

CINIRA SANTANA SOLEDADE

**O EFEITO DO DMA (COMPOSTO QUINAZOLÍNICO)
SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

CINIRA SANTANA SOLEDADE

**O EFEITO DO DMA (COMPOSTO QUINAZOLÍNICO)
SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So43e Soledade, Cinira Santana
O efeito do DMA (composto quinazolínico) sobre o processo
inflamatório. / Cinira Santana Soledade. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Lílían Tereza Lavras Costallat; Kleber Gomes
Franchini

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Adenosina. 2. Inflamação. 3. Quinazolininas. I. Costallat,
Lilian Tereza Lavras. II. Franchini, Kleber Gomes. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês : Effects of DMA (Quinazoline Compound) on
inflammatory process**

Keywords: . **Adenosine**
. **Inflammation**
. **Quinazolines**

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação:Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora: Profª. Drª. Lílían Tereza Lavras Costallat

Profº. Drº. Manoel Barros Bertolo

Profº. Drº. Edson Antunes

Profº. Drº. Eduardo Ferreira Borba

Profº. Drº. Paulo Louzada Junior

Data da defesa: 26-08-2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Cinira Santana Soledade

Orientador: Profª Drª Lilian Tereza Lavras Costallat

Membros:

1. Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

2. Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

3. Prof. Dr. Manoel Barros Bertolo

4. Prof. Dr. Edson Antunes

5. Profª Drª Lilian Tereza Lavras Costallat

Handwritten signatures of the five members of the examination board, corresponding to the list on the left. The signatures are written in black ink on a white background. The first signature is for Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto, the second for Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior, the third for Prof. Dr. Manoel Barros Bertolo, the fourth for Prof. Dr. Edson Antunes, and the fifth for Profª Drª Lilian Tereza Lavras Costallat.

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/2008

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, minha fortaleza.
Ao Renato pela paciência, carinho e companheirismo
desde o começo deste trabalho e ao Gabriel,
nosso filho, também envolvido “desde o começo”.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Lilian Costallat pela orientação, alegria, atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Kleber Franchini pela oportunidade de formular perguntas, trabalhar e aprender no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Heraldo Sousa pelas opiniões e discussões durante o início da elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pelas sugestões e pelo “empurrão final” em direção à defesa.

Ao Prof. Dr. Francisco Soriano pela colaboração na dosagem de citocinas.

Ao Prof. Dr. Antônio Lapa por disponibilizar seu laboratório para execução de experimentos.

À Prof^a. Dra. Salete Castro por ter me orientado e ensinado sobre experimentos em edema e dor; mas também pela paciência e carinho.

À Dra. Soraia Costa e ao Eduardo Valentin por nos ensinar o modelo de artrite crônica

À Daniela Crosara por ter me ensinado o primeiro modelo animal realizado e me introduzido ao admirável mundo novo dos camundongos.

À Silvana Rocco e Rodrigo Marin pelos dados sobre o composto DMA e pela amizade.

À Carla Maria e Carol Guido pela ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao Michel Oliveira pela indispensável colaboração na realização de experimentos para este trabalho.

Aos colegas Jackeline e Antônio por todo auxílio e boa vontade.

A todos os colegas e amigos do laboratório sempre dispostos a ajudar quando possível.

Às minhas amigas Daniela e Mônica pelo apoio a qualquer distância.

	PÁG.
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- O composto quinazolínico estudado (DMA).....	21
1.2- O processo inflamatório.....	24
1.3- O papel do NFκ-B no processo inflamatório.....	25
1.4- Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).....	25
1.5- O papel dos “Toll-like receptors” (TLRs) no processo inflamatório.....	27
1.5.1- Adenosina.....	29
1.5.2- Receptores de adenosina.....	30
1.5.3- Adenosina e sinalização intracelular.....	33
1.5.4- Efeitos antiinflamatórios da adenosina-Potencial ação na terapêutica.....	35
2- OBJETIVOS.....	38
2.1- Objetivo geral.....	39
2.2- Objetivos específicos.....	39
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1- Compostos quinazolínicos.....	41
3.2- Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	41
3.3- Cultura de células.....	41
3.4- Animais de experimentação.....	42
3.5- Descrição dos modelos experimentais de inflamação em animais.....	43

3.6- Descrição dos processos analíticos.....	45
3.7- Protocolos experimentais em modelos animais.....	49
3.8- Protocolos experimentais em cultura de células.....	52
3.9- Análise estatística.....	54
4- RESULTADOS.....	55
5- DISCUSSÃO.....	69
6- CONCLUSÃO.....	81
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

5-IT	5-Iodotubercidina
8-SPT	“8-Sulpho-phenil-theophilina”
ABCA1	“ATP Binding Casser A1”
ADA	Adenosina deaminase
ADO	Adenosina
ADK	Adenosina quinase
ADP	Adenosina di-fosfato
AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
AMP	Adenosina mono-fosfato
AP-1	“Activator protein 1”
ATP	Adenosina tri-fosfato
AUC	“Area under curve”
CD73	Ecto 5'-nucleotidase
CpG DNA	“Bacterial DNA containing unmethylated CpG dinucleotides”
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme linked immuno sorbent assay”
EMSA	“Electrophoretic mobility shift assay”
EN	Extrato nuclear
EGFR	“Epidermic Growth Factor Receptor”
GLUT4	“Glucose transporter-4”
HEPES	Ácido(hidroxi-piperazina)etanosulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta Eficiência
HSP	“Heat shock protein”

ICAM-1	Intercelular adesion molecule 1
IL	Interleucina
IKK	“IkB kinase complex”
IkB	“Inhibitor of NFκ-B
LPL	“Lipoprotein lipase”
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL	“MyD88 adapter like”
MCP-1	“Monocyte chemotactic protein-1”
MIP-2	“Macrophage-inflammatory protein-2”
MHC II	“Major histocompatibility complex”
MMP-9	Metalloproteinase de matriz-9
MSR1	“Macrophage scaravenger receptor 1”
MTX	“Methotrexate”
MyD88	“Myeloid differentiation primary response gene 88”
NADPH	“Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P”
NFAT	“Nuclear factor of activated T cells”
NF-κB	“Nuclear factor κB”
NIK	“NF-κB inducing kinase”
NO	“Nitric oxid”
PAF	“Platelets activator factor”
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	“Polimerase Chain Reaction”
PMSF	Fenil-metilsulfonilfluoreto
PKA	“Protein Kinase A”
PMA	“Alpha Phorbol Myristate Acetate”
PMN	Polimorfonucleares

PPAR	“Peroxisome Proliferator-activated Receptors”
PPRE	“PPAR-responsive element”
PRRs	“Patern Recognition Receptors”
TAD	“Transcription Activation Dominium”
TAK1	“TGF- activated kinase 1”
TLR	“Toll Like Receptors”
TNF- α	“Tumor Necrosis Factor alpha”
TRAF	“TNF Receptor Associated Factor”
TRAM	“TRIF Related Adapter Molecule”
TRIF	“TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β ”
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano
TZD	Thiazolidionas
RNA	Ácido ribonucleico
RIP	“Receptor Interacting Protein”
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SF	Sonda Fria
SL	Sonda Livre
STATS	“Signal Transducers and Activators of Transcription”
SR-B1	“Scaravenger Receptor B1”
VCAM1	“Vascular cell adhesion molecule-1”
VEGF	“Vascular endothelial growth factor”
TF	“Tissue factor”

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Peritonite asséptica (Relação tempo-resposta e dose-resposta).....	57
Figura 2- Efeito da 8-SPT sobre a ação do DMA.....	58
Figura 3- Dosagem de citocinas no líquido peritoneal.....	59
Figura 4- Dor e edema.....	61
Figura 5- Artrite aguda.....	63
Figura 6- Ação do DMA sobre a translocação de NFκ-B.....	64
Figura 7- Ação do DMA sobre TLR4.....	66
Figura 8- Ação do DMA e adenosina sobre a ativação de PPAR.....	68

LISTA DE ESQUEMAS

	PÁG.
Esquema 1- Apresentação do composto DMA.....	23
Esquema 2- Adenosina: metabolismo e ação.....	32
Esquema 3- Regulação esquemática do NF- κ B pela adenosina.....	34
Esquema 4- Mecanismo proposto de ação do DMA.....	80

RESUMO

A inflamação é apontada como o principal processo mediador das diversas doenças do tecido conjuntivo e um componente importante da fisiopatologia das doenças infecciosas. Mais recentemente também tem lhe sido atribuído papel de destaque na obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, em especial a aterosclerose. Dentre os vários mediadores envolvidos no processo inflamatório, a adenosina tem sido apontada como um potente mediador endógeno. A adenosina é um autacóide, cuja ação se dá pela interação com quatro receptores de superfície celular (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), sendo a sua concentração modulada pelo equilíbrio entre os processos de síntese (5- nucleotidases), fosforilação (adenosina quinase), e deaminação (adenosina deaminase). A adenosina sabidamente age em múltiplos aspectos do processo inflamatório, como: apoptose, migração de leucócitos, liberação de mediadores (citocinas, quimiocinas) e mecanismos vasoregulatorios. No nível celular os efeitos da adenosina incluem várias vias de sinalização, modulando a ativação de importantes fatores de transcrição como o NF- κ B. Neste contexto, a imunomodulação exercida pela adenosina tem seu potencial terapêutico reconhecido e avaliado na literatura, através do estudo de compostos que agem sobre seus receptores específicos ou através do aumento de sua concentração.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as propriedades antiinflamatórias e mecanismos de ação de um novo composto, inibidor de adenosina quinase (6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-*N,N*-dimetilfenil)aminoquinazolina, DMA), cuja ação resulta no aumento da concentração tecidual de adenosina. Para isso, foram utilizados modelos de inflamação aguda em animais de experimentação e ensaios *in vitro* em cultura de células. No modelo de peritonite aguda induzida por tioglicolato em camundongos, o tratamento com DMA reduziu o acúmulo de neutrófilos, ($\cong 55\%$, $p < 0,05$) e esse efeito foi bloqueado por um antagonista de receptor de adenosina, a 8-sulpho-phenil- theophilina. Ainda neste modelo, houve diminuição de Interleucina-6 no exudato dos animais tratados com DMA ($\cong 35\%$; $p < 0,005$). O DMA também foi efetivo na redução da inflamação nos modelos de artrite aguda em ratos, reduzindo o volume articular ($\cong 30\%$ na segunda hora e $\cong 35\%$ na quarta hora; $p < 0,05$), número de leucócitos no líquido sinovial ($\cong 50\%$; $28,6 \times 10^6 \pm 5,2$ células/ml vs. $13,8 \times 10^6 \pm 1,7$ células/ml; $p < 0,05$) e escala de dor ($2,62 \pm 0,18$ vs. $1,53 \pm 0,136$; $p < 0,05$). No modelo de edema de pata induzidos por carragenina demonstrou-se uma redução do edema

($\cong 30\%$ na quarta hora e $\cong 35\%$ na sexta hora; $p < 0,05$) e o modelo de “Liking Test” mostrou efeito analgésico, relacionado a sua atuação no processo inflamatório (redução do tempo de lambeduras em 40% ; $p < 0,01$). Já nos modelos de cultura celular, o tratamento de macrófagos com o DMA reduziu a expressão de TLR4, importante receptor relacionado ao reconhecimento e processamento de antígenos. Também foi observada a diminuição da ativação em neutrófilos e macrófagos de NF- κ B, um dos principais fatores de transcrição do processo inflamatório; assim como o aumento da ativação de PPAR, receptor nuclear que modula a inflamação, em células monocíticas THP-1.

Os antiinflamatórios são medicamentos muito utilizados, mas o uso ainda é limitado pelos efeitos colaterais. Ainda não existe uma classe dessas drogas que combine eficiência e segurança, sendo a investigação de novos compostos e mecanismos de ação desejada e necessária. Este trabalho demonstrou as propriedades antiinflamatórias do DMA, um novo e potente inibidor de ADK que foi eficaz em melhorar a inflamação em modelos experimentais animais e em cultura de células. Novos estudos serão realizados, a partir desses dados, visando futuramente avaliar um eventual potencial terapêutico para o DMA em doenças inflamatórias em seres humanos.

ABSTRACT

Inflammation has a main role in several connective tissue diseases and is an important element of infectious disease physiopathology. Recently it has been linked to obesity, diabetes and cardiovascular diseases. Adenosine, among the various inflammatory process mediators, is a potent autocoid and its bioavailability is limited by catabolism to inosine by adenosine deaminase or by salvage following cellular uptake via adenosine kinase (ADK). Once in extracellular space adenosine interacts with specific cell-surface receptors (A_1 , A_2 , A_{2B} , A_3) and acts on multiples aspects of the inflammatory process: apoptosis, leukocyte migration, release of proinflammatory cytokines and vascular regulation. At cellular level adenosine acts in a wide-range of pathways, modulating important transcription factors like NF- κ B. Based on these premises, adenosine immune regulatory properties and potential in therapeutics have been acknowledged and investigated through the study of specific receptors agonists and compounds able to increase its concentration.

The main objective of this study was to evaluate the antiinflammatory properties and mechanisms of DMA, a novel adenosine kinase inhibitor, which increases adenosine tissue concentration. In order to accomplished that, animal models of acute inflammation and cell culture assay were used. DMA was orally effective to reduce neutrophils migration ($\sim 55\%$; $p < 0,05$) and IL-6 concentration ($\sim 35\%$; $p < 0,005$) in the aseptic thioglycollate peritonitis model. DMA significantly inhibited arthritis in an acute arthritis carrageenan model, decreasing articular volume ($\sim 30\%$ second hour and $\sim 35\%$ fourth hour, $p < 0,05$), leukocytes on synovial liquid ($\sim 50\%$; $28,6 \times 10^6 \pm 5,2$ cells/ml vs. $13,8 \times 10^6 \pm 1,7$ cells/ml; $p < 0,05$) and pain score ($2,62 \pm 0,18$ vs. $1,53 \pm 0,136$; $p < 0,05$). DMA was also effective in reducing edema in the carrageenan-induced paw edema model ($\sim 30\%$ second hour and 36% fourth hour; $p < 0,05$) and pain in the second phase of the “Liking test” induced by formalin ($\sim 40\%$ in liking time; $p < 0,01$). *In vitro*, macrophage expression of TLR4, an important cell receptor in recognizing and processing antigens, was decreased after DMA treatment. The results suggest that DMA also impacts the inflammatory cascade by modulating inflammatory related nuclear transcription. It was demonstrated that DMA was also able to inhibit macrophages and neutrophils, LPS induced NF- κ B activation and promote PPAR activation in THP-1 cells.

Antiinflammatories are drugs in high demand, but their use is still limited by side-effects. The DMA is a novel, potent non-nucleoside ADK inhibitor, orally effective to improve inflammation in some well characterized animal models and in vitro assays. New studies, based on this data, will be design to further explore the therapeutic use of DMA in inflammatory diseases.

1- INTRODUÇÃO

1.1- O composto quinazolínico estudado: DMA- cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-(3-N,N-dimetilfenil) aminoquinazolina.

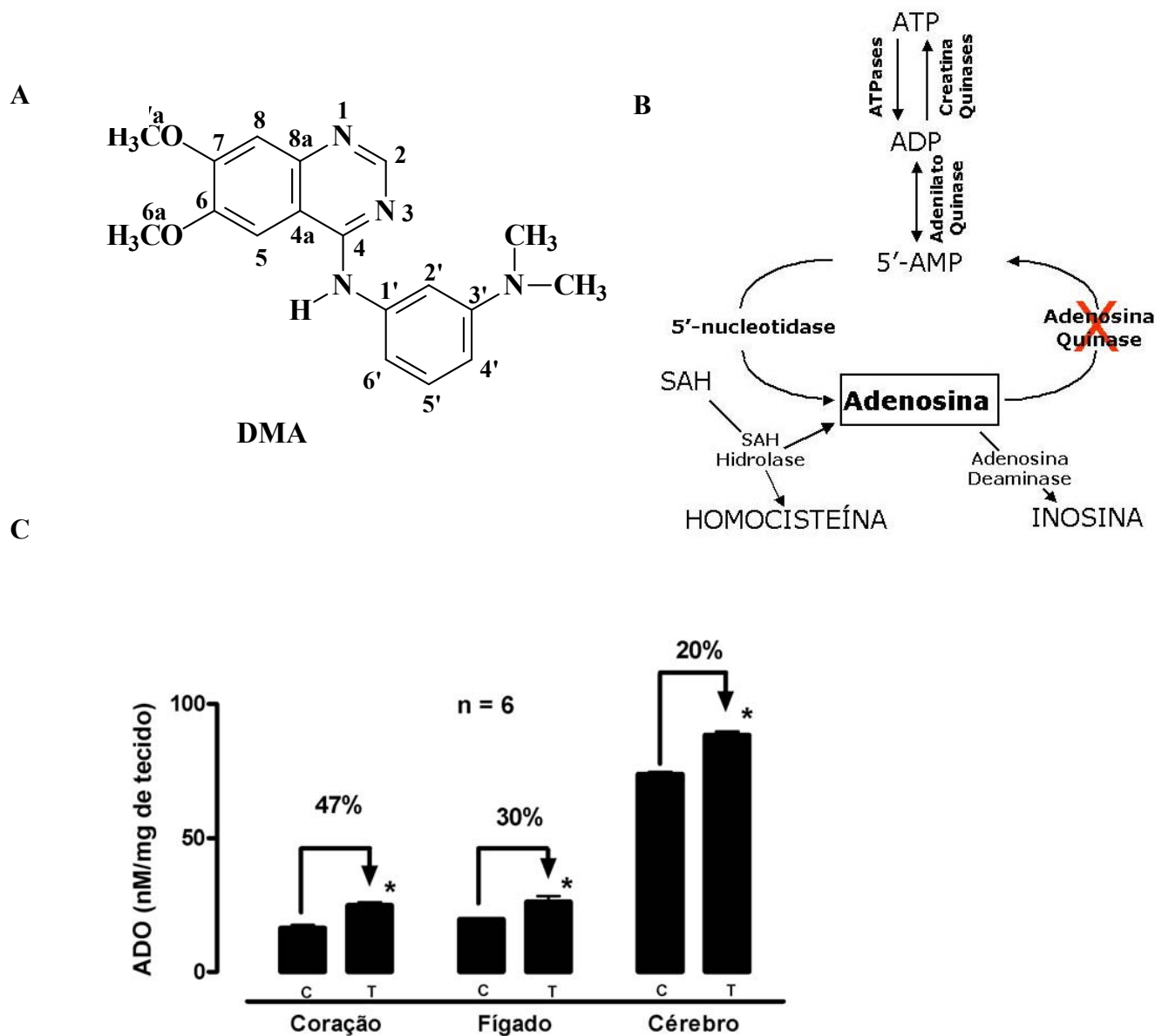
Em estudos realizados no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular da FCM UNICAMP, foram identificados derivados de 4-anilinoquinazolinas com potente atividade inibitória sobre a adenosina quinase (Rocco, 2002; Marin, 2007). Dentre os vários derivados sintetizados, foi demonstrado que o composto 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil)aminoquinazolina (identificado como DMA; Esquema 1A) inibe a adenosina quinase (ADK) de forma seletiva e com potência comparável a outros inibidores conhecidos (Gomtsyan e Lee, 2004; Jacobson et al., 2004; Jacobson e Gao, 2006).

