

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Francisney Pinto do Nascimento

**A INOSINA COMO UM MODULADOR ENDÓGENO DA  
DOR: DE COADJUVANTE A PROTAGONISTA DO  
SISTEMA PURINÉRGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nascimento, Francisney Pinto do  
A INOSINA COMO UM MODULADOR ENDÓGENO DA DOR: DE  
COADJUVANTE A PROTAGONISTA DO SISTEMA PURINÉRGICO [tese] /  
Francisney Pinto do Nascimento ; orientador, Adair  
Roberto Soares dos Santos - Florianópolis, Sc, 2012.  
205 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Inosina. 3. Nocicepção. 4. Dor. 5.  
Receptores de adenosina. I. Santos, Adair Roberto Soares  
dos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

A verdade não resulta do número dos que nela creem  
*Galileu Galilei*



Dedico este trabalho aos curiosos,  
aos inquietos, aos contestadores,  
aos questionadores e aos desconfiados.  
São eles que fazem o mundo mudar!



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar tantas oportunidades, experiências, aprendizados e amigos.

Aos meus pais, Valdelírio e Maria do Carmo pelo apoio incondicional nestes 10 anos de vida universitária distante de casa. Por terem trabalhado tanto para me proporcionar oportunidades que eles não tiveram, por terem sonhado, sofrido e sorrido junto comigo nestes anos todos. Pela confiança depositada em mim. Meu eterno muito obrigado.

À minha irmã, Maikiara, por ser muito amiga e companheira nos momentos sérios. E por ser muito louca e parceira nos momentos de festejar e beber até o sol raiar!

Ao meu orientador, professor Adair, que me ofereceu a primeira oportunidade de conhecer a ciência, que então virou minha cachaça e a qual espero que um dia também traga o meu pão. Obrigado pelo apoio, pelos ensinamentos, pelas broncas, pelas brincadeiras, pelo incentivo, e sobretudo pela amizade e a certeza de que esses oito anos de trabalho juntos foram apenas os primeiros de décadas que teremos pela frente. Obrigado professor!

À professora Jana Sawynok que me proporcionou o estágio na Dalhousie University, e juntamente com a técnica Allison Reid foram extremamente amáveis, solícitas e profissionais. O período em Halifax mudou minha vida e sou muito grato a vocês. Thank you very much!

Aos amigos que durante estes anos passaram pelo lab, Serginho, Rodrigo Soweto, Fábio Gaúcho, Fran, Ismael Superman, Fernanda, Cris Setim, Cris Baggio, Maria Fernanda, Marina, Daniel, Leidiane, Murilo, Morgana, Igão,

Vini, Ana, Sonia, Celeste, Chico, Ari, Tati, Bira, Carol, Flávia, Deise, Calouro e Débora. Graças a todos vocês, trabalhar no LANDI sempre foi divertido!

Aos grandes amigos e também colaboradores deste trabalho Daniel, Sonia, Rodrigo e Morgana pela parceria, amizade e contribuição a este trabalho.

Aos grandes amigos Fábio Gaúcho e Marina, pelos muitos momentos de alegria, e por ventura algumas tristezas compartilhadas comigo. Parceira é parceria e vice-versa, afinal nunca fomos *pipi!*

Aos guris Serginho e Murilo, colaboradores deste trabalho, que foram meus alunos de IC e hoje estão no mestrado iniciando suas carreiras científicas, boa sorte piizada! Só no kichute branco!!!

Ao amigo e colaborador Pamplona, que no último ano se inteirou e participou de discussões, na maioria das vezes *online*, desta tese.

Ao professor Anicleto e ao Gabriel pela dedicação e inúmeras tentativas para padronização e realização dos experimentos em HPLC, valeu por conseguirmos pelo menos uma palhinha já nos descontos do segundo tempo.

À Leandra pela colaboração nos experimentos de ligação específica.

Ao amigo e colega Rafael Dutra pela colaboração nos estudos de imunistoquímica.

Ao Seu Carlos, Dona Vilma e Nivaldinho, sempre solícitos, papo bom e amizade nos corredores da Fisiologia.



Ao Daniel Celestino e Miguel, amigos desde Pato Branco, que dividiram o teto comigo durante 8 anos em Floripa. Não viemos pra inibir gurizada!

À Marlenne, que conviveu comigo durante 4 anos e hoje me faz muita falta.

Aos meus “pais canadenses”, Breezy e Norman, que me acolheram e me trataram realmente como um filho no período que estive em Halifax.

Aos colegas e amigos de doutorado pela convivência nestes anos, Allison e Rafael Bitencourt.

Ao professor Rui, que me convidou e proporcionou-me a oportunidade de realizar estágio em docência.

À todos os professores da pós-graduação em Farmacologia e Neurociências que participaram de alguma forma de minha formação científica.

À Dra. Shanta Bantia, Biocryst, pela doação da forodesina.

À Floripa, esta cidade maravilhosa e encantadora, onde vivi 10 anos fantásticos de minha vida, que moldaram minha formação profissional e também grande parte de minha formação pessoal. Além disso, esta cidade me proporcionou dezenas de amigos que levarei para a vida toda. Hoje sou um pouquinho manezinho também, ixtepô!

À Universidade Federal de Santa Catarina, minha casa há 10 anos. Por me proporcionar viver, aprender, curtir e saborear esta gostosa vida universitária que estendi enquanto pude. Mas agora, tudo virará saudades!

Aos animais utilizados neste estudo, meu profundo respeito e agradecimento!

À CAPES, CNPq, LANDI, UFSC e Dalhousie University pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A inosina é um nucleosídeo formado pela desaminação da adenosina pela ação da adenosina desaminase (ADA). A adenosina e a inosina possuem grande semelhança química, tendo como diferença um grupamento amina. Entre outras funções fisiológicas, a inosina apresenta atividade anti-inflamatória, neuroprotetora e cardiotônica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil antinociceptivo da inosina, avaliando seus mecanismos de ação e comparando seus efeitos aos causados pela adenosina. Foram utilizados camundongos das linhagens *C57black/6*, *Swiss* e ratos *Wistar*. A inosina e a adenosina (10 mg/kg, i.p.) reduziram a nocicepção induzida pela formalina, ambas com inibições de 44%. Quando coinjectada com a formalina, a inosina (20 µg/sítio) apresentou efeito antinociceptivo na pata ipsilateral, mas não na pata contralateral. O DPCPX, um antagonista seletivo de receptores A1 de adenosina (A1R), quando injetado pela via i.t. (10 nmol/sítio) ou i.p. (0,1 mg/kg) preveniu a antinocicepção induzida pela inosina (10 mg/kg, i.p.). Porém, quando injetado localmente, o DPCPX (5µg/sítio) não preveniu o efeito antinociceptivo local da inosina. A inosina administrada pelas vias i.t. (10 µg/sítio) ou i.p. (10 mg/kg) não apresentou efeito antinociceptivo em animais nocaute para A1R, contudo, localmente (20 µg/sítio, i.pl.) a inosina exerceu atividade antinociceptiva. Animais tratados com oligodeoxinucleotídeo antisentido para o A1R (AS-ODN-A1R) apresentaram redução da expressão do A1R, e foram insensíveis ao efeito antinociceptivo da inosina (10 mg/kg, i.p.). A inosina e a adenosina deslocaram o ligante radioativo [3H]DPCPX no ensaio de ligação específica para o A1R, com CI50 de 36 nM e 113 nM, respectivamente. A toxina pertussis, o CaCl<sub>2</sub>, os bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> caribdotoxina, glibenclamida, tetraetilamônio e 4-aminopiridina previniram o efeito antinociceptivo da inosina (10 mg/kg, i.p.) no teste da formalina. A inosina (10 mg/kg, i.p.) também reduziu a hiperalgesia induzida pelo PMA (0,1 nmol/pata) e pela bradicinina (3 nmol/pata), ativadores direto e indireto da PKC, respectivamente, mas não reduziu a hiperalgesia induzida pela PGE<sub>2</sub> (10 nmol/pata) e forskolina (1 µmol/pata), ambos ativadores indiretos da PKA. A inosina também reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA e pela ligação parcial do nervo ciático, além de reduzir os níveis de TNF-α na pata induzido pela injeção intraplantar de CFA. A inosina (10 mg/kg, i.p.) reduziu a dor espontânea induzida pela injeção intratecal de TNF-α (0,1 pg/sítio) e substância P (50 nmol/sítio), mas não a dor induzida pela IL-

1 $\beta$  (1 pg/sítio). A administração de deoxicoformicina (DCF, inibidor da adenosina desaminase, 50 mg/kg, i.p.) reduziu a antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina. As doses sub-ativas de forodesínea (FDS, inibidor da purina nucleosídeo fosforilase, 0,1 mg/kg, i.p) e inosina (3 mg/kg, i.p.) quando associadas induziram antinocicepção no teste da formalina. A inosina e a adenosina apresentaram efeito antinociceptivo até 2 horas após o tratamento no teste da formalina. Trinta minutos após a administração de adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou inosina (10 mg/kg, i.p.), foi encontrado no plasma sanguíneo de camundongos apenas níveis elevados de inosina. Estes resultados demonstram que os A1R centrais estão envolvidos na antinocicepção da inosina, e que este envolvimento se dá pela ativação direta do receptor, sendo a inosina um ligante endógeno do A1R. A ativação dos canais de K<sup>+</sup>, redução dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> e a inibição da PKC são eventos que parecem estar envolvidos neste efeito. Ainda, a inosina reduz a hiperalgesia através da redução dos níveis de TNF- $\alpha$ . Finalmente, a inosina e a adenosina além de serem moléculas muito parecidas quimicamente, também possuem efeitos muito similares, sendo a inosina, um provável modulador endógeno da dor.

**Palavras-chave:** nucleosídeos, dor, dor crônica, nocicepção, inosina, adenosina, adenosina desaminase

## ABSTRACT

Inosine is formed from adenosine breakdown after deamination by adenosine deaminase (ADA) action. Adenosine and inosine have several structural and chemical similarities, being one amine group the only difference. Among other physiological functions, inosine has anti-inflammatory, neuroprotective and cardiostimulatory effects. The objective of this study was to evaluate the antinociceptive profile of inosine, to investigate its mechanisms of action and to evaluate and compare its effects with those caused by adenosine. Animals used were C57black/6 and swiss mice and Wistar rats. Inosine and adenosine (10 mg/kg, ip) reduced nociception induced by formalin, both which 44% of inhibition. When co-administered with formalin, inosine (20 µg / site) induced antinociceptive effect in the ipsilateral, but not in the contralateral paw. DPCPX, an antagonist of adenosine A1 receptor (A1R), when injected via i.t. (10 nmol / site) or i.p. (0.1 mg / kg) blocked the antinociceptive effect of inosine (10 mg / kg, ip). However, when injected peripherally, DPCPX (5µg/sítio) did not prevent the local antinociception induced by inosine. Using knockout animals for A1R, inosine by i.t. (10 mg / site) or i.p. (10 mg / kg) routes showed no antinociceptive effect. However, when injected locally (20 µg / site, i.pl.) inosine induced antinociceptive activity. Animals treated with antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) for A1R showed a reduction of A1R expression, and abolished the inosine (10 mg / kg, ip) antinociception. Both inosine and adenosine displaced the radioactive ligand in the specific binding assay for the A1R, with maximum inhibition of 71 and 60%, respectively. Pertussis toxin, CaCl<sub>2</sub>, blockers of K<sup>+</sup> channels such as caribdotoxin, glibenclamide, tetraethylammonium and 4-aminopyridine prevented the inosine antinociception. Inosine (10 mg / kg, ip) also decreased hyperalgesia induced by PMA (0.1 nmol / paw), and bradykinin (3 nmol / paw), direct and indirect PKC activators, respectively. However, inosine did not prevent hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub> (10 nmol / paw) and forskolin (1 mmol / paw), both indirect PKA activators. Inosine also reduced the mechanical hyperalgesia induced by CFA and partial ligation of sciatic nerve. In addition, inosine reduced TNF- $\alpha$  levels in the paw after intraplantar injection of CFA. Inosine (10 mg / kg ip) also

reduced spontaneous pain induced by intrathecal injection of TNF- $\alpha$  (0.1 pg / site) and Substance P (50 nmol / site), but did not reduce the pain induced by IL-1 $\beta$  (1 pg / site). Administration of deoxycoformicin (DCF, 50 mg / kg ip) reduced inosine antinociception in the formalin test. Subactive doses of FDS (0.1 mg / kg, ip) and inosine (3 mg / kg, ip) when associated induced antinociception in the formalin test. Inosine and adenosine presented antinociceptive effect up to 2 hours after treatment in the formalin test. Thirty minutes after administration of adenosine (10 mg / kg, ip) or inosine (10 mg / kg, ip), only inosine elevated plasma levels were found. These results demonstrate that the central A1R are involved in antinociception induced by inosine, and this involvement occurs by direct activation of the receptor, being inosine an endogenous ligand of A1R. In addition, after activation of A1R, activation of K<sup>+</sup> channels, reduction of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and inhibition of PKC are events that are involved in this effect. Further, inosine reduces chronic hyperalgesia by reducing levels of TNF- $\alpha$ . Finally, adenosine and inosine are very similar molecules that also have very similar effects. Then, we suggest that inosine is an endogenous modulator of pain.

**Keywords:** nucleosides, pain, chronic pain, nociception, inosine, adenosine, adenosine deaminase

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Estrutura química do ATP  | 22 |
| <b>Figura 2.</b>  | Metabolismo purinérgico   | 24 |
| <b>Figura 3.</b>  | Estrutura química da adenosina  | 25 |
| <b>Figura 4.</b>  | Principais vias de sinalização intracelular desencadeadas após ativação do A1R  | 31 |
| <b>Figura 5.</b>  | Esquema de mecanismo proposto para o envolvimento do sistema purinérgico na analgesia induzida por acupuntura por Goldman e colaboradores                   | 40 |
| <b>Figura 6.</b>  | Estrutura química da inosine  | 41 |
| <b>Figura 7.</b>  | Conversão da adenosina em inosina realizada pela ADA  | 47 |
| <b>Figura 8.</b>  | Teoria de René Descartes sobre a via da dor (detecção, transmissão e percepção)   | 51 |
| <b>Figura 9.</b>  | Tabela para registro do comportamento dos animais para o teste de formalina 2%  | 66 |
| <b>Figura 10.</b> | Efeitos da inosina e adenosina sobre o modelo de dor induzida pela formalina  | 74 |
| <b>Figura 11.</b> | Efeitos locais da inosina sobre o modelo de dor induzida pela formalina   | 76 |
| <b>Figura 12.</b> | Envolvimento do receptor A1 sobre o efeito antinociceptivo sistêmico, espinhal e local da inosina no modelo de dor induzida pela formalina                  | 78 |
| <b>Figura 13.</b> | Efeito antinociceptivo da inosina utilizando animais nocaute para o receptor A1 no teste da formalina   | 79 |
| <b>Figura 14.</b> | Expressão dos A1R na medula espinhal de camundongos pré-tratados com oligonucleotídeo antisense para o A1R  | 81 |
| <b>Figura 15.</b> | Efeito antinociceptivo da inosina sobre animais com expressão reduzida do A1R no teste da formalina   | 82 |
| <b>Figura 16.</b> | Ensaio de ligação específica da adenosina e da inosina em A1R   | 84 |
| <b>Figura 17.</b> | Efeito do pré-tratamento com toxina Pertussis sobre a antinocicepção induzida pela inosina na nocicepção inflamatória causada pela formalina em camundongos | 89 |
| <b>Figura 18.</b> | Efeito dos bloqueadores de canais de potássio caribtoxina, apamina e glibenclamida sobre a antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina       | 90 |
| <b>Figura 19.</b> | Efeito dos bloqueadores de canais de potássio TEA e 4-aminopiridina sobre a antinocicepção induzida pela inosina  | 91 |
| <b>Figura 20.</b> | Efeito do pré-tratamento com CaCl <sub>2</sub> sobre a  | 92 |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
|                   | antinociceção induzida pela inosina  |     |
| <b>Figura 21.</b> | Efeitos da inosina sobre a hiperalgesia induzida pelo PMA, BK, PGE2 e forskolina                                       | 93  |
| <b>Figura 22.</b> | Efeitos da inosina sobre a nociceção induzida pelo CFA   | 98  |
| <b>Figura 23.</b> | Efeitos da inosina sobre a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 induzida por CFA                    | 100 |
| <b>Figura 24.</b> | Efeito da inosina sobre a nociceção induzida pela TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e SP                                    | 101 |
| <b>Figura 25.</b> | Efeitos da inosina sobre o modelo de dor neuropática induzido pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC)            | 102 |
| <b>Figura 26.</b> | Dosagem da atividade da ADA na corrente sanguínea em animais tratados com DCF  | 105 |
| <b>Figura 27.</b> | Influência da DCF sobre o efeito da inosina e da adenosina no teste da formalina                                       | 107 |
| <b>Figura 28.</b> | Decurso temporal da influência da DCF sobre o efeito da adenosina no teste da formalina                                | 108 |
| <b>Figura 29.</b> | Influência da FDS sobre o efeito da inosina no teste da formalina  | 109 |
| <b>Figura 30.</b> | Avaliação do efeito antinociceptivo da FDS sobre o teste da formalina 2% e análise do envolvimento do AIR neste efeito | 111 |
| <b>Figura 31.</b> | Efeitos da associação da DCF com adenosina no teste do sono induzido por cetamina                                      | 113 |
| <b>Figura 32.</b> | Decurso temporal do efeito da inosina e adenosina no teste da formalina.   | 117 |
| <b>Figura 33.</b> | Cromatogramas dos padrões para adenosina, inosina, xantina e ácido úrico   | 118 |
| <b>Figura 34.</b> | Curvas de calibração para detecção e quantificação sérica de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico                 | 120 |
| <b>Figura 35.</b> | Espectro de absorção UV, obtidos dos cromatogramas para adenosina; inosina; xantina; ácido úrico e cafeína             | 121 |
| <b>Figura 36.</b> | Análise do decurso temporal dos níveis plasmáticos de purinas após administrações de adenosina e inosina               | 122 |
| <b>Figura 37.</b> | Análise do decurso temporal dos níveis plasmáticos de nucleosídeos após administrações de adenosina e inosina          | 123 |
| <b>Figura 38.</b> | Envolvimento do receptor A1 no efeito antinociceptivo induzido pela inosina  | 132 |
| <b>Figura 39.</b> | Ilustração dos mecanismos intracelulares envolvidos na antinociceção induzida pela inosina                             | 138 |
| <b>Figura 40.</b> | Mecanismo de ação proposto para o efeito sobre modelos de dor inflamatória e neuropática induzido pela inosina         | 146 |



|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Figura 41.</b> | Estruturas químicas da adenosina, inosina e forodesina   | 152 |
| <b>Figura 42.</b> | Modulação enzimática do sistema purinérgico e envolvimento do receptor A1 de adenosina no efeito antinociceptivo induzido pelas purinas AMP, adenosina e inosina | 153 |
| <b>Figura 43.</b> | Breve correlação temporal entre os níveis plasmáticos das purinas após administração de adenosina e inosina e seus efeitos antinociceptivos                      | 158 |



## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Receptores de adenosina e suas principais vias de transdução intracelular | 28 |
| <b>Tabela 2.</b> | Mecanismo de ação/função dos fármacos utilizados neste trabalho           | 63 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- [<sup>3</sup>H]DPCPX - 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
- 4-AP - 4-aminopiridina
- 5-HT – 5 hidroxitriptamina
- 8-PT - 8 fenil-teofilina
- A1R – receptor para adenosina do subtipo 1
- A2AR – receptor para adenosina do subtipo 2A
- A2BR – receptor para adenosina do subtipo 2B
- A3R - receptor para adenosina do sub tipo 3
- AC – adenilil ciclase
- ADA – adenosina desaminase
- ADP - difosfato de adenosina
- AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais
- AK – adenosina quinase
- AMP - monofosfato de adenosina
- AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol-propionato
- AMPc - monofosfato de adenosina cíclico
- ANOVA – análise de variância
- AS-ODN - antisentido oligodeoxinucleotídeo
- ATP – trifosfato de adenosina
- BK - bradicinina
- BSA – albumina de soro bovino
- Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio
- CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio
- CCPA - 2-cloro-N(6)-ciclopentiladenosina
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFA - adjuvante completo de Freund
- GMPc – monofosfato de guanosina cíclico
- CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CI50 – concentração inibitória 50%

cJNK - c-Jun N-terminal kinases

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CPA - N6-ciclopentiladenosina

CREB – elemento responsivo ao ligador de AMPc

CWS - nado em água gelada

DAG – diacilglicerol

dCF – deoxicoformicina

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNR - resposta nociceptiva atrasada

