAT D.A., CHRISTENSEN R.D., ROTHSTEIN G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal Of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.

BRAUN M., LELIEUR K., KIETZMANN M. (2006). Purinergic substances promote murine keratinocyte proliferation and enhance impaired wound healing in mice. *Wound Repair Regen*, 14, 152-161.

BROWN J.R., CORNELL K., COOK P.W. (2000). Adenosine- and adenine-nucleotide mediated inhibition of normal and transformed keratinocyte proliferation is dependent upon dipyridamole-sensitive adenosine transport. *J Invest Dermatol*, 115, 849-859.

BUCKERLEY S., BARSKY K., WEINBERG K., WARBURTON D. (2005). In vivo inosine protects alveolar epithelial type 2 cells against hyperoxia-induced DNA damage through MAP kinase signaling. *American Journal Of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 228, 569-575.

BUCLE, D. R.; HEDGEKOK, C. J. R. (1997). Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discov Today*, 2(8), 235-332.

BURKE J.R., DAVERN L.B., STANLEY P.L., GREGOR K.R., BANVILLE J., REMILLARD R., RUSSELL J.W., BRASSIL P.J., WITMER M.R., JOHNSON G., TREDUP J.;A., TRAMPOSCH K.M. (2001). BMS-229724 is a tight-binding inhibitor of cytosolic phospholipase A2 that acts at the lipid-water interface and possesses anti-inflammatory activity in skin inflammation models. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1), 376-385.

BURNSTOCK G., KNIGHT G.E., GREIG A.V. (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *The Journal Of Investigative Dermatology*, 132(3), 526-546.

CABRINI D.A., MORESCO H.H., IMAZU P., DA SILVA C.D., PIETROVSKI E.F., MENDES D.A., DA SILVEIRA PRUDENTE A., PIZZOLATTI M.G., BRIGHENTE I.M., OTUKI M.F. (2011). Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of averrhoa carambola l. in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

CHO J.S., GUO Y., RAMOS R.I., HEBRONI F., PLAISIER S.B., XUAN C., GRANICK J.L., MATSUSHIMA H., TAKASHIMA A., IWAKURA Y., CHEUNG A.L., CHENG G., LEE D.J., SIMON SI, MILLER LS (2012) Neutrophil-derived IL-1beta is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS pathogens*, 8(11), e100347.

COOK, P. W., ASHTON, N. M., & PITTELKOW, M. R. (1995). Adenosine and adenine nucleotides inhibit the autonomous and epidermal growth factor-mediated proliferation of cultured human keratinocytes. *Journal Of Investigative Dermatology*, 104(6), 976-981.

DA ROCHA LAPA F., DA SILVA M.D., DE ALMEIDA CABRINI D., SANTOS A.R. (2012). Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A2 receptors. *Purinergic signalling*, 8(4), 693-704.

DA ROCHA LAPA F., DE OLIVEIRA A.P., ACCETURI B.G., MARTINS, I.O., DOMINGOS H.V., CABRINI, D.A., LIMA W.T., SANTOS A.R. (2013). Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2a and A3 receptors. *Purinergic Signalling*, (9), 325-336.

DE BENEDETTI F. (1960). Inosine in the therapy of heart diseases. *La Riforma medica*, 74, 827-832.

DIAMANTINO, F., FERREIRA, A. (2011). Perspectiva futura no tratamento da psoríase: novidades em terapêutica biológica. *Acta Médica Portuguesa*, 24, 997-1004.

DISEPIO, D.; CHANDRARANTNA, R.A.S. (1999); Napgal, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. *Therapeutics Focus*, 4(5), 222-231.

DO NASCIMENTO, FP (2008). Atividade antinociceptiva da inosina em camundongos: participação dos receptores A1 e A2a. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

DRURY AN, SZENT-GYORGYI A (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal Of Physiology*, 68(3), 213-237.

EL-HASHIM A.Z., ABDUO H.T., RACHID O.M., LUQMANI Y.A., AL AYADHY B.Y., ALKHALEDI G.M. (2009). Intranasal administration of NECA can induce both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects in BALB/c mice: evidence for A 2A receptor sub-type mediation of NECA-induced anti-inflammatory effects. *Pulm Pharmacol Ther*, 22(3), 243-252.

ELTZSCHIG H.K., FAIGLE M., KNAPP S., KARHAUSEN J., IBLA J., ROSENBERGER P., ODEGARD K.C., LAUSSEN P.C., THOMPSON L.F., COLGAN S.P. (2006). Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood*, 108(5), 1602-1610.

FEELY, M.A.; SMITH, B.L.; WEINBERG, J.M. (2015). Novel psoriasis therapies an patient outcomes, part 3: systemic medication. *Cutis*, 96(1), 47-53.

FISHMAN P., COHEN S. (2016). The A adenosine receptor (AAR): therapeutic target and predictive biological marker in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 35(9), 2359-2362.

FISHMAN, P., BAR-YEHUDA, S., LIANG, B. T., & JACOBSON, K. A. (2012). Pharmacological and therapeutic effects of A 3 adenosine receptor agonists. *Drug Discovery Today*, 17(7), 359-366.