A adenosina quinase (EC 2.7.1.20) e a adenosina deaminase são as principais enzimas reguladoras dos níveis locais de adenosina (Gomtsyan e Lee, 2004). A adenosina quinase é a quinase de nucleosídeos mais abundante nos tecidos de mamíferos, inclusive em seres humanos (Mathews et al., 1998; Maj et al., 2000). Essa enzima catalisa a síntese de AMP através da reação entre adenosina e ATP, como representado no Esquema 1B. Em consonância com seu papel crítico na via metabólica responsável pelo controle da concentração local de adenosina, a inibição da adenosina quinase produz aumentos sensíveis nas concentrações intra e extracelulares de adenosina (Kowaluk e Jarvis, 2000). A inibição farmacológica da ADK foi descrita anteriormente com análogos da adenosina tais como aminoadenosina e iodotubercidina, bem como com derivados piridopirimidínicos e alquinilpirimidínicos (Muchmore et al., 2006; Gomtsyan et al., 2004; Jacobson et al., 2004). Os estudos de aplicação terapêutica destes compostos têm demonstrado seu potencial efeito benéfico em situações de isquemia miocárdica, dor e processos inflamatórios, todos eles decorrentes dos efeitos farmacológicos da adenosina.

Os derivados quinazolínicos foram sintetizados no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular (Rocco et al., 2004). O efeito sistêmico no metabolismo de purinas foi confirmado em ratos tratados com o derivado quinazolínico DMA (VO. 30 mg/Kg). Os ratos tratados com DMA tiveram um aumento de 47%, 30% e 20% nos valores médios das áreas dos picos de adenosina (Esquema 1C) nas amostras de coração, fígado e cérebro, respectivamente. O pico máximo de adenosina em ratos foi observado após 1 hora de administração oral do DMA (Marin, 2007).

Foram realizados estudos de farmacodinâmica e farmacocinética do DMA, por meio de um método de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e detecção por UV (HPLC) para a análise em plasma e tecidos de camundongos. Considerando as dosagens por via oral e intraperitoneal, os valores de concentração máxima (C_{máx.}) do DMA detectados foram de 12,5 e 5,5 µmol/L em 10 e 5 minutos (T_{máx.}), respectivamente, sendo que o composto ainda permanece no plasma por um período superior a quatro horas. Considerando-se a administração oral e intraperitoneal, parâmetros farmacocinéticos como, tempo de meia vida de eliminação ($t_{1/2\lambda}$), AUC_{0-240min.}, clearance (CL/F) e volume de distribuição (V/F) foram determinados. De maneira geral, os resultados destes estudos mostraram que o DMA é rapidamente absorvido, amplamente distribuído e tem taxa de eliminação moderada. A análise dos extratos de tecidos mostrou que o DMA tem concentrações de acúmulo em tecidos como o fígado, rins, pulmões e pâncreas relativamente altas (>9 µg/g) (Marin, 2007).

Os projetos inicialmente desenvolvidos no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, seguindo o que foi previamente publicado, em relação ao potencial miocárdio protetor da adenosina, buscaram avaliar o efeito do DMA em modelos de isquemia/reperfusão. Os resultados positivos, e o conhecimento da adenosina como um autacóide que modula múltiplas funções celulares como proteção celular à agressão por isquemia e trauma, modulação da resposta inflamatória, modulação da atividade neural e diversos efeitos metabólicos, motivaram o estudo do composto em alguns outros modelos. Nesse contexto surgiram projetos para avaliação do composto em modelos de aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, e o presente projeto de inflamação.



Esquema 1- Apresentação do composto DMA (**A**) Estrutura química do 6,7-dimetóxi-4-*N*-(3'-*N,N*-dimetilfenil) aminoquinazolina (DMA) (**B**) Mecanismo de ação do DMA, inibindo a adenosina quinase (**C**) Gráfico representativo do perfil de adenosina (expresso em nM/mg de tecido) de coração, fígado e cérebro de ratos controle e tratados com DMA-01 (t) na dose de 30mg/Kg, sacrificados após 3 horas ao tratamento.

1.2- O processo inflamatório

O processo inflamatório é fundamentalmente um mecanismo de proteção, tendo a função de livrar o organismo de agentes que causem lesão de células e tecidos (ex.: microorganismos e toxinas) e remover os que foram danificados em consequência de uma injúria. Dessa forma, a reação inflamatória é determinante na defesa e homeostasia do corpo e, na sua ausência, as infecções não seriam combatidas e feridas nunca cicatrizariam. No entanto, os processos de inflamação e reparo podem ser potencialmente danosos ao organismo quando sua intensidade ou duração ultrapassam o suficiente e necessário para conter o agente agressor. Como exemplo tem-se as reações de hipersensibilidade às picadas de insetos, drogas e toxinas, assim como algumas das doenças crônicas mais comuns, a artrite reumatóide, a aterosclerose, as doenças inflamatórias intestinais e a fibrose pulmonar (Rankin, 2004). Por esta razão muitas drogas com a capacidade de interferir no processo inflamatório, atenuando sua intensidade ou reduzindo seu tempo de duração, são objeto de interesse e pesquisa. O antiinflamatório ideal deveria preservar os efeitos benéficos da inflamação e controlar os indesejáveis.

A inflamação pode ser definida como uma reação tecidual local à agressão, ou sistêmica, iniciada por patógenos microbianos, toxinas, corpo estranho, trauma ou neoplasia. Alterações na microcirculação como o aumento do fluxo sanguíneo para o local, da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos são características da resposta inflamatória que provocam o surgimento dos clássicos sinais clínicos da inflamação: rubor, calor, tumor e dor; descritos pela primeira vez por Aulus Cornelius Celsus (25 B.C.–50 A.D.) no primeiro século.

As células do sistema imune, peças essenciais ao processo inflamatório, são dotadas de receptores capazes de reconhecer mediadores inflamatórios e microorganismos invasores. A ligação a esses receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação ou repressão dos fatores de transcrição. Estes fazem o elo entre os estímulos recebidos pelas células e a subsequente reação, caracterizada pela resposta celular por meio da expressão gênica. Neste estudo, um dos principais receptores do sistema imune inato TLR4 (Toll Like Receptor 4) e dois importantes fatores de transcrição no processo

inflamatório foram avaliados: os PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) e o NF- κ B (nuclear factor kappa B).

1.3- Papel do NF- κ B no processo inflamatório

Durante a última década, o papel do fator de transcrição NF- κ B na atividade inflamatória tem sido extensivamente investigado. Atualmente o NF- κ B é considerado peça fundamental na gênese da inflamação e no processo de proliferação, desenvolvimento e apoptose celular. A família do NF- κ B consiste em cinco membros: p50, p52, p65(RelA), c-Rel e RelB. Os dímeros NF- κ B, originalmente retidos no citoplasma, sofrem um processamento e migram para o núcleo, onde se ligam aos sítios κ B dos genes alvos e regulam sua transcrição através do recrutamento de coativadores ou correpressores. O domínio de ativação de transcrição (TAD) necessário para regulação positiva da expressão gênica está presente apenas em p65, c-Rel e RelB. Já as subunidades p50 e p52, que não possuem TADs, tendem a reprimir a transcrição, a exceção de quando associadas a outro membro da família NF- κ B que contém um TAD ou a outra proteína com propriedades coativadoras. A sinalização por NF- κ B tem sido dividida em canônica e não-canônica. Após a ligação aos receptores, a sinalização para IKK (I κ B kinase complex) se dá através do complexo TRAF (TNF Receptor Associated Factor) e RIP (Receptor Interacting Protein), geralmente em conjunção com o TAK1 (TGF- activated kinase 1), levando à fosforilação e degradação de I κ β (canônica); ou através dos complexos TRAFs e NIK (NF- κ B inducing kinase), promovendo o processamento de p100 a p52 (não-canônico) (Hayden e Ghosh, 2008).

1.4- Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) : inflamação e metabolismo

Os Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) são uma subfamília de receptores nucleares e apresentam três isoformas já identificadas: PPAR α , β/δ e γ . Uma grande variedade de funções celulares como controle sobre metabolismo de lípidos,

lipoproteínas, glicose, oxidação de ácidos graxos, adipogênese e diferenciação celular têm sido atribuída aos PPARs. Além disso, evidências recentes têm sugerido um papel importante para os PPARs no processo inflamatório. Esta função é mediada principalmente através das isoformas PPAR α e γ , utilizando mecanismos agonista-dependentes para reprimir a atividade de vários fatores de transcrição como NF- κ B, STATs (signal transducers and activators of transcription), AP-1 (activator protein 1) e NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Glass e Ogawa, 2006; Kota et al., 2005).

PPAR α

O PPAR α é expresso em tecidos como fígado, rim, músculo esquelético, adiposo e também em células endoteliais, células musculares lisas e monócitos/macrófagos. Um dos papéis inicialmente descritos para os PPAR α foi a regulação da oxidação e captação de ácidos graxos. Ligantes exógenos dos PPAR α como os fibratos promovem a expressão de citocromo P4504A (CYP4A), da lipoproteína lipase e inibem a expressão de apolipoproteína C-III no fígado levando a uma diminuição dos níveis de triglicérides. Além disso, o PPAR α ativa a expressão de apolipoproteína A-1 (principal apolipoproteína do HDL) e da proteína que promove efluxo de colesterol de macrófagos ABCA1 (ATP -binding cassette A1) (Chinetti et al., 2001). Em relação ao processo inflamatório, já foi demonstrado que o PPAR α reduz a expressão de VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) em células endoteliais, TF (fator tissular), PAF (fator ativador de plaquetas) e MMP-9 em monócitos/macrófagos, ciclooxygenase-2 em células musculares lisas e níveis séricos de IL-6 e fibrinogênio (Kota et al., 2005).

PPAR γ

O gene do PPAR γ contém três promotores que resultam em três isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. A expressão de PPAR γ varia de acordo com os tecidos. O PPAR γ 1 é encontrado em muitos tecidos (fígado, baço, adrenal, cólon, pâncreas, endotélio)

e células (monócitos/macrófagos), já o PPAR γ 2 está restrito ao tecido adiposo e o PPAR γ 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco (Kota et al., 2005). O PPAR γ está relacionado a ligantes endógenos como ácidos graxos e ecosanóides, componentes da LDL oxidada e alguns fosfolípides; e ligantes exógenos como as thiazolidionas (TZD). As TZD são os compostos sintéticos com propriedades agonistas de PPAR γ que diminuem resistência à insulina e reduzem níveis séricos de glicose em pacientes com diabetes tipo 2.

O PPAR γ regula genes envolvidos com diferenciação de adipócitos, metabolismo e armazenamento de ácidos graxos (aumento de expressão de proteína transportadora de ácidos graxos e ayl-coenzima A sintetase), lipólise (aumento de LPL) e captação de glicose (aumento de expressão IRS-1, IRS-2, phosphatidil 3-kinase, GLUT4 insulin sensitive glucose transporter, Cbl- associated protein, Glicerol kinase) (Kota et al., 2005, Yki-Järvinen, 2004). Como o PPAR α , o PPAR γ está envolvido no transporte reverso de colesterol elevando a expressão de ABCA-1 e SR-B1 (Chinetti et al., 2001).

Trabalhos também têm demonstrado que ligantes específicos para PPAR γ inibem a produção de citocinas inflamatórias como, TNF- α , IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina -6), além de NO (óxido nítrico) induzido, MMP-9 (metalloproteinase de matriz-9) e MSR1 (macrophage scavenger receptor 1), MCP-1, TF) (Kota et al., 2005).

1.5- O papel dos “Toll-like receptors” (TLRs) no processo inflamatório

Os “Toll-like receptors” são proteínas transmembranas que fazem parte de uma classe maior de receptores chamada de “pattern recognition receptors” (PRRs). Os TLRs são capazes de reconhecer componentes constitutivos de inúmeros patógenos e, em se ligando a estes, ativar vias intracelulares para desencadear principalmente a resposta imune do sistema inato, mas também do adaptativo (Krishnan et al., 2007).

Recentemente tem-se discutido que, apesar do sistema imune inato ser submetido a uma modulação extremamente complexa e sofisticada, a ocorrência de desbalanços na sua regulação pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e auto-imunes (Seilbl et al., 2004). A etiopatogenia da aterosclerose, por exemplo, tem sido associada aos TLRs, mais especificamente ao TLR4 (Kiechl et al., 2003). Em humanos já foram identificados dez tipos de receptores “toll-like” associados ao reconhecimento de elementos microbianos como lipopolissacárides, CpG DNA e RNA viral (Beuttler, 2004). Após o reconhecimento destes elementos, os TLRs produzem um sinal transmembrana que induz, principalmente mediante a ativação de NF- κ B, a diferenciação celular, a expressão de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12) e de moléculas de adesão (Means et al., 2000; Underhil e Ozinsky, 2002).

O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, as proteínas de choque térmico (heat-shock proteins, HSP), as proteínas do envelope viral, ácidos graxos, o fibrinogênio, entre outros ligantes (Takeda e Akira, 2004). A associação do TLR4 com os seus ligantes pode levar a sinalização através de quatro diferentes moléculas adaptadoras: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), MAL (MyD88 adapter like), TRIF (TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β) e TRAM (TRIF-related adapter molecule). Além do papel de proteção, dados mais recentes relacionam os TLR4 a doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes. Estudos observaram que a deficiência de TLR4 protege os camundongos (C3H/HeJ) da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007) e da artrite mediada por imunocomplexos (ICA) (van Lent et al., 2007).

TLR4 e a migração de neutrófilos

Estudos demonstram a associação dos TLRs com a migração de neutrófilos, um dos principais agentes no processo inflamatório agudo. Fan e Malik (2003) mostraram que a sinalização através dos TLR4 aumenta a migração de neutrófilos por modular a expressão na superfície celular dos polimorfonucleares (PMNs) de receptores de MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago - 2). Em outro trabalho, Fan et al (2003) revelaram que a

NADPH oxidase de neutrófilos induz, via TLR4, a expressão de TLR2 em células endoteliais. Os TLR2, por sua vez, elevam a expressão de ICAM-1 e consequentemente aumentam a migração de polimorfonucleados em resposta a constituintes microbianos como LPS, perpetuando assim o processo inflamatório.

1.5.1- Adenosina

A adenosina é uma molécula de sinalização autacóide, responsável pela modulação de respostas fisiológicas em todos os tecidos vivos. É um metabólito, produto da quebra de ATP, que está presente no sangue humano em concentração basal entre 30-300nM (Hirschhorn et al., 1981; Schulte e Fredholm, 2003). Em estudos com animais registrou-se concentrações mais elevadas de adenosina em tecido isquêmico (até de 1-30 μ M) ou inflamado (1-100 μ M) (Matherne et al., 1990; Newby et al., 1983; Latini et al., 1999; Martin, 2000). Cronstein et al (1993) e Newby et al (1983) revelaram que suspensões de neutrófilos liberam adenosina para o meio extracelular. A remoção desta adenosina endógena promove um aumento significativo na resposta de neutrófilos a quimioatrativos (Cronstein et al., 1983). Outras células, como as do endotélio vascular, também são capazes de liberar adenosina. Em 1986 foi demonstrado pela primeira vez que tanto um agonista exógeno do receptor de adenosina, como a adenosina de liberação endógena protegem as células do endotélio vascular contra lesões provocadas por neutrófilos humanos ativados (Cronstein et al, 1986). Essas observações foram subsequenteiramente confirmadas por Gunter e Herring (1991), sugerindo então que a adenosina exerceria papel crítico na regulação da inflamação.

As fontes mais comuns de produção de adenosina endógena são as células endoteliais, parenquimais isquêmicas, neutrófilos e nucleotídeos derivados de nervos ou mastócitos intersticiais (Linden, 2001; Gunther e Herring, 1991; Sperlagh, 2000). Já foi demonstrado que no coração a inibição da adenosina quinase induzida por hipóxia leva a um aumento na concentração de adenosina. Esse mecanismo tem papel importante na recuperação desse tecido quando submetido a pouca oxigenação (Decking et al., 1997). A adenosina também pode ser derivada de nucleotídeos de adenina liberados por vários tipos

de células através de mecanismos ainda pouco conhecidos. Quantidades substanciais de adenosina podem ser provenientes da quebra de nucleotídeos de adenina que estão presentes em grânulos de nervos autonômicos, plaquetas e mastócitos. Os nucleotídeos de adenina são rapidamente convertidos em adenosina por uma família de ecto-ATP/ADPases (CD39 e ecto-5' nucleotidase CD73) (Koziak et al., 2000).

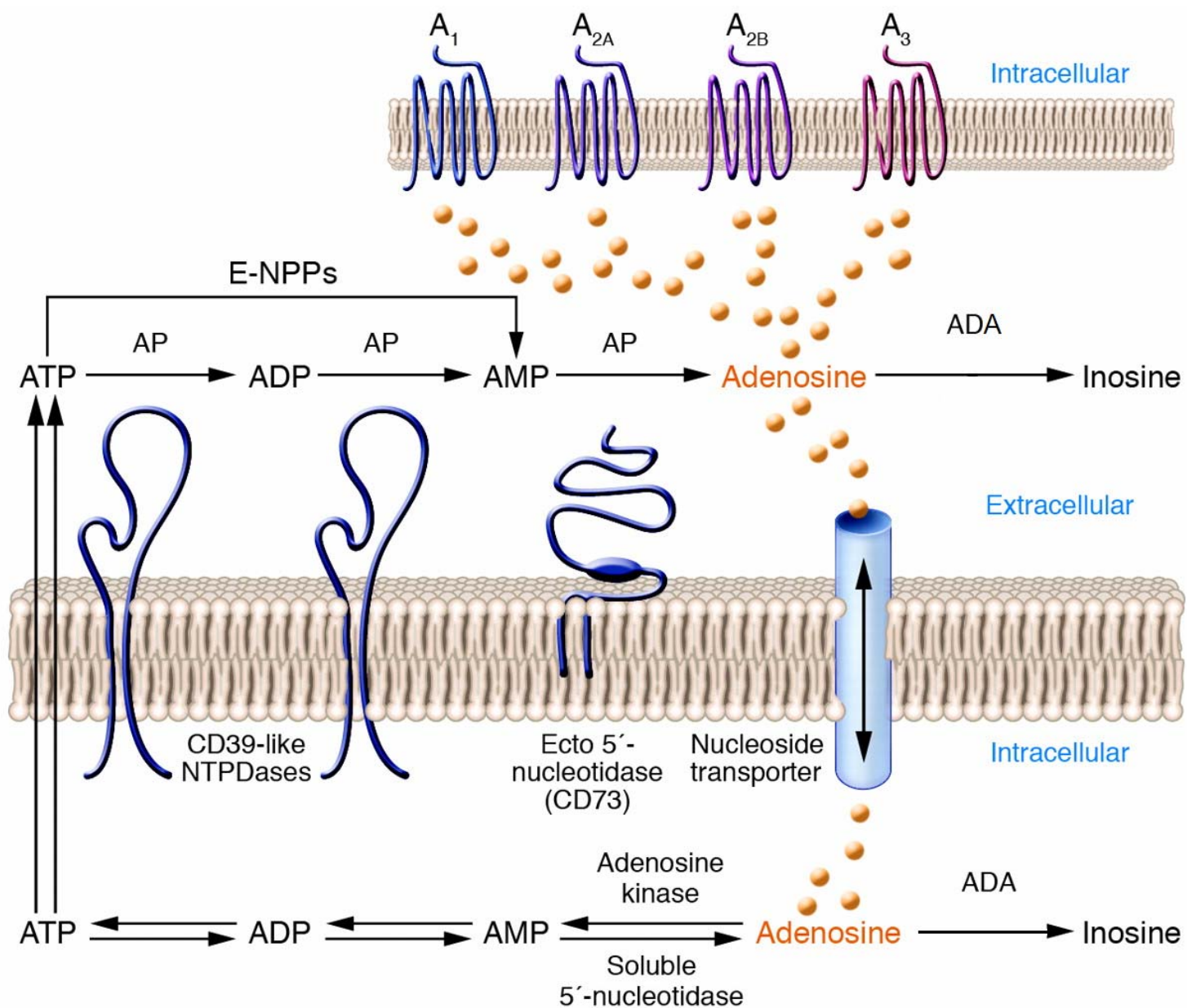
A inosina, formada a partir da desaminação da adenosina, acumula-se em níveis até maiores que a adenosina em tecidos isquêmicos. A inosina ativa receptores A_3 em ratos e porcos guinea com valores de K_i entre 15-25 μ M (Jin et al., 1997). Ao contrário dos seus efeitos em roedores, a inosina é um agonista parcial fraco dos receptores A_3 em humanos (Linden, 2001).