DO - densidade óptica

DPCPX - 8-Ciclopentil-3-dipropilxantina

DZP – diazepam

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – imunoenensaio enzimático

EPM - erro padrão da média

ERK1 - proteína quinase regulada extracelularmente de sinal tipo 1

ERK2 - proteína quinase regulada extracelularmente de sinal tipo 2

FDS - forodesina

FK – forskolina

GABA - ácido  $\gamma$  aminobutírico

GAP 43 – proteína associada ao crescimento 43

GPCR - receptores acoplados a proteínas G

GRD - gânglio da raiz dorsal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HEK293 – células renais embrionárias humanas 293

i.c.v. - intracerebroventricular

i.p. – intraperitoneal

i.pl. – intraplantar

i.t. – intratecal

i.v. - intravenoso

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-1 – interleucina 1

IL-10 - interleucina 10

IL1RI – receptor de interleucina 1 tipo I

IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta

IL-4 - interleucina 4

IL-6 - interleucina 6

IP3 – inositol 1,4,5 trifosfato

K<sup>+</sup> - íon potássio

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – carbonato de potássio

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – fosfato de potássio dibásico

K<sub>2P</sub> - canais de K<sup>+</sup> de dois poros

K<sub>ATP</sub> – canal de potássio sensíveis à ATP

K<sub>Ca</sub> canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup>

Kd – coeficiente de dissociação

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio dihidrogenado

Ki – coeficiente de inibição

K<sub>ir</sub> canais de K<sup>+</sup> retificadores de entrada

KOH – hidróxido de potássio

K<sub>v</sub> - canais de K<sup>+</sup> operados por voltagem

LPNC - ligadura parcial do nervo ciático

LPS - lipopolissacarídeo

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MEK – proteína quinase regulada por mitógeno

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

MK-801- [(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepten-5,10-imina maleato)

Na<sup>+</sup> - íon sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – fosfato de sódio dibásico monohidratado

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O – fosfato de sódio monobásico monohidratado

NGF - fator de crescimento do nervo

NF-κB - fator nuclear κB

NH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> –sulfato de amônia

NMDA - N-metil D-Aspartato

NO – óxido nítrico

NT5E - ecto-5-nucleotidase

p.o. - via oral

P1 – receptores purinérgicos do tipo 1

P2 – receptores purinérgicos do tipo 2

P<sub>2X</sub> – receptor purinérgico do subtipo 2X

P<sub>2Y</sub> - receptor purinérgico do subtipo 2Y

p38 – proteína quinase ativada por mitógeno p38

p42/44 - proteína quinase ativada por mitógeno p42/44

PAG - substância cinzenta periaquedutal

PAP - fosfatase ácida prostática

PBS – salina tamponada com fosfato

PCA – ácido perclórico

PFA – paraformaldeído

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

PIP2 - fosfatidil 4,5 bifosfato

PKA – proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PKCε - proteína quinase C epsilon

PKG – proteína quinase G

PLA2 - fosfolipase A2

PLC – fosfolipase C



PLD - fosfolipase D  
PMA - miristato acetato de forbol  
PNP - purina nucleosídeo fosforilase  
RNAm –ácido ribonucleico mensageiro  
R-PIA - N-(1-metil-2-feniletil)adenosina  
s.c.- subcutânea  
SNC – sistema nervoso central  
SNP – sistema nervoso periférico  
SP - substância P  
TEA – tetraetilamônio  
TNFR1 – receptor tipo 1 para fator de necrose tumoral  
TNFR2 – receptor tipo 2 para fator de necrose tumoral  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
Tris – hidroximetilaminometano  
TrkA - receptores de tirosina quinase A  
TrK - receptores de tirosina quinase  
UCLA - University Committee on Laboratory Animals  
UDP - difosfato de uracila  
UTP - trifosfato de uracila  
UV – ultravioleta  
VGCC - canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem  
XO - xantina oxidase  
ZM241385 - {1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol



# SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>21</b> |
| 1.1          | O SISTEMA PURINÉRGICO .....   | 21        |
| 1.2          | OS RECEPTORES PURINÉRGICOS.....   | 26        |
| 1.3          | OS RECEPTORES P <sub>1</sub> PARA ADENOSINA E DOR .....   | 32        |
| 1.4          | ADENOSINA E DOR.....  | 36        |
| 1.5          | OUTRAS ABORDAGENS PARA O CONTROLE DA DOR ENVOLVENDO O SISTEMA ADENOSINÉRGICO .....  | 38        |
| 1.6          | A INOSINA .....   | 40        |
| 1.7          | DOR.....  | 48        |
| <b>2</b>     | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>59</b> |
| 3.1          | OBJETIVO GERAL .....  | 59        |
| 3.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 59        |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>61</b> |
| 4.1          | ANIMAIS .....   | 61        |
| 4.2          | SUBSTÂNCIAS E REAGENTES .....   | 62        |
| 4.3          | MECANISMO DE AÇÃO/FUNÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO .....   | 63        |
| 4.4          | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....  | 64        |
| 4.5          | PARTE I - ENVOLVIMENTO DO A <sub>1</sub> R NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA .....   | 64        |
| <b>4.5.1</b> | <b>Metodologia</b> .....  | <b>64</b> |
| 4.5.1.1      | Teste da formalina 2% .....   | 64        |
| 4.5.1.2      | Comparação do efeito antinociceptivo da inosina com o efeito da adenosina no teste da formalina .....   | 66        |
| 4.5.1.3      | Efeito antinociceptivo da inosina administrada perifericamente no teste da formalina .....  | 67        |
| 4.5.1.4      | Abordagem farmacológica para avaliar o envolvimento dos receptores A <sub>1</sub> de adenosina (A <sub>1</sub> R) na antinocicepção induzida pela inosina... ..       | 67        |
| 4.5.1.5      | Avaliação do efeito antinociceptivo da inosina em camundongos nocaute para o A <sub>1</sub> R .....   | 68        |
| 4.5.1.6      | Avaliação do efeito antinociceptivo da inosina em camundongos com expressão reduzida de A <sub>1</sub> R após receberem injeção de oligonucleotídeo antisentido ..... | 69        |
| 4.5.1.7      | Análise Imunoistoquímica .....  | 69        |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| 4.5.1.8      | Ensaio de ligação específica de inosina e adenosina no A <sub>1</sub> R .....   | 71        |
| <b>4.5.2</b> | <b>Resultados .....</b>   | <b>73</b> |
| 4.5.2.1      | A inosina possui eficácia e potência semelhantes à adenosina no teste da formalina, porém em doses elevadas a adenosina perde eficácia ...                                  | 73        |
| 4.5.2.2      | A inosina reduz a nocicepção induzida pela formalina quando injetada localmente .....   | 75        |
| 4.5.2.3      | O efeito antinociceptivo sistêmico da inosina depende totalmente dos AIRs centrais, enquanto que o efeito antinociceptivo local parece depender parcialmente dos AIRs ..... | 76        |
| 4.5.2.4      | Sistemicamente, a inosina não apresenta efeito antinociceptivo em animais nocaute AIR .....   | 78        |
| 4.5.2.5      | O tratamento com AS-ODN-AIR reduziu a expressão dos AIR na medula espinhal de camundongos .....   | 80        |
| 4.5.2.6      | A inosina não apresentou efeito antinociceptivo em animais com expressão reduzida de AIR no teste da formalina .....  | 82        |
| 4.5.2.7      | A inosina se liga diretamente ao AIR com afinidade semelhante à adenosina .....   | 83        |
| 4.6          | PARTE II – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO INTRACELULAR DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA .....  | 84        |
| <b>4.6.1</b> | <b>Metodologia .....</b>  | <b>85</b> |
| 4.6.1.1      | Teste da formalina .....  | 85        |
| 4.6.1.2      | Influência da toxina pertussis na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....  | 85        |
| 4.6.1.3      | Influência de bloqueadores de canais de potássio na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....  | 86        |
| 4.6.1.4      | Influência do cálcio na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....  | 86        |
| 4.6.1.5      | Envolvimento das proteínas PKA e PKC na ação antihiperalgésica induzida pela inosina nos testes de Randall-Selitto e Hargreaves .....                                       | 87        |
| 4.6.1.6      | Avaliação da hiperalgésia mecânica e térmica .....  | 88        |
| <b>4.6.2</b> | <b>Resultados .....</b>   | <b>88</b> |
| 4.6.2.1      | Os receptores metabotrópicos sensíveis à toxina pertussis estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....                              | 88        |
| 4.6.2.2      | Os canais de potássio estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....  | 89        |
| 4.6.2.3      | Os canais de cálcio estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina .....  | 91        |
| 4.6.2.4      | A proteína PKC, mas não a PKA, está envolvida na ação antihiperalgésica induzida pela inosina .....   | 92        |
| 4.7          | PARTE III – ESTUDO DO EFEITO DA INOSINA EM MODELOS DE DOR CRÔNICA .....   | 93        |
| <b>4.7.1</b> | <b>Metodologia .....</b>  | <b>93</b> |

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| 4.7.1.1      | Avaliação do efeito da inosina na nocicepção crônica inflamatória induzida por injeção de CFA na pata .....   | 93         |
| 4.7.1.2      | Avaliação do efeito da inosina nos níveis de citocinas pró e antiinflamatórias após injeção de CFA na pata .....  | 94         |
| 4.7.1.3      | Avaliação do efeito da inosina na nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias e por substância P .....  | 95         |
| 4.7.1.4      | Avaliação do efeito da inosina no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) .....  | 96         |
| 4.7.1.5      | Avaliação da hiperalgesia mecânica .....  | 97         |
| <b>4.7.2</b> | <b>Resultados</b> .....   | <b>97</b>  |
| 4.7.2.1      | A inosina reduz a nocicepção crônica inflamatória induzida pela injeção de CFA na pata .....  | 97         |
| 4.7.2.2      | A inosina reduz os níveis locais da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , mas não altera os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 após injeção de CFA na pata de camundongos ..... | 98         |
| 4.7.2.3      | A inosina reduz a nocicepção induzida por injeções intratecais de TNF- $\alpha$ e SP, mas não da IL-1 $\beta$ .....   | 100        |
| 4.7.2.4      | A inosina reduz a nocicepção induzida pela LPNC .....   | 101        |
| 4.8          | PARTE IV – INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO DAS ENZIMAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO SOBRE O EFEITO INOSINA .....   | 103        |
| <b>4.8.1</b> | <b>Metodologia</b> .....  | <b>103</b> |
| 4.8.1.1      | Dosagem da adenosina desaminase (ADA) após administração da deoxicoformicina .....  | 103        |
| 4.8.1.2      | Influência da deoxicoformicina (DCF) na antinocicepção causada pela inosina e adenosina .....   | 104        |
| 4.8.1.3      | Influência da forodesina (FDS) na antinocicepção causada pela inosina .....   | 104        |
| 4.8.1.4      | Avaliação da atividade antinociceptiva da forodesina (FDS) e o seu envolvimento com o AIR .....   | 104        |
| <b>4.8.2</b> | <b>Resultados</b> .....   | <b>105</b> |
| 4.8.2.1      | Níveis plasmáticos da adenosina desaminase (ADA) após administração da DCF .....  | 105        |
| 4.8.2.2      | A deoxicoformicina (DCF) altera os efeitos da inosina e da adenosina no teste da formalina .....  | 105        |
| 4.8.2.3      | Decurso temporal da influência da deoxicoformicina (DCF) sobre os efeitos da adenosina no teste da formalina .....  | 107        |
| 4.8.2.4      | Dose sub-ativa de FDS em sinergia com dose sub-ativa da inosina induz antinocicepção no teste da formalina .....  | 108        |
| 4.8.2.5      | A FDS induz antinocicepção per se e este efeito é mediado pelo AIR no teste da formalina .....  | 110        |
| 4.8.2.6      | Avaliação do efeito sedativo da associação de DCF e adenosina e da associação de FDS e inosina .....  | 111        |
| 4.8.2.7      | Indução de sono por cetamina .....  | 112        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 4.8.2.8      | Os tratamentos com DCF + adenosina e com FDS prolongam o tempo de sono induzido por cetamina .....   | 112        |
| 4.9          | PARTE V – NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INOSINA E ADENOSINA .....  | 114        |
| <b>4.9.1</b> | <b>Metodologia .....</b>   | <b>114</b> |
| 4.9.1.1      | Avaliação do decurso temporal da atividade antinociceptiva da inosina e da adenosina no teste da formalina .....   | 114        |
| 4.9.1.2      | Análise temporal dos níveis plasmáticos de inosina e adenosina após administração única de cada substância .....   | 114        |
| 4.9.1.3      | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....   | 115        |
| <b>4.9.2</b> | <b>Resultados .....</b>  | <b>116</b> |
| 4.9.2.1      | Avaliação do decurso temporal da atividade antinociceptiva da inosina e da adenosina no teste da formalina .....   | 116        |
| 4.9.2.2      | Padronização da metodologia para dosagem dos níveis sanguíneos de inosina e adenosina pelo método de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) ..... | 117        |
| 4.9.2.3      | Avaliação do decurso temporal dos níveis sanguíneos de inosina e adenosina após administração única de cada substância .....                               | 121        |
| <b>5</b>     | <b>DISCUSSÃO .....</b>   | <b>124</b> |
| 5.1          | PARTE I - ENVOLVIMENTO DO A1R NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA .....   | 124        |
| 5.2          | PARTE II - MECANISMO DE AÇÃO INTRACELULAR DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA.....  | 132        |
| 5.3          | PARTE III - EFEITO DA INOSINA EM MODELOS DE DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA.....  | 139        |
| 5.4          | PARTE IV - INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA INOSINA SOBRE O SEU EFEITO ANTINOCICEPTIVO .....  | 147        |
| 5.5          | PARTE V – EFEITO ANTINOCICEPTIVO DEPENDENTE DO TEMPO E NÍVEIS SANGUÍNEOS DE INOSINA E ADENOSINA .....  | 154        |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>159</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>161</b> |
|              | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>183</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O SISTEMA PURINÉRGICO

### *O ATP e um breve histórico do sistema purinérgico na farmacologia*

A história do sistema purinérgico na Farmacologia inicia em 1929, quando Drury e Szent-Gyorgi descrevem as potentes ações das purinas adenina e adenosina no coração e em vasos sanguíneos de cães (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929). No entanto, a história deste sistema na Farmacologia se tornou importante devido ao trifosfato de adenosina (ATP). O ATP (figura 1) é um nucleotídeo que, entre suas principais funções, fornece energia para as células dos organismos vivos (Jordan e Oster, 1948; Ghosh, 1963). Inclusive, erroneamente, por décadas acreditou-se que esta fosse a única função do ATP (Burnstock, 2009). No entanto, no decorrer do século passado foram descobertas diversas novas funções biológicas do ATP, as quais demonstraram, por exemplo, que o ATP exerce funções no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (Burnstock, 2009). Hoje sabe-se que o ATP pode ser liberado de vários tipos celulares, em sinapses neuronais, sendo liberado como um neurotransmissor (Burnstock, Krugel et al., 2011; Bodin e Burnstock, 2001). Entretanto, o ATP pode também ser liberado sob condições patológicas após danos celulares e de plaquetas, por exemplo, em resposta a uma diminuição da pressão parcial de oxigênio (Burnstock, 2007a).

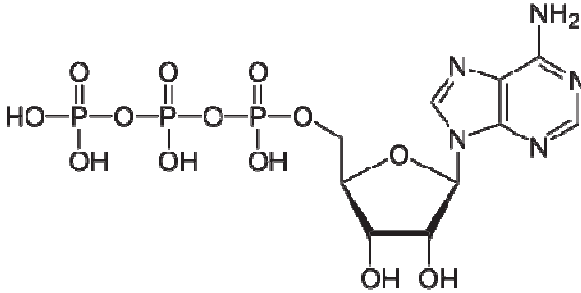


Figura 1. Estrutura química do ATP

Em 1970, Burnstock apresentou evidências de que o ATP atuava como um neurotransmissor em neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos. Finalmente, em 1972, Burnstock propôs a hipótese da neurotransmissão purinérgica. Em seguida, foi estabelecido que o ATP atuava como um cotransmissor, juntamente com transmissores clássicos, tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central. Ainda, foi evidenciado que purinas também atuavam como potentes mensageiros extracelulares em células não neuronais (Kasakov e Burnstock, 1982; Sneddon e Burnstock, 1984; Sneddon e Westfall, 1984; Burnstock e Knight, 2004). Em 1978, Burnstock estabeleceu as bases para a distinção de dois tipos diferentes de receptores purinérgicos. Ele denominou os receptores sensíveis à adenosina de P1 e os receptores sensíveis à ATP de P2 (Burnstock, 1978; Burnstock e Kennedy, 1985).

### *Os constituintes e o metabolismo do sistema purinérgico*

Purinas extracelulares como a adenosina, o difosfato de adenosina (ADP) e o ATP, ou pirimidinas como o difosfato de uracila (UDP) e o trifosfato de uracila (UTP) são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam diversos efeitos biológicos via receptores de superfície de membrana, chamados receptores para purinas (Ralevic e Burnstock, 1998). Todas estas moléculas



pertencem ao sistema purinérgico e possuem como principal molécula precursora de vários outros metabólitos o ATP. No interior da célula, o ATP pode ser convertido em monofosfato de adenosina (AMP) através de uma reação reversível dependente de adenilil quinase e ATPase (ver figura 2). O AMP pode ser convertido em adenosina através da enzima intracelular 5-nucleotidase e a adenosina, pode ser transportada para o meio extracelular através de transportadores bidirecionais de nucleosídeos, podendo ativar receptores de adenosina em células adjacentes. O ATP pode também sair para o meio extracelular, e ativar seus respectivos receptores do tipo P2. Uma parte deste ATP pode originar adenosina por ação da ecto-nucleotidases. Existe uma família de ecto-nucleotidases, sendo a ecto-5-nucleotidase (NT5'E) a principal enzima responsável em realizar estas reações sob condições fisiológicas (para revisão ver Sawynok e Liu, 2003).

A adenosina ou o AMP também podem ser sintetizados a partir do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), que é produzido intracelularmente a partir da ativação de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) de superfície celular, com posterior conversão para AMP sob ação da fosfodiesterase. Outra fonte de adenosina no interior da célula é a S-adenosil- homocisteína, no entanto, esta via não está intimamente relacionada com o estado de energia da célula (Rosenberg e Li, 1995; Brundege, Diao et al., 1997).

A conversão da adenosina para inosina, pode ocorrer nos meios intra e extracelular. Intracelularmente a inosina é formada pela quebra da adenosina pela adenosina desaminase (ADA). No meio extracelular, a ecto-adenosina desaminase é responsável pela biossíntese da inosina a partir da adenosina (Figura 2) (Sala-Newby, Skladanowski et al., 1999; Sawynok e Liu, 2003).

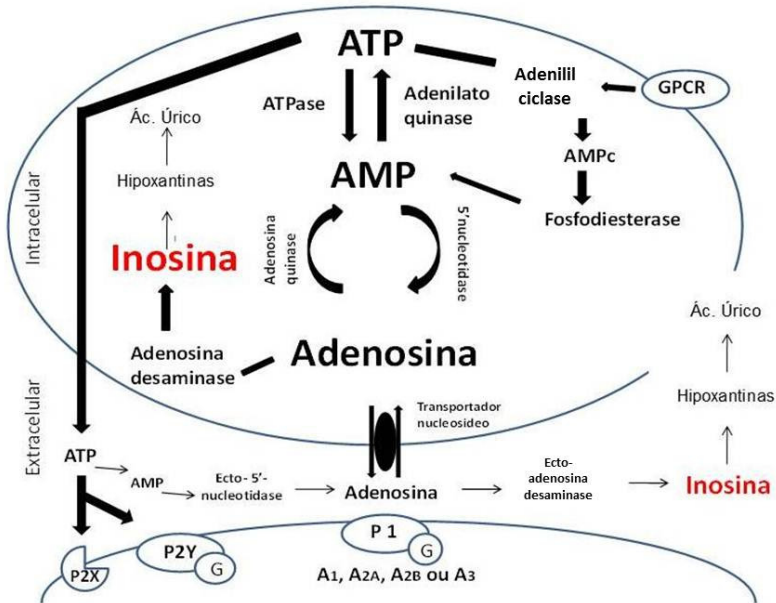


Figura 2. Metabolismo purinérgico. ATP, trifosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; GPCR, receptores acoplados a proteínas G; G, proteína G; P1, receptores de adenosina do tipo P1; A1, A2A, A2B e A3, receptores de adenosina; P2X e P2Y, receptores purinérgicos do tipo P2. Adaptado de Sawynok e Liu, 2003.

Quando metabolizada, a inosina é convertida em hipoxantinas pela ação da purina nucleosídeo fosforilase (PNP), que posteriormente são convertidas em ácido úrico e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela xantina oxidase (XO) (para revisão ver Hasko, Sitkovsky et al., 2004). Intracelularmente, a concentração de ATP é 50 vezes mais elevada do que a de AMP, e pequenas variações nas concentrações de ATP podem resultar em um grande aumento do AMP. Desta forma, este sistema representa um sensor muito sensível a qualquer aumento do estresse metabólico (Latini e Pedata, 2001).