FREDHOLM B.B., AP I.J., JACOBSON K.A., LINDEN J., MULLER C.E. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 1-34.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D. T. (2001). *The Biology of the Skin*. Lancaster: Parthenon.

GÁBOR M. (2003). Models of Acute Inflammation in the Ear. *Methods In Molecular Biology*, 225, 129-137.

GARCIA SORIANO F., LIAUDET L., MARTON A., HASKO G., BATISTA LORIGADOS C., DEITCH E.A., SZABÓ C. (2001). Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care Med*, 29(4), 703-708.

GESSI S., MERIGHI S., BOREA P.A. (2014) Targeting adenosine receptors to prevent inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol*, 23(8), 553-554.

GOMEZ G., SITKOVSKY M.V. (2003) Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood*, 102(13), 4472-4478.

GORDON, K. B.; MCCRMICK, T. S. EVOLUTION OF BIOLOGIC THERAPIES FOR THE TREATMENT OF GOTTLIEB, A. B. (2005) Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*, 4(1), 19-34.

HASKO G., CRONSTEIN B.N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*, 25(1), 33-39.

HASKO G., KUHEL D.G., NEMETH Z.H., MABLEY J.G., STACHLEWITZ R.F., VIRAG L., LOHINAI Z., SOUTHAN G.J., SALZMAN A.L., SZABO C. (2000) Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*, 164(2), 1013-1019.

HASKO G., LINDEN J., CRONSTEIN B., PACHER P. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 759-770.

HASKO G., NEMETH Z.H., VIZI E.S., SALZMAN A.L., SZABO C. (1998). An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol*, 358(3), 261-268.

HASKO G., SITKOVSKY M.V., SZABO C. (2004). Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends In Pharmacological Sciences*, 25(3), 152-157.

HIRAMATSU Y., TAKAHASHI H., IZUMI A. (1971). Effect of inosine on adrenaline and vasopressin induced myocardial hypoxia. *Japanese Journal Of Pharmacology*, 21(3), 355-360.

JACOBSON, K.A. (2009). Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp. Pharmacol*, (193), 1-24.

JACOBSON, K.A.; GAO, Z. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5(3) 247-264.

JEAN J.; LAPOINTE, M.; SOUCY, J.; POULIOT, R (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci.*, 53(1), 19-25.

JUNQUEIRA S.C., DOS SANTOS COELHO I., LIEBERKNECHT V., CUNHA M.P., CALIXTO J.B., RODRIGUES A.L., SANTOS A.R., DUTRA R.C. (2016). Inosine, an endogenous purine nucleoside, suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for a2a adenosine receptor. *Molecular Neurobiology*, 1-15.

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

KOSZALKA P., GOLUNSKA M., URBAN A., STASILOJC G., STANISLAWOWSKI M., MAJEWSKI M., SKLADANOWSKI A.C., BIGDA J. (2016). Specific activation of a3, a2a and a1 adenosine receptors in cd73-knockout mice affects b16f10 melanoma growth, neovascularization, angiogenesis and macrophage infiltration. *PloS one*, 11(3), e0151420.

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

LAW W.R. (2006). Adenosine receptors in the response to sepsis: what do receptor-specific knockouts tell us? *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(4), 957-958.

MABLEY JG, PACHER P, LIAUDET L, SORIANO FG, HASKO G, MARTON A, SZABO C, SALZMAN AL (2003) Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. *American Journal Of Physiology Gastrointestinal And Liver Physiology*, 284 (1), 138-144.

MABLEY JG, PACHER P, MURTHY KG, WILLIAMS W, SOUTHAN GJ, SALZMAN AL, SZABO C (2009) The novel inosine analogue INO-2002 exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. *Shock*, 32(3), 258-262.

MERIGHI S., BOREA P.A., VARANI K., GESSI S. (2017). Deregulation of Adenosine Receptors in Psoriatic Epidermis: An Option for Therapeutic Treatment. *Journal of Investigative Dermatology*, 137, 11-13.

MIYAGAKI T., SUGAYA M. (2015). Recent advances in atopic dermatitis and psoriasis: Genetic background, barrier function, and therapeutic targets. *Journal of Dermatological Science*, 78, 89-94.

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

MONTESINOS M.C., GADANGI P., LONGAKER M., SUNG J., LEVINE J., NILSEN D., REIBMAN J., LI M., JIANG C.K., HIRSCHHORN R., RECHT P.A., OSTAD E., LEVIN R.I., CRONSTEIN B.N. (1997). Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s-linked) receptors. *J Exp Med*, 186(9), 1615-1620

MONTINARO A., IANNONE R., PINTO A., MORELLO S. (2013). Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacological Research*, 76, 34-40.

MUNNS A.R., TOLLIN P. (1970). The crystal and molecular structure of inosine. *Acta crystallographica. Section B: Structural Crystallography And Crystal Chemistry*, 26(8), 1101-1113.