A adenosina é rapidamente retirada do meio extracelular e fosforilada; uma vez fosforilada, a adenosina permanece retida dentro da célula, onde não exerce sua ação antiinflamatória (Esquema 2). Componentes capazes de inibir esta fosforilação (inibidores de adenosina quinase) poderiam aumentar a concentração extracelular de adenosina e dessa forma inibir a resposta inflamatória.

1.5.2- Receptores de adenosina

Os efeitos da adenosina como modulador de funções fisiológicas relevantes foi inicialmente descritos por Drury em 1929, entretanto seus receptores só foram descobertos mais tarde (De Gubareff, 1965). A classificação inicial em $A_1(R_i)$ e $A_2(R_s)$ foi baseada nos efeitos opostos dos agonistas nos níveis de cAMP em diversos tecidos: inibitórios para A_1 e estimulatórios para A_2 . Os receptores A_2 foram subdivididos mais tarde em A_{2A} e A_{2B} com base na habilidade de estimularem a produção de cAMP no cérebro em concentrações baixas (0.1-1 μ M) e altas (>10 μ M) de adenosina respectivamente. O receptor A_3 foi descoberto mais recentemente através de clonagem molecular a partir de cDNA de testículo de rato (Zhou 1992). Na última década os quatro receptores foram clonados em diferentes espécies e caracterizados bioquímica e farmacologicamente (Schulte e Fredholm, 2003; Linden, 2001).

Os receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} são antagonizados pelas metilxantinas, como a cafeína, teofilina e enprofilina, já o subtipo A_3 é relativamente insensível às xantinas; motivo da descoberta mais tardia. Os quatro receptores de adenosina estão acoplados com a proteína G (GPCRs). Os receptores A_1 e A_3 (A_1R e A_3R) interagem com as proteínas G_i e G_o e os receptores A_{2A} e A_{2B} (A_{2AR} e A_{2BR}) estimulam a adenil ciclase via G_s . O A_{2BR} também podem ativar a fosfolipase C, provavelmente através da ativação de G_q (Feoktistov e Biaggioni, 1997). A adenosina pode ativar os receptores A_1 , A_{2A} e A_3 com um EC_{50} em torno de 0.2 a 0.7 μM , já a potência do receptor A_{2B} é mais baixa, com o EC_{50} de 24 μM (Fredholm et al., 2001).

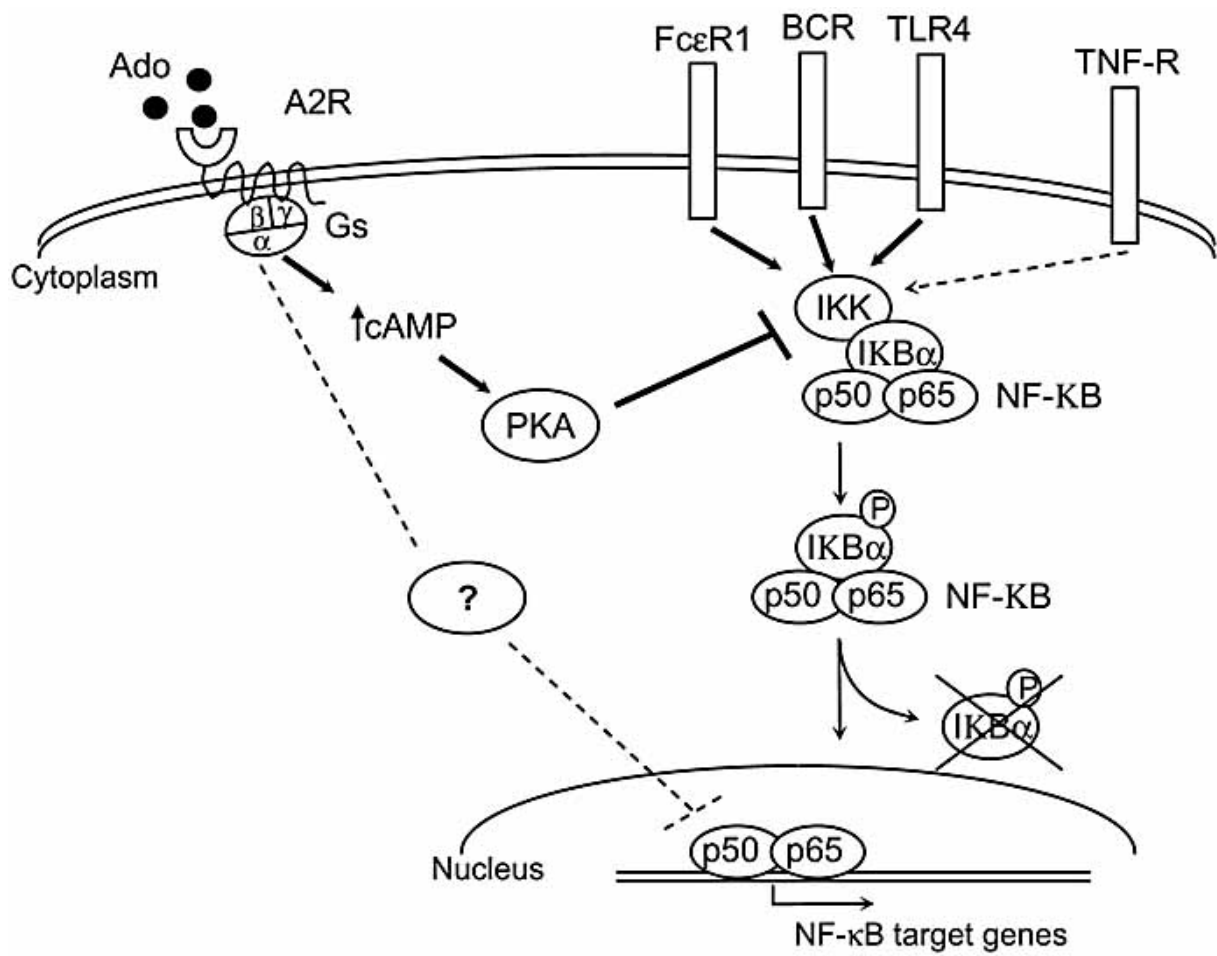


Esquema 2- Adenosina: metabolismo e ação.

1.5.3- Adenosina e sinalização intracelular

Adenosina e NF- κ B

Um dos mecanismos pelos quais a adenosina exerceria seu papel antiinflamatório seria através da sua capacidade de suprimir a ativação do NF- κ B. No entanto, ainda não está claro como esta supressão acontece. Em revisão recente, Hershfield (2005) aborda este assunto. Já foi demonstrado que a adenosina suprime a ativação de NF- κ B induzido por TNF- α em células de linhagem mielóide, mas sem alterar a fosforilação de I κ B α e a degradação da I κ B α quinase. A partir destes dados foi sugerido que o mecanismo provável de supressão seria secundário à atenuação da capacidade de ligação do NF- κ B (Majumdar e Aggarwal, 2003). Entretanto outro estudo mostrou que o bloqueio da ativação de NF- κ B pela adenosina em células B de murinos estava associado com a inibição da fosforilação de I κ B. O efeito da adenosina sobre o NF- κ B foi bloqueado por um inibidor de proteína quinase A (PKA), o que sugere uma ativação de adenil ciclase mediada pelo receptor A_{2A} (Minguet et al., 2005) (Esquema 3). A leitura deste e outros trabalhos permite supor que a regulação da adenosina sobre o NF- κ B ocorra de diversas formas dependendo da sua concentração, condições locais e sobretudo do tipo de célula envolvido.



Esquema 3- Regulação esquemática do NF-κB pela adenosina.

(Hershfield, Eur. J. Immunol, 2005)

TLR4 e adenosina

Alguns trabalhos sugerem uma interação entre os receptores de adenosina e os TLRs. A adenosina inibe de forma importante a expressão de citocinas inflamatórias, secundária à ativação de TLR4, em diferentes tipos de célula (Hasko e Cronstein 2004). Pinhal-Enfield et al (2003) relatam um sinergismo entre os TLRs 2, 4, 7 e 9 e o receptor A_{2A} regulando positivamente a expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e negativamente a de TNF- α . Outro estudo demonstra que este sinergismo se dá através da sinalização por MyD88 e que macrófagos sem MyD88 (MyD88^{-/-}) não expressam VEGF em resposta ao agonista de A_{2A}R (CGS21680). Também mostra que o tratamento de camundongos MyD88^{+/+} com CGS21680 promove cicatrização e estimula a angiogênese de lesão, mas em camundongos MyD88^{-/-} não apresenta nenhum efeito significativo (Macedo et al., 2007).

PPAR e adenosina

Até o momento não existe trabalho demonstrando uma relação direta entre os PPARs e adenosina.

1.5.4- Efeitos antiinflamatórios da adenosina - Potencial ação na terapêutica

Vários trabalhos revisam os mecanismos antiinflamatórios para adenosina (Cronstein, 1994; Haskó e Cronstein, 2004; Linden, 2001). Existem evidências de que a adenosina modularia a liberação de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 6, 8, 10 e 12 (IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) e o TNF- α (Link et al., 2000; Haskó et al., 2000); atenuaria a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas diminuindo a migração de leucócitos; teria atividade supressora sobre a produção de radicais superóxido e degranulação de neutrófilos (Bouma et al., 1994; Bouma et al., 1996; Reinstien et al., 1994) e diminuiria a ativação de linfócitos (Lappas et al., 2005). Em monócitos humanos a ativação dos receptores A_{2A} inibe, por mecanismo dependente de

AMP, a secreção de IL-12, uma citocina pró-inflamatória, indutora de resposta Th1 (Link et al., 2000). Esta pode ser uma outra via de ação antiinflamatória da adenosina, levando a uma supressão seletiva de respostas Th1 e consequentemente da imunidade celular. Em relação às vias intracelulares envolvidas, já foi discutido anteriormente que a adenosina suprime a ativação de NF- κ B induzida por TNF- α , em células mielóides, células T e endoteliais (Majumdar e Aggarwal, 2003).

Stolk et al (1999) sugerem que haveria uma redução da atividade da 5'- nucleotidase intracelular nos linfócitos de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (LES), levando a um acúmulo de nucleotídeos de (deoxy)purina e uma diminuição da produção de adenosina. Dessa forma, a ação antiinflamatória da adenosina estaria prejudicada e isso poderia ter papel relevante na persistência da inflamação no LES (Stolk et al., 1999). Outros trabalhos apontam para um aumento da concentração de adenosina deaminase (ADA), responsável pela conversão de adenosina em inosina, nos pacientes com LES, que estaria positivamente associada à atividade de doença (Stancikova et al., 1998, Nalini et al., 1993).

A modulação da concentração de adenosina e o uso de agonista dos seus receptores têm sido avaliados com opção terapêutica para doenças inflamatórias crônicas. Cronstein et al têm relacionado o efeito antiinflamatório do Methotrexate (MTX), o agente mais usado e a primeira escolha no tratamento da artrite reumatóide e também muito utilizado em outras doenças reumáticas (lupus eritematoso sistêmico, espondiloartropatias, artrite psoriásica, dermatopolimiosite), com a maior concentração de adenosina extracelular (Cronstein et al., 1993, Cronstein et al., 1995). O MTX levaria ao acúmulo de 5-aminoimidazolecarboxiamidoribonucleotídeo (AICAR) intracelular, o que promove um aumento de AMP que é exportado para o extracelular onde é convertido a adenosina (Montesinos et al., 2007). A adenosina, através de ligação a receptores A₂ ou A₃, exerceria seus efeitos antiinflamatórios. Em um modelo de inflamação aguda (“air pouch mice”), demonstrou-se uma diminuição significativa no número de leucócitos e na concentração de TNF α do “pouch” em ratos tratados com MTX e seu análogo MX68. Já os ratos nocauteados para os receptores A_{2A} e A₃ não apresentaram tal redução destes marcadores de inflamação. Portanto, esse estudo demonstrou que a adenosina tem efeito antiinflamatório

por diminuir a migração de leucócitos e a concentração de TNF- α , potente citocina pró-inflamatória (Montesinos et al., 2003). Quando antagonistas não seletivos dos receptores para adenosina, como a teofilina e a cafeína foram administrados em modelo de artrite adjuvante em ratos, tratados com MTX, evidenciou-se uma reversão do efeito antiinflamatório do MTX. Assim sendo, essa evidência leva a crer que a ação antiinflamatória dessa droga, tão amplamente utilizada na prática clínica em doenças inflamatórias crônicas, se deve, em grande parte, à atuação da adenosina em seus receptores (Montesinos et al., 2000).

Os inibidores de adenosina quinase também têm sido avaliados quanto ao seu potencial antiinflamatório e analgésico (Gomtsyan e Lee, 2004). O composto GP-515, um dos primeiros inibidores de adenosina quinase testados, mostrou ser protetor em modelos *in vivo* de choque séptico e capaz de inibir a adesão de neutrófilos em monocamadas de endotélio estimuladas *in vitro*, pelo aumento da concentração de adenosina. Em modelo “air pouch”, tratado com GP-515, houve um aumento de adenosina e diminuição do acúmulo de leucócitos. A injeção de adenosina deaminase reverteu completamente tal efeito (Cronstein et al., 1995). Mais recentemente, agonistas seletivos para os receptores A_{2A} e A_3 entraram em fase clínica de investigação (Silverman et al., 2008; Gao e Jacobson, 2007).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar os efeitos do DMA (6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil) aminoquina-zolina sobre o processo inflamatório agudo .

2.2- Objetivos específicos

(1) Avaliar o mecanismo de ação e os efeitos do DMA sobre o processo inflamatório em animais utilizando os seguintes modelos experimentais: peritonite asséptica induzida por tioglicolato, edema de pata induzida por carragenina, “Linking test” induzido por formalina e artrite aguda induzida por carragenina.

(2) Investigar em modelos de cultura de células o efeito do composto DMA sobre as vias intracelulares de sinalização do processo inflamatório (TLR4, PPARs e NF- κ B).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Compostos quinazolínicos

Derivados quinazolínicos foram sintetizados no laboratório pela Dra. Silvana A. Rocco (2004). Nos experimentos deste trabalho foi utilizado o composto quinazolínico identificado por DMA (cloridrato de 6,7-dimetóxi-4-N-[3'-N,N-dimetilfenil] aminoquinazolina).

3.2- Anticorpos, reagentes químicos e materiais

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), triton X-100, tween 20, colagenase tipo II e glicerol foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA). A membrana de nitrocelulose (Hybond *ECL*, 0.45 µm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O ácido (hidroxi-piperazina) etanosulfônico (HEPES) foi obtido da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). Os anticorpos anti-p65 (sc-372), foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). TRIzol® foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA). O RPMI-1640 e o soro bovino fetal foi adquiridos da Gibco. O antibiótico Penicilina/Estreptomicina foi obtido da Nutricell. A LPS (L3755- *E. coli* serotype 026:B6) foi fornecida pela Sigma, assim como o PMA (P1585).

3.3- Cultura de células

Linhagem monocítica THP-1

A linhagem monocítica de células THP-1 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Heraldo Sousa – LIM 51 – Faculdade de Medicina – USP e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (SBF 10%) e penicilina/estreptomicina 2% em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Para alguns dos experimentos, as células foram submetidas à diferenciação por meio do uso de PMA (100nM) por 48hs.

Isolamento de neutrófilos humanos

Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico de doadores normais, na presença de EDTA (0,5%), através de gradiente de ficoll Histopaque Sigma (1170 e 1119) de acordo com as instruções do fabricante. Os neutrófilos foram então contados, ressuspensos em meio RPMI 1640 suplementado com SBF 10% e penicilina/estreptomicina 2% e mantidos em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 30 min até o início do experimento.

Isolamento de macrófagos de camundongos

Para recrutar macrófagos dos camundongos, 2ml de tioglicolato 3% foram injetados no peritônio de cada animal. Após 3 dias os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal foi coletado imediatamente através da lavagem da cavidade peritoneal com 5 ml de meio RPMI 1640 gelado. As células foram então centrifugadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com SBF 10% e penicilina/estreptomicina 2% e contadas. Em seguida, quantidades iguais de células foram semeadas em placas de cultura e mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por três horas, permitindo assim a adesão dos macrófagos à superfície das placas. Estas foram então delicadamente lavadas com RPMI a fim de descartar as células não aderidas. Observa-se então a presença de um tapete de macrófagos, que, após a reposição do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SBF 10% e penicilina/estreptomicina 2%, está pronto para ser utilizado nos experimentos envolvendo cultura de macrófagos.

3.4- Animais de experimentação

Os camundongos machos C3H/HeJ, C3H/HeN foram obtidos do laboratório Jackson e providos pela Universidade de São Paulo.

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos e ratos foram mantidos sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2°C.

3.5- Descrição dos modelos experimentais de inflamação em animais

Peritonite asséptica induzida por tioglicolato

A cavidade peritoneal de camundongos apresenta-se como um local ideal para o estudo do desenvolvimento de uma reação inflamatória, por ser um ambiente estéril no qual um grande número de células pode ser facilmente isolada por lavagem para contagem e avaliação diferencial. O meio tioglicolato é utilizado há muito tempo para induzir uma resposta inflamatória em cavidade peritoneal, apesar de não se saber precisamente o mecanismo de estímulo, por se tratar de um material extremamente heterogêneo. Neste modelo, espera-se a maior concentração de polimorfonucleados entre a quarta e quinta hora após o estímulo, seguido de redução gradativa destas células e aumento da concentração de macrófagos que atingem o pico de concentração ao redor do quarto dia. Camundongos são submetidos à injeção intraperitoneal de 1,5ml tioglicolato a 3% em PBS estéril (Baron e Proctor, 1982). Após quatro horas, os animais são sacrificados, a cavidade peritoneal prontamente lavada com 3ml de solução PBS estéril (heparina 5 Ui/ml). O número total de células por cavidade é avaliado através da contagem realizada em solução de Turk em uma câmara de Neubauer. O diferencial destas células é realizado em “slides” por centrifugação (cytospin 3, Shandon Southern products Atsmoore UK) e a coloração por solução-panótico rápido (Laborclin).

Edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Em sua revisão, Morris (2003) afirma que a resposta inflamatória induzida pela carragenina é usualmente quantificada pelo aumento no volume da pata (edema) o qual atinge um pico em torno da 5ª hora pós-injeção e pode ser modulado por inibidores específicos da cascata inflamatória, entre os quais as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs), como a indometacina. Este modelo teve e continua tendo um papel importante na avaliação do efeito antiinflamatório de novas drogas. São avaliados grupos de camundongos submetidos a algum tipo de tratamento e um grupo controle. Em ambos os grupos, todos os animais têm a pata direita injetada com carragenina (1%) e a

esquerda com solução salina (tempo 0h). O volume das patas (direita e esquerda) é medido por um hidropletismômetro antes dos tratamentos ($t = -1h$), imediatamente após a aplicação da carragenina ($t = 0h$), e 1, 2, 4, e 6 horas depois ($t = 1h, 2hs, 4hs$ e $6hs$). A pata dos animais, previamente umidecida em solução de Extran (1% em salina), é imersa até a articulação tíbio-társica, na cuba do aparelho, registrando-se o volume deslocado. Medidas triplas asseguraram a constância do resultado. O valor do edema é calculado como delta (Δ) do volume das patas traseiras, determinado pela diferença (μl) entre o volume da pata injetada e o volume da pata contralateral ($\Delta = \text{volume da pata injetada} - \text{volume da pata contralateral}$). Para aumentar a confiabilidade, apenas um examinador, treinado previamente, cego para o tratamento, realiza estas medidas. A diferença entre os volumes das patas direita e esquerda é calculado para todos os tempos em ambos os grupos e realizada a média de cada grupo.

“Liking test” induzido por formalina

O “Linking Test” ou Teste da Lambadura envolve dor contínua, moderada provocada por lesão tecidual. A resposta a formalina mostra uma fase inicial e tardia. A fase inicial parece ser causada predominantemente por ativação de fibras-C em consequência do estímulo periférico, enquanto a fase tardia parece depender da combinação da reação inflamatória local e de mudanças funcionais no corno posterior da medula. (Dubuisson e Dennis 1977, TjOlsen et al., 1992). Neste modelo, geralmente, são avaliados camundongos submetidos a algum tipo de tratamento e um grupo controle. Em ambos os grupos, todos os animais tiveram a pata direita injetada com formalina (1,5%). Cada animal é avaliado por trinta minutos para comportamento que demonstra dor (lamber a pata injetada). Os primeiros 5 minutos são correspondentes ao período neurogênico da dor e os últimos 15 minutos ao período inflamatório da dor. É então realizada a média do tempo que os camundongos (em cada grupo) lambem a pata e esse valor é comparado entre os dois grupos.

Artrite aguda induzida por carragenina

O modelo de artrite aguda por carragenina está amplamente descrito; para este estudo foi utilizado aquele já publicado por Lam e Ferrell (1989). Para a indução da artrite, os animais são submetidos à anestesia transitória, por via inalatória, com isoflurano. A seguir, é realizada a injeção intra-articular (i.a) de carragenina (50 µl; 3%) no joelho esquerdo, com o auxílio de seringa e agulha (30G; BD Franklin Lakes, NJ, USA). Os animais são recolocados em caixas apropriadas com livre acesso à comida e bebida durante a avaliação dos parâmetros inflamatórios e dolorosos, os quais são realizados duas e quatro horas após a indução.

A escala de dor é determinada de acordo com o padrão de marcha, conforme o descrito por Otsuki et al. (1986). Cada rato é colocado em uma bancada ampla, o que permite que o animal ande livremente. A nota 0 foi dada se o rato não mostrasse alteração na marcha, a nota 1 se o animal mancasse com a pata injetada, a nota 2 se o animal andasse de forma intermitente com as três patas e a nota 3 se andasse sempre apenas com três patas. Para incentivar o início da deambulação, a cauda é delicadamente manipulada. O padrão da marcha é avaliado antes da indução da inflamação, após duas horas e quatro horas. O aumento do volume articular é avaliado através da medida do diâmetro articular, utilizando um paquímetro digital (Digimess) nos tempos 0h (basal), 2hs e 4hs. Após quatro horas os animais são então anestesiados e sacrificados por aprofundamento anestésico. É realizado o lavado articular com 100ul de PBS, e as células deste líquido contadas em solução de Turk, utilizando a câmara de Newbauer.

3.6- Descrição dos processos analíticos

Dosagem de IL-6 e IL-10

A dosagem foi realizada no exudato peritoneal obtido através do modelo de peritonite asséptica. Após a centrifugação (1,000xg por 10 minutos), o exsudato, livre de células, foi conservado a -80°C até a análise. A concentração das citocinas foi determinada por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de acordo com as instruções do

fabricante. Estas dosagens foram realizadas no LIM-51 Faculdade de Ciências Médicas da USP, com a colaboração do Prof. Dr. Francisco Soriano.

Preparação dos extratos nucleares

O exsudato recolhido da cavidade peritoneal foi centrifugado e o “pellet” ressuspenso em tampão A (HEPES 10mM, Kcl 10mM, NaCl 3mM, MgCl 3mM, EDTA 1mM, ditiotritol 2mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 1mM, PMSF 2mM e 0,1mg/mL de aprotinina) e incubado em gelo por 15 minutos. Adicionado nonidet P40 a 10% 0,005 volumes, realizado vortex por 10 segundos e centrifugado 500xg por 10 minutos a 4°C para a obtenção de precipitados contendo a fração nuclear. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -80°C (fração citosólica). O precipitado contendo a fração nuclear foi lavado em tampão A e centrifugado a 500xg por 10 minutos a 4°C. Foi então ressuspenso em Tampão NE gelado (HEPES 20mM, Kcl 800mM, glicerol 25%, MgCl 1mM, Nonidet P40 1%, EDTA 0.5mM, ditiotritol 2mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 1mM, PMSF 2mM e 0,1mg/mL de aprotinina. e incubado por 20 minutos, agitando-se eventualmente. A suspensão foi centrifugada a 14000xg por 15 minutos a 4°C e o extrato nuclear obtido do sobrenadante. As frações citosólica e nuclear foram analisadas para quantificação de proteínas (método de Lowry) e as proteínas desnaturadas após adição de tampão de Laemmli, seguida de aquecimento por cinco minutos a 100°C.

Determinação de proteínas pelo método de Lowry

Este método foi escolhido por ser mais sensível e preciso em amostras de baixa concentração protéica e cada amostra foi analisada em triplicata. Para cada 1mL de solução C foram adicionados 10µL de amostra e os tubos de ensaio foram incubados por dez minutos protegidos da luz. Após esse período, adicionaram-se 50µL *Folin Chateau* e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos protegidas da luz. Após esta última

incubação, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660nm. Para o cálculo de concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina (Sigma), variando concentrações de 5,5 µg/µL a 0,5 µg/µL, e os valores de absorbância obtidos das amostras foram comparados para adquirir a concentração de proteínas correspondente.

Solução A: 2% Na₂CO₃; 0,1N NaOH

Solução B₁: 1% CuSO₄

Solução B₂: 2% NaK tartarato

Solução C: para cada 1 mL de solução A, adicionar 100µL de solução B₁ e 100µL de solução B₂.

Análise de proteína por “Western Blot”

As frações subcelulares foram tratadas com tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescida de ditioneitol 100mM e aquecidas em banho seco (95°C) por cinco minutos e centrifugadas por um minuto. Após este procedimento, ambos foram submetidos a gel de SDS poliacrilamida a 10%, em aparelho de eletroforese miniaturado da Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories), a 35 miliamperes em corrente constante. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 min a 120 V (constante) em aparelho miniaturado da Bio-Rad. Em seguida, as membranas foram incubadas em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20), acrescida de 5% de leite em pó magro, por uma hora à temperatura ambiente, de modo a reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários às proteínas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com 10µl de anticorpos primários específicos, diluídos em solução basal, contendo 3% de leite em pó magro, por 18 horas a 4°C, em local preservado de luz. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes por dez minutos em TBS-T. Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário adequado, diluído na solução inicial de bloqueio (1:5000). As incubações foram desenvolvidas à temperatura ambiente e

agitação constante. Após 1 hora de incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas novamente, duas vezes por cinco minutos com TBS-T e 1 única vez com TBS por dez minutos. A revelação foi realizada pelo ensaio de quimioluminescência, utilizando o kit SuperSignal West Pico da Thermo Scientific seguindo o protocolo padrão do fabricante. As membranas foram analisadas no ImageQuant 350. As intensidades das bandas foram determinadas pelo programa Scion Image.

Real Time PCR

As células foram retiradas do meio de cultura, lavadas com PBS e centrifugadas a 3000 rpm por dez minutos. O RNA foi extraído utilizando o TRIzol, de acordo com as especificações do fabricante. De forma resumida: foi adicionado 1ml de TRIzol no frasco de cultura ou no tubo eppendorf e aguardou-se cinco min em TA. Foi adicionado 200µl de clorofórmio para cada ml inicial de TRIzol e agitou-se manualmente ou em vortex, de modo a homogeneizar moderadamente; realizada incubação por três min em TA e centrifugação por 15min a 12000xg, 4°C. Transferiu-se o sobrenadante (fase superior) para outro tubo. Adicionou-se 500µl de isopropanol gelado para cada ml inicial de TRIzol e foi iniciada incubação por dez min em TA. Realizada centrifugação por dez min a 12000xg, 4°C. O isopropanol foi desprezado, vertendo o tubo cuidadosamente sobre gaze. Em seguida foi adicionado 1ml de etanol 70% (feito com água DEPC, dietilpirocabonato) para cada ml inicial de TRIzol. Agitou-se manual e vigorosamente para lavar o “pellet”; e foi centrifugado a 7500xg por 5min a 4°C. O “pellet” contém o RNA e foi ressuspensionado em água DEPC (máximo de 50µl). A quantificação foi realizada utilizando o aparelho nanodrop.

Os “primers” utilizados foram: TLR4 (f) AGAAATTCCTGCAGTGGGTCA, (r) TCTCTACAGGTGTTGCACATGTCA; e GAPDH (f) AACGACCCCTTCATTGAC (r) TCCACGACATACTCAGCAC. A amplificação por PCR (SYBR Green Supermix- Invitrogen) foi realizada utilizando o Termociclador STRATEGENE. As curvas de dissociação foram realizadas no final dos ciclos a fim de assegurar que produtos inespecíficos estavam ausentes. Para quantificar os transcritos de TLR4, foi feita uma curva

padrão (diluição seriada de duas vezes, com dez pontos) para determinar a eficiência do “primer” e o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) para PPAR

Os oligonucleotídeos dupla fita de PPRE (PPRE F 5' CAA AAC TAG GTC AAA GGT CA3' PPRE R 5' TGA CCT ACC TAG TTT TC 3') foram produzidos pela Santa Cruz biotecnologia. As sondas foram marcadas com Py32 (Amersham Biosciences) usando T4 polynucleotide kinase (Promega) e purificadas com colunas G-50 (Amersham Biosciences). O extrato nuclear (10µg) foi incubado com a sonda marcada no tampão de ligação (10 mM HEPES, pH 7.8, 5% glicerol, 0.3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mM ZnCl₂, 0.04 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 40 mg/ml albumina bovina) por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, por aproximadamente duas horas em temperatura ambiente a 100 Volts. O gel foi secado por 45 minutos a 80°C e exposto “overnight” ou até atingir o nível de sinal desejado. Como controle para especificidade, o extrato nuclear foi pré-incubado com um excesso de sonda fria (concentração 200 vezes maior) por 20 minutos antes da adição da sonda marcada.

3.7- Protocolos experimentais em modelos animais

Avaliação do efeito do DMA sobre o processo inflamatório na peritonite asséptica

A avaliação do efeito do DMA sobre a migração de leucócitos contou inicialmente com dois grupos de camundongos, Balb-c, entre 20 e 25g, grupo tratado e grupo controle, ambos submetidos à indução de inflamação pelo modelo de peritonite por thioglicolato. O grupo tratado recebeu o composto DMA (30mg/kg) por gavagem e o grupo controle recebeu apenas o veículo (goma arábica). A contagem total e diferencial de células foi realizada no lavado peritoneal. Em seguida foi realizada uma curva temporal comparando um grupo controle (veículo) e grupos tratados com DMA 30mg/kg

(pré-tratamentos de 0, 1, 2, 6, 12, 24 horas). Também foi realizada uma relação dose-resposta para avaliar a cinética do composto. Os animais foram tratados com as diferentes doses de DMA imediatamente antes da indução da peritonite por tioglicolato.

Avaliação da ação da 8-sulpho-phenil-theophilina sobre o efeito do DMA na peritonite asséptica

Este protocolo buscou demonstrar que existe uma relação de causa e efeito entre o aumento da disponibilização de adenosina pelo DMA e a diminuição do acúmulo de neutrófilos no lavado. Para tanto foi injetada no peritônio um antagonista de receptor de adenosina, 8-sulfo-phenil-teofilina (8-SPT). Se a administração de 8-SPT revertesse a ação do DMA sobre a migração dos neutrófilos poderia-se concluir que esta migração era realmente consequência do aumento de disponibilidade de adenosina no extracelular. Para este fim, quatro grupos de camundongos, Balb-C entre 20 e 25g foram submetidos ao modelo de peritonite asséptica. Um grupo foi tratado com veículo (goma arábica), outro apenas com DMA (30mg/kg), um terceiro grupo com 8-SPT (20mg/kg) e DMA (30mg/kg) e um quarto grupo apenas com 8-SPT (20mg/kg). A 8-SPT foi dissolvida em PBS e injetada intra peritoneal 15 minutos antes da administração do DMA por gavagem, realizada imediatamente antes da indução da peritonite.

Avaliação da concentração de interleucinas (IL6, IL-10) no exsudato da peritonite asséptica

Como, em estudos prévios, já se demonstrou que a adenosina é capaz de diminuir a produção de TNF- α , IL-6, IL-12 e aumentar a de IL-10 em macrófagos, investigou-se o efeito do DMA sobre a concentração IL-6, IL-10 no líquido peritoneal dos camundongos submetidos a peritonite asséptica. Os camundongos foram divididos em dois grupos: o grupo controle (tratado apenas com veículo) e o grupo tratado com DMA (30mg/kg). O tratamento foi realizado uma hora antes da indução da peritonite por tioglicolato. Quatro horas após a indução os animais foram sacrificados, o exudato

coletado e centrifugado (1,000xg por 10 minutos) e o exsudato livre de células foi conservado a -80° C até a análise. Os grupos foram avaliados quanto as concentrações de IL6, e IL-10 no líquido peritoneal pelo método de ELISA.

Avaliação do efeito do DMA no modelo de edema induzido por carragenina em pata de camundongo

O modelo de edema induzido por carragenina em pata de camundongo foi escolhido para avaliar o efeito do DMA sobre o edema. Kowaluk et al (2000a) mostraram que o ABT-702 (inibidor de adenosina quinase) diminui o edema neste mesmo modelo. Foram avaliados dois grupos de camundongos swiss entre 25-30g: o grupo controle (tratado com veículo) e um grupo tratado por gavagem com DMA (30mg/kg), uma hora antes da indução da inflamação. O protocolo foi realizado de acordo com o modelo de edema de pata descrito no item 3.5. Este protocolo foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Prof. Dr. Antônio Lapa, na Faculdade Paulista de Medicina, sob orientação da Profa. Dra. Salete Castro.

Avaliação do efeito do DMA sobre a dor no modelo experimental de dor “Liking Test”, induzido por formalina

Já está definido que a adenosina é um importante neuromodulador em sistema nervoso central e periférico. A adenosina regula a transmissão da dor principalmente através do receptor A₁ e parece ter um papel relevante na dor de origem neuropática e inflamatória (Sawynok e Liu, 2003). Através do modelo experimental de dor induzido por formalina em pata de camundongo, buscou-se avaliar o efeito do DMA sobre a dor de característica neuropática e inflamatória. Foram avaliados 2 grupos de camundongos swiss entre 25-30g: o grupo controle (tratado com veículo- goma arábica) e um grupo tratado por gavagem com DMA (30mg/kg), uma hora antes injeção de formalina. O protocolo foi realizado de acordo com o modelo “Liking test” descrito no item 3.5. Este protocolo foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Prof. Dr Antônio Lapa, na Faculdade Paulista de Medicina, sob orientação da Prof^a. Dra. Salete Castro.

Avaliação dos efeitos do DMA sobre a peritonite asséptica em camundongos com inativação do TLR4 (C3H/HeJ)

Os receptores de membrana “Toll-like” são peças chave na regulação da resposta imune inata. Existem evidências do envolvimento da adenosina na sinalização intracelular mediada pelos TLRs (conforme já citado no item 1.9). A adenosina poderia atuar regulando negativamente a ação dos TLRs. Para avaliar esta possibilidade, os camundongos deficientes para TLR4 (TLR4^{-/-} ou C3H/HeJ) e os selvagens (TLR4^{+/+} ou C3H/HeN) foram submetidos à peritonite inflamatória, tratados com o DMA (30mg/kg) ou veículo e avaliados quanto a migração de leucócitos e neutrófilos para cavidade no modelo de peritonite asséptica descrito no item 3.5.

Avaliar o efeito do DMA sobre o processo inflamatório no modelo experimental de artrite aguda

Levando em conta que o DMA promoveu uma proteção contra o processo inflamatório nos outros modelos, buscou-se um modelo que avaliasse conjuntamente os parâmetros de migração de células inflamatórias, edema e dor. Para tanto foram avaliados então dois grupos de ratos Wistar, machos, entre seis e sete semanas e com aproximadamente 250g. O grupo controle foi tratado com veículo e um grupo tratado com DMA (30mg/kg), administrados por gavagem uma hora antes da injeção intraarticular de carragenina. O protocolo foi realizado de acordo com o modelo de artrite aguda induzida por carragenina descrito no item 3.5.

3.8- Protocolos experimentais em cultura de células

Diluição dos compostos utilizados em cultura

O DMA foi pesado e diluído em DMSO para uma concentração de 10mM. As diluições subsequentes necessárias foram feitas em PBS. Utilizou-se no máximo 10µl da solução para cada 1 ml de meio. A 8-SPT é diluída em PBS, assim como o LPS.

Diferenciação das células THP-1

As células THP-1 foram contadas e distribuídas em igual número nas garrafas de cultura. Em seguida adicionou-se o PMA na concentração de 100nM. Após 48hs as células estavam aderidas e diferenciadas.

Avaliação da ação do DMA sobre a ativação do NF- κ B

Tanto os neutrófilos humanos, quanto os macrófagos murinos foram semeados em placas de cultura de células, em quantidades iguais. Três grupos foram avaliados: controle, LPS (5 μ g/ml), e um grupo estimulado com LPS(5 μ g/ml) e pré-tratado com DMA (100nM) por 20 minutos. Quarenta minutos após o estímulo com LPS as células foram coletadas. A ativação do NF- κ B avaliados através de “Western blot” para a subunidade p65 no extrato nuclear esta de acordo com o descrito no item 3.6.

Avaliação da ação do DMA sobre a expressão de TLR4

Os macrófagos murinos foram semeados em placas de cultura de células, em quantidades iguais. Quatro grupos foram avaliados após duas horas de estímulo: controle, DMA 100nM, DMA300nM, Adenosina 100 μ M. As células foram então coletadas, o RNA extraído e o “Realtime PCR” realizado de acordo com o descrito no item 3.6.