## *A adenosina*

A adenosina é um nucleosídeo derivado do ATP, formado a partir do AMP pela ação da enzima 5-nucleotidase (Sawynok, 1998; Sawynok e Liu, 2003). A estrutura química da adenosina é constituída por uma molécula de adenina ligada a uma molécula de ribose (figura 3). A fórmula molecular deste nucleosídeo é  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ .

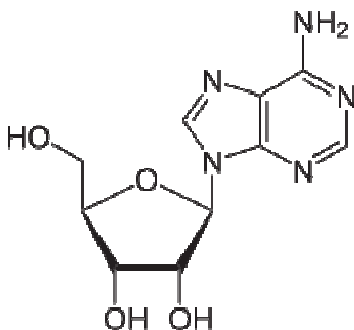


Figura 3. Estrutura química da adenosina.

A adenosina é uma molécula com ação neuromoduladora e está envolvida em muitas funções fisiológicas no SNC e na periferia (para revisão ver Ribeiro, Sebastião et al., 2002). Entre as funções que a adenosina exerce estão as de regulação do sono, da ansiedade, da dor, da cognição e da memória. A adenosina apresenta efeitos neuroprotetores sob certas condições patológicas, como trauma, isquemia, convulsão, hemorragia e epilepsia (Dunwiddie e Masino, 2001; Mayne, Fotheringham et al., 2001). A regulação dos níveis endógenos de adenosina se dá através da sua produção, do seu metabolismo e transporte (Dunwiddie e Masino, 2001; Fredholm, Ap et al., 2001; Latini e Pedata, 2001).

## 1.2 OS RECEPTORES PURINÉRGICOS

Como já mencionado, os receptores purinérgicos são divididos em dois grandes grupos, os receptores P1, que possuem como principal agonista endógeno a adenosina, e os receptores P2, sensíveis principalmente ao ATP e à UTP. Os receptores do tipo P1, também chamados de receptores para adenosina, são divididos em quatro subtipos, A1, A2A, A2B e A3, e todos são acoplados a proteínas G (Fredholm, Ap et al., 2011). Os receptores P2 dividem-se em duas categorias, P2X e P2Y. Os receptores P2Y são acoplados a proteínas G e os P2X são receptores ionotrópicos (Burnstock e Kennedy, 1985).

### Os receptores P2

Os receptores P2 não serão muito explorados no presente trabalho, uma vez que o mesmo abordará as propriedades e o perfil de substâncias sobre o sistema adenosinérgico e sobre os receptores do tipo P1. No entanto, será apresentado de uma forma breve e resumida algumas características básicas destes receptores que são ativados pelo ATP e que juntamente com os receptores P1, constituem os receptores do sistema purinérgico. A ativação pelo ATP destes receptores que incluem as famílias P2X e P2Y, de forma geral, estimulam a excitabilidade celular, aumenta a liberação de aminoácidos excitatórios e conseqüentemente facilita a transmissão e as respostas à dor (Burnstock, Fredholm et al., 2011; Burnstock, 1981; Burnstock e Knight, 2004; Burnstock, 2007b). Em seguida, serão apresentadas algumas características e classificações referentes aos receptores P2X e P2Y.

### *Os Receptores P2X*

Os receptores P2X compõem uma família de canais iônicos operados por ligantes, seletivos a cátions e que apresentam permeabilidade praticamente igual para  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , mas também são permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Khakh, Burnstock et al., 2001; North, 2002). O domínio extracelular contém sítios de ligação para outros reguladores

extracelulares além do ATP (Vial, Roberts et al., 2004), além de sítios para agonistas, antagonistas e moduladores alostéricos (Khakh, 2001; Silberberg, Li et al., 2007). No espaço intracelular o ATP estimula os receptores P2X, causando despolarização celular, abertura do poro do canal e fluxo iônico, com conseqüente acúmulo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , e assim, a iniciação das funções celulares. O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  evoca uma liberação de transmissores de células gliais e neuronais do sistema nervoso central e periférico, promove liberação de hormônios de glândulas endócrinas, disparos na contração muscular, regula motilidade ciliar de vias aéreas e ativa cascatas de sinalização em uma variedade de células (North, 2002).

### *Os Receptores P2Y*

Os receptores P2Y compõem uma família de receptores metabotrópicos e são constituídos de sete domínios transmembranas. Em contraste com os receptores P2X, os receptores P2Y são ativados não apenas por ATP, mas também pelo seu metabólito, o ADP, e por outros nucleotídeos tais como UTP e UDP (Abbracchio, Burnstock et al., 2006). Os receptores P2Y podem ser divididos em dois grupos de acordo com a proteína G à qual estão acoplados. Os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 são acoplados a proteínas  $G_{\text{aq}}$  e os receptores P2Y12, P2Y13 e P2Y14 são acoplados a proteínas  $G_{\text{oi}}$  (Abbracchio, Burnstock et al., 2006). Assim, em resposta à ligação do nucleotídeo, os receptores P2Y tanto podem ativar a via PLC/IP3 através da  $G_{\text{aq}}$  para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e ativar a PKC, ou podem inibir a adenilil ciclase para reduzir os níveis de AMPc através da  $G_{\text{oi}}$  (Abbracchio, Burnstock et al., 2006).

### *Os receptores P1*

Os receptores do tipo P1 ou os receptores para adenosina, como anteriormente destacado, são todos receptores metabotrópicos e subdivididos em quatro tipos, A1, A2A, A2B e A3 e encontrados em mamíferos. Esta classificação e nomenclatura é baseada nas

características bioquímicas, moleculares e farmacológicas destes receptores (Tabela 1) (Fredholm, Ap et al., 2011; Ralevic e Burnstock, 1998; Ribeiro, Sebastião et al., 2002; Sawynok e Liu, 2003).

Tabela 1. Receptores de adenosina e suas principais vias de transdução intracelular.

| Receptor              | Afinidade relativa da adenosina (EC50;nm) | Proteína-G | AMPC    | PKA   | PLC   | Canais de Ca <sup>+2</sup> | Canais de K <sup>+</sup> |
|-----------------------|---|------------|---------|-------|-------|----------------------------|--------------------------|
| <b>A<sub>1</sub></b>  | ~ 70                                      | Gi/Go      | Reduz   | Inibe | Ativa | Inibe                      | Ativa                    |
| <b>A<sub>2A</sub></b> | ~ 150                                     | Gs/Golf    | Aumenta | Ativa | NE    | Inibe ou ativa             | Ativa                    |
| <b>A<sub>2B</sub></b> | ~ 5100                                    | Gs/Gq      | Aumenta | Ativa | Ativa | NE                         | NE                       |
| <b>A<sub>3</sub></b>  | ~ 6500                                    | Gi/Go      | Reduz   | Inibe | Ativa | NE                         | NE                       |

Adaptado de Sawynok e Liu, 2003, Dunwiddie e Masino, 2001. \*NE, não produz efeito.

As primeiras evidências sobre a existência dos receptores de adenosina foram publicadas em meados da década de 70. Nesta época, demonstrou-se que a teofilina (substância pertencente à família das metilxantinas, na qual se encontram também a cafeína e a teobromina) possuía a capacidade de reduzir os efeitos da adenosina em íleo isolado de coelho (Ally e Nakatsu, 1976). Dois anos após, van Calker e colaboradores evidenciaram que a adenosina poderia diminuir ou aumentar o acúmulo de AMPC em células do sistema nervoso central. Após essas evidências, este grupo de pesquisadores

sugeriu a existência de dois tipos de receptores de adenosina. Nestes estudos, foi demonstrado que a adenosina e seus derivados poderiam inibir a atividade da adenilil ciclase em cultura de células de cérebro de camundongos por ativação de um dos tipos dos receptores P1. Por outro lado, essas substâncias também poderiam estimular a adenilil ciclase ativando outro subtipo receptor P1 (Van Calker, Muller et al., 1978; 1979).

Um ano mais tarde, Londos e colaboradores obtiveram resultados muito semelhantes. No entanto, eles utilizaram preparações de membrana de adipócitos de ratos, hepatócitos e células tumorais de Leydig (Londos, Cooper et al., 1980). Os autores denominaram esses receptores de Ri e Ra, porque um receptor era capaz de inibir e outro capaz de ativar a adenilil ciclase, respectivamente (Londos, Cooper et al., 1980; Ralevic e Burnstock, 1998). Mais tarde, Ri e Ra vieram a ser denominados A1 e A2, respectivamente. Alguns anos depois, os receptores A2 (A2R) foram subdivididos em receptores A2A (A2AR) e receptores A2B (A2BR). Esta divisão foi originalmente proposta devido à descoberta de que a estimulação da adenilil ciclase mediada pela adenosina em cérebro de ratos envolvia sua ligação com sítios de alta afinidade em membranas do núcleo estriado e de baixa afinidade em membranas de todo o encéfalo (Daly, Butts-Lamb et al., 1983). No início dos anos 90 foi identificado o quarto receptor para adenosina, que foi nomeado receptor A3 (A3R). Este receptor quando ativado reduz a produção de AMPc através do acoplamento a proteínas G<sub>i/o</sub> (Zhou, Li et al., 1992).

### *A distribuição dos receptores P1*

Os receptores para adenosina P1 estão presentes em várias espécies animais e em vários tecidos. No entanto, a distribuição destes receptores é bastante irregular entre as espécies e principalmente entre os tecidos (Fredholm, Ap et al., 2011). O receptor A1 (A1R) é um receptor ubíquo, sendo que, no sistema nervoso central está distribuído no cerebelo, córtex cerebral,

hipocampo, tálamo, medula espinhal (substância gelatinosa), tronco encefálico, bulbo olfatório e outras regiões. Periféricamente, a distribuição dos A1R é menos abundante que centralmente. Contudo, há uma considerável densidade de A1R em fibras aferentes sensoriais primárias, principalmente em fibras C, as principais em detectar o estímulo nociceptivo (Dixon, Gubitzi et al., 1996; Carruthers, Sellers et al., 2001; Sawynok e Liu, 2003; Schulte e Fredholm, 2003). O receptor A2A de adenosina (A2AR) também é encontrado no sistema nervoso periférico e central, mas sobretudo, no núcleo acumbens, putamen, timo, músculo liso vascular, endotélio, plaquetas e neurônios sensoriais primários (Dixon, Gubitzi et al., 1996; Ralevic e Burnstock, 1998; Carruthers, Sellers et al., 2001). O A2BR é encontrado também no sistema nervoso periférico e central. Entretanto, a densidade deste receptor é muito baixa e ele é expresso consideravelmente apenas no intestino e na bexiga. Os A3R são amplamente distribuídos em diversos mamíferos, porém, até o momento poucos estudos atribuem funções fisiológicas para este receptor (Salvatore, Jacobson et al., 1993; Dixon, Gubitzi et al., 1996; Ralevic e Burnstock, 1998).

### *A sinalização dos receptores P1*

Todos os receptores P1 são acoplados a proteínas G. No entanto, sabe-se que existem várias proteínas G que podem ativar diferentes vias de sinalização. Desta forma, os quatro receptores para adenosina podem ativar ou inibir várias vias de sinalização intracelular, o que resulta, conseqüentemente, em muitas ações fisiológicas (Ralevic e Burnstock, 1998; Jacobson e Gao, 2006).

O A1R é acoplado à família das proteínas  $G_{i/o}$  sensíveis à toxina pertussis. Muitos dos efeitos biológicos causados pela ativação do A1R se dão devido à inibição da formação do segundo mensageiro AMPc (Burnstock, Fredholm et al., 2011; Sawynok, 1998). As subunidades beta e gamma da proteína G acoplada ao A1R, quando ativadas, induzem ativação da fosfolipase C (PLC) (figura 4). A ativação da PLC quebra o fosfatidil 4,5 bifosfato (PIP2)



em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), induzindo assim um aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em seguida, o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  facilita a ativação de algumas enzimas como PKC, fosfolipase D (PLD), fosfolipase A2 (PLA2) entre outras. Outra sinalização que pode ocorrer via ativação do A1R é a ativação de canais de  $\text{K}^+$  (Megson, Dickenson et al., 1995; Ralevic e Burnstock, 1998). A ativação do A1R também pode induzir à redução da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e redução da liberação do CGRP (Dolphin, Forda et al., 1986; Macdonald, Skerritt et al., 1986; Carruthers, Sellers et al., 2001), além causar ativação das vias *fosfatidilinositol 3 quinase* (PI3K) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), mais especificamente ERK1/ERK2 e MEK, proporcionando mudanças na expressão gênica (Boison, Chen et al., 2010; Schulte e Fredholm, 2003).

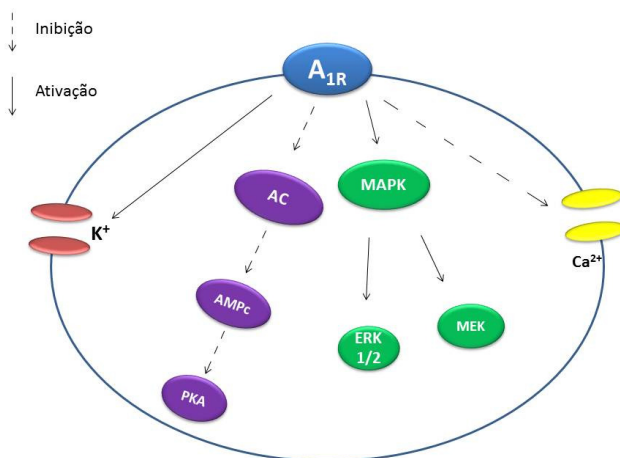


Figura 4. Principais vias de sinalização intracelular desencadeadas após ativação do A1R. Baseado em Jacobson e Gao, 2006.

O A2AR é acoplado a proteínas G<sub>s</sub> (na sua maioria) ou a proteínas G<sub>oif</sub> (principalmente no núcleo estriado). O principal evento intracelular após a ligação do agonista neste receptor é a ativação da

adenilil ciclase e conseqüentemente o aumento da produção de AMPc, que pode induzir a ativação da proteína quinase A (PKA). Então, a PKA se torna capaz de ativar PKC, canais de  $Ca^{+2}$ , canais de  $K^{+}$ , elemento responsivo ligador de AMPc (CREB), MAPK, PLC entre outros (Fredholm, Cunha et al., 2003; Burnstock, 2008; Cunha, Ferre et al., 2008).

As proteínas  $G_s$  e  $G_q$  são as principais responsáveis por desencadear a transdução intracelular do A2BR e possuem como primeiros alvos a adenilil ciclase e a PLC. Em humanos, o A2BR ativado pode aumentar o nível de  $Ca^{2+}$  intracelular por intermédio do IP3 (Feoktistov e Biaggioni, 2011; Peakman e Hill, 1994; Jacobson e Gao, 2006).

Finalmente, o A3R, assim como o A1R, é chamado de receptor inibitório, pois também é acoplado às proteínas  $G_{i/o}$ , mas também pode ser encontrado acoplado às proteínas  $G_{q/11}$ . A principal sinalização do A3R é a inibição da adenilil ciclase e ativação da PLC, IP3, DAG, PKC e PLD. Além disso, assim como outros receptores adenosinérgicos, o A3R pode ativar a via das MAPK, principalmente ERK1/2 (Armstrong e Ganote, 1994; Abbracchio, Brambilla et al., 1995; Palmer, Gettys et al., 1995; Shneyvays, Zinman et al., 2004).

### 1.3 OS RECEPTORES P1 PARA ADENOSINA E DOR

Os receptores para adenosina estão altamente implicados na modulação da nocicepção, principalmente os A1R e A2AR (Sawynok, 1998; 2007). São centenas de estudos que demonstram, avaliam e buscam entender como estes receptores atuam impedindo ou facilitando a detecção, transmissão e percepção dolorosa. Desta forma, discutiremos o envolvimento de cada um desses receptores na dor e na nocicepção.

*Efeitos mediados pelo A1R*

Dentre os receptores adenosinérgicos descritos, o A1R é o principal responsável por induzir analgesia (para revisão ver Burnstock, Fredholm et al., 2011; Sawynok e Liu, 2003). Está bem estabelecido que o A1R é amplamente distribuído na medula espinhal dorsal, principalmente na lamina II (substância gelatinosa) (Horiuchi, Ogata et al., 2010; Choca, Green et al., 1988). Neste local, muitos neurônios aferentes sensoriais fazem conexões com neurônios de segunda ordem. Além do mais, o A1R está localizado em projeções neurais da via descendente dentro do corno dorsal da medula espinhal (Choca, Green et al., 1988). Há vários trabalhos demonstrando a importância do A1R no controle da dor aguda (Nascimento, Figueredo et al., 2010; Song, Hahm et al., 2011; Sawynok, 1998; Jacobson e Gao, 2006). A administração de vários agonistas A1R pode produzir analgesia em uma série de modelos animais (Gong, Li et al., 2010; Nascimento, Figueredo et al., 2010; Song, Hahm et al., 2011; Schmidt, Bohmer et al., 2009). Provavelmente, estes efeitos são causados em grande parte pela ativação de receptores espinhais, mas também por receptores periféricos e supraespinhais. Além disso, animais que não expressam o A1R (animais nocaute) demonstram um limiar de dor reduzido em testes de hiperalgesia (Wu, Hao et al., 2005) e um bloqueio do efeito antinociceptivo induzido por injeções intratecais de adenosina (Johansson, Halldner et al., 2001).

Os A1R também foram encontrados no corpo celular de neurônios aferentes primários (Lima, Souza et al., 2010; Taiwo e Levine, 1990; Karlsten, Gordh et al., 1992). Recentemente, demonstrou-se que a ativação do A1R periférico induz analgesia através da ativação da via intracelular dependente do NO/cGMP/PKG/K<sub>ATP</sub> (Lima, Souza et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que agonistas A1R reduziram a hiperalgesia térmica, mas não a hiperalgesia mecânica induzida por lesão no nervo ciático (Cairns, 2009). Sabe-se que a hiperalgesia térmica é mediada principalmente por fibras C e a hiperalgesia mecânica por sua vez depende em sua maior parte por fibras A, o que sugere a

presença destes receptores nas fibras C, mas não nas fibras do tipo A (Cairns, 2009).

Com relação à dor crônica, também há uma vasta literatura demonstrando que agonistas do A1R reduzem a nocicepção em vários modelos animais, como neuropatias periféricas e dor induzida por artrite (para revisão ver Hasko et al., 2008). Além disso, alguns estudos clínicos que utilizaram agonistas A1R também mostraram resultados promissores (Horiuchi, Ogata et al., 2010; Song, Hahm et al. 2011; Curros-Criado e Herrero, 2005; Hwang, Hwang et al., 2005). Outros mecanismos também contribuem para o efeito analgésico da ativação do A1R em modelos de dor crônica, como por exemplo, a inibição da liberação de glutamato.

#### *Efeitos mediados pelo A2AR*

Taiwo e Levine (1990) demonstraram que a ativação dos A1R e A2AR resulta em efeitos distintos em modelos animais de nocicepção periférica. De forma geral, eles demonstraram que o A1R mediava analgesia enquanto o A2AR facilitava a transmissão nociceptiva na periferia. Posteriormente, outros autores também demonstraram que o A2AR ativado perifericamente induz nocicepção (Li, Hao et al., 2010; Taiwo e Levine, 1990; Doak e Sawynok, 1995). Entretanto, em nível central a função do A2AR na dor ainda não está totalmente elucidada. Alguns autores demonstraram que o A2AR ativado reduz a nocicepção em vários modelos animais (By, Condo et al., 2011; Borghi, Przewlocka et al., 2002; Yoon, Bae et al., 2005). Por outro lado, outros estudos mostram que a ativação espinal deste receptor induz nocicepção (Bastia, Varani et al., 2002; Hussey, Clarke et al., 2007). Esses resultados controversos podem estar associados à transdução intracelular do A2AR. A ativação deste receptor induz um aumento da produção de AMPc (que pode induzir dor) e também à abertura de canais de  $K^+$  (que pode reduzir a dor) (Sawynok, 1998; Regaya, Pham et al., 2004; Jacobson e Gao, 2006).

Estudos utilizando animais nocaute para o A2AR demonstraram que estes animais apresentavam menor sensibilidade à dor, sugerindo que o A2AR é um facilitador da transmissão da dor aguda (Hussey, Clarke et al., 2007) e crônica (Bura, Nadal et al., 2008). Além disso, em animais nocaute para A2AR submetidos a modelos de dor crônica, foi observado uma menor ativação de microglia e astrócitos quando comparado com animais selvagens (Bura, Nadal et al., 2008). Sabe-se ainda que o A2AR localizado em células gliais é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios que participam da indução e manutenção da dor crônica (Boison, Chen et al., 2010). Logo, o bloqueio do A2AR pode ser uma abordagem interessante para futuros tratamentos de dores neuropáticas e crônicas. No entanto, também em estudos de dor neuropática existem resultados distintos acerca do envolvimento do A2AR. Um trabalho recente mostrou que uma única injeção intratecal de agonista A2AR foi capaz de induzir antinocicepção durante vários dias em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática (Loram, Harrison et al., 2009). Este conjunto de dados indica que o A2AR pode ter um papel relevante na modulação da nocicepção. Entretanto, estudos adicionais são necessários para explicar precisamente como este receptor atua em determinadas situações e tipos de dor, uma vez que ele também pode ser útil em futuras abordagens clínicas.