NAKAV S., CHAIMOVITZ C., SUFARO Y., LEWIS E.C., SHAKED G., CZEIGER D., ZLOTNIK M., DOUVDEVANI A. (2008). Anti-inflammatory preconditioning by agonists of adenosine A1 receptor. *PloS one*, 3(5), e2107.

OLIVEIRA B.D. (2013). Avaliação da purina inosina sobre a resposta inflamatória cutânea: a possível participação do receptor P1(A2a). Dissertação.

OLIVER S.J., MATHEW S., WILDER T.F., CRONSTEIN B.N. (2011). Restraint stress fails to modulate cutaneous hypersensitivity responses in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Purinergic Signal*, 7 (1), 47-56.

PEREZ-ASO M., MEDIERO A., CRONSTEIN B.N.(2013). Adenosine A2A receptor (AR) is a fine-tune regulator of the collagen1:collagen3 balance. *Purinergic Signal*, 9(4), 573-83.

PERREIRA M., JIANG J.K., KLUTZ, A.M., GAO, Z.G., SHAINBERG A., LU C., THOMAS C.J., JACOBSON K.A. (2005). Reversine and its 2-substituted adenine derivatives as potent an selective A3 adenosine receptor antagonists. *J Med Chem.*, 48(15), 4910-4918.

PETTENGILL M., ROBSON S., TRESENITER M., MILLAN J.L., USHEVA A., BINGHAM T., BELDERBOS M., BERGELSON I., BURL S., KAMPMANN B., GELINAS L., KOLLMANN T., BONT L., LEVY O. (2013). Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem*, 288(38), 27315-27326.

PICHER M., BURCH L.H., HIRSH A.J., SPYCHALA J., BOUCHER R.C. (2003). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(15), 13468-13479.

PRADHAN, M., SINGH, D., SINGH, M. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis: current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release*, 170, 380-395.

RAHIMIAN R., FAKHFOURI G., DANESHMAND A., MOHAMMADI H., BAHREMAND A., RASOULI M.R., MOUSAVIZADEH K., DEHPOUR A.R. (2010) Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol*, 649(1-3), 376-381.

RING S., ENK A.H., MAHNKE K. (2011). Regulatory T cells from IL-10-deficient mice fail to suppress contact hypersensitivity reactions due to lack of adenosine production. *The Journal Of Investigative Dermatology*, 131(7), 1494-1502.

RING S., OLIVER S.J., CRONSTEIN B.N., ENK A.H., MAHNKE K. (2009) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 123(6), 1287-1296.

ROBSON S.C., WU Y., SUN X., KNOSALLA C., DWYER K., ENJYOJI K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost*, 31(2), 217-233.

SHAFY A., MOLINIE V., CORTES-MORICHETTI M., HUPERTAN V., LILA N., CHACHQUES J.C. (2012). Comparison of the effects of adenosine, inosine, and their combination as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction. *ISRN cardiology*, 2012, 326809.

SHAFY A., MOLINIE V., CORTES-MORICHETTI M., HUPERTAN V., LILA N., CHACHQUES J.C. (2012). Comparison of the effects of adenosine, inosine, and their combination as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction. *ISRN cardiology*, 2012, 326809.

STANLEY P.L., STEINER S., HAVENS M., TRAMPOSCH K.M. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin. Pharmacology Society*, 4(4), 262-271

STEFANIA, M., BOREA, P. A., VARANI, K., & GESSI, S. (2017). Deregulation of adenosine receptors in psoriatic epidermis: an option for therapeutic treatment. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), 11-13.

SUN L.L., XU L.L., NIELSEN T.B., RHEE P., BURRIS D. (1999). Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth. *The Journal of surgical research*, 87(1), 14-24.

SWINDEL W., JOHNSTON A., CARBAJAL S. (2011). Genome-Wide Expression Profiling of Five Mouse Models Identifies Similarities and Differences with Human Psoriasis. *Plos One*, 6(4), 18266.

SWINGLE K.F., REITER M.J., SCHWARTZMILLER D.H. (1981). Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their

modification by topically applied drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 254(1), 168-176.

SZABO C, SCOTT GS, VIRAG L, EGNACZYK G, SALZMAN AL, SHANLEY TP, ET AL. (1998). Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *British Journal Of Pharmacology*, 125(2), 379-387.

TONEL G., CONRAD C. (2009) Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(5), 963-8.

TRAGNI E., TUBARO A., MELIS S., GALLI C.L. (1985). Evidence from two classic irritation tests for an anti-inflammatory action of a natural extract, Echinacina B. *Food Chem Toxicol*, 23(2), 317-319

VALLS M.D., CRONSTEIN B.N., MONTESINOS M.C. (2009) Adenosine receptor agonists for promotion of dermal wound healing. *Biochemical Pharmacology* 77 (7), 1117-1124.

VECCHIA B.D., DA SILVA M.D., CABRINI A. D., SANTOS A.R. (2012). Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A(2) receptors. *Purinergic signaling*, 8(4), 693-704.

WELIHINDA, A. A., KAUR, M., GREENE, K., ZHAI, Y., & AMENTO, E. P. (2016). The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A 2A receptor with a unique signaling bias. *Cellular Signalling*, 28(6), 552-560.