Avaliação da ação do DMA sobre a ativação do PPAR

As células THP-1 foram semeadas em placas de cultura de células, em quantidades iguais. Os grupos foram avaliados após duas horas de estímulo. Foram testadas concentrações de adenosina (100nM, 300nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 300 μ M) , DMA (10nM, 30nM, 100nM, 300nM) e alguns grupos foram pré-tratados com 8-SPT 10 μ M e estimulados com DMA (100nM ou 300nM). Alguns experimentos foram realizados com

células THP1 indiferenciadas, outros com células THP-1 diferenciadas (pré- tratamento com PMA 100nM por 48hs). As células foram então coletadas, a fração nuclear extraída e o EMSA para PPAR realizado de acordo com o descrito no item 3.6.

3.9- Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do teste “t Student’s” quando comparados dois grupos e pela análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Bonferroni) quando apropriado. A significância estatística adotada foi $p < 0,05$ (a não ser quando especificado o contrário).

4- RESULTADOS

O DMA diminui a migração de leucócitos/neutrófilos no modelo de peritonite asséptica em camundongos

O composto DMA atua inibindo a atividade da adenosina quinase aumentando a disponibilidade extracelular de adenosina que tem sido considerada um importante mediador endógeno com propriedades antiinflamatórias. Assim sendo, ao tratar com o DMA camundongos, submetidos ao modelo de peritonite asséptica esperava-se um aumento da concentração de adenosina extracelular levando a uma diminuição no acúmulo de leucócitos, principalmente de neutrófilos no lavado peritoneal. Esse efeito foi observado de forma consistente, com a diminuição do número de leucócitos na cavidade em torno de aproximadamente 48% e neutrófilos em 60%. Para melhor compreensão da cinética do composto foi também realizada uma curva de temporal e a relação dose-resposta.

Os resultados mostraram uma redução significativa na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos tratados com o composto no momento da indução da inflamação ($\cong 59\%$), assim como nos tempos de uma e duas horas de pré-tratamento ($\cong 55\%$ e 30% , respectivamente). (Figura 1A)

Nas doses avaliadas de 3mg/kg, 10mg/kg, 30mg/kg e 90mg/kg de DMA o composto mostrou uma redução dose dependente da migração de neutrófilos de 9%, 33%, 55% e 70%, respectivamente (Figura 1B).

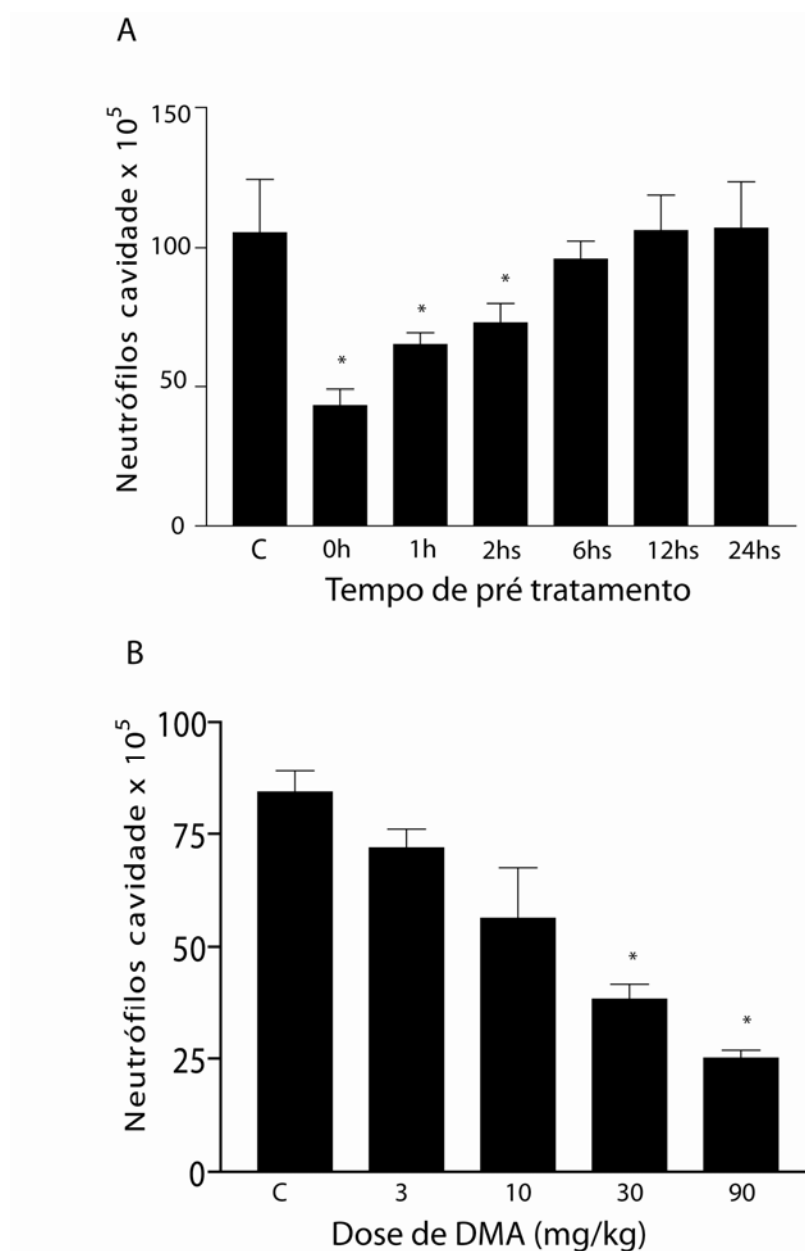


Figura 1- Peritonite asséptica (A) Curva tempo/resposta: Em relação ao controle houve redução na migração de neutrófilos nos tempos 0h, 1h e 2hs de pré tratamento (* $p < 0,05$). **(B)** Relação dose/resposta: em relação ao controle houve redução na migração de neutrófilos nas doses de 30mg e 90mg (* $p < 0,05$).

Caracterização da adenosina como principal agente do efeito antiinflamatório do DMA no modelo de peritonite asséptica

Como o DMA diminuiu o acúmulo de leucócitos/neutrófilos no lavado, buscou-se demonstrar que esse pode ser um efeito do aumento da concentração de adenosina e consequente ação sobre seus receptores. Foi então injetado no peritônio um antagonista de receptor de adenosina, 8-sulfo-phenil-teofilina (8-SPT). Ficou evidente que a 8-SPT reverte o efeito do composto DMA e isso demonstra que o efeito do DMA depende dos receptores de adenosina (Figura 2).

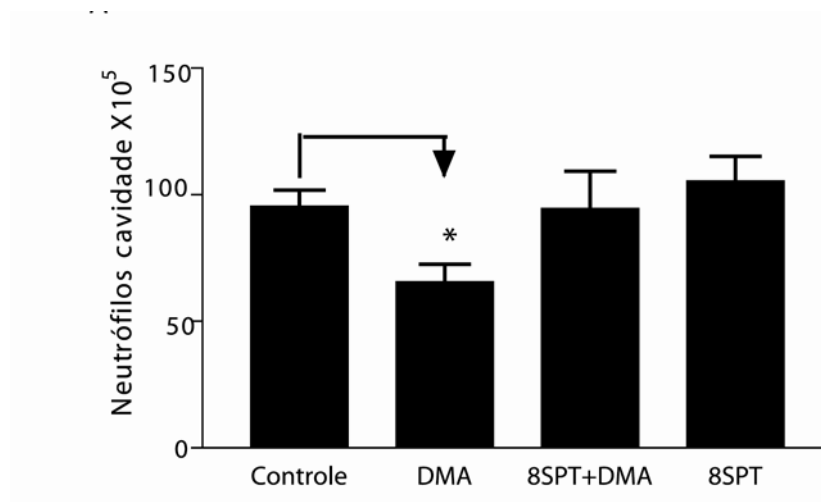


Figura 2- (A) Efeito da 8-SPT sobre a ação do DMA. Avaliados quatro grupos (n = 7). Os camundongos foram tratados e imediatamente após foi induzida a peritonite. Redução do número de neutrófilos no grupo tratado com DMA comparando com o controle (*p < 0,05). O grupo pré-tratado 8-SPT, seguido de tratamento com DMA têm número de neutrófilos por cavidade igual ao controle.

O DMA reduz as concentrações de IL6 e IL10 no líquido peritoneal

Nas dosagens destas citocinas (ELISA) no líquido peritoneal de camundongos submetidos a peritonite asséptica por tioglicolato, observou-se no grupo de camundongos pré tratados com DMA (n=8) uma redução na concentração de IL-6 ($\cong 35\%$) e IL-10 ($\cong 20\%$) em relação ao controle ($p < 0,005$ em ambas as dosagens) (Figura 3).

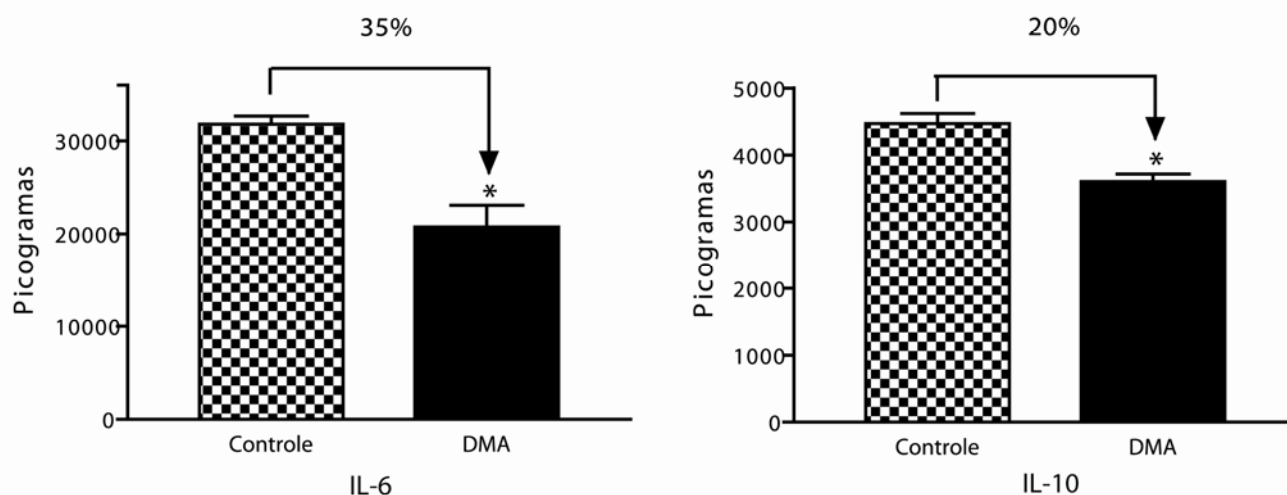


Figura 3- Dosagem de citocinas no líquido peritoneal (* $p < 0,005$). DMA reduziu 35% a concentração de IL-6 e 20% a de IL-10

O DMA diminui o edema e a dor em modelos experimentais em camundongos

No modelo do “Liking test” observou-se que o DMA (30mg/Kg) reduziu o comportamento sugestivo de dor em aproximadamente 40% na segunda fase do teste. O tempo de lambertura aferido para o grupo controle (n = 6) foi de $212,5 \pm 20,1$ seg e para o grupo tratado com DMA (n = 6) de $129,5 \pm 18,7$ seg ($p < 0,01$) (Figura 4A).

O modelo de edema de pata induzida por carragenina, no grupo tratado com o DMA (30mg/kg), demonstrou diminuição do edema em relação ao grupo tratado com veículo (n = 6), a partir da segunda hora ($\cong 38\%$); no entanto, essa diferença só passa a ser significativa ($p < 0,05$) nos tempos de quatro ($\cong 38\%$) e seis horas ($\cong 45\%$) (Figura 4B).

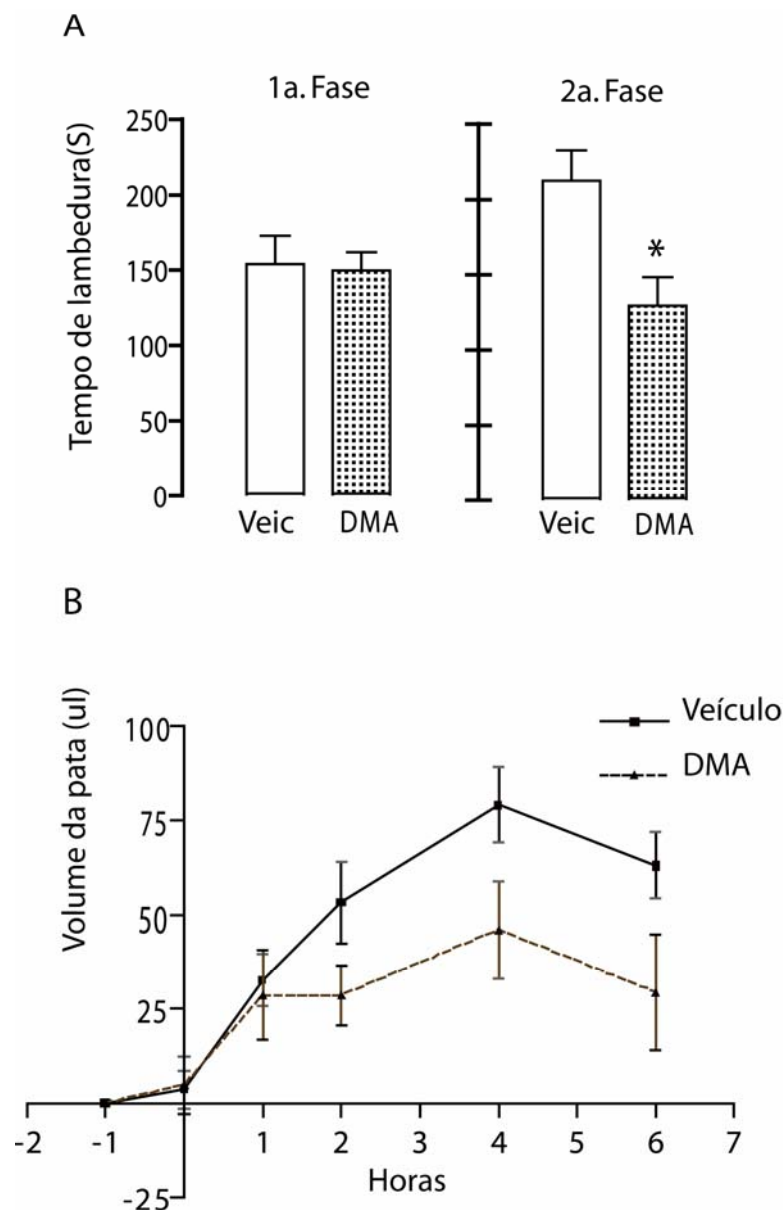


Figura 4- Dor e edema (A) “Liking test”. Na primeira fase que corresponde aos 5 minutos após a injeção da formalina na pata não houve diferença entre os grupos. Na segunda fase que corresponde ao tempo de 15 a 30 minutos, após a injeção de formalina, o DMA reduziu a dor (* $p < 0,01$). **(B)** Neste modelo de edema induzido por carragenina o volume da pata foi aferido nos tempos imediatamente antes do tratamento com veículo ou DMA ($t = -1h$), imediatamente antes da aplicação da carragenina ($t = 0h$), e 1,2, 4 e 6 horas depois ($t = 1h, 2hs, 4hs$ e $6hs$), com diferença significativa nos tempos de 4 e 6 horas (* $p < 0,05$)

O DMA diminui a artrite aguda experimental em ratos

A injeção de carragenina, no grupo controle, promoveu um aumento do diâmetro do joelho (em 2hs $\cong 25\%$ e em 4hs $\cong 28\%$) e alteração da marcha, mais evidente na quarta hora após a indução da inflamação. O tratamento com DMA (30mg/kg) reduziu o edema articular significativamente já na segunda hora ($\cong 30\%$) em relação ao controle (n = 8, Δ diâmetro articular $2,06 \pm 0,16$ mm vs. $1,53 \pm 0,13$ mm; $p < 0,05$). Na quarta hora, a redução do edema foi de aproximadamente 35% (n = 8, Δ diâmetro articular $2,61 \pm 0,17$ mm vs. $1,58 \pm 0,21$ mm; $p < 0,01$) (Figura 5A). O número de polimorfonucleares no lavado articular do grupo tratado com DMA diminuiu em torno de 50% (n = 8; $28,6 \times 10^6 \pm 5,2$ células/ml vs. $13,8 \times 10^6 \pm 1,7$ células/ml) (Figura 5B). A escala de dor também estava reduzida no animal tratado com DMA, mas de forma significativa apenas na quarta hora (n=8; $2,62 \pm 0,18$ vs. $1,53 \pm 0,136$; $p < 0,05$), possivelmente porque na segunda hora até mesmo o grupo controle demonstrava pouca dor (n = 8; $0,37 \pm 0,18$ vs. $0,25 \pm 0,16$) (Figura 5C)

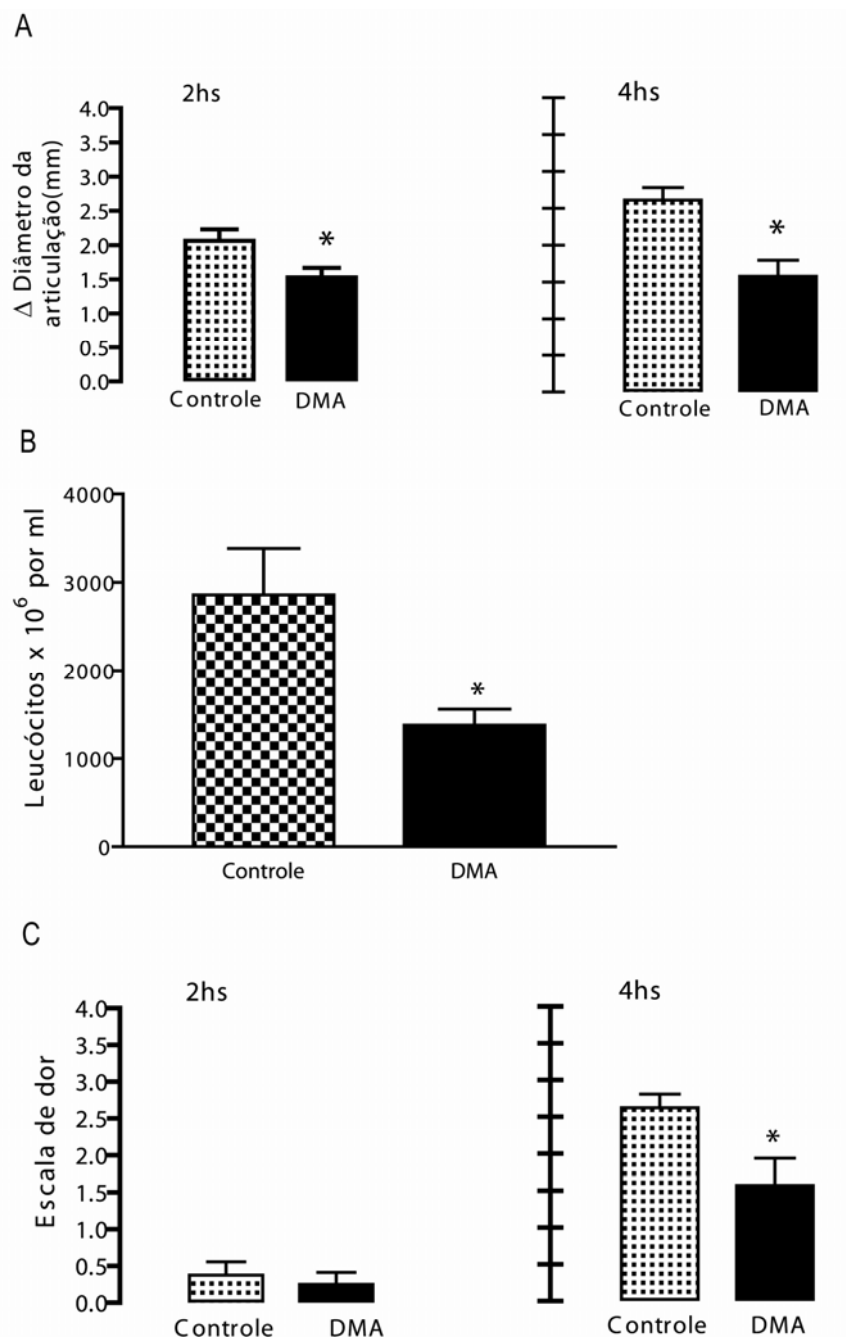


Figura 5- Artrite aguda. (A) Avaliação do diâmetro articular 2 e 4hs após indução da artrite: redução significativa no grupo tratado com DMA (*p < 0,01). (B) Contagem de leucócitos no lavado sinovial 4hs após indução da artrite: redução de $\approx 50\%$ no grupo tratado com DMA (*p < 0,05). (C) Escala de dor. Avaliação realizada 2 e 4hs após indução da artrite: redução significativa no tempo de 4 horas no grupo tratado com DMA (*p < 0,05).