#### *Efeitos mediados pelo A2BR na dor*

Poucos estudos têm avaliado a função do A2BR na dor, no entanto, a maioria destes sugere que o A2BR facilita a transmissão nociceptiva, pois antagonistas para este receptor reduzem a dor em diferentes modelos animais (Abo-Salem, Hayallah et al., 2004; Godfrey, Yan et al., 2006; Bilkei-Gorzo, Abo-Salem et al., 2008).

#### *Efeitos mediados pelo A3R na dor*

Similarmente ao A2BR, o A3R não parece ser um alvo interessante para o controle da dor. Este receptor está mais implicado

em condições patológicas tais como doenças isquêmicas e inflamação (Borea, Gessi et al., 2009). Relacionado à dor, há raros estudos avaliando o papel do A3R. Sawynok e colaboradores demonstraram que a ativação do A3R causa dor e edema de pata através da liberação de histamina e serotonina. Em alguns modelos de dor, os animais nocaute para o A3R apresentaram um limiar de dor elevado em comparação com animais selvagens. No entanto, em outros modelos de dor, o mesmo animal nocaute não demonstrou diferença significativa em relação aos selvagens (Wu, Hao et al., 2002; Fedorova, Jacobson et al., 2003).

#### 1.4 ADENOSINA E DOR

##### *Estudos pré-clínicos e clínicos*

Vários estudos pré-clínicos têm demonstrado que a adenosina e seus análogos produzem ações antinociceptivas em modelos animais de dor nociceptiva e dor inflamatória e que são capazes de prevenir/reverter a dor neuropática em modelos de lesão nervosa (Poon e Sawynok, 1998; Reeve, Dickenson et al., 1998; Sawynok, 1998; Rane, Karlsten et al., 1999; Bastia, Varani et al., 2002; Nascimento, Figueredo et al., 2010). Por sua vez, estudos clínicos corroboram os dados de ensaios pré-clínicos ao mostrar que em pacientes com dor neuropática, a adenosina aliviou a dor espontânea, a alodínia tátil e térmica, bem como a hiperalgesia térmica (Qu, Cooney et al., 1997; Lynch, Clark et al., 2003). Outro estudo interessante demonstrou que pacientes que sofriam de dor neuropática apresentavam níveis sanguíneos reduzidos de adenosina (Guieu, Couraud et al., 1996; Guieu, Peragut et al., 1996). Além disso, a infusão intravenosa de adenosina durante cirurgia torácica reduziu a dor pós-operatória (Sollevi, Belfrage et al., 1995; Lynch, Clark et al., 2003). A administração espinhal de adenosina e de análogos de adenosina em humanos também apresentou efeitos analgésicos. Um estudo clínico de fase I em voluntários saudáveis

demonstrou que 1 mg de adenosina administrada pela via intratecal não apresentou efeitos colaterais e causou significativa redução da dor inflamatória induzida por óleo de mostarda, da dor isquêmica induzida por torniquete e reduziu a área de alodinia secundária após inflamação da pele (Rane, Segerdahl et al., 1998). A redução de algumas características da dor neuropática e da dor pós-operatória apresentada pela adenosina e seus análogos em humanos, ocorre provavelmente como resultado de sua ação sobre os A1R (Lynch, Clark et al., 2003).

### *Farmacocinética da adenosina*

Clinicamente, a adenosina é utilizada há décadas como antiarrítmico para tratar a taquicardia supraventricular paroxística, por diminuir a formação de impulsos no nodo sinoatrial (Muller e Jacobson, 2011). Estudos farmacocinéticos da adenosina em humanos demonstram que a meia-vida da adenosina na circulação sanguínea e em outros fluídos é em torno de apenas 10 s, fato que ocorre devido às enzimas responsáveis pela sua degradação serem encontradas em altas concentrações principalmente em hemácias e em células endoteliais (Moser, Schrader et al., 1989; Hasko, Linden et al., 2008). Em ratos, é possível que a meia-vida da adenosina seja um pouco mais longa (Tsai, Lin et al., 2010). Além disso, principalmente por ação da enzima adenosina quinase (AK), que parece ter uma afinidade maior pela adenosina do que a ADA, essa rápida síntese também se torna uma barreira metabólica para a adenosina atingir o sistema nervoso central (Pardridge, Yoshikawa et al., 1994; Sawynok, 1998). Outrossim, no início deste ano foi demonstrado que o AMP, que é o precursor da adenosina mas que também pode ser formado após a fosforilação da adenosina pela AK, também é agonista do A1R (Rittiner, Korboukh et al., 2012) . Também é importante relatar o fato de não existir estudos avaliando o decurso temporal da farmacocinética da inosina ou da adenosina em roedores. Assim, levando-se em conta que a adenosina exógena apresenta efeitos biológicos tanto em animais como em humanos

(Doak e Sawynok, 1995; Guieu, Couraud et al., 1996; Guieu, Peragut et al., 1996; Sawynok, 1998; Lynch, Clark et al., 2003), pode-se cogitar que parte dos efeitos atribuídos à adenosina sejam causados pela inosina ou pelo AMP devido às ações da ADA e AK, respectivamente.

## 1.5 OUTRAS ABORDAGENS PARA O CONTROLE DA DOR ENVOLVENDO O SISTEMA ADENOSINÉRGICO

### *Manipulação dos receptores de adenosina via modulação enzimática*

Keil e DeLander (1992) demonstraram que a administração de inibidor da AK poderia apresentar atividade antinociceptiva. A enzima no caso inibida, foi a AK, que conforme pôde ser visto na figura 2, é responsável pela fosforilação da adenosina em AMP. A partir deste estudo, vários outros surgiram demonstrando que a inibição desta enzima poderia promover ou favorecer a antinocicepção causada pela adenosina, em virtude do aumento dos níveis extracelulares deste nucleosídeo. Mais tarde, outra abordagem semelhante foi utilizada, desta vez, inibindo a enzima ADA, que desamina a adenosina, transformando-a em inosina. No entanto, em relação aos inibidores da ADA, os resultados não são muito claros. Alguns estudos demonstram que inibidores da ADA são capazes de induzir antinocicepção *per se*, enquanto outros estudos demonstram que não (Keil e Delander, 1992; 1994; Poon e Sawynok, 1999).

De posse da informação de que, em alguns modelos animais, a inibição da ADA não induz antinocicepção, aventamos a hipótese de que a quebra da adenosina em inosina poderia ser um facilitador da analgesia em animais.

### *Analgesia induzida pelo fornecimento de produtos purinérgicos*

A enzima NT5'E localiza-se na membrana celular e catalisa a conversão extracelular de AMP para adenosina em vários tecidos,



inclusive no gânglio da raiz dorsal (GRD) e substância gelatinosa (lâmina II) (Zylka, 2011). O efeito analgésico do AMP, combinado com inibidor de AK é reduzido pela metade em animais nocaute NT5E, e totalmente bloqueado em animais nocaute para o A1R (Sowa, Taylor-Blake et al., 2010). Esses dados podem sugerir que a conversão do AMP em adenosina facilita a antinocicepção. Esses dados inspiraram outro estudo no qual avaliou-se se a administração de NT5E poderia induzir um efeito antinociceptivo prolongado. A administração de NT5E apresentou efeito antinociceptivo que persistiu até 2 dias em modelos de dor inflamatória e neuropática. Efeito que foi dependente do A1R (Sowa, Voss et al., 2010). Portanto, o suprimento de enzimas que geram adenosina é uma nova e interessante abordagem que pode ser testada para tratar a dor.

#### *Envolvimento dos receptores de adenosina na analgesia induzida pela acupuntura*

Em um elegante estudo publicado em 2010, Goldman e colaboradores mostraram que a analgesia induzida pela acupuntura depende da liberação local de purinas, tais como ATP, ADP, AMP e adenosina (figura 5). Ademais, demonstrou-se que agonistas A1R replicam o efeito da acupuntura e que em animais nocaute A1R, a acupuntura não apresentou efeito antinociceptivo. Por fim, demonstrou-se que a inibição da ADA prolongou a analgesia induzida pela acupuntura em camundongos (Goldman, Chen et al., 2010). Direcionando estes resultados para a prática clínica da acupuntura, é indispensável mencionar que a cafeína, droga mais usada em todo o mundo e encontrada em bebidas como chás, café, chimarrão, bebidas achocolatadas, energéticos e outras, é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina.

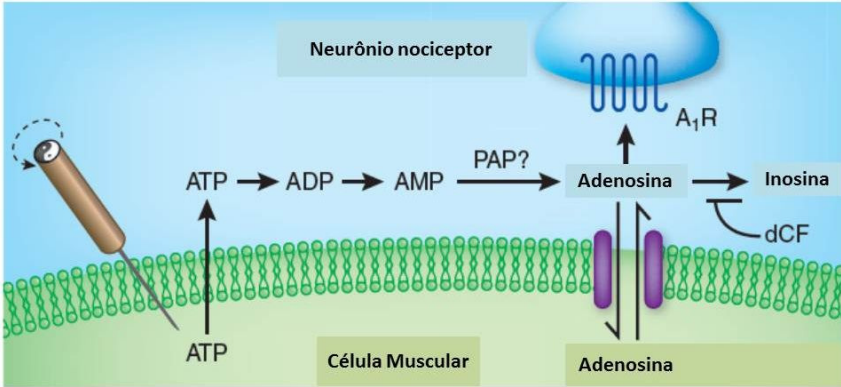


Figura 5. Esquema de mecanismo proposto para o envolvimento do sistema purinérgico na analgesia induzida por acupuntura por Goldman e colaboradores. ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; PAP, fosfatase ácida prostática; DCF, deoxicoformicina (inibidor da adenosina desaminase); A<sub>1</sub>R, receptor A<sub>1</sub> de adenosina (Zylka, 2010).

Isto posto, pacientes em tratamento com acupuntura deveriam evitar bebidas com cafeína, pois estas bebidas podem reduzir o efeito analgésico da acupuntura. Interessante destacar que na China e outros países asiáticos, onde a acupuntura é utilizada largamente e com maior eficácia do que no mundo ocidental, a ingestão média de cafeína por pessoa é várias vezes menor do que a média de consumo nos países do ocidente (Fredholm, Battig et al., 1999). Isto pode ser uma das causas da efetividade analgésica maior da acupuntura nestes povos, adicionado logicamente às questões culturais.

## 1.6 A INOSINA

A inosina é um nucleosídeo que possui em sua estrutura uma hipoxantina ligada a um anel de ribose (figura 6). Como mencionado anteriormente, é o primeiro metabólito da adenosina, sendo formada

pela ação da ADA. A quebra da inosina pela PNP origina hipoxantinas. O peso molecular da inosina é 268,23 g/mol e sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{12}N_4O_5$ .

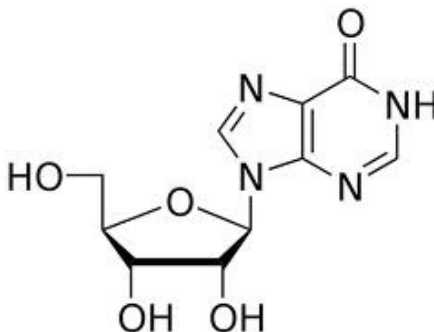


Figura 6. Estrutura química da inosina

#### *Breve histórico da inosina*

Durante muitos anos após a descoberta da inosina, este metabólito purinérgico foi considerado uma molécula desprovida de funções ou efeitos biológicos. Os primeiros estudos envolvendo a inosina avaliavam principalmente a participação deste nucleosídeo em processos metabólicos. Estes primeiros trabalhos se interessavam em descobrir como a inosina juntamente com a adenosina e fosfatos estava envolvida, por exemplo, no metabolismo muscular (Kleinzeller, 1942), reações com miosina (Spicer e Bowen, 1951) e em outras reações em tecidos animais (Krebs e Hems, 1953).

Um interessante artigo sobre os efeitos biológicos da inosina demonstrou que ela era capaz de corrigir a porfíria em um modelo animal. Nesta publicação, os autores descrevem que a inosina foi escolhida para tratar a porfíria porque mesmo em doses elevadas esta molécula não apresentava efeitos tóxicos (Lottsfeldt, Labbe et al., 1961). Além disso, vários cientistas, a maioria da Itália, pesquisavam nos anos 60 os efeitos da inosina principalmente nos sistemas

cardiovascular e hepático (Carminati, 1963; Tincani e Traldi, 1963; Corsini, Grazia et al., 1964).

### *As funções fisiológicas da inosina*

Um trabalho que teve grande importância pela época em que foi publicado e pela função atribuída à inosina, foi o trabalho de Aviado que demonstrou nos anos 70 que a inosina exercia ações cardiotônicas e vasodilatação coronariana. Ainda, este mesmo pesquisador demonstrou que a inosina aumentava a contratilidade ventricular, diminuía a resistência vascular coronariana e em altas doses induzia uma leve queda da pressão arterial (Juhász-Nagy e Aviado, 1977; Aviado, 1978). Depois de décadas sem que houvesse publicações importantes sobre efeitos biológicos da inosina, surgiram, principalmente a partir dos anos 2000, várias publicações que demonstravam que a inosina possui diversas funções fisiológicas.

A inosina promove o crescimento axonal no SNC em experimentos *in vitro* por meio da indução de proteínas, como a proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43). Ademais, a inosina foi capaz de induzir crescimento axonal em ratos submetidos a uma transecção do trato corticoespinhal. Os mesmos autores demonstraram ainda, que em animais que sofreram infarto cerebral, a inosina estimulou neurônios do lado não lesionado do cérebro a enviarem projeções para áreas lesionadas (Benowitz, Goldberg et al., 1999; Benowitz, Goldberg et al., 2002; Chen, Goldberg et al., 2002). A inosina também induziu regeneração de neurônios ganglionares da retina de ratos que haviam sido axotomizados (Wu, You et al., 2003). Todos estes dados sugerem que a inosina possui potencial para ser utilizada em futuros estudos como uma nova abordagem para tratar lesões nervosas tanto no SNC como no SNP.

### *A inosina na inflamação*

Apesar dos efeitos sobre o sistema cardiovascular e crescimento axonal, são os efeitos anti-inflamatórios da inosina os

mais estudados. A inosina tem apresentado efeitos anti-inflamatórios em vários modelos *in vivo* e *in vitro* de inflamação. A inosina protege contra pancreatite aguda reduzindo a ação de mediadores inflamatórios e os distúrbios na microcirculação, além de induzir a recuperação de aspectos histológicos do pâncreas (Yamagiwa, Shimosegawa et al., 2004; Schneider, Pietschmann et al., 2006). Outrossim, a inosina apresenta também importantes efeitos anti-inflamatórios em modelos animais de choque séptico ou endotóxico, pois reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, a inflamação sistêmica, os danos a órgãos e a disfunção vascular (Garcia Soriano, Liaudet et al., 2001; Liaudet, Mabley et al., 2001).

Além disso, estudos *in vitro* têm evidenciado que a inosina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), e reduz a ativação de neutrófilos humanos (Hasko, Kuhel et al., 2000; Marton, Pacher et al., 2001; Gomez e Sitkovsky, 2003). Estes efeitos parecem ser mediados pelos receptores de adenosina (Hasko, Kuhel et al., 2000; Gomez e Sitkovsky, 2003). A inosina também inibe a ativação plaquetária e apresenta efeito neuroprotetor (para revisão ver Hasko, Sitkovsky et al., 2004).

### *A inosina na dor*

Em virtude da inosina apresentar efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios, e sabendo-se que algumas substâncias com esse perfil de atividade serem eficazes em reduzir a dor, na década passada nosso grupo de pesquisa interessou-se em avaliar o possível efeito antinociceptivo da inosina.

A inosina possui ação antinociceptiva quando administrada por diferentes vias (intraperitoneal, i.p.; oral p.o.; intratecal, i.t.; e intracerebroventricular, i.c.v.) contra a dor induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. A inosina também reduz a dor inflamatória observada na segunda fase do teste da formalina, fase esta que envolve principalmente a ativação de fibras C e A $\delta$ ,

liberação de mediadores pró-inflamatórios e sensibilização central. Por outro lado, a primeira fase da dor induzida pela formalina, quando predomina a ativação direta de nociceptores, não é afetada pela inosina mesmo em doses elevadas (Nascimento, Figueredo et al., 2010). Os efeitos da inosina neste modelo de dor estendem os dados do modelo do ácido acético, pois o teste da formalina é um modelo de nocicepção que apresenta menos resultados falso-positivos, ao contrário do primeiro que é mais inespecífico e utilizado principalmente como um modelo para triagem inicial de drogas com potencial analgésico.

Em relação ao teste da formalina, sabe-se também que este alógeno induz alterações e sensibilização em nível medular. Desta forma, a ação da inosina poderia ser explicada em parte devido à existência dos receptores de adenosina na medula espinhal, como na substância gelatinosa, principalmente o A1R, que parece ser ativado quando a inosina é administrada sistemicamente. No modelo de dor aguda induzida por glutamato (principal aminoácido excitatório envolvido na transmissão da informação nociceptiva) na pata de camundongos, a inosina também reduziu de forma dependente da dose o comportamento de dor (Nascimento, Figueredo et al., 2010).

Como já citado, a inosina possui efeitos anti-inflamatórios em animais quando avaliada in vivo e ex vivo publicados por diferentes grupos de pesquisadores. Além disso, estes efeitos corroboram com os nossos resultados que demonstram a atividade antinociceptiva deste nucleosídeo em modelos de dor aguda. Assim, nos questionamos se não seria a inosina também capaz de induzir antinocicepção em modelos de dor crônica inflamatória ou neuropática, modelos estes que dependem em parte do processo inflamatório para sua indução e manutenção da dor.

#### *Sinalização desencadeada pela inosina para induzir antinocicepção*

Logicamente, em virtude dos dados envolvendo inosina e dor serem muito recentes, sabe-se muito pouco sobre a sinalização intracelular implicada no seu efeito antinociceptivo. Nosso grupo

demonstrou, em 2010, que antagonistas dos A1R e A2AR foram capazes de bloquear a antinocicepção induzida pela inosina no modelo do ácido acético. Assim, acreditamos que o efeito mediado pelo A1R seja principalmente devido à redução da produção de AMPc, e que a principal contribuição do A2AR seja pela sua função anti-inflamatória, visto que o ácido acético induz uma nocicepção visceral com perfil inflamatório (Nascimento, Figueredo et al., 2010).

Assumindo que os efeitos antinociceptivos da inosina dependem dos receptores de adenosina A1R e A2AR, podemos considerar que as vias de sinalização dos receptores de adenosina estão fortemente implicadas em sua mediação. Assim, sabemos que o A1R, que é acoplado a proteínas  $G_{i/o}$ , induz uma cascata de sinalização que inibe a adenilil ciclase e ativa a PLC (Jacobson e Gao, 2006) .

Quando ativado, o A1R ainda causa abertura de canais de  $K^+$  e indução das vias PI3K e MAPK (Sawynok, 1998; Schulte e Fredholm, 2003; Jacobson e Gao, 2006). Outra resposta importante da ativação do A1R é a inibição da liberação de neurotransmissores de terminações sinápticas, uma ação que tem sido ligada à redução do influxo e da disponibilidade de  $Ca^{2+}$  (Wu e Saggau, 1997; Haas e Selbach, 2000). Neste caso, a inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, seria maior que a inibição da liberação de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), por exemplo (Hollins e Stone, 1980). Esse ‘balanço’ favorece a inibição da transmissão nociceptiva, resultando também em mais um mecanismo que pode induzir analgesia quando o A1R é ativado.

### *Os receptores de adenosina envolvidos no efeito da inosina*

O A1R é considerado o mais importante receptor do sistema adenosinérgico no que se refere à dor (Sawynok, 1998; Burnstock, 2007). O A1R também parece ser o principal receptor envolvido no efeito antinociceptivo da inosina, visto que os antagonistas seletivos do A1R (DPCPX e 8-PT) revertem a analgesia induzida por este

nucleosídeo (Nascimento, Figueredo et al., 2010). Outros estudos têm mostrado que antagonistas dos receptores de adenosina bloqueiam efeitos da inosina *in vivo* e *in vitro* (Hasko, Kuhel et al., 2000) e que a inosina deixa de apresentar efeitos imunoprotetores quando avaliada em animais nocaute para o A2AR e A3R (Gomez e Sitkovsky, 2003).

Como já mencionado anteriormente, o envolvimento do receptor A2AR na dor não está ainda totalmente elucidado. No modelo de dor induzida pelo ácido acético, o antagonista do A2AR, ZM241385, bloqueou a ação analgésica da inosina, demonstrando que a ativação deste receptor pela inosina induz antinocicepção no modelo de dor visceral (Nascimento, Figueredo et al., 2010). A indução de antinocicepção através da ativação do A2AR pode decorrer: a) do perfil anti-inflamatório do A2AR e da inosina (Milne e Palmer, 2011; Hasko, Kuhel et al., 2000; Hasko, Sitkovsky et al., 2004) ou b) da ativação dos canais de K<sup>+</sup> (Regaya, Pham et al., 2004). No entanto, como já mencionado anteriormente, este perfil funcional do A2AR ocorre apenas em alguns testes, o que gera muitas discussões acerca deste receptor, demonstrando claramente a necessidade de mais estudos nesta área.