O DMA reduz a ativação do NF- κ B em macrófagos e neutrófilos

Foi realizado “Western Blot” para proteína P-65 do NF- κ B em extrato nuclear de neutrófilos humanos e macrófagos de camundongo em cultura. Além do grupo controle, as células foram estimuladas apenas com LPS (5 μ g/ml) ou pré-tratadas com DMA por 20 minutos e em seguida estimuladas com LPS. Observou-se a diminuição da migração do P-65 para o núcleo nas células estimuladas com LPS e tratadas com DMA, em comparação às apenas estimuladas com LPS (Figura 6).

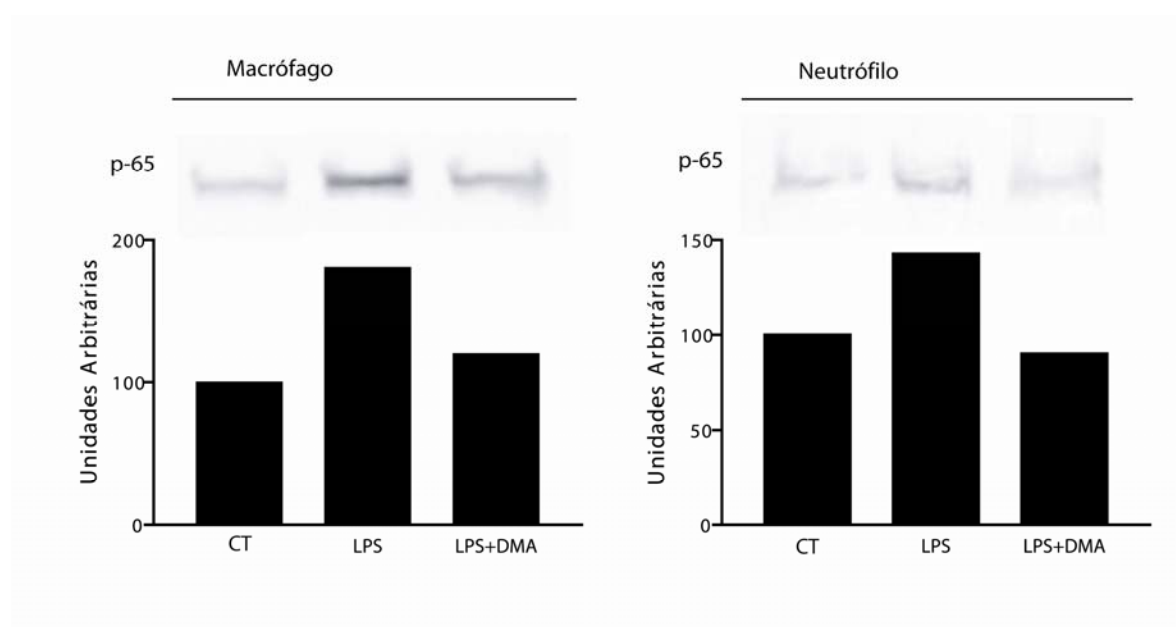


Figura 6- Ação do DMA sobre translocação de NF- κ B. Extrato nuclear macrófagos de camundongo e neutrófilos. As células foram divididas em 3 grupos: controle, estímulo com LPS 5ng/ml (40 min) e estímulo com LPS (40 min) mais pré tratamento com DMA 100nM (30 min). O DMA reduz a translocação de p-65 (NF- κ B) para o núcleo. Figura representativa de três experimentos.

Avaliação da participação do receptor Toll-Like 4 (TLR4) no efeito antiinflamatório do DMA

Para avaliar a participação do receptor TLR4 no efeito antiinflamatório do DMA utilizou-se camundongos C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) no modelo de peritonite asséptica induzida por tioglicolato sabendo-se que apesar de deficientes para o TLR4, os camundongos C3H/HeJ respondem ao estímulo de tioglicolato, recrutando aproximadamente 2,5 vezes mais leucócitos por cavidade do que quando injetados com PBS (Cotena et al., 2004). Quando os TLR4^{-/-} foram tratados com DMA ou veículo observou-se que o DMA não diminuiu a migração de células inflamatórias para cavidade peritoneal dos camundongos TLR4^{-/-} como faz nos TLR4^{+/+}. Nos TLR4^{+/+} o DMA diminuiu em $\cong 34\%$ a migração de leucócitos para a cavidade ($164,1 \pm 8,3$ células/ml vs. $108,2 \pm 4,9$ células/ml; $p < 0,01$) e em $\cong 45\%$ a migração de neutrófilos ($126,1 \pm 9,2$ células/ml vs. $70 \pm 5,3$ células/ml; $p < 0,01$). Já nos TLR4^{-/-} observou-se um aumento não significativo na migração de leucócitos ($66,8 \pm 4,8$ células/ml vs. $75,7 \pm 7,5$ células/ml) e neutrófilos ($26,4 \pm 2,5$ células/ml vs. $37,0 \pm 5,9$ células/ml) nos camundongos tratados com DMA (Figura 7A e B)

Para investigar se o DMA modula, *in vitro*, a expressão do TLR4, macrófagos de camundongo em cultura foram estimulados com DMA (100 e 300nM) por duas horas e avaliados através da “Real Time PCR”. Demonstrou-se uma redução na expressão do TLR4 em torno de 40% em ambas as concentrações de DMA testadas (Figura 7C).

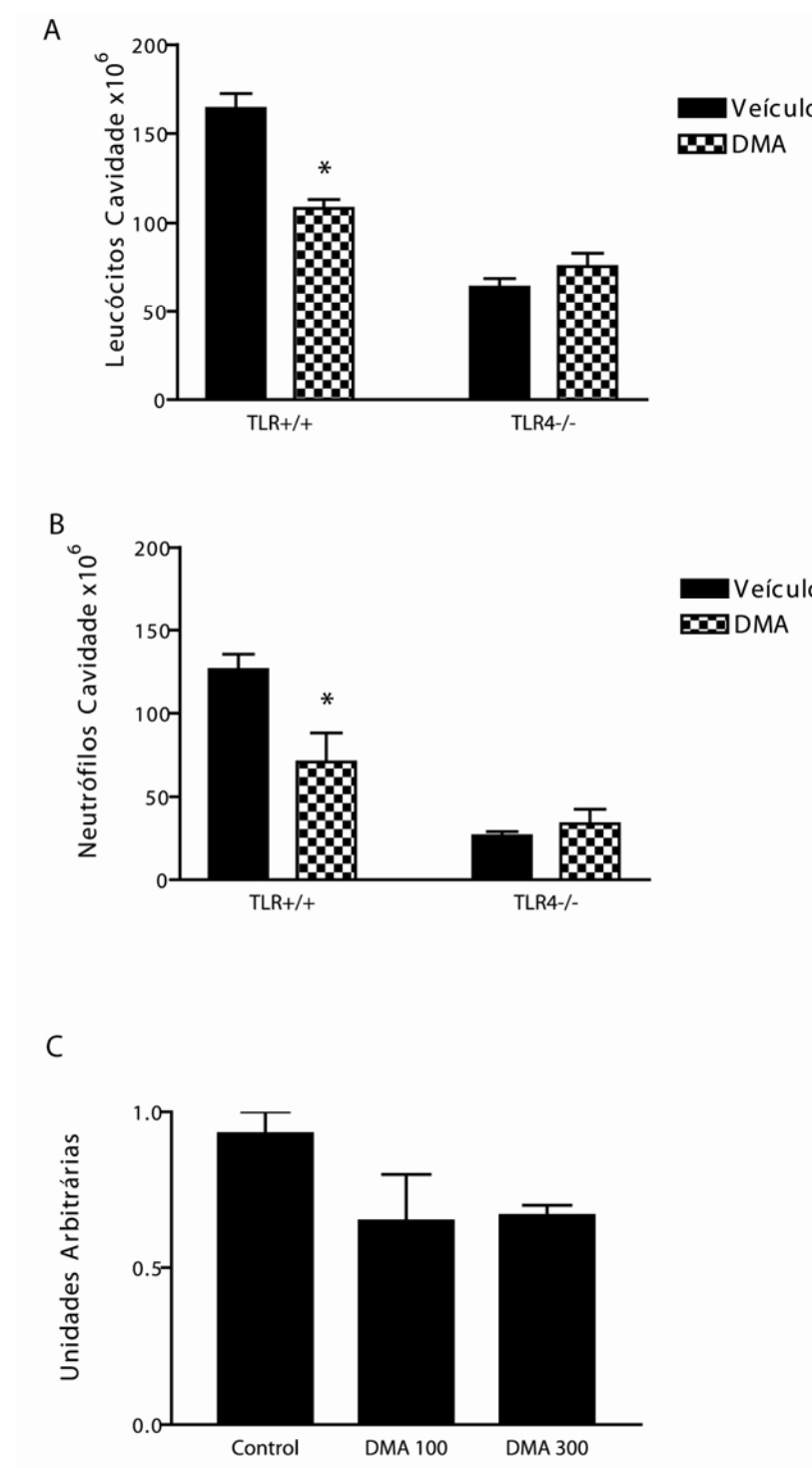


Figura 7- Ação do DMA sobre TLR4. DMA não reduz migração de leucócitos **(A)** ou neutrófilos **(B)** em animais TLR4-/- (n= 8 por grupo). **(C)** O DMA diminui a expressão de TLR4 *in vitro*.

Modulação da ativação do PPAR pela adenosina e DMA *in vitro*

Os PPARs apresentam efeitos antiinflamatórios utilizando mecanismos agonistas-dependentes para reprimir a atividade de vários fatores de transcrição, entre eles o NF- κ B. Utilizando uma linhagem monocítica (THP-1), foi investigada uma possível interação entre a adenosina e os PPARs. Observou-se, então, que tanto a adenosina quanto o DMA foram capazes de aumentar a ativação do PPAR nas células THP-1. A adenosina foi capaz de ativar a ligação do PPAR ao DNA a partir da concentração de 1 μ M, sendo a concentração de 10 μ M a mais potente (Figura 8A). O DMA, por sua vez, foi eficaz a partir da concentração de 100nM, apresentando efeito máximo na concentração de 300nM. O pré-tratamento com 8-SPT na concentração de 10 μ M suprimiu quase totalmente o efeito do DMA (Figura. 8B). Buscou-se então avaliar a ação do DMA sobre uma cultura celular que assemelha-se mais aos macrófagos. Para tanto as células THP-1 foram submetidas a diferenciação através do tratamento com PMA. Nas células diferenciadas (macrófagos) observou-se também que a adenosina e o DMA eram capazes de ativar os PPARs. No entanto, curiosamente, observou-se que as bandas correspondentes aos experimentos utilizando as células THP-1 diferenciadas eram visualizadas mais abaixo do que as correspondentes às THP-1 indiferenciadas (monócitos) (Figura. 8C). Além disso, as células diferenciadas pareciam mais sensíveis a concentrações mais baixas, tanto de adenosina, quanto de DMA, sendo que o efeito aparentemente variava pouco em relação às concentrações utilizadas. Este dado é fruto de avaliações preliminares e necessita de confirmação. Para determinar a especificidade da banda observada, os extratos nucleares (EN) de macrófagos e monócitos foram pré-incubados com a sonda fria (SF) (Figura 8D).

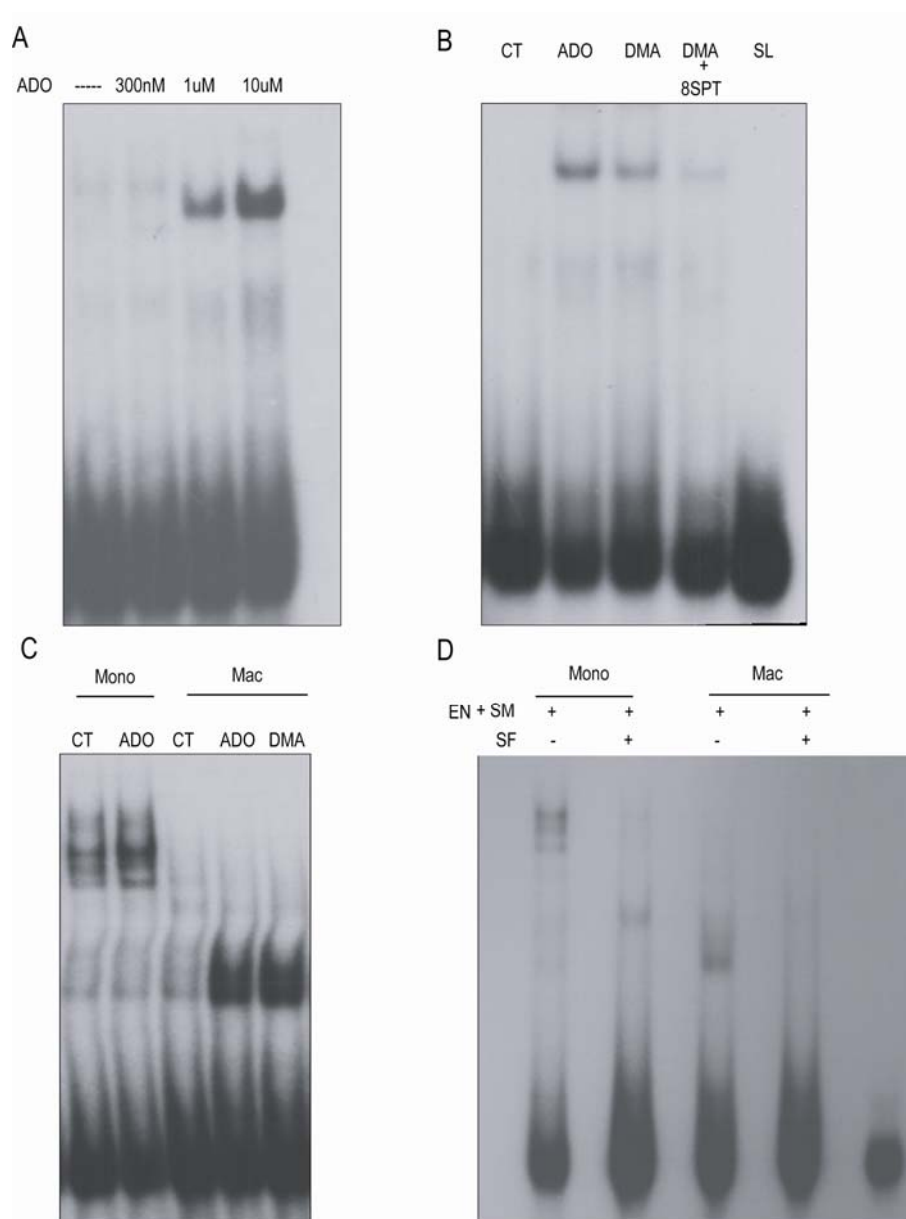


Figura 8- Ação do DMA e adenosina sobre a ativação de PPAR. (A) Monócitos estimulados com diferentes concentrações de ADO. **(B)** Monócitos estimulados com ADO 10 μ M, DMA 100nM e DMA 100nM+8-SPT 10 μ M. **(C)** Diferentes alturas para as bandas monócitos e macrófagos (ADO 10 μ M, DMA 100nM). **(D)** Experimento com sonda fria para demonstrar especificidade.

5- DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o composto DMA (Franchini PCT/BR2004/00019, 2004), inibidor de adenosina quinase, tem efeitos antiinflamatórios em modelos experimentais de inflamação aguda em animais e cultura de células. O DMA inibiu, de forma dose dependente, a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório no modelo de peritonite asséptica e diminuiu a concentração de IL-6 no exudato peritoneal. O DMA também foi efetivo na redução da inflamação nos modelos de edema de pata e artrite aguda induzidos por carragenina, além de mostrar efeito analgésico, relacionado ao seu potencial antiinflamatório, no modelo de dor do “Liking test”. O tratamento de células, *in vitro*, com DMA diminuiu a expressão do receptor TLR4, reduziu a translocação de NF- κ B induzida por LPS para o núcleo e aumentou a ativação de PPAR. Esses efeitos sugerem para o DMA um papel de regulação negativa no processo inflamatório.

O composto DMA pertence à família de quinazolinas. Derivados de 4-anilinoquina-zolinas têm sido utilizados como base para o desenvolvimento de uma ampla gama de agentes farmacológicos, tais como: inibidores de tirosina-quinases (e.g. receptor do fator de crescimento epidérmico - EGFR), antagonistas α -adrenérgicos e inibidores de fosfodiesterases do tipo 5 (PDE5) (Rewcastle, 2000; Minarini et al., 1998; Ukita, 2001). Interessado inicialmente no estudo das tirosina-quinases, um grupo de pesquisa do nosso laboratório sintetizou uma série de derivados de 6,7-dimetóxi-4-N-anilinoquinazolinas 3'- e 4'-substituídas (4a-4j e 4b'-4j') para avaliação de seus efeitos biológicos (Rocco, 2002). Dentre os vários derivados sintetizados, demonstrou-se que um dos compostos 6,7-dimetóxi-4-N-(3'-N,N-dimetilfenil)aminoquinazolina (DMA) era capaz de inibir as tirosina-quinases apenas em concentrações relativamente elevadas. Por outro lado, a inibição da adenosina-quinase ocorria em baixas concentrações (IC₅₀ 0,8nM). Comparado com o inibidor padrão de ADK, a 5-Iodotubercidina (5-IT), o DMA revelou-se mais potente. Desta forma, a ação do DMA sobre a adenosina quinase resultaria no aumento de concentração de adenosina tecidual, conforme foi demonstrado em nosso laboratório (Marin, 2007). A hipótese do presente trabalho foi de que o DMA apresentaria propriedades antiinflamatórias consequentes a esse aumento de concentração e subsequente atividade imunomoduladora da adenosina.