### *Há receptor para a inosina?*

Poucos estudos têm avaliado se a inosina se liga a receptores de adenosina. Jin e colaboradores demonstraram que em células mastocitárias a inosina se liga a receptores A3R de adenosina, mas não em A1R ou A2AR, embora ambos sejam expressos por estas células (Jin, Shepherd et al., 1997). Em 2001, o grupo do professor Fredholm realizou a técnica de acúmulo de AMPc utilizando receptores humanos de adenosina expressos em ovários de hamster. Foi observado que a inosina deveria se ligar fracamente aos receptores A1R e A3R, mas não ao A2AR (Fredholm, Irenius et al., 2001). Fredholm concluiu que a inosina não poderia ser considerado um ligante natural dos receptores de adenosina, devido à baixa especificidade da inosina em reduzir o acúmulo de AMPc.



Entretanto, além de raros, estes estudos utilizaram amostras que pouco expressam o A1R, por exemplo. Além disso, existem vários estudos *in vivo*, nos quais os efeitos da inosina são bloqueados por antagonistas de adenosina ou animais nocaute para receptores de adenosina (Nascimento, Figueredo et al., 2010; Hasko, Kuhel et al., 2000; Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko, Sitkovsky et al., 2004), que sugerem que a inosina poderia interagir diretamente com os receptores de adenosina. Ainda, podemos observar a semelhança estrutural entre as moléculas da adenosina e da inosina, semelhança esta que poderia favorecer a ligação da segunda no mesmo sítio do receptor onde a primeira se liga (Figura 7).

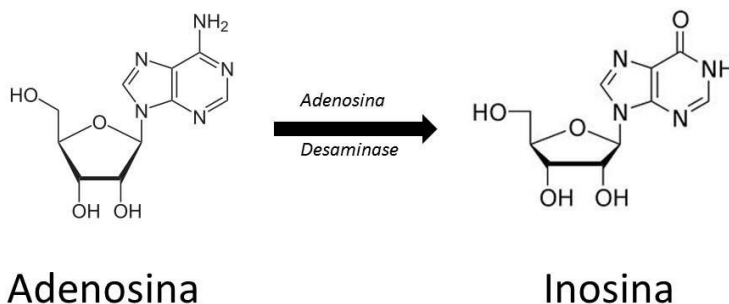


Figura 7. Conversão da adenosina em inosina realizada pela ADA. As estruturas químicas destes dois nucleosídeos são muito semelhantes.

Recentemente, descobriu-se que outra molécula do sistema purinérgico é capaz de ativar o A1R. Demonstrou-se que o AMP, molécula precursora da adenosina e a qual acreditava-se causar efeitos biológicos através da ativação indireta do A1R (Street et al., 2011), é um agonista total do A1R equivalente à adenosina (Rittiner, Korboukh et al., 2012). Este estudo demonstra que análogos da adenosina de ocorrência natural (além de substâncias sintéticas) também podem ativar diretamente receptores adenosinérgicos. Ainda, este mesmo estudo demonstrou que a inosina foi capaz de reduzir o acúmulo de AMPc em células HEK transfectadas com

A1R. *Assim, sugerimos que a inosina possa também ser um ligante natural dos receptores de adenosina, atuando pelo menos como um agonista parcial.*

## 1.7 DOR

Sempre que ouvimos a palavra *dor* relacionamos com uma sensação necessariamente mau e desagradável. No entanto, seria praticamente impossível nos mantermos vivos e saudáveis sem este mecanismo sensorial. A dor é na verdade um interessante sistema de alerta que nos protege de perigos reais ou iminentes de lesões ao acionar respostas de proteção (Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (para revisão ver Loeser e Melzack, 1999). Desta forma, a dor aguda pode ser definida como uma modalidade sensorial semelhante à visão ou ao olfato, onde um estímulo de certa qualidade ou intensidade é detectado por células especializadas (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001). Quando um estímulo térmico, mecânico ou químico ativa neurônios sensoriais primários nociceptivos, inicia-se a transmissão da informação dolorosa. Os nociceptores conduzem informações nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. Os neurônios do GRD emitem projeções axonais em duas direções, para a periferia e ao corno dorsal da medula espinhal (para revisão ver Besson, 1999; Wall e Melzack, 1999).

O tempo e a origem da dor são os principais fatores utilizados para classificá-la. Quanto à origem, a dor classifica-se em nociceptiva (ativação excessiva de nociceptores), neurogênica (tecido neuronal é lesionado e libera peptídeos que induzem a dor), neuropática (ocorre quando há lesão ou disfunção de um ou mais nervos) ou psicogênica (não possui um fator somático identificável

(para revisão ver Millan, 1999). Quanto ao tempo, a dor aguda se dá pela ativação direta dos nociceptores (sensores especializados para a detecção da dor) após estímulos que podem causar lesão ou apenas estimulam o nociceptor sem consequências teciduais. A dor que perdura para além de semanas, seja por meses ou anos, é classificada como dor crônica. Este tipo de dor, pode inclusive persistir mesmo após a cura ou recuperação tecidual da lesão que inicialmente a induziu (para revisão ver Loeser e Melzack, 1999; Millan, 1999).

Em muitos casos, dor induzida por lesão tecidual ativa uma série de eventos celulares e moleculares em cascata. Assim, há liberação de enzimas e proteínas que se sucedem ou induzem uma à outra, originando um processo inflamatório. É normal nestas situações, ocorrer uma sensibilização dos nociceptores, ou seja, uma redução do seu limiar de ativação, induzindo conseqüentemente uma potencialização da transmissão nociceptiva. Assim, surge o termo *hiperalgesia*. Na realidade, mesmo entre especialistas da área, as definições associadas aos termos *hiperalgesia*, *alodínia* e *hipernocicepção* sempre causaram discussões. *Hiperalgesia* seria uma resposta exacerbada a um estímulo previamente nocivo, enquanto que a *alodínia* seria uma resposta nociceptiva ou dolorosa a um estímulo inócuo. Ou seja, neste caso o principal diferencial entre *hiperalgesia* e *alodínia* seria o estímulo aplicado para a indução da resposta, e não o processo de sensibilização em si, o que gera muitos desencontros de utilização (para revisão ver Woolf, 1995; Millan, 1999, Haddad, 2007). Por outro lado, alguns pesquisadores utilizam o termo *hipernocicepção* para estudos envolvendo animais justamente pelas discussões dos termos *hiperalgesia* e *alodínia* que são utilizados de formas diferentes em muitas publicações. Para estes pesquisadores, o termo *hipernocicepção* seria empregado de uma forma mais ampla, e significaria de forma geral uma sensibilização dos nociceptores ou redução do limiar de dor (Lima, Souza et al., 2010; Sachs, Cunha et al., 2004; Cunha, Verri et al., 2005).

Então, em 2008 a revista *Pain* publicou o protocolo de Kyoto sobre a terminologia básica da dor, elaborada pela IASP após um

encontro para definições de termos empregados no campo da dor. Deste modo, foi proposto que o termo hiperalgesia pudesse ser usado como um termo “guarda-chuva” para abrigar todas as condições nas quais houvesse um aumento da sensibilidade à dor. De acordo com esta nova proposta, a definição de hiperalgesia seria paralela à definição de sensibilização (Loeser e Treede, 2008). Assim, alodínia seria um caso especial de hiperalgesia, o qual foi introduzido para descrever uma situação clínica que agora é chamada “alodínia tátil dinâmica”. Desta forma, considerando que o termo alodínia é classificado atualmente como um tipo de hiperalgesia, e que este trabalho apresentará apenas resultados obtidos com animais, o termo *hiperalgesia* será empregado para reportar sobre todos os experimentos realizados em animais.

#### *A dor em animais*

A expressão dor é válida apenas quando nos referimos a humanos, pois, pela sua definição, a dor é uma experiência que envolve componentes neurais, fisiológicos, comportamentais e psicológicos. Obviamente, a dor que um animal é capaz de sentir pode envolver também muitos aspectos, porém, até o momento somos capazes de mensurar com relativa precisão ou exatidão apenas os seus aspectos neurais e fisiológicos. Dessa forma, para distinguir os aspectos envolvidos em estudos com animais, surgiu o termo nocicepção. Nocicepção deriva do latim, nocere, que significa ferir. A nocicepção define-se então, como a parte fisiológica da dor, desprezando-se os aspectos emocionais e/ou psicológicos. Assim, a nocicepção torna-se passível de mensuração, e em consequência disso os modelos animais para investigação da dor, são na verdade, modelos animais de nocicepção (para revisão ver Lamotte, Shimada et al., 2011; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001; Le Bars, Gozariu et al., 2001).

### *Os sensores da dor*

A ideia de detecção e transmissão da dor é muito antiga. René Descartes, que viveu a maior parte de sua vida no século XVII, escreveu sobre seu conceito da via da dor (Figura 8): “Se por exemplo, seu pé está perto de um fogo em chamas, pequenas partículas do fogo se movem em uma grande velocidade para a sua pele. Essas partículas possuem o poder de se colocarem em marcha e começarem a percorrer a sua pele, como se fossem puxadas por um delicado fio, que está anexado à pele. Neste instante, poros da pele vão se abrindo e este delicado fio pode transmitir as partículas de fogo, que continuam percorrendo sua pele, sobem pelo seu tronco, e finalmente as partículas de fogo puxam uma corda que faz bater o sino da dor na sua cabeça” (tradução livre).



Figura 8. Teoria de René Descartes sobre a via da dor (detecção, transmissão e percepção). Figura extraída de Wall e Melzack (1965).

Assim, há quase quatrocentos anos Descartes propôs um circuito da dor completo da forma em que era possível estudá-lo na época. No entanto, o conceito de nociceptor surgiu apenas no início do século XX, ainda muito antes do advento da tecnologia biomolecular e de técnicas eletrofisiológicas apuradas. Em 1908, o fisiologista Sherrington propôs a existência do nociceptor, um

neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual (para revisão ver McMahon e Koltzenburg, 1990; Julius e Basbaum, 2001). De acordo com o modelo de Sherrington, nociceptores teriam limiares ou sensibilidades características que os distinguiriam de outras fibras nervosas sensoriais. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos mostraram de fato a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, intensa pressão ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos, tais como um contato morno ou um leve toque (Greer e Hoyt, 1990; Julius e Basbaum, 2001).

### *Classificação dos nociceptores*

Os nociceptores são classificados de acordo com suas características anatômicas, de velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. A maioria dos nociceptores são formados por fibras de pequeno diâmetro. Neste grupo, encontram-se as fibras do tipo C e do tipo A $\delta$  que são responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva sob condições fisiológicas. As fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, que se distinguem pela temperatura de ativação (para revisão ver Millan, 1999; Wall e Melzack, 1999; Julius e Basbaum, 2001; Jacobson e Gao, 2006).

As fibras C, que em sua maioria são também conhecidas como fibras polimodais por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em virtude de não possuírem bainha de mielina (Plevry e Lauretti, 1996; para revisão ver Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Estas fibras são classificadas em dois grandes grupos. O das fibras chamadas peptidérgicas, que expressam o peptídeo neurotransmissor substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e receptores de tirosina quinase A (TrKA) que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF); e o das fibras C que expressam o receptor P2X3, um subtipo de receptor iônico para ATP. Além disso,

envia suas terminações nervosas quase que exclusivamente para a lâmina II, que juntamente com a lâmina I, constituem a região chamada substância gelatinosa (para revisão ver Besson, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001).

### *Vias da nocicepção*

Como já visto, Descartes foi o primeiro a propor uma via de nocicepção, a qual podemos dizer que apenas foi melhor “dissecada” com o passar dos séculos devido ao advento de tecnologias e a contribuição de outros pesquisadores. Assim, sabemos hoje que primeiramente os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários ao corno dorsal da medula espinhal nas respectivas lâminas onde realizam conexões sinápticas com outros nociceptores de segunda ordem, com exceção dos aferentes primários localizados na cabeça e pescoço. Para simplificar e tornar mais didática a compreensão dessas conexões e terminações dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal, este foi dividido em lâminas de I a VI. Foi considerada a lâmina I a mais superficial e a lâmina VI a mais profunda. As fibras A $\beta$ , responsáveis por sensações mecânicas e de propriocepção, terminam em lâminas mais profundas, como III, IV, V e VI. As fibras A $\delta$  que respondem a estímulos nocivos terminam nas lâminas de I a V, enquanto que as fibras A $\delta$  sensíveis mecanicamente realizam conexões nas lâminas II e III. As fibras C, que são os principais nociceptores, terminam nas lâminas I e II (para revisão ver Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Após isso, a informação nociceptiva se projeta do corno dorsal para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários. Além disso, este processo excitatório também depende de canais de Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>, sendo os canais de Ca<sup>2+</sup> os principais reguladores da liberação de neurotransmissores.

As vias ascendentes da dor mais importantes são a espinotalâmica, a trigeminal, a espinoparabraquial e a via

espinomesencefálica. Dentre elas, a via espinotalâmica é a mais estudada. Os neurônios de segunda ordem desta via, após a sinapse com os neurônios de primeira ordem no corno dorsal emitem suas projeções diretamente ao tálamo e córtex somatosensorial, onde a informação é processada. Por outro lado, existem vias descendentes da dor, que atuam no controle da percepção da dor. Uma das principais vias descendentes inibitória ocorre quando a substância cinzenta periaquedutal (PAG), é estimulada. A estimulação elétrica da PAG, por exemplo, causa uma analgesia intensa, que se dá pela transmissão sináptica no núcleo da rafe, através do neurotransmissor serotonina e dos interneurônios que inibem a transmissão da via espinotalâmica. O hipotálamo e a amígdala também são estruturas que participam da modulação descendente inibitória, além de sistemas de neurotransmissores, como o opióide, gabaérgico, glutamatérgico, canabinóides, noradrenérgico, purinérgico, entre outros (para revisão ver Millan, 1999, Hunt e Mantyh, 2001).

### *Mediadores da nociceção*

O estímulo que é capaz de ativar os nociceptores, seja ele térmico, mecânico ou de origem química, pode também ser o fator desencadeante da produção e liberação de vários moduladores da transmissão nociceptiva. Após a lesão tecidual, esses mediadores podem ser liberados por neurônios sensoriais e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (Argoff, 2011; Kawabata, 2011; Schaible, Ebersberger et al., 2011; Besson, 1999).

O aminoácido excitatório glutamato é o principal neurotransmissor presente em todos os nociceptores. O glutamato atua principalmente em receptores ionotrópicos, do tipo NMDA, AMPA e cainato, mas também em receptores metabotrópicos. Entretanto, muitas outras substâncias endógenas são capazes de sensibilizar os nociceptores após lesões teciduais, como CGRP, SP, ATP, prostaglandinas, neuropeptídeo Y, neurotrofinas,



somatostatina, prótons, histamina, serotonina e muitos outros (Besson, 1999; Loeser e Melzack, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001; Kidd, Photiou et al., 2004) Assim, as fibras são ativadas por canais iônicos e receptores específicos que desencadeiam muitas vezes uma cascata de sinalização através de segundos mensageiros e outros sinalizadores intracelulares. Esta sinalização intracelular ativada sucessivas vezes pode ocasionar alterações na transcrição gênica, induzindo assim alterações na estrutura e função destes neurônios sensoriais. Estas alterações resultam em aumento ou diminuição da expressão de canais iônicos e receptores, na produção de mediadores químicos e ativação de enzimas (Kidd, Photiou et al., 2004; Shibasaki, 2004; Knyihar e Csillik, 2006).

Algumas substâncias causam ativação direta dos nociceptores, como bradicinina e capsaicina, causando assim uma dor aguda. Outros mediadores inflamatórios como prostaglandinas e serotonina produzem dor por sensibilizar os nociceptores, diminuindo o limiar de ativação. A excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal pode ocorrer pela ativação de proteínas quinases intracelulares, por exemplo, ou até indiretamente pela inibição ou estimulação da síntese de outros reguladores celulares. O aparecimento de novos canais iônicos e receptores também podem ser oriundos dessas alterações intracelulares (Coggeshall e Carlton, 1997; Besson, 1999; Millan, 1999).

### *Citocinas inflamatórias e dor*

As citocinas pró-inflamatórias são substâncias que são liberadas em diversas situações, como estresse, lesões nervosas, ativação do sistema imune e outras. Assim, normalmente as citocinas são produzidas no próprio local da lesão ou pelo sistema imunológico (De Oliveira, Sakata et al., 2011; Verri, Cunha et al., 2006; Zhang e An, 2007). Ao contrário de neurotransmissores, as citocinas não são armazenadas em vesículas, mas sim liberadas de acordo com a sua produção e atuam de modo localizado (Sommer e

Kress, 2004; Uceyler, Rogausch et al., 2007). Inicialmente, após a liberação das pró-inflamatórias, elas atingem o local da lesão, por exemplo, uma lesão nervosa no nervo ciático, e promovem um processo inflamatório. Assim, como ocorre com os mediadores inflamatórios, muitas vezes a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias se dá em excesso ou continua a ocorrer mesmo após o reparo tecidual. Neste momento, as citocinas se tornam as substâncias responsáveis por facilitar a dor e a inflamação e passam a ser elas próprias o alvo de outros fármacos ou tratamentos, com o objetivo de bloquear ou reduzir a sua ação, e conseqüentemente reduzir a dor e a inflamação (De Oliveira, Sakata et al., 2011; Cunha, Poole et al., 1992; Verri, Cunha et al., 2006; Zhang e An, 2007). Alguns exemplos de citocinas pró-inflamatórias são o TNF- $\alpha$ , as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-33, IL-17, IFN-8, dentre outras. Entretanto, também existem citocinas anti-inflamatórias, sendo as principais a IL-10 (interleucina 10) e a IL-4 (interleucina 4) (Uceyler, Rogausch et al., 2007; Zhang e An, 2007).

Todas as citocinas atuam em receptores específicos, normalmente com atividade de tirosina quinase, que depois de ativados induzem transdução intracelular e transcrição gênica. Assim, as citocinas podem participar da diferenciação e proliferação celular, e inclusive regular a liberação de outras citocinas. Sabe-se por exemplo, que em roedores, o TNF- $\alpha$  induz a liberação de IL-1 $\beta$ , ou seja, há uma cascata de liberação das citocinas pró-inflamatórias (Cunha, Verri et al., 2005; Zhang e An, 2007). Em casos de dor crônica e/ou neuropática, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias facilitam a transmissão nociceptiva, reduzindo o limiar nociceptivo através da sensibilização periférica ou central (Cunha, Verri et al., 2005; Rocha, Fernandes et al., 2006). A injeção de TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  na pata de roedores induz hiperalgesia, demonstrando a importância destas moléculas na dor, principalmente em casos de dor crônica ou neuropática, quando há por longos períodos de tempo liberação destes polipeptídeos (Cunha, Verri et al., 2005).

## 2 JUSTIFICATIVA

Após citar algumas ações da inosina relacionadas à dor, inflamação e neuroproteção, somadas a estudos que sugerem que a inosina poderia atuar como a adenosina devido às suas semelhanças estruturais, o presente trabalho se propõe a avaliar os efeitos da inosina em modelos de nocicepção principalmente devido às seguintes evidências:

- 1) A inosina apresenta atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e neuroprotetora que depende direta ou indiretamente dos receptores de adenosina (Nascimento, Figueredo et al., 2010; Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko, Kuhel et al., 2000);
- 2) A ativação dos receptores de adenosina ativa canais de  $K^+$ , bloqueia canais de  $Ca^{2+}$ , e pode ativar/inibir vias de proteínas quinases (Ralevic e Burnstock, 1998; Megson, Dickenson et al., 1995; Dolphin, Forda et al., 1986);
- 3) Em experimentos *in vitro* a inosina reduz níveis de citocinas pró-inflamatórias e favorece a regeneração nervosa (Benowitz, Goldberg et al., 2002; Liaudet, Mabley et al., 2001; Garcia Soriano, Liaudet et al., 2001);
- 4) A inibição da ADA apresenta efeitos dúbios em modelos animais de nocicepção (Keil e De Lander, 1992, 1994; Poon e Sawynok, 1999);
- 5) A meia-vida da adenosina é extremamente curta em fluídos biológicos e não há estudos sobre a farmacocinética da inosina (Moser, Schrader et al., 1989; Hasko, Linden et al., 2008).

Assim, baseando-se nos 5 grupos de evidências supracitadas, o presente trabalho investigará o perfil da inosina utilizando basicamente modelos animais de nocicepção e avaliar a possibilidade deste nucleósídeo atuar como um modulador endógeno da dor assim como outras substâncias do sistema purinérgico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil antinociceptivo da inosina e caracterizá-la como um modulador endógeno da dor.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) investigar o envolvimento do **receptor A1 de adenosina (A1R)** no efeito antinociceptivo da inosina e comparar a eficácia, potência e a afinidade de ligação da inosina e da adenosina por este receptor;
- 2) investigar mecanismos de **transdução intracelular** envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina;
- 3) investigar o efeito antinociceptivo da inosina em modelos de dor com **perfil inflamatório** (dor crônica inflamatória, dor neuropática e dor induzida por citocinas inflamatórias);
- 4) investigar se a **modulação das enzimas** envolvidas na síntese e degradação da inosina altera o efeito antinociceptivo da adenosina ou da inosina;
- 5) investigar **níveis sanguíneos da adenosina e da inosina** durante o intervalo de tempo em que ambas possuem efeito antinociceptivo.

Cada objetivo corresponde a uma parte do trabalho, sendo assim esse trabalho está dividido em 5 grandes partes.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com aproximadamente 3 meses de idade fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Camundongos *C57/black* foram fornecidos pelo laboratório Charles Tupper da Dalhousie University (Halifax, Canadá) e utilizados no local de origem ou adquiridos do biotério da Universidade Univali (Itajáí, SC) e utilizados em Florianópolis. Os camundongos *C57-black* utilizados em Halifax ou Florianópolis eram de ambos os sexos com idade entre 2,5 a 3 meses. Todos os animais foram mantidos em temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas as 6:00h) e com água e ração *ad libitum*.

Os camundongos Swiss foram mantidos em caixas coletivas contendo no máximo 15 animais por caixa, e os ratos em caixas coletivas com 5 animais. Os camundongos *C57black/6* (selvagens e nocautes) foram mantidos em grupos de 2 a 5 animais por caixa. Para os estudos comportamentais, os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor em animais de laboratório (Zimmermann, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo PP00484, processo n° 23080.016339/2010-61) ou pelo University Committee on

Laboratory Animals (UCLA) da Dalhousie University, protocolo número 11-021 (em anexo).

## 4.2 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: caribdotoxina, apamina, glibenclamida, tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina, deoxicofornicina, diclofenaco, diazepam, DPCPX (Tocris, EUA);  $\text{CaCl}_2$ , inosina, adenosina, toxina Pertussis, miristato de acetato de forbol (PMA), bradiginina, captopril, forsquolina, prostaglandina E2, Adjuvante completo de Freund (CFA)(Sigma, EUA); forodesina (BioCryst, EUA); formalina, cloridrato de morfina (Merck, Alemanha); anticorpos para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 (R&D Systems); ácido perclórico,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KOH,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , metanol (Nuclear), silano (3-amino-propil-trietoxissilano; Sigma-Aldrich, EUA, Brasil), paraformaldeído 4% (PFA 4%), Acetona, xilol, etanol, peróxido de hidrogênio, tampão citrato, tampão fosfato (PBS), anticorpo anti-A<sub>1</sub>R (1:500; Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, MA, USA), anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloroto) (DAB, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), hematoxilina de Harris, Tris-HCl,  $\text{MgCl}_2$ , [<sup>3</sup>H]DPCPX, BSA, polietilenamina, AS - ODN-*mismatch*, AS- ODN- A<sub>1</sub>R, AS- ODN- A<sub>2A</sub>R (Prodinol), Coomassie brilliant blue BG-250, xilazina, cetamina, solução estoque de sulfato de amônio, solução padrão de sulfato de amônio, fenol/solução de nitroprussiato, hipoclorito de sódio,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3\text{SO}_4$ , NaOCl (Nuclear<sup>®</sup>). Os fármacos foram preparados em solução salina NaCl 0,9% com até 5 % de tween 80.



### 4.3 MECANISMO DE AÇÃO/FUNÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Tabela 2. Mecanismo de ação/função dos fármacos utilizados neste trabalho

| <b>Substâncias</b>                   | <b>Mecanismo/Função</b>  |
|--------------------------------------|--|
| Adenosina                            | Agonista de receptores P <sub>1</sub>  |
| Adjuvante completo de Freund (CFA)   | Imunoestimulante   |
| Apamina                              | Bloqueador de canais de K <sup>+</sup> sensíveis a Ca <sup>2+</sup> de baixa condutância |
| 4-aminopiridina (4-AP)               | Bloqueador não seletivo de canais de K <sup>+</sup> voltagem-dependentes                 |
| Bradicinina                          | Ativador indireto de PKC   |
| CaCl <sub>2</sub>                    | Atua sobre os canais de Ca <sup>2+</sup>   |
| Captopril                            | Inibidor da enzima conversora de angiotensina  |
| Caribdotoxina                        | Bloqueador de canais de K <sup>+</sup> sensíveis a Ca <sup>2+</sup> de alta condutância  |
| Deoxicoformicina                     | Inibidor da adenosina desaminase (ADA)   |
| Diazepam                             | Agonista receptores GABA <sub>A</sub>  |
| Diclofenaco sódico                   | Anti-inflamatório não esteroideal  |
| DPCPX                                | Antagonista seletivo A <sub>1</sub> R  |
| Forodesina                           | Inibidor da purina nucleosídeo fosforilase   |
| Formalina                            | Agente algogênico  |
| Forscolina (FK)                      | Ativador direto da PKA   |
| Glibenclamida                        | Bloqueador de canais de K <sup>+</sup> sensíveis à ATP                                   |
| Miristato de acetato de forbol (PMA) | Ativador direto da PKC   |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Morfina               | Agonista opióide                                      |
| Prostaglandina E2     | Ativador indireto da PKA                              |
| Tetraetilamônio (TEA) | Bloqueador do canais de K <sup>+</sup> não específico |
| Toxina Pertussis      | Inativador da proteína G <sub>i</sub>                 |

#### 4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Na partes I, IV e V deste trabalho foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela formalina 2%. Na parte II, utilizamos o teste de nocicepção induzida pela formalina 2,5%, com uma avaliação ligeiramente diferente, que será detalhada em seguida. Todos os camundongos utilizados nas partes I, IV e V foram da linha *C57black/6*, enquanto os camundongos utilizados nas partes II e III foram da linhagem *swiss*.

#### 4.5 PARTE I - ENVOLVIMENTO DO A<sub>1</sub>R NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA

##### 4.5.1 Metodologia

##### 4.5.1.1 Teste da formalina 2%

Este modelo de dor induzida por formalina consiste numa injeção intraplantar de formalina 2% diluída em salina, no volume de 20 microlitros. O comportamento do animal é analisado durante uma hora, onde se registra: 1) o número de recuos e/ou levantamentos (do inglês: *flinching*) realizados com a pata injetada; 2) cronometra-se o tempo que o animal dispende lambendo e/ou mordendo a pata injetada (do inglês: *licking* e *biting*). Ambos os comportamentos são considerados indicativos de nocicepção (Poon e Sawynok, 1999). Entretanto, há algumas diferenças sutis entre ambos os

comportamentos. Atualmente, a maioria dos autores normalmente consideram uma resposta mais fidedigna o comportamento de recuo/elevação da pata. Segundo estes autores, este comportamento seria correlacionado com a dor em humanos, devido à : i) sua maior sensibilidade às vias descendentes inibitórias; ii) o comportamento é mais contínuo e duradouro; iii) este comportamento é sensível a estímulos nociceptivos menos intensos; iv) é sensível à naloxona e amitriptilina (diferentemente do comportamento de lambida/mordida da pata). Além disso, o comportamento lambida/mordida é: mais sensível a interferências motoras; é considerada uma dor supramáxima; muitas vezes é um comportamento estereotipado do animal; e ainda pode sofrer interferência se por algum motivo alguma substância/urina/fezes entrar em contato com a região plantar da pata do animal, causando aversão ao comportamento de lambida/morder a pata (para revisão ver Sawynok e Liu, 2003).

Nesta metodologia, o pesquisador realiza a análise comportamental de 2 animais de uma única vez, intercalando entre cada animal 2 minutos de observação, utilizando a tabela 9 para registro. Neste modelo de nocicepção induzida pela formalina, a primeira fase (fase neurogênica) é considerada do tempo 0 até o 8º minuto; o restante do tempo é considerado segunda fase (fase inflamatória). A primeira fase (neurogênica) consiste basicamente na ativação direta de fibras C e A $\delta$ , além da liberação de substâncias como ATP, histamina, 5-HT e bradicinina. Durante a segunda fase (inflamatória), além da ativação contínua de fibras C e A $\delta$ , ocorre também a liberação de vários mediadores inflamatórios além daqueles liberados durante a primeira fase, sensibilização central principalmente em virtude da intensa liberação de glutamato e SP que leva à uma redução do limiar nociceptivo (para revisão ver Sawynok e Liu, 2003; Le Bars, Gozariu *et al.*, 2001). A figura 9 mostra a tabela utilizada para registro dos comportamentos avaliados no teste da formalina 2%.

| TABELA DE REGISTRO DE DADOS – TESTE DA FORMALINA – 2 %- |            |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|---|------------|--------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| DATA:   |            | Experimento: |         |           |         | Animal:   |         |           |         | Operador: |         |           |         |
| Tempo de análise  | Tempo real | Grupo:       |         | Grupo:    |         | Grupo:    |         | Grupo:    |         | Grupo:    |         | Grupo:    |         |
|   |            | Flinching    | Licking | Flinching | Licking | Flinching | Licking | Flinching | Licking | Flinching | Licking | Flinching | Licking |
| 2-4   | 0-2        |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 2-4        |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 6-8   | 4-6        |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 6-8        |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 10-12   | 8-10       |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 10-12      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 14-16   | 12-14      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 14-16      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 18-20   | 16-18      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 18-20      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 22-24   | 20-22      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 22-24      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 26-28   | 24-26      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 26-28      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 30-32   | 28-30      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 30-32      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 34-36   | 32-34      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 34-36      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 38-40   | 36-38      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 38-40      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 42-44   | 40-42      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 42-44      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 46-48   | 44-46      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 46-48      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 50-52   | 48-50      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 50-52      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 54-56   | 52-54      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 54-56      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| 58-60   | 56-58      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
|   | 58-60      |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |
| Total   |            |              |         |           |         |           |         |           |         |           |         |           |         |

Figura 9. Tabela para registro do comportamento dos animais para o teste de formalina 2%.

#### 4.5.1.2 Comparação do efeito antinociceptivo da inosina com o efeito da adenosina no teste da formalina

Embora tenha sido publicado previamente um artigo no qual demonstra-se uma curva dose-reposta para inosina em camundongos *Swiss* (Nascimento, Figueredo et al., 2010), em virtude da utilização de um teste de formalina com algumas modificações (concentração e comportamento avaliado), somado à diferente linhagem de animais utilizados, decidimos realizar um novo experimento de curva dose-reposta para a inosina. Ainda, decidimos realizar outro experimento

de curva dose-resposta com adenosina, a fim de comparar a potência e a eficácia entre esses nucleosídeos, visto que o objetivo número 1 basicamente consiste em demonstrar que a inosina pode também ser um ativador dos A<sub>1</sub>R. Neste bloco de experimentos, foi administrado pela via i.p. inosina ou adenosina nas doses de 1, 10, 30 ou 100 mg/kg, i.p. Os animais do grupo controle receberam apenas veículo, na dose de 5 ml/kg, i.p. Vinte minutos após a administração dos nucleosídeos ou veículo (salina + 5% de tween 80), os animais foram submetidos ao teste da formalina 2%.

#### 4.5.1.3 Efeito antinociceptivo da inosina administrada perifericamente no teste da formalina

Para avaliar o possível efeito antinociceptivo periférico da inosina, coadministramos este nucleosídeo com formalina 2% na pata dos animais. Baseando-se em estudos prévios de nosso laboratório (dados não mostrados), iniciamos o estudo utilizando a dose de 10 µg/sítio de inosina administrada na mesma solução da formalina. O volume total administrado na pata do camundongo não ultrapassou 20 µl. Após encontrar a dose necessária para induzir antinocicepção, utilizamos esta dose para tratar os animais com injeções de inosina na pata contralateral, afim de excluir um possível efeito sistêmico desta dose.

#### 4.5.1.4 Abordagem farmacológica para avaliar o envolvimento dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina (A<sub>1</sub>R) na antinocicepção induzida pela inosina

Com o objetivo de investigar a participação do A<sub>1</sub>R no efeito antinociceptivo da inosina no teste da formalina, utilizamos o antagonista seletivo A<sub>1</sub>R DPCPX. Neste experimento e nos seguintes, a inosina foi utilizada nas doses de 10 mg/kg, i.p. em razão desta dose ter induzido antinocicepção igual à dose de 100 mg/kg, i.p. Para estudos periféricos, utilizamos a dose de 20 µg/pata,

pelo motivo que foi essa a dose que administrada pela via intraplantar causou antinocicepção localmente. As doses do DPCPX foram escolhidas em função de publicação prévia (Nascimento, Figueredo *et al.*, 2010) ou experimentos pilotos em nosso laboratório. Para avaliar o envolvimento do  $A_1R$  em nível sistêmico e espinhal, os animais foram divididos em 3 grandes grupos e foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.), DPCPX (10 nmol/5 $\mu$ l, i.t.) ou DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.). Posteriormente os animais foram tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.) ou inosina (10 mg/kg, i.p.) e após 20 min submetidos ao teste da formalina 2%. Em outro grupo de animais, avaliamos a participação dos receptores periféricos  $A_1R$  na antinocicepção induzida pela inosina. Para isto, os animais foram pré-tratados com DPCPX (5  $\mu$ g/20  $\mu$ l, i.pl.) e após 5 min receberam uma coadministração de inosina + formalina (20  $\mu$ g + 2%/20  $\mu$ l, i.pl.) e imediatamente após tiveram seu comportamento nociceptivo observado.

#### 4.5.1.5 Avaliação do efeito antinociceptivo da inosina em camundongos nocaute para o $A_1R$

O passo seguinte foi confirmar o envolvimento do  $A_1R$  no efeito antinociceptivo da inosina através da utilização de animais geneticamente modificados que não expressavam o receptor  $A_1R$ , ou seja, animais nocaute para o  $A_1R$ . Para confirmar a genotipagem destes animais, amostras sanguíneas foram colhidas da cauda, o DNA foi extraído e a genotipagem foi realizada por reação de cadeia de polimerase. Neste experimento, os animais selvagens ( $A_1R$  +/+) e os animais nocaute ( $A_1R$  -/-) foram tratados intraperitonealmente com veículo (5 ml/kg) ou inosina (10 mg/kg), intratecalmente com veículo (5  $\mu$ l) ou inosina (10  $\mu$ g/5  $\mu$ l) ou intraplantarmente com veículo (20  $\mu$ l) ou inosina (20  $\mu$ g/20  $\mu$ l). A injeção de formalina 2% para cada grupo foi dada após 20 min (animais tratados via i.p.), 5 min (animais tratados via i.t.) e conjuntamente (animais tratados via i.pl.).

#### 4.5.1.6 Avaliação do efeito antinociceptivo da inosina em camundongos com expressão reduzida de A<sub>1</sub>R após receberem injeção de oligonucleotídeo antisentido

Outra abordagem utilizada para verificar o envolvimento do A<sub>1</sub>R no efeito antinociceptivo da inosina, foi a utilização de animais com expressão reduzida dos receptores A<sub>1</sub>R. Para isto, os animais receberam 2 injeções i.t. diárias durante 5 dias de oligonucleotídeo *antisense*. O primeiro grupo (controle) recebeu injeções de *antisense* oligodeoxinucleotídeo-*mismatch* (AS-ODN-*mismatch*; *sequência embaralhada*, 5'-AAGTTGGCGGGGAAGCAGGG-3', 1µM, sítio, i.t.), o segundo grupo recebeu injeções de *antisense* oligodeoxinucleotídeo para A<sub>1</sub>R (AS-ODN-A1R; 5'-GTCCTTGCTCTCCCTTCCTC-3', 1µM, sítio, i.t.) e o terceiro grupo recebeu injeções de *antisense* oligodeoxinucleotídeo para A<sub>2A</sub>R (AS-ODN-A2AR; 5'-GCTGTTCCTACCCTACCCT-3', 1µM, sítio, i.t.). Todos os grupos, uma hora após a última injeção de *antisense* receberam inosina (10 mg/kg, i.p.) e após 20 min foram submetidos ao teste da formalina 2 %. Após o teste da formalina, os animais foram anestesiados (mistura de cetamina 10 mg/kg e xilazina 30 mg/kg, i.m.) e perfundidos com paraformaldeído 4 %. Após a perfusão, a medula espinhal dos animais foi retirada para análise imunoistoquímica para avaliar a expressão dos A<sub>1</sub>R.

#### 4.5.1.7 Análise Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica na medula espinhal dos animais foi realizada imediatamente após a realização do teste da formalina, conforme descrito anteriormente (Dutra, Cola *et al.*, 2011). Para tal, a medula espinhal foi coletada após processo de perfusão com solução fisiológica e PFA 4%, sendo mantidos nessa mesma solução durante 24 h. Posteriormente, foram realizadas secções transversais na região lombar da medula espinhal, seguidos de processamento

histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 5  $\mu\text{m}$  foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de silano (3-amino-propil-trietoxisilano; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Em seguida, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 h, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos mesmos. Após fixação, as lâminas foram desparafinizadas através de imersões consecutivas em xilol e reidratadas por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%), com posterior lavagem em água destilada. Em seguida realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, a fim de eliminar reações inespecíficas, com solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v) durante 20 min.

Após a lavagem das lâminas com água destilada, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos encobertos pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Por esta razão, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 40 min, em banho-maria com temperatura ajustada para 95–98°C. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada e solução tampão fosfato (PBS). A imunodeteção das proteínas de interesse foi realizada utilizando-se o seguinte anticorpo anti-A<sub>1</sub>R (1:500; Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, MA, USA). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–18 h, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) em câmara úmida durante 60 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina-biotina-



peroxidase (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). Após 40 min de incubação das lâminas com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase, as mesmas foram lavadas com PBS e a imunodeteção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) (DAB, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, foi realizada contra-coloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Frankfurt, Darmstadt, Germany).

Os resultados foram documentados utilizando câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Para análise da reação antígeno-anticorpo, foram obtidas cinco imagens a partir dos cortes histológicos da medula espinhal de cada animal. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcção (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a análise dos níveis de A<sub>1</sub>R a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade óptica (DO).

#### 4.5.1.8 Ensaio de ligação específica de inosina e adenosina no A<sub>1</sub>R

Para avaliar se a interação da inosina com o A<sub>1</sub>R ocorre de forma direta, utilizamos a técnica de ligação específica, amplamente usada nos estudos de interação fármaco-receptor. Foi avaliado a afinidade da inosina e da adenosina pelo A<sub>1</sub>R. O ensaio de ligação foi realizado utilizando fração membranas de cérebro total de ratos, conforme metodologia previamente descrita (Sousa, Assaife-Lopes *et al.*, 2011). Após preparação de fração enriquecida com sinaptossomas (P2), o *pellet* foi ressuspenso e as membranas foram

homogeneizadas e diluídas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH=7,4) resultando em uma concentração final de 1 mg/ml de proteínas totais. No dia do ensaio, as membranas diluídas para avaliar a ligação da inosina ao A<sub>1</sub>R foram incubadas com 4U/ml de adenosina desaminase por 30 min à temperatura ambiente para eliminação do ligante endógeno. O ensaio de ligação ocorreu pela incubação de 50 µg de proteínas a um tubo contendo 0,5 nM do antagonista do A<sub>1</sub>R radioativo [<sup>3</sup>H]DPCPX em quantidade suficiente de tampão de ensaio (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml de BSA, pH=7,4), totalizando um volume final de 500 µl.

A ligação inespecífica foi estimada pela adição de 1 µM de um ligante A<sub>1</sub>R (CCPA ou DPCPX) sem marcação radioativa. Após incubação por 1 h a 30 °C, o ensaio de ligação foi finalizado pela adição de 1 ml do tampão de ensaio resfriado em gelo e filtração a vácuo por filtros de feltro previamente tratados com polietilenamina (0,1 %) por pelo menos 2 h, seguidos de 3 lavagens com 1 ml de tampão gelado. Os filtros foram mergulhados individualmente em 1 ml de líquido de cintilação e incubados durante aproximadamente 18 h previamente à determinação da radioatividade em contador beta (Beckman Coulter, modelo: LS6500). Os resultados foram normalizados pela ligação específica total e calculados como porcentagem de inibição para realização das curvas de ensaio competitivo de ligação específica dos compostos sob investigação. O K<sub>i</sub> foi calculado pelo melhor ajuste (*best-fitting*) de equação não linear para ligação específica competitiva de um sítio, utilizando o K<sub>d</sub> do 3H-DPCPX (1 nM). A concentração do [<sup>3</sup>H]DPCPX utilizada foi 5 nM.