Alguns outros parâmetros farmacocinéticos importantes (considerando-se dose oral) foram determinados em ratos: o DMA apresentou rápida absorção com um valor de $t_{1/2}$ de 12,8 minutos e uma velocidade de eliminação de $t_{1/2}$ de 63 minutos. Após os estudos farmacocinéticos foi padronizado que os ratos recebessem dose única de gavagem de DMA (30mg/kg) para o estudo do perfil de adenosina nos tecidos. Foi observado um aumento de adenosina em fígado, cérebro e coração após uma hora (Esquema 1). Tomando como base estes resultados, a dose de 30mg/kg também foi estipulada para os nossos experimentos *in vivo*. Experimentos em corações isolados de ratos, perfundindo-os com 100nM de DMA durante uma hora e meia, em condições basais, mostraram aumento de 64% na concentração da adenosina tecidual quando comparados aos controles (Marin, 2007). Esse valor de 100nM foi utilizado, então, como ponto de partida para a concentração de DMA nos experimentos *in vitro* deste estudo.

A opção de estudar os efeitos do DMA em modelos agudos de inflamação, deu-se inicialmente porque o composto é pouco hidrossolúvel, inviabilizando a utilização de bombas de infusão nos animais de experimentação. Essa característica dificulta o tratamento a longo prazo requerido pelos modelos crônicos. Ao mesmo tempo, alguns trabalhos já avaliavam outros inibidores de ADK, em sua maioria em modelos agudos (Koluwaluk et., 2000, Boyle et al., 2000, Gomtsyan 2004, McGaraughty et al., 2001). Neste estudo foram então utilizados modelos de inflamação em animais de experimentação, já amplamente descritos: peritonite asséptica induzida por tioglicolato, edema de pata induzido por carragenina, “Liking test” induzido por formalina e artrite aguda induzida por carragenina. Em todos os modelos avaliados o DMA foi capaz de diminuir o processo inflamatório e os resultados indicam que a adenosina tem um papel importante nesta regulação.

A concentração de adenosina nos fluidos corporais resulta do equilíbrio entre as taxas de síntese (5-nucleotidase), fosforilação (ADK) e deaminação (ADA). Dessa forma, qualquer interferência em algum desses processos pode alterar este balanço. A inibição da ADK diminui a velocidade em que a adenosina é incorporada nos “pools” de nucleotídeos, o que aumenta a concentração local de adenosina e seus efeitos no espaço extracelular (Davis et al., 1984). Um inibidor de adenosina quinase, como o DMA, tende a alterar a

concentração de adenosina de forma mais marcante em tecidos submetidos a “stress”, onde o metabolismo de nucleotídeos é maior, como por exemplo, no sítio inflamatório. O aumento da concentração de adenosina levaria a uma redução na ação imuno celular mediada por neutrófilos (Cronstein et al., 1986, Cronstein, 1994), bloquearia a adesão de neutrófilos mediada por selectina e $\beta 2$ integrina em células endoteliais (Cronstein et al., 1992; Firestein, 1994) e diminuiria a produção de superóxidos, citocinas e quimiocinas no local, consequentemente reduzindo a migração de células inflamatórias.

A peritonite asséptica induzida por tioglicolato é um modelo de inflamação aguda quando a coleta do lavado peritoneal é realizada depois de quatro horas da injeção do tioglicolato. Durante este período se dá tanto o pico da concentração dos polimorfonucleados, principalmente neutrófilos, assim como de algumas citocinas pró-inflamatórias (Baron e Proctor, 1982; Chadzinska et al., 2001). Neste modelo demonstrou-se que: 1) O DMA reduziu a migração de leucócitos/neutrófilos para a cavidade peritoneal; 2) O efeito do DMA sobre a migração de leucócitos/neutrófilos é dose dependente; 3) A 8-SPT, antagonista do receptor de adenosina, reverteu o efeito do DMA sobre a migração de leucócitos/neutrófilos; 4) O DMA reduziu as concentrações de IL-6 e IL-10 no líquido peritoneal dos camundongos. A administração de dose única de DMA, imediatamente antes da indução da peritonite, levou à redução de aproximadamente 60% na migração de neutrófilos, na dose padrão de 30mg/kg e de até 70% na dose de 90mg/kg. Observou-se também uma diminuição significativa na variabilidade da resposta com o aumento progressivo da dose.

A reversão do efeito do DMA sobre a migração de neutrófilos, observada com o uso da 8-SPT é mais um elemento que corrobora a idéia de que o composto atua através do aumento da concentração de adenosina, de acordo com resultados prévios observados em nosso laboratório e anteriormente citados. Outros métodos como a dosagem de adenosina no exsudato peritoneal e em cultura de células estimuladas com DMA estão sendo desenvolvidos para confirmar essa hipótese.

A produção de citocinas tem papel fundamental na inflamação aguda e por esse motivo decidiu-se avaliar se o DMA seria capaz de alterar a concentração de dois destes mediadores no exsudato da peritonite asséptica, sendo eles IL-6 e IL-10. A IL-6 é uma

citocina multifuncional, produzida em resposta a estímulos inflamatórios, “stress” biomecânico e associada a quase todas as patologias inflamatórias crônicas, especialmente a Artrite Reumatóide (Cronstein, 2007). No nosso modelo de peritonite asséptica observou-se uma diminuição da concentração de IL-6 de quase 40%. Produzida por mononucleares, mas também por neutrófilos, a redução de IL-6 no exsudato provavelmente já reflete a ação da adenosina sobre os macrófagos residentes e os neutrófilos atraídos para o sítio inflamatório. Este resultado é condizente com o já descrito por Bouma et al sobre a capacidade da adenosina reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células endoteliais (Bouma et al 1994, Bouma et al 1996). A IL-10, no entanto, tem sido mais reconhecida pelo seu potencial antiinflamatório. Mais precisamente, estudos recentes esclarecem que a IL-10 inibe citocinas associadas à imunidade celular e à inflamação alérgica, enquanto estimula a resposta imune humoral e citotóxica (Steinke e Borish, 2006). Foi descrito que a adenosina aumentaria a secreção de IL-10 por macrófagos (Bouma et al 1994). No presente estudo, observou-se uma redução de aproximadamente 20% em relação ao grupo controle da concentração de IL-10. Este dado pode já ser conseqüente à diminuição do potencial inflamatório no local e, portanto, refletir uma diminuição subseqüente da produção de IL-10. Para chegar a esta conclusão seriam necessárias dosagens seriadas de IL-10 com início logo após o estímulo.

Para continuar avaliando o potencial antiinflamatório do composto foram escolhidos mais três modelos experimentais. No modelo de edema em pata de camundongo induzido por carragenina, demonstrou-se diminuição do edema no grupo tratado com DMA. Kowaluk et al (2000) obtiveram resultado semelhante neste mesmo modelo utilizando um outro inibidor de ADK (ABT-702), demonstrando também uma redução da infiltração de neutrófilos e da atividade de mieloperoxidase (MPO) na pata injetada, justificando assim a redução do edema observada. Outro mecanismo que pode estar relacionado com a redução do edema neste modelo é a atuação da adenosina diretamente sobre o endotélio. A adenosina quando se liga a seus receptores no endotélio leva a um aumento do AMP cíclico intracelular, desencadeando o fechamento das junções endoteliais e conseqüentemente favorecendo a função de barreira vascular. Essa regulação promove um mecanismo que sela o extravasamento vascular que se dá durante a interação dos neutrófilos com o endotélio. Assim sendo, para Eltzschig et al (2006), a modulação

exercida pela adenosina seria uma das maneiras pelas quais os neutrófilos, depois de sua passagem, reestabelecem a homeostasia local.

O modelo do “Liking test” foi escolhido por poder avaliar dois tipos de dor. Uma primeira fase associada à dor de aspecto neurogênico e uma segunda fase associada à dor inflamatória. A adenosina regula a transmissão da dor na medula espinhal e na periferia, particularmente pela ativação do receptor A_1 (Sawnok e Liu, 2003). Observou-se neste modelo uma redução significativa da dor de aspecto inflamatório (segunda fase), condizente com os nossos resultados supracitados, confirmando o potencial antiinflamatório do DMA. Já na primeira fase (dor neurogênica), não se demonstrou redução da dor. Kowaluk et al (2000a), no entanto, utilizando o ABT-702 (inibidor de ADK) no mesmo modelo, obtiveram resultados positivos em ambas as fases. Contudo, os dados com o ABT-702 revelam que, para obter resultados estatisticamente significativos, também na primeira fase, foram necessárias doses no mínimo três vezes maiores do que as efetivas para redução da dor na segunda fase. Além disso os efeitos de ABT-702 no modelo de dor neuropática de ligação de L5/L6 parecem ser mediados pela ativação de A_1 e não A_{2A} , o mesmo acontecendo no modelo de dor aguda térmica (Jarvis et al., 2000). Esses dados sugerem que os mecanismos de controle de dor são diferentes para dor de origem inflamatória se comparada com a dor neuropática. Outro dado interessante revela que o compartimento medular é importante para analgesia após a administração sistêmica de inibidores de ADK, pois a analgesia fica inibida pela injeção intratecal de metilxantinas que são antagonistas dos receptores A_1 e A_{2A} (McGaraughty et al., 2001; Zhu et al., 2001). Isso indica que esses inibidores de ADK promovem um aumento da disponibilidade de adenosina medular, capaz de modular a dor neurogênica. Como no estudo com o DMA, não foi realizada uma relação de doses-resposta para o modelo da formalina, talvez com um aumento da dose de DMA também se observasse seu efeito na fase de dor neurogênica.

O último modelo a ser avaliado foi o de artrite aguda induzida por carragenina. Este modelo está bem estabelecido, com pequenas variações no protocolo como a percentagem de carragenina, o uso concomitante ou não do caolin e o intervalo de tempo eleito para avaliação. Apesar de os modelos crônicos serem mais clássicos, foi feita a opção de utilizar apenas modelos agudos nesta fase da investigação, reservando os modelos de

artrite crônica para um próximo passo. O DMA, de acordo com o esperado após os resultados observados nos demais modelos, foi efetivo em todos os parâmetros avaliados para artrite. Esta é a primeira vez que o modelo de artrite aguda induzida por carragenina é utilizado para avaliar o potencial antiinflamatório de um inibidor de ADK. O inibidor de ADK ABT-702 (Boyle et al., 2001) e especialmente o agonista de receptor A₃ (CF101) (Baharav et al., 2005), por outro lado, já foram estudados nos modelos de artrite crônica. Um estudo de fase clínica II em artrite reumatóide utilizando o CF101 foi recentemente publicado com resultados promissores (Silverman et al., 2008); ao mesmo tempo, a adenosina tem sido apontada como principal agente responsável pela ação do Methotrexate (Montesinos et al., 2007), droga de escolha para iniciar o tratamento de artrite reumatóide. Dados como esses indicam que a modulação da adenosina em sítios inflamatórios tem potencial terapêutico real.

Inúmeros trabalhos investigaram os vários aspectos do processo de modulação da inflamação pela adenosina, sendo seus resultados contraditórios. Não foi o propósito deste trabalho explicar em detalhes todos os mecanismos de ação do DMA na inflamação, e consequentemente da adenosina, assunto por demasiado amplo e complexo. Dessa forma, o segundo objetivo específico deste trabalho foi uma tentativa inicial de investigar em modelos de cultura celular o efeito do composto DMA sobre algumas reconhecidas vias intracelulares de sinalização do processo inflamatório.

O estímulo dos receptores de adenosina, na maioria dos estudos *in vitro* e *in vivo*, resulta em um fenótipo antiinflamatório. Está demonstrado que o efeito da adenosina extracelular em neutrófilos depende da sua concentração, mas, de uma forma geral, tende a promover um “feedback” negativo, prevenindo um excesso de recrutamento e ativação dessas células. Já em monócitos/macrófagos estimulados por LPS, a ligação da adenosina aos seus receptores diminui a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-12, MIP-1 α), previne a expressão da óxido nítrico sintase, liberação de óxido nítrico e suprime a expressão de MHC-II. Em concordância com esses efeitos, vários estudos demonstraram que a adenosina diminui a ativação do fator de transcrição NF- κ B, principalmente através do receptor A_{2A}. (Hershfield, 2005).

Os resultados do presente estudo demonstram que o DMA foi capaz de diminuir a translocação induzida por LPS de p-65 para o núcleo em macrófagos de murinos e estão de acordo com os dados de Minguet et al. (2005) que mostraram que a adenosina bloqueou a fosforilação de IKB em células B esplênicas primárias também estimuladas com LPS. Já outros dois estudos que utilizam células de linhagem, RAW e U937, e estímulo com LPS, sugerem que os efeitos antiinflamatórios da adenosina nestas células não se devem à inibição de NF- κ B. Contudo, os níveis baixos de expressão dos receptores A_{2A}, nestas linhagens de célula e o uso apenas de um agonista A₁/A₃ em um deles permitem questionar a validade desta informação (Nemeth et al., 2003; Sajjadi et al., 1996). A fim de estabelecer o papel dos receptores específicos de adenosina na regulação de NF- κ B, camundongos nocautes para os receptores de adenosina têm sido utilizados. Os camundongos A_{2A}^{-/-}, por exemplo, são mais sensíveis que os seus controles, tanto ao choque séptico induzido por LPS quanto à inflamação induzida por CpG DNA, ao mesmo tempo apresentam maior ativação de NF- κ B e produção de citocinas quando tratados com LPS (Lukashev e Ohta, 2004). Dessa forma, apesar de não haver um consenso, existe a idéia de que a regulação de NF- κ B pela adenosina se dá preferencialmente através do receptor A_{2A}, mas nem todos os passos dessa via intracelular estão esclarecidos (Hershfield, 2005).

De acordo com os dados já citados na introdução existem evidências recentes de um sinergismo entre a adenosina e a sinalização entre os TLRs. Foi observado também um aumento significativo da expressão dos receptores A_{2A} em macrófagos humanos e murinos após a ativação de TLR4 por LPS (Murphree et al., 2005), o que sugere a presença de um mecanismo de interregulação. Resultados *in vivo*, do presente trabalho, no modelo de peritonite asséptica demonstram que o DMA perde a sua habilidade de reduzir o processo inflamatório em camundongos deficientes em TLR4 e pela primeira vez que a adenosina e o DMA em macrófagos, *in vitro*, diminuem a expressão de TLR4. Outro resultado do nosso laboratório também aponta para essa mesma direção. Corações de camundongos foram submetidos à análise através do método de microarranjos a fim de comparar a expressão gênica induzida após a administração da dose única de DMA. Observou-se uma tendência de repressão do TLR4 de duas vezes após 48 horas do tratamento (Deckmann, 2008). Estes resultados corroboram a hipótese de que a adenosina

está envolvida nesta via sinalizatória dos TLRs, inclusive regulando a expressão do TLR4, dado inédito e ainda não publicado.

Ainda investigando possíveis vias intracelulares de ação do DMA buscou-se avaliar se havia interação entre os receptores nucleares PPARs e adenosina. Utilizando o método de EMSA, capaz de avaliar a ativação de fatores de transcrição, observou-se que tanto a adenosina como o DMA eram capazes de aumentar a ativação dos PPARs. A idéia de explorar essa relação surgiu da observação de que muitas das ações mediadas pela adenosina eram compartilhadas pelos PPARs, como por exemplo o favorecimento de uma resposta Th2 (humoral) em relação a Th1 (celular). A adenosina reduz a produção de IL-12 por células dendríticas maduras e aumenta de forma significativa a expressão da membrana de CD86, HLA-DR e moléculas MHC classe I. As células dendríticas, quando em presença de adenosina, têm sua capacidade diminuída de promover a diferenciação de células T na direção Th1 (Panther et al., 2003.). Ao mesmo tempo, tem sido demonstrado que os PPARs são expressos nestas células e sua ativação parece inibir a produção de IL-12 e aumentar a expressão de CD80, CD86 e IL-4 (citocina Th2), favorecendo também uma resposta imune Th2 (Faveeuw et al., 2000, Gosset et al., 2001; Lovett-Racke et al., 2004) Em modelo experimental animal de miocardite auto-imune, a Pioglitazona, agonista de PPAR, reduziu o processo inflamatório, diminuindo os níveis de expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , IFN e aumentando a expressão da citocina IL-4, considerada parte da resposta Th2 (Hasegawa et al., 2005). Considerando estes dados, questionou-se se a adenosina e os PPARs poderiam então, em alguns momentos, pertencer a um mesmo sistema de regulação do processo inflamatório. Nesse contexto, os experimentos realizados mostraram ativação do PPAR pela adenosina e pelo DMA tanto das células THP-1 na forma não diferenciada, como na forma diferenciada. A ativação ficou evidente para adenosina a partir de concentrações relativamente baixas como 1 μ M. Em geral, estudos avaliando o estímulo adenosina, em cultura celular, utilizam doses em torno de 100 μ M.

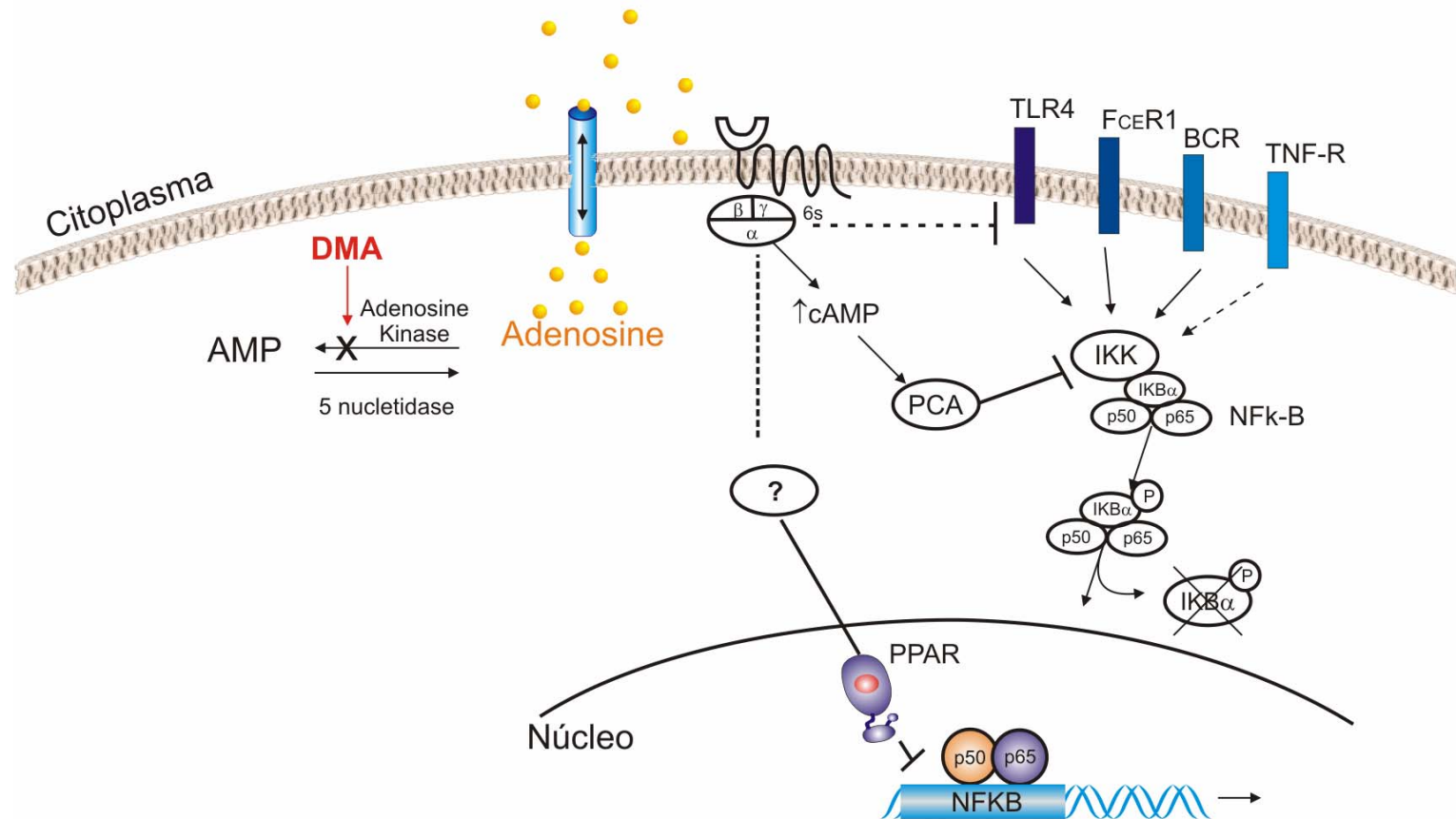
Os PPARs sabidamente regulam negativamente a atividade de NF- κ B, através do mecanismo de transrepressão (Glass e Ogawa, 2006); a adenosina também regula negativamente o NF- κ B, como já discutido previamente. Na revisão de Hershfield (2005)

sobre adenosina e NF- κ B o autor sugere que dois mecanismos possam estar provavelmente envolvidos: a adenosina evitaria a degradação de I κ B α retendo e bloqueando as subunidades de NF- κ B no núcleo ou, através de mecanismo ainda desconhecido, inibiria a atividade transcricional de NF- κ B já dentro do núcleo. Dentro desse cenário e tendo em mente os resultados, sugere-se que talvez esse segundo mecanismo de inibição da ativação de NF- κ B se dê através dos PPARs. Estes resultados são ainda preliminares e foram realizados em células de linhagem, mas podem indicar a existência de uma comunicação entre a adenosina, PPAR e NF- κ B (Esquema 4).