## 4.5.2 Resultados

4.5.2.1 A inosina possui eficácia e potência semelhantes à adenosina no teste da formalina, porém em doses elevadas a adenosina perde eficácia

A inosina e a adenosina não foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela formalina na primeira fase. Assim, todos os resultados reportados neste trabalho mostram os resultados da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina. A figura 10 mostra o efeito antinociceptivo da inosina e da adenosina no modelo de nocicepção induzida pela formalina. Os painéis A e B mostram o efeito antinociceptivo da inosina sobre os comportamentos de recuo/elevação e lambida/mordida da pata, respectivamente. A inosina (10 e 100 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina em ambos os comportamentos, no entanto, não houve diferença estatística entre as duas doses, ou seja, estatisticamente, ambas as doses apresentaram o mesmo efeito. As inibições da inosina foram de  $44 \pm 10\%$  e  $46 \pm 6\%$  para a dose de 10 mg/kg, i.p. nos painéis A e B, respectivamente.

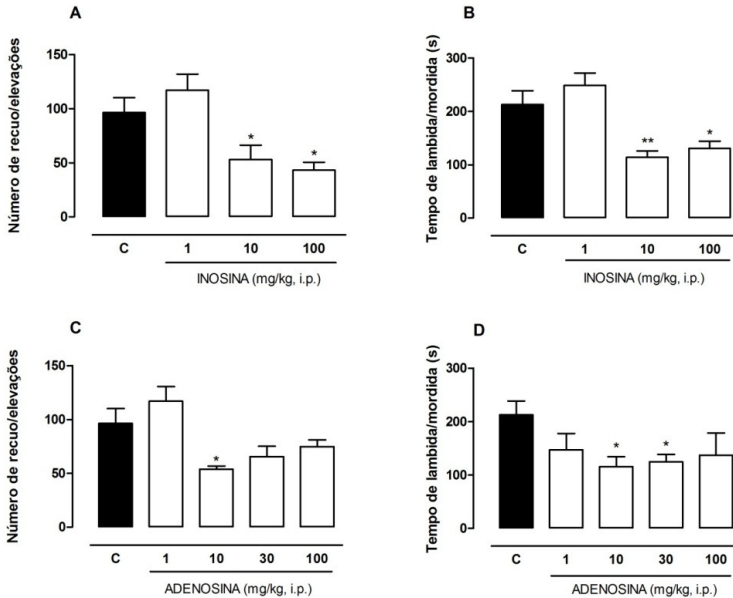


Figura 10. Efeitos da inosina e adenosina sobre o modelo de dor induzida pela formalina. Efeito antinociceptivo da inosina (1 – 100 mg/kg, i.p.) e da adenosina (1 – 100 mg/kg, i.p.) no teste da formalina 2 %. Nos painéis A e B, observa-se o efeito da inosina sobre o comportamento de recuo/elevações e sobre o tempo de lambida/mordida da pata, respectivamente. Nos painéis C e D, observa-se o efeito da adenosina sobre o comportamento de recuo/elevações e sobre o tempo de lambida/mordida da pata, respectivamente. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . (n=6-8).

A adenosina por sua vez, também reduziu o comportamento de dor associado a recuo/elevações da pata (painel C), no entanto, apenas a dose de 10 mg/kg, i.p. teve efeito antinociceptivo, a dose de 100 mg/kg, i.p. não foi eficaz. Finalmente, no painel D podemos observar que as doses de 10 e 30 mg/kg, i.p. de adenosina foram

capazes reduzir o comportamento de lambida/mordida da pata. As inibições da adenosina foram  $44 \pm 3\%$  e  $47 \pm 9\%$  para a dose de 10 mg/kg, i.p., nos painéis C e D, respectivamente. É interessante destacar que na dose de 100 mg/kg, a inosina apresenta efeitos semelhantes à dose de 10 mg/kg, mas a adenosina deixa de ser eficaz, sugerindo uma curva em “U” para a adenosina no teste da formalina.

#### 4.5.2.2 A inosina reduz a nocicepção induzida pela formalina quando injetada localmente

A figura 11 mostra o efeito da inosina coadministrada com formalina 2%, também apenas sobre a fase 2 do referido teste. Iniciamos o estudo utilizando a dose de 10  $\mu\text{g/sítio}$  devido aos resultados prévios obtidos em nosso laboratório no teste de nocicepção induzida pelo glutamato. No entanto, no teste da formalina esta dose não foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção. Logo, utilizamos uma dose maior, 20  $\mu\text{g/sítio}$ , que foi efetiva em reduzir a nocicepção nos comportamentos de recuo/elevações e lambida/mordida da pata. Por fim, com o intuito de confirmar que o efeito exercido pela dose de 20  $\mu\text{g/sítio}$  estaria sendo apenas um efeito local (periférico) e não sistêmico, administrou-se inosina (20  $\mu\text{g/sítio}$ ) na pata contralateral dos camundongos e imediatamente após os animais foram submetidos ao teste da formalina 2%. Como é possível verificar na figura 11, a inosina quando injetada na pata contralateral não foi capaz de induzir antinocicepção em nenhum dos comportamentos avaliados, demonstrando que o efeito exercido quando administrada na pata ipsilateral é puramente local.

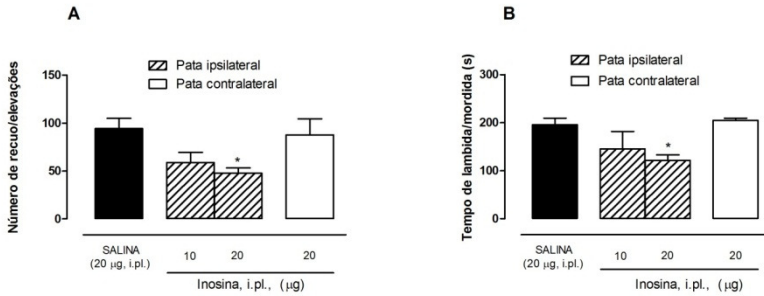


Figura 11. Efeitos locais da inosina sobre o modelo de dor induzida pela formalina. Efeito antinociceptivo da inosina injetada intraplantarmente (10 – 20 µg, sítio) na pata ipsilateral e contralateral no teste da formalina 2 %. Nos painéis A e B, observa-se o efeito da inosina sobre o comportamento de recuo/elevações e lambida/mordida da pata, respectivamente. Os valores são expressos como média ± EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ . (n=5-6).

#### 4.5.2.3 O efeito antinociceptivo sistêmico da inosina depende totalmente dos A1Rs centrais, enquanto que o efeito antinociceptivo local parece depender parcialmente dos A1Rs

As figuras 12A e B demonstram a atividade antinociceptiva da inosina (10 mg/kg, i.p.) sendo prevenida pelas injeções i.t. e i.p. do antagonista seletivo para A<sub>1</sub>R, DPCPX. No painel A está demonstrado o comportamento de recuo/elevação da pata, e no painel B o comportamento de lambida/mordida da pata. Em ambos os painéis é possível observar que a administração do DPCPX (i.t. ou i.p.) não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo no teste da formalina em comparação com os animais do grupo controle (tratados com veículo). Nos painéis C e D, demonstra-se o envolvimento do A1R periférico na antinocicepção induzida pela inosina quando administrada na pata do animal. O painel C mostra o comportamento de recuo/elevação da pata, onde é possível verificar

que o DPCPX injetado diretamente na pata do animal não altera o limiar de nocicepção. A inosina (20  $\mu\text{g/sítio}$ ) induziu antinocicepção quando coadministrada com formalina 2%. Entretanto, o DPCPX (5  $\mu\text{g/sítio}$ ) administrado 5 min antes da coadministração de formalina com inosina não foi capaz de prevenir a antinocicepção periférica induzida pela inosina. No entanto, no painel D onde podemos observar o mesmo desenho experimental que no painel C, mas avaliando o comportamento de lambida/mordida da pata, o DPCPX preveniu a antinocicepção induzida pela inosina.

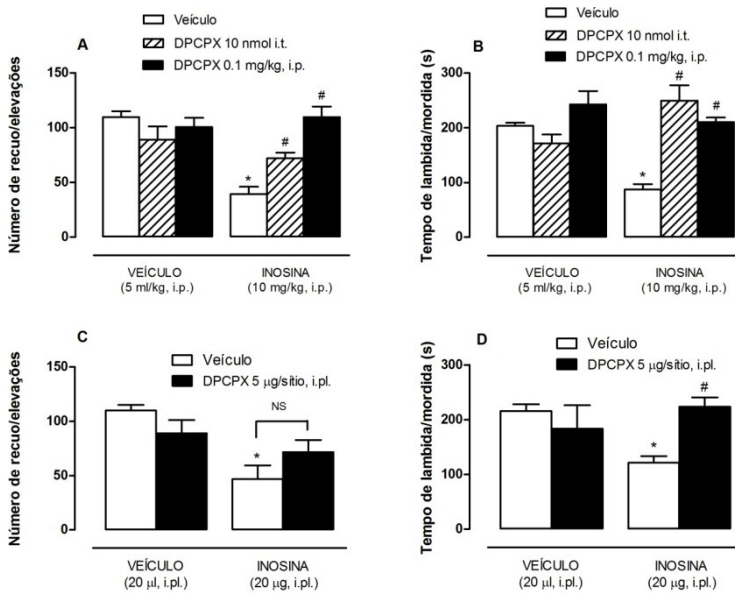


Figura 12. Envolvimento do receptor A1 sobre o efeito antinociceptivo sistêmico, espinal e local da inosina no teste da formalina. Efeitos do pré-tratamento com DPCPX (antagonista seletivo do A1R) pelas vias intraperitoneal (0,1 mg/kg), intratecal (10 nmol/sítio), nos painéis A e B; e intraplantar (5 µg/sítio), painéis C e D, sobre o efeito antinociceptivo da inosina injetada sistemicamente (10 mg/kg, i.p.) ou localmente (20 µg/sítio) no teste da formalina 2 %. Nos painéis A e C observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, nos painéis B e D observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. Os valores são expressos como média ± EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa nível de diferença significativa quando comparado com o grupo controle (tratado com veículo). O sustenido (#) representa nível de diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo + inosina ( $P < 0,05$ ). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ . (n=6-10).

#### 4.5.2.4 Sistemicamente, a inosina não apresenta efeito antinociceptivo em animais nocaute A1R



A figura 13 mostra o efeito da administração da inosina por diferentes vias em animais do tipo selvagem ou animais nocautes para o A1R. No painel A da figura observamos o comportamento de recuo/elevação da pata, e no painel B o comportamento de lambida/mordida da pata. Em ambos os comportamentos, os resultados obtidos foram semelhantes. Observou-se que o tratamento prévio com inosina, independente da via pela qual foi administrada (i.p., i.t. ou i.pl.), reduziu a nocicepção induzida pela formalina em animais do tipo selvagem em comparação com outro grupo de animais selvagens que foi pré-tratado com veículo.

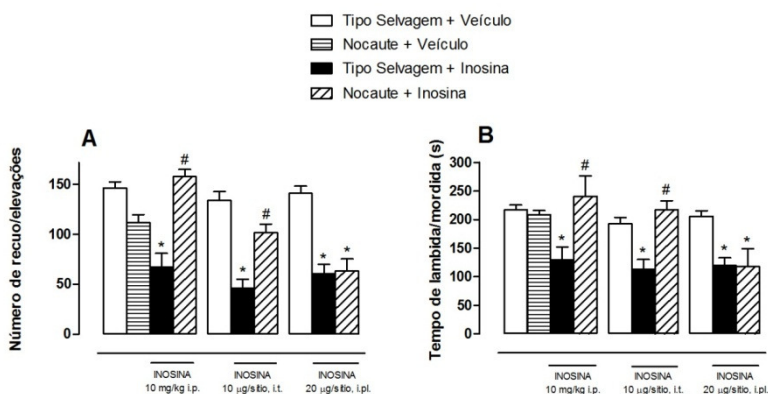


Figura 13. Efeito antinociceptivo da inosina em animais nocaute para o A1R no teste da formalina. Envolvimento do receptor A1 na antinocicepção induzida pela inosina pelas vias intraperitoneal (10 mg/kg), intratecal (10 µg/sítio) e intraplantar (20 µg/sítio) em animais selvagens e nocaute para o A1R no teste da formalina 2%. No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. Os valores são expressos como média ± EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa nível de diferença significativa do grupo selvagem + inosina quando comparado com o grupo controle (selvagem + veículo). O cerquilha (#) representa nível de diferença significativa do grupo nocaute + inosina quando comparado com o grupo selvagem + inosina. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ ; # $P < 0,05$ . (n=5-8).

Quando foi avaliado o limiar de nocicepção em animais nocaute para o A1R pré-tratados com veículo, observou-se que este grupo de animais apresentou um limiar nociceptivo semelhante ao grupo selvagem pré-tratado com veículo, ou seja, a ausência/falta do A1R não alterou significativamente o limiar de dor destes animais. Diferentemente do que ocorreu com os animais selvagens, quando os animais nocaute para o A1R foram pré-tratados com inosina pelas vias i.p. e i.t., o nucleosídeo não foi capaz de induzir antinocicepção. No entanto, quando a inosina foi administrada pela via i.pl. para animais nocaute para A1R, a inosina induziu antinocicepção no teste da formalina, de magnitude semelhante àquela observada em animais do tipo selvagem.

#### 4.5.2.5 O tratamento com AS-ODN-A1R reduziu a expressão dos A1R na medula espinhal de camundongos

##### *Análise imunoistoquímica*

A figura 14 ilustra a expressão dos A1R na medula espinhal de camundongos submetidos ao tratamento com AS-ODN-*mismatch*, AS-ODN-A1R e AS-ODN-A2AR.

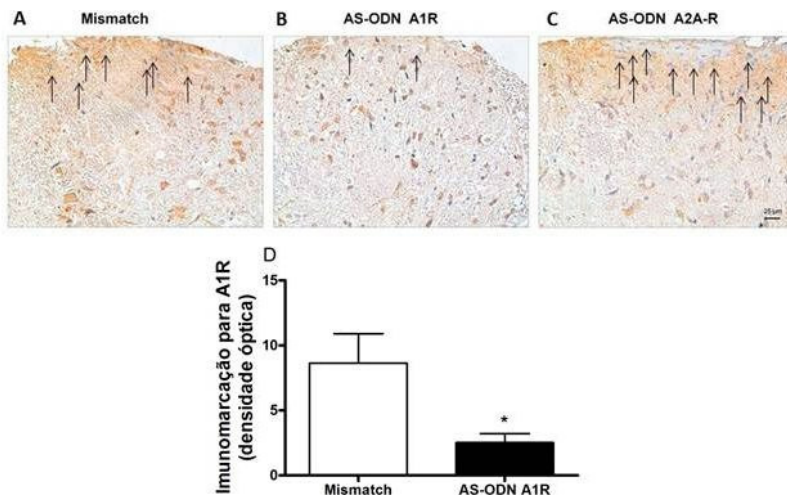


Figura 14. Expressão dos A1R na medula espinhal de camundongos pré-tratados com oligodeoxinucleotídeo antisentido mismatch, para o A1R e o A2AR. Os camundongos foram tratados com *mismatch* (1 $\mu$ M, sítio, i.t.), AS-ODN-A1R (1 $\mu$ M, sítio, i.t.) ou AS-ODN-A2AR (1 $\mu$ M, sítio, i.t.) duas vezes ao di a durante 5 dias. Uma hora após a última injeção dos oligodeoxinucleotídeos antisentido utilizados (5<sup>o</sup> dia), os animais receberam injeções intraplantar de formalina 2% e uma hora após foram perfundidos e a medula espinhal (nível L1-L5) removida para análise imunoistoquímica. Os receptores A1R são os pontos em azul na figura e são mais facilmente visualizados dentro das linhas tracejadas na figura. A região superior de cada quadro representa a região do corno dorsal da medula espinhal. No painel A, observa-se a expressão dos A1R nos animais tratados com *mismatch*. No painel B, observa-se a expressão dos A1R nos animais tratados com AS-ODN-A1R. No painel C, observa-se a expressão dos A1R nos animais que receberam AS-ODN-A2AR. No painel D, observa-se a quantificação da expressão dos A1R na medula espinhal dos animais pré-tratados com oligodeoxinucleotídeo antisentido mismatch ou oligodeoxinucleotídeo antisentido para A1R, realizada através de densidade óptica.

No painel A, pode-se observar a expressão normal dos A1R no grupo que recebeu *mismatch* (grupo controle). No painel B, que corresponde aos animais tratados com AS-ODN-A1R, podemos verificar uma expressão reduzida de A1R, principalmente na região destacada, a região do corno dorsal da medula espinhal. E por último,

no painel C, onde estão apresentados os animais que receberam injeção AS-ODN-A2AR, podemos verificar também a grande expressão dos A1R, reforçando a especificidade do antisense oligodeoxinucleotídeo utilizado. Por último, no painel D pode-se observar a quantificação da expressão dos A1R nos grupos *mismatch* e AS-ODN-A1R, onde, é possível verificar a redução estatisticamente significativa deste receptor no segundo grupo.

#### 4.5.2.6 A inosina não apresentou efeito antinociceptivo em animais com expressão reduzida de A1R no teste da formalina

Demonstra-se na figura 15, o efeito antinociceptivo da inosina sobre animais que receberam injeções intratecais (1  $\mu$ M) de AS-ODN-A1R ou de AS-ODN-*mismatch*.

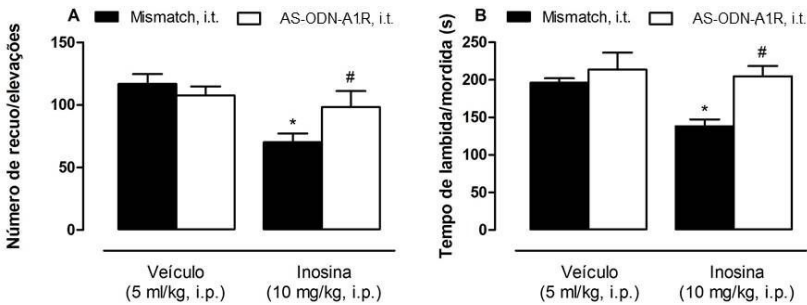


Figura 15. Efeito antinociceptivo da inosina sobre animais com expressão reduzida do A1R no teste da formalina. Envolvimento do receptor A1 na antinocicepção induzida pela inosina (10 mg/kg, i.p.) em animais pré-tratados duas vezes ao dia durante 5 dias com *antisense* oligonucleotídeo para o A1R. No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa nível de diferença significativa do grupo selvagem + inosina quando comparado com o grupo controle (selvagem + veículo). O sustenido (#) representa nível de diferença significativa do grupo nocaute + inosina quando comparado com o grupo selvagem + inosina. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*P < 0,05; #P < 0,05. (n=4-7).

O efeito dos tratamentos foi semelhante sobre ambos os comportamentos nociceptivos (recuo/elevação e lambida/mordida da pata, figuras 15A e B, respectivamente), sendo assim, é possível observar que os animais que receberam a injeção de AS-ODN-*mismatch* ou de AS-ODN-A1R durante 5 dias e foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.) 20 min antes de serem submetidos ao teste da formalina apresentaram respostas nociceptivas semelhantes, ou seja, sem diferença estatística. O grupo de animais tratado diariamente com AS-ODN-*mismatch*, que foi pré-tratado com inosina (10 mg/kg, i.p.) 20 min antes do teste da formalina, apresentou redução significativa do comportamento nociceptivo. Finalmente, no grupo que recebeu AS-ODN-A1R, a inosina não foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela formalina.

#### 4.5.2.7 A inosina se liga diretamente ao A1R com afinidade semelhante à adenosina

A figura 16 ilustra os resultados do ensaio de ligação específica da inosina e da adenosina para o A1R em cérebro total de ratos. Podemos observar que a inosina deslocou consideravelmente o ligante do A1R, o antagonista  $^3\text{H}$ -DPCPX do sítio de ligação, com uma CI50 de 36 nM e um valor de  $K_i$  de 5,9 (1,5 – 23,7) nM.

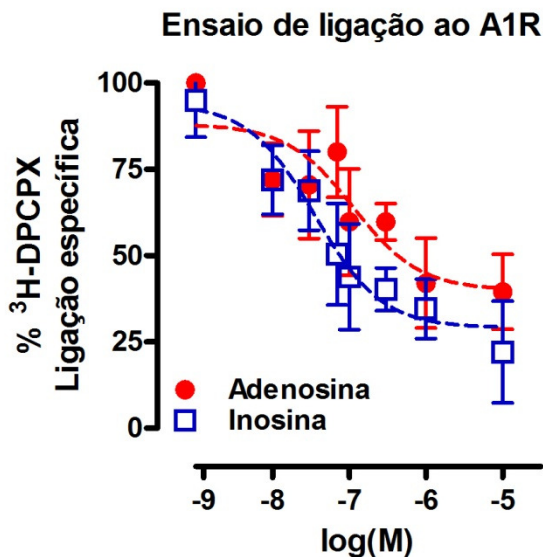


Figura 16. Ensaio de ligação específica da adenosina e da inosina em A1R. No ensaio de ligação específica, a adenosina e a inosina foram incubadas com as membranas de cérebro total de ratos na presença do antagonista para o A1R [3H]DPCPX por 60 min a 37°C. Ambas as substâncias foram capazes de deslocar o [3H]DPCPX. (n=4).