Os resultados aqui demonstrados são consistentes com a hipótese, já bem explorada, de que agentes que aumentam a concentração extracelular de adenosina são antiinflamatórios. Esta hipótese têm levado ao estudo de alguns compostos capazes de aumentar a concentração ou a atuação da adenosina em sítios de “stress”. Entre eles temos os agonistas de receptores de adenosina e os inibidores de adenosina quinase. Além disso, o aumento da liberação de adenosina tem sido apontado como um dos mecanismos de vários já conhecidos agentes antiinflamatórios como: Methotrexate, Sulfassalazina (Cronstein et al., 1999) e Salicilato de sódio (Croinstein, 1994).

O conceito de inflamação não mais se restringe a observação de um quadro agudo, recorrente ou não, e definido pelos sinais de dor, tumor, calor e rubor. Esse conceito foi ampliado e, além dos processos agudos, identifica-se uma enorme variedade de doenças determinadas por exacerbação crônica do processo inflamatório. Ao mesmo tempo, o conhecimento deixou de ser baseado apenas em observações macroscópicas para ser também consubstanciado por observações microscópicas e moleculares. Dentro desse contexto, nas últimas décadas o número de doenças qualificadas como inflamatórias aumentou. Foram incluídas patologias de alta prevalência como aterosclerose, obesidade e resistência à insulina que estão associadas às doenças cardiovasculares, identificadas como maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental. Como consequência, o entendimento da modulação do sistema imune é determinante para detectar possíveis alvos de atuação no controle destas patologias. As opções terapêuticas para lidar com a inflamação, aguda ou crônica, são até o momento limitadas, principalmente pelos efeitos colaterais. Apesar de muito utilizados ainda não existe uma classe de imunomoduladores

(em geral designados como antiinflamatórios) que combine eficiência e segurança. A investigação de novos compostos e mecanismos de ação é desejada e necessária. Este trabalho demonstrou as propriedades antiinflamatórias do DMA, um composto inédito, e alguns dos seus prováveis mecanismos de ação. Novos estudos serão realizados a partir destes dados, visando futuramente avaliar um eventual potencial terapêutico para o DMA em doenças inflamatórias em seres humanos.



Esquema 4- Esquema proposto para a ação do DMA, através da adenosina, sobre as vias do TLR4, NF-κB e PPAR.
(Modificado de Hershfiel, Eur. J. Immunol, 2005)

6- CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que :

O composto DMA, um novo e potente inibidor de adenosina quinase, é efetivo em reduzir o processo inflamatório em modelos experimentais em animais e em cultura de células.

O DMA age em múltiplos mecanismos do processo inflamatório, diminui a expressão de TLR4, mas não o suprime; ativa o PPAR e diminui atividade de NF- κ B. A sua atuação em diversos pontos do sistema imune aumenta a possibilidade de ajustes e contraregulações, o que poderia evitar efeitos colaterais indesejados.

A adenosina é capaz de modular a ativação dos PPARs e possivelmente a expressão dos TLR4, sugerindo assim novos mecanismos para regulação exercida pela adenosina no sistema imune.

Os dados apresentados são preliminares, mas promissores na investigação de um novo composto e seu eventual potencial terapêutico para doenças inflamatórias em seres humanos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baharav E, Bar-yehuda S, Madi L, Silberman D, Rath-wolfson L, Halpren M et al. Antiinflammatory Effect of A3 Adenosine Receptor Agonists in Murine Autoimmune Arthritis Models. *J Rheumatol* 2005; 32:469–76.

Baron EJ e Proctor RA. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *J. immunol methods* 1982; 49: 305-311.

Beuttlér B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257-263.

Bouma MG, Stad RK, Van den Wildenberg FAJM., Buurman WA. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J immunol* 1994; 153: 389-396.

Bouma MG, Van den Wildenberg FAJM, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996; 270: C522-C529.

Boyle DL, Kowaluk EA, Jarvis MF, Lee CH, Bhagwat SS, Williams M, Firestein GS. Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296(2):495-500.

Chadzinska M, Maj M, Scislowska-Czarnecka A, Przew³ocka B, Plytycz B. Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol* 2001; 53,715–718.

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 2001; 7:53–58.

Cotena A, Gordon S, Platt N. The class A macrophage scavenger receptor attenuates CXC chemokine production and the early infiltration of neutrophils in sterile peritonitis. *J Immunol.* 2004; 15;173(10):6427-32.

Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 1983; 1;158(4):1160-77.

Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury in endothelial cells. *J. Clin Invest* 1986; 78: 760-770.

Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 1992; Apr 1;148(7):2201-6.

Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leucocyte accumulation in vivo model of inflammation *J. Clin. Invest* 1993; 92: 2675-2682

Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76, 5-13

Cronstein BD, Dwight N, Firestein G. The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1040-1045.

Cronstein BN, Montesinos MC, Weissmann G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 25;96(11):6377-81.

Cronstein BN. Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65 Suppl 1:S11-5. Review.

Davies LP, Jamieson DD, Baird-Lambert JA, Kazlauskas R. Halogenated pyrrolopyrimidine analogues of adenosine from marine organisms: pharmacological activities and potent inhibition of adenosine kinase. *Biochem Pharmacol* 1984; 1;33(3): 347-55.

Decking UKM, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res*. 1997 81:154-64.

Deckmann AN. Estudo da expressão gênica global na fase tardia da proteção cardíaca induzida por compostos quinazolínicos em corações de camundongos. [Tese-Doutorado] Campinas (SP); Universidade Estadual de Campinas; 2008.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4 161-174.

Eltzschig HK, Weissmüller T, Mager A, Eckle T. Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol*. 2006; 341:73-87.

Fan J, Malik AB. TLR4 signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med*; 2003a 9: 315-321.

Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J. Clin Invest* 2003b; 112 :1234-1243.

Faveeuw C, Fougeray S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett*. 2000; 15;486(3):261-6.

Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49:381-402.

Franchini, K. G.; Marin, R. M.; Saad, M. J. A.; Rittner, R.; Rocco, S. A. Compounds 4-anilinoquinazoline derivatives with adenosine-kinase inhibitory properties. PCT/BR2004/00019, 2004.

Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Shulte G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol* 2001; 61: 443-448.

Gao ZG, Jacobson KA. Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opin Emerg Drugs* 2007; 12:479–492.

Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(1):44-55.

Gomtsyan A; Lee CH. Nonnucleoside inhibitors of adenosine kinase. *Curr. Pharm. Des*. 2004a; 10, 1093.

Gomtsyan A, Didomenico S, Lee C-H, Stewart AO, Bhagwat SS, Kowaluk EA.; Jarvis MF. Synthesis and biological evaluation of pteridine and pyrazolopyrimidine based adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004b; 14, 4165.

Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, Tonnel AB, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31(10):2857-65.

Gunther GR, Herring MB. Inhibition of neutrophil superoxide production by adenosine released from vascular endothelial cells. *Ann. Vasc Surg* 1991; 5: 35-330.

Hasegawa H, Takano H, Zou Y, Qin Y, Hizukuri K, Odaka K, Toyozaki T, Komuro I. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 balance. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38(2):257-65.

Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabó C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J*. 2000;14(13):2065-74.

Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunol* 2004; 25: 33-39.

Hayden MS e Ghosh S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 2008; 132 344-363.

Hershfield MS. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J immunol* 2005; 35:25-30.

Hirschhorn R, Roegner-Maniscalco V, Kuritsky L, Rosen FS. Bone marrow transplantation only partially restores purine metabolites to normal in adenosine deaminase deficient patients. *J. Clin Invest.* 1981; 68: 1387-1393.

Jacobson, K. A.; Kim, S.-K.; Costanzi, S.; Gao, Z-G. Purine receptors: GPCR structure and agonist design. *Mol. Interv.* 2004; 4, 337.

Jacobson, K. A.; Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Rev. Drug Disc.* 2006; 5(3):247-64.

Jarvis MF, Yu H, Kohlhaas K, Alexander K, Lee C-H, Jiang M, Bhagwat SS, Williams M and Kowaluk EA. ABT-702 (4-Amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6- morpholino-pyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor analgesic with anti-inflammatory properties. I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:1156–1164.

Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. Inosine binds A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2849-2857.

Kiechl S, Wiedermann CJ, Willeit J. Toll-like receptor and atherogenesis. *Ann Med* 2003; 35:164-171.

Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signaling and the role of accessory proteins. *Cell Signalling.* 2002; 14:99-108.

Klippel JH. Mediators of inflammation, tissue destruction, and repair. In: *Primer on the reumatic diseases*, 12th ed. p.51-88.

Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 2005; 51:85–94.

Kowaluk EA, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Jarvis MF ABT-702 a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties II. In vivo characterization in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000a; 295; 11165-1174.

Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2000b; 9, 551.

Koziak K, Kaczmarek E, Kittel A, Sevigny J, Blusztajn JK, et al. Palmitoylation targets CD39/endotelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 2057-2062.

Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and Molecular Medicine* 2007; 39, 4, 421-438.

Lam FY, Ferrell WR. Inhibition of carragenin induced inflammation in the rat knee joint by Substance P antagonist. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:928-932.

Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005;15;174(2):1073-80.

Latini S, Bordoni F, pedataF, Corradetti R. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J. Pharmacol.* 1999; 127:2057-62.

Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML et al. Ligand-activation of adenosine A2A receptors Inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol* 2000; 164: 436-442.

Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* 1999; 56:705-713.

Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Ver. Pharmacology Toxicol.* 2001; 41: 775-787.

Lovett-Racke AE, Hussain RZ, Northrop S, Choy J, Rocchini A, Matthes L, Chavis JA, Diab A, Drew PD, Racke MK. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J Immunol.* 2004; 1;172(9):5790-8.

Lukashev D, Ohta A. Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J Immunol.* 2004; 1;173(1):21-4.

Macedo L, Pinhal-Enfield G, Alshits V, Elson G, Cronstein BN e Leibovich SJ. Wound Healing Is Impaired in MyD88-Deficient Mice. A Role for MyD88 in the Regulation of Wound Healing by Adenosine A2A Receptors. *The American Journal of Pathology* 2007; 171, No. 6.

Maj MC, Singh B, Gupta RS. Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 275, 386.

Majumdar S, Aggarwal BB. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kB induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* 2003; 22: 1206-1218.

McGaraughty, S., Chu, K.L., Wismer, C.T., Mikusa, J., Zhu, C.Z., Cowart, M., Kowaluk, E.A., Jarvis, M.F. Effects of A-134974, a novel adenosine kinase inhibitor, on carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia and locomotor activity in rats: evaluation of the sites of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 296, 501–509.

Marin, RM. Efeitos de Compostos Quinazolínicos com Propriedades Inibidoras de Tirosina Quinase em Corações Isolados de Ratos. [Dissertação de mestrado] FCM-UNICAMP; 2003.

Marin RM. Caracterização do efeito inibitório de derivados anilinoquinazolínicos na atividade da adenosina quinase [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Martin C. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit. Care med.* 2000; 28:3198-3202.

Matherne GP, Headdrick JP, Coleman SD, Berne RM. Interstitial transudate purines in normoxic and hypoxic immature and mature rabbits hearts. *Pediatr. Res.* 1990; 28: 348-353.

Mathews II, Erion, MD, Ealick SE. Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* 1998; 37, 15607.

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of toll like receptors proteins. *Life Sci* 2000; 68:241-258.

Minarini, A.; Budriesi, R.; Chiarini, A.; Leonardi, A.; Melchiorre, C. Search for α_1 -adrenoceptor Subtypes Selective Antagonists: Design, Synthesis and Biological Activity of Cystazosin, an α_{1D} -adrenoceptor Antagonist. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1998; 8, 1353.

Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol.* 2005; 35(1):31-41.

Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the inflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 656-663.

Montesinos MC, Desai A, Fink JS., Cronstein BN. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. *Am. J. Pathol.* 2002; 160:2009-2018.

Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, Cronstein BD. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthr Rheum* 2003; 48:240-247.

Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, and Cronstein BN. The Antiinflammatory Mechanism of Methotrexate Depends on Extracellular Conversion of Adenine Nucleotides to Adenosine by Ecto-5'-Nucleotidase. *Arthritis Rheum.* 2007;56(5):1440-5.

Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003; 225:115-21.

Muchmore, S.W.; Smith, R. A.; Stewart, A. O.; Cowart, M. D.; Gomtsyan, A.; Matulenko, M. A.; Yu, H.; Severin, J. M.; Bhagwat, S. S.; Lee, C-H.; Elizabeth A. Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F.; Clarissa L. Jakob, C. L. Crystal structures of human adenosine kinase inhibitor complexes reveal two distinct binding modes. *J. Med. Chem.* 2006; 49, 6726.

Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J.* 2005; 1;391(Pt 3):575-80.

Nalini G, Hariprasad C, Chandrase-Karan NA, Poongunzhali K. A comparative study of serum deaminases in systemic rheumatic diseases. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 1118-1119.

Németh ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Vizi ES, Szabó C, Hasko G. cDNA microarray analysis reveals a nuclear factor-kappaB-independent regulation of macrophage function by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306(3):1042-9.

Newby AC, Holmquist CA, Illingworth J, Pearson JD. The control of adenosine concentration in polymorphonuclear leucocytes, cultured heart cells and isolated perfused heart from rat. *Biochem. J.* 1983; 214: 317-323.

Otsuki T, Nakahama H, Niizuma H, Suzuki J. Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res.* 1986; 19;365(2):235-40.

Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la Sala A, Girolomoni G, Norgauer J. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood.* 2003; 15;101(10):3985-90.

Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Leibovich SJ. An angiogenic Switch in macrophages involving synergy between TLRs 2,4,7 and 9 and adenosine A_{2A} receptor. *Am J Pathol* 2003; 163: 711-721.

Rankin JA (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* 15:3–17.

Reinstien LJ, Lichtman SN, Currin RT, Wang J, Turman RG, Lemasters JJ. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated release of tumor necrosis factor by adenosine: evidence for A2 receptor on rat Kuppfer cells. *Hepatology* 1994; 19: 1445-1452.

Rewcastle, G. W.; Denny, W. A.; Showalter, H. D. H. Synthesis of 4-(Phenylamino)pyrimidine Derivatives as ATP-Competitive Protein Kinase Inhibitors with Potential for Cancer Chemotherapy. *Curr. Org. Chem.* 2000; 4, 679.

Rocco, S. A. Estudos de Ressonância Magnética Multinuclear, de Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Quinazolinias Polissubstituídas. [Tese de Doutorado] IQ-UNICAMP; 2002.

Rocco SA., Barbarini JE., Rittner R. Syntheses of some 4-anilinoquinazoline derivatives. *Syntesis. Journal of Synthetic Organic Chemistry* 2004; v3, p. 429-435.

Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol.* 1996; 156(9):3435-42.

Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Progress in neurobiol* 2003; 69; 313-340.

Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell signall* 2003; 15:813-827.

Seilbl S, Kybursz D, Launer RP, Gay S. Pattern recognition receptors and their involvement in the pathogenesis of arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 411-418.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116:3015–3025.

Silverman MH, Strand V, Markovits D, Nahir M, Reitblat T, Molad Y et al, Clinical Evidence for Utilization of the A3 Adenosine Receptor as a Target to Treat Rheumatoid Arthritis: Data from a Phase II Clinical Trial. *J Rheumatol* 2008; 35:41–8.

Sperlágh B, Dóda M, Baranyi M, Haskó G. Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. *J neuroimmunol.* 2000; 111:45-54.

Stancíková M, Lukác J, Istok R, Cristalli G, Rovensky J. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheum* 1998; 16: 583-586.

Steinke JW e Borish L. V Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S441-5.

Stolk JN, Koning DGM, PenningsAH, Boerbooms AM. Reduced purine 5' - nucleotidase activity in lymphocytes of patients with sistemic lupus erytematosus: results of a pilot study. *Ann. Rheum Dis.* 1999; 58:122-125.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004; 16(1):3-9.

TjOlsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. and Hole, K., The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992; 51, 5-17.

Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56(8):1986-98.

Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, Yamamoto Y, Moritani Y, Saruta K, Higashijima T, Kotera J, Takagi M, Kikkawa K, Omori K. Novel, Potent, and Selective Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Synthesis and Biological Activities of a Series of 4-Aryl-1-isoquinolinone Derivatives. *J. Med. Chem.* 2001; 44, 2204.

Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors : Key mediators of microbe detection. *Curr opin Immunol* 2002; 14: 103-110.

van Lent PL, Blom AB, Grevers L, Sloetjes A, van den Berg WB. Toll-like receptor 4 induced FcγR expression potentiates early onset of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex arthritis: Toll-like receptor 4 largely regulates FcγR expression by interleukin 10. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66(3):334-40.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* 2005; 115:1111-1119.

Wessels JAM, Huizinga TWJ and Guchelaar HJ. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008;47:249–255.

Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J med* 2004; 351:1106-1118.

Zhu CZ, Mikusa J, Chu KL, Cowart M, Kowaluk EA, Jarvis MF, McGaraughty S. A-134974: a novel adenosine kinase inhibitor, relieves tactile allodynia via spinal sites of action in peripheral nerve injured rats. *Brain Res*. 2001; 905, 104–110.