Pode-se verificar também que a adenosina também deslocou o antagonista  $^3\text{H-DPCPX}$  do sítio do A1R, com uma afinidade semelhante, tendo os valores de  $\text{CI}_{50}$  e  $\text{K}_i$  de 113 nM e 18,9 (2,8 – 127,2) nM. As inibições máximas foram de 71% para a inosina e 60% para a adenosina, sendo que estatisticamente não houve diferença entre os deslocamentos causados pela inosina e adenosina.

#### 4.6 PARTE II – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO INTRACELULAR DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA

## 4.6.1 Metodologia

### 4.6.1.1 Teste da formalina

O teste foi realizado de acordo como descrito previamente (Hunskaar, Fasmer *et al.*, 1985) com pequenas modificações. Os camundongos receberam uma injeção intraplantar contendo 20  $\mu$ l de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% formaldeído) diluída em salina. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram colocados em câmaras de vidro para observação comportamental. Os animais foram observados no intervalo de 0 a 5 min após a injeção de formalina (fase neurogênica) e de 15 a 30 min (fase inflamatória). O tempo que os animais despenderam lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi cronometrado em segundos e considerado indicativo de nocicepção. Na parte II deste trabalho serão descritos apenas os resultados obtidos durante a fase inflamatória, ou seja, entre o período de 15 e 30 min após a injeção de formalina, pois o nosso grupo demonstrou anteriormente que a inosina não possui atividade antinociceptiva durante a fase neurogênica (Nascimento, Figueredo *et al.*, 2010).

### 4.6.1.2 Influência da toxina pertussis na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

A toxina Pertussis é produzida pela bactéria *Bordetella pertussis* e possui a capacidade de catalisar a ribosilação do ADP (difosfato de adenosina) da subunidade  $\alpha$ i da proteína G. Assim, essa toxina previne a interação da subunidade  $\alpha$ i com os receptores metabotrópicos localizados na membrana celular, interferindo desta maneira na comunicação extra/intracelular. Para verificar se os receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  sensíveis à toxina Pertussis estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina, os camundongos foram pré-tratados com toxina pertussis (2,5  $\mu$ g/sítio, i.t.). O grupo controle foi tratado com salina (5  $\mu$ l/sítio, i.t.). Sete dias

após o pré-tratamento, os animais receberam veículo (10 ml/kg, i.p.), inosina (10 mg/kg, i.p.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo) como descrito previamente (Meotti, Luiz *et al.*, 2006). Após 20 min, os animais receberam uma injeção de formalina e imediatamente após foi observado o comportamento nociceptivo.

#### 4.6.1.3 Influência de bloqueadores de canais de potássio na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

Os canais de potássio ( $K^+$ ) são o alvo terapêutico de muitos medicamentos analgésicos, principalmente opioides como morfina e fentanil. A ativação dos receptores A1R e A2AR pode resultar na ativação dos canais de  $K^+$  e mediar a antinocicepção. Assim, para investigar a participação dos canais de  $K^+$  no efeito antinociceptivo induzido pela inosina, utilizamos diferentes bloqueadores destes canais. Os animais foram pré-tratados pela via i.t. com tetraetilamônio (TEA; 1µg/sítio, bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$  voltagem-dependentes), 4-aminopiridina (4-AP, 1 µg/sítio, bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$  voltagem-dependentes), apamina (50 ng/sítio, bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis a  $Ca^{2+}$  de baixa condutância), caribdotoxina (250 pg/sítio, bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis a  $Ca^{2+}$  de alta condutância), ou glibenclamida (100 µg/sítio, bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis à ATP). Após 15 min, os animais receberam inosina (10 mg/kg, i.p.) ou diclofenaco (10 mg/kg, i.p., controle positivo) e 20 min após foram submetidos ao teste da formalina 2,5%.

#### 4.6.1.4 Influência do cálcio na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

Os canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) são importantes na geração do sinal nociceptivo nas terminações nervosas e nas sinapses nociceptivas que ocorrem na medula espinhal, além de o nível intracelular de  $Ca^{2+}$  ser responsável pela liberação de transmissores nociceptivos. Por



este motivo, investigamos a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  no efeito antinociceptivo induzido pela inosina. Os animais foram pré-tratados com  $\text{CaCl}_2$  (200 nmol/sítio, i.t.) ou salina (5  $\mu\text{l}$ /sítio, i.t.). Após 15 min, os animais receberam inosina (10 mg/kg, i.p.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo) e 20 min após foram submetidos ao teste da formalina 2,5%.

#### 4.6.1.5 Envolvimento das proteínas PKA e PKC na ação antihiperálgica induzida pela inosina nos testes de Randall-Selitto e Hargreaves

As proteínas quinases A e C (PKA e PKC) estão implicadas na indução e na manutenção da hiperálgia, por ativar enzimas, canais iônicos e outras vias protéicas. Assim, avaliamos se um possível efeito anti-hiperálgico da inosina poderia envolver as proteínas PKA e PKC. Utilizou-se o miristato acetato de forbol (PMA, ativador direto da PKC), bradicinina (BK, ativador indireto de PKC), forskolina (FK, ativador direto da PKA) ou  $\text{PGE}_2$  (ativador indireto da PKA). Os testes comportamentais utilizados foram o de hiperálgia mecânica e o de hiperálgia térmica ao calor avaliados através do aparelho de Randall & Selitto e Hargreaves, respectivamente (Randall e Selitto, 1957; Hargreaves, Dubner *et al.*, 1988; Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). Os animais foram pré-tratados pela via i.p. com veículo (10 ml/kg) ou com inosina (10 mg/kg). Após 30 min, ambos os grupos (veículo e inosina) receberam injeções na pata com 100  $\mu\text{l}$  de PMA (0,1 nmol), BK (3 nmol),  $\text{PGE}_2$  (10 nmol), FK (1  $\mu\text{mol}$ ) ou veículo. Trinta minutos após, a hiperálgia térmica e mecânica foi avaliada como descrito no item 4.6.1.6. O grupo de animais que recebeu bradicinina, foi pré-tratado 1 h antes com o inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (5 mg/kg, s.c.). Este pré-tratamento foi realizado para prevenir a degradação da bradicinina pela cininase III, também chamada de enzima conversora de angiotensina (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Parada, Reichling *et al.*, 2005).

#### 4.6.1.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica

A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada pelo método de Randall e Selitto (1957). O teste consiste em um aparelho (Ugo Basile, Comerio, Itália) que exerce uma pressão crescente (0 – 750 g) na região dorsal da pata do animal. Considerou-se como resposta nociceptiva no teste a vocalização do animal ou pela retirada da pata do aparelho. Desta forma, no momento da resposta nociceptiva, consideramos a pressão exercida como sendo o limiar nociceptivo, que foi expresso em carga tolerada (g). Para avaliação da hiperalgesia térmica ao calor utilizamos o aparelho de Hargreaves. Este aparelho possui uma fonte luminosa de infravermelho (Ugo Basile, Comerio, Itália) que é posicionada abaixo de uma plataforma transparente sobre a qual o animal é colocado. Após 30 min de habituação do animal no aparelho, a fonte luminosa foi colocada exatamente abaixo da pata ipsilateral (que recebeu o estímulo algogênico) e posteriormente ligada por um operador. A latência de retirada da pata foi medida automaticamente através de um sensor. O tempo limite de exposição do animal foi de 20 s para evitar danos teciduais. A intensidade luminosa foi pré-definida para obter-se uma latência basal entre 10 e 15 s.

### 4.6.2 Resultados

#### 4.6.2.1 Os receptores metabotrópicos sensíveis à toxina pertussis estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

Para verificar se o efeito antinociceptivo da inosina depende dos receptores acoplados a proteínas G sensíveis à toxina Pertussis, foi utilizado inosina na dose de 10 mg/kg, i.p.. Esta dose foi selecionada em virtude da publicação prévia do nosso grupo

(Nascimento, Figueredo *et al.*, 2010). O resultado ilustrado na figura 17 mostra que a toxina Pertussis administrada sete dias antes ao teste de nocicepção aboliu completamente o efeito antinociceptivo induzido pela morfina.

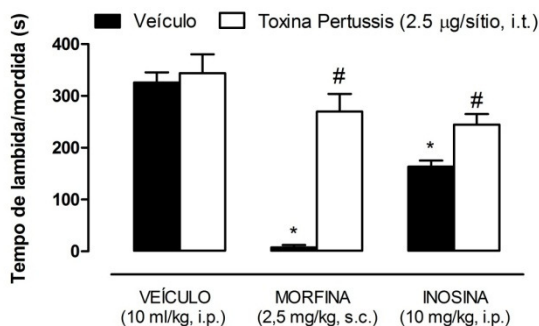


Figura 17. Efeito do pré-tratamento com toxina pertussis sobre a antinocicepção induzida pela inosina na nocicepção inflamatória causada pela formalina em camundongos. Os animais foram pré-tratados com injeções intratecais de toxina pertussis 7 dias antes da administração subcutânea de morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou intraperitoneal de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPm (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*P < 0,05; # indica um nível de reversão significativo (P < 0,05) dos efeitos antinociceptivos da morfina ou da inosina. (n=6-8).

Nos animais pré-tratados com toxina pertussis, que sete dias após receberam inosina, observou-se uma prevenção do efeito antinociceptivo do nucleosídeo. Além disso, o pré-tratamento com toxina pertussis não causou nenhum efeito *per se* sobre o limiar de dor dos animais.

4.6.2.2 Os canais de potássio estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

Como é possível observar nas figuras 18 e 19, demonstrou-se que nenhum dos bloqueadores de canais de  $K^+$  alterou o limiar de nocicepção induzido pela formalina quando administrado *per se*. Já o diclofenaco usado como controle positivo, induziu efeito antinociceptivo que se mostrou sensível a prevenção por cada um dos bloqueadores de canais de  $K^+$  testados.

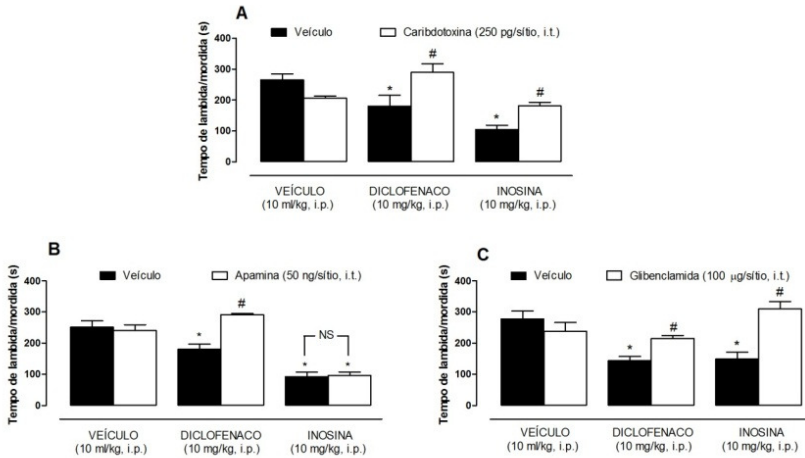


Figura 18. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio caribdotoxina, apamina e glibenclamida sobre a antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina. Os animais foram pré-tratados pela via i.t. com caribdotoxina (250 pg/sítio, bloqueador do canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância, painel A), apamina (50 ng/sítio, bloqueador dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa condutância, painel B) ou glibenclamida (100  $\mu$ g/sítio, bloqueador dos canais de  $K^+$  sensíveis à ATP, painel C) 15 min antes da administração de inosina ou diclofenaco. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ ; # indica um nível de reversão significativo ( $P < 0,05$ ) dos efeitos antinociceptivos do diclofenaco ou da inosina. (n=6-8).

De forma semelhante, verificamos que os bloqueadores TEA, 4-AP (figura 19), caribdotoxina e glibenclamida foram capazes

de inibir a antinocicepção induzida pela inosina. Apenas a apamina (bloqueador dos canais de  $K^+$  sensíveis a  $Ca^{2+}$  de baixa condutância) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da inosina.

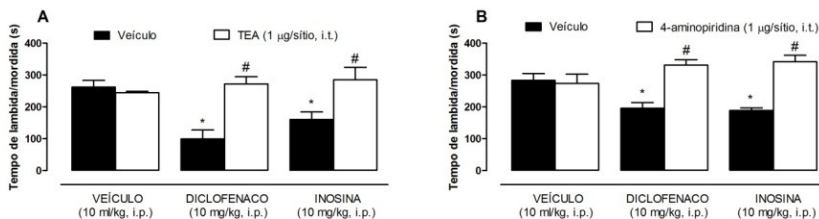


Figura 19. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio TEA e 4-aminopiridina sobre a antinocicepção induzida pela inosina. Os animais foram pré-tratados com injeções intratecais de TEA (1 µg/sítio, tetraetilamônio, bloqueador não específico dos canais de  $K^+$  operados por voltagem, painel A) ou com 4-aminopiridina (1 µg/sítio, bloqueador não específico dos canais de  $K^+$  operados por voltagem, painel B) 15 min antes da administração de inosina ou diclofenaco. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ ; # indica um nível de reversão significativo ( $P < 0,05$ ) dos efeitos antinociceptivos do diclofenaco ou da inosina. (n=6-8).

#### 4.6.2.3 Os canais de cálcio estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina no teste da formalina

O pré-tratamento com  $CaCl_2$ , que é capaz de ativar os canais de  $Ca^{2+}$ , preveniu o efeito antinociceptivo tanto da morfina como também da inosina, no teste da formalina (figura 20). Quando administrado individualmente, o  $CaCl_2$  não alterou o limiar nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina.

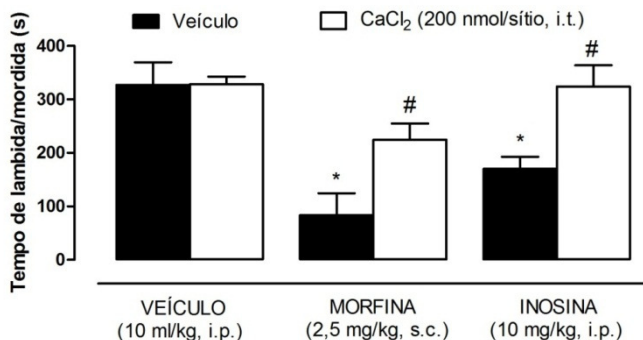


Figura 20. Efeito do pré-tratamento com CaCl<sub>2</sub> sobre a antinociceção induzida pela inosina. Os animais foram pré-tratados pela via intratecal com de CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/sítio) 15 min antes da administração subcutânea de morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou da administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos como média ± EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*P < 0,05; # indica um nível de reversão significativo (P < 0,05) dos efeitos antinociceptivos da morfina ou da inosina. (n=6-8).

#### 4.6.2.4 A proteína PKC, mas não a PKA, está envolvida na ação antihiperálgica induzida pela inosina

Observou-se pelos resultados expressos na figura 21, que as injeções intraplantar de BK, PMA, PGE<sub>2</sub> e FK induziram hiperálgia mecânica (A) e térmica (B) em ratos quando comparados aos animais que receberam apenas veículo na pata. O grupo de animais que foi pré-tratado com inosina 30 min anteriormente aos testes, apresentou uma redução significativa da hiperálgia induzida pela BK e PMA quando avaliados no teste de Randall-Selitto (hiperálgia mecânica). No teste de Hargreaves (hiperálgia térmica ao calor), a inosina reduziu a hiperálgia induzida pela BK e pelo PMA. Por outro lado, a inosina não foi

capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela PGE<sub>2</sub> ou FK em nenhum dos testes utilizados.

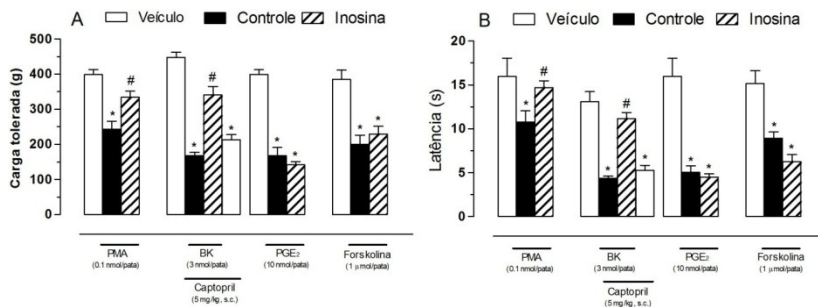


Figura 21. Efeitos da inosina sobre a hiperalgesia induzida pelo PMA, BK, PGE<sub>2</sub> e forskolina. Efeito do pré-tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) sobre a hiperalgesia induzida por injeções intraplantar (100 μl) de PMA (0,1 nmol/sítio), BK (3 nmol, sítio), PGE<sub>2</sub> (10 nmol/sítio) ou forskolina (1 μmol/sítio). No painel A foi avaliado a hiperalgesia mecânica pelo método Randall e Selitto, no painel B foi avaliado a hiperalgesia térmica ao calor pelo método Hargreaves. Os valores estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo controle quando comparado com o grupo tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*P < 0,05; # P < 0,05 indica um nível de reversão significativo do grupo tratado com inosina em comparação com o grupo controle. (n=5-10).

## 4.7 PARTE III – ESTUDO DO EFEITO DA INOSINA EM MODELOS DE DOR CRÔNICA

### 4.7.1 Metodologia

#### 4.7.1.1 Avaliação do efeito da inosina na nocicepção crônica inflamatória induzida por injeção de CFA na pata

O Adjuvante Completo de Freund (CFA) é uma substância capaz de induzir uma inflamação crônica por liberar diversos mediadores e citocinas pró-inflamatórias, sendo comumente utilizado

para induzir um modelo animal de dor crônica inflamatória. Assim, os camundongos receberam injeções de 20  $\mu$ l de CFA 30% (extraído da *Mycobacterium sp*) na região plantar da pata como descrito previamente (Ferreira, Campos *et al.*, 2001) com pequenas modificações. Em nosso protocolo utilizamos CFA 30% pois inicialmente realizamos um estudo piloto com CFA 100%, 70% e 30%. Neste estudo piloto, observamos que as concentrações de CFA 100% e 70% induziram uma inflamação e um edema muito intensos, e que a concentração de 30% foi suficiente para induzir a sensibilização e hiperalgesia mecânica nos animais. Assim, eticamente achamos mais correto a utilização da concentração de 30%. O grupo veículo recebeu 20  $\mu$ l de tampão fosfato em salina na pata ipsilateral. O CFA produziu significativo edema e hiperalgesia mecânica na pata. Para avaliar os efeitos do tratamento agudo da inosina contra a dor inflamatória crônica induzida pelo CFA, os animais receberam inosina (30 mg/kg, i.p.) 24 h após a injeção de CFA.

O desenvolvimento da hiperalgesia mecânica foi avaliado com filamentos de von Frey pelo método de frequência de retirada (Bortalanza, Ferreira *et al.*, 2002) nos tempos 0, 30 min, 1, 2, 4, 8 e 24 h após a injeção de inosina. Para investigar os efeitos do tratamento crônico da inosina, os animais receberam inosina (30 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia durante 22 dias. A avaliação dos animais ocorreu 4 h após o tratamento com inosina, pois este foi o tempo máximo que a inosina induziu efeito quando o tratamento foi agudo. O tratamento foi interrompido durante um período de 4 dias (do 16° ao 20°), para avaliar possíveis efeitos cumulativos ou de tolerância causados pela inosina.

#### 4.7.1.2 Avaliação do efeito da inosina nos níveis de citocinas pró e antiinflamatórias após injeção de CFA na pata

A injeção de CFA na pata dos animais usualmente induz a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e Il-6, que



estão entre as principais substâncias que participam da sensibilização sensorial em casos de hiperalgesia. Assim, os animais receberam injeção intraplantar de CFA (20  $\mu$ l), e após 24 horas começaram a receber 2 injeções diárias de inosina (10 mg/kg, i.p.). Além disso, eles foram avaliados a cada 3 dias (apenas para confirmação da ação da inosina) no teste de von Frey conforme descrito no item 4.7.1.1. Quinze dias após a injeção de CFA na pata dos camundongos, os animais foram sacrificados e foi coletado a pata ipsilateral à lesão. As patas foram homogeneizadas em tampão contendo inibidores de proteinases e centrifugadas para avaliação dos níveis de citocinas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Alíquotas de 100  $\mu$ l da amostra foram utilizadas para medir os níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias. As citocinas dosadas foram IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 utilizando kits ELISA para avaliação de citocinas de camundongo (R&D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante. As absorvâncias utilizadas para a leitura de todas as amostras foram de 450 e 550 nm. Ao final, os valores das amostras foram corrigidos através do método de Bradford, técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de *Coomassie brilliant blue* BG-250, a 620 nm. Os níveis totais são apresentados em em picogramas por miligrama de proteína.

#### 4.7.1.3 Avaliação do efeito da inosina na nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias e por substância P

A injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos em camundongos tem como principal característica a indução do comportamento de lambar e/ou morder a região inferior do corpo, como indicativo de nocicepção. Assim, para avaliar o efeito da inosina contra a nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias e SP, os animais foram pré-tratados com inosina (10 mg/kg, i.p.) e 20 min após receberam injeções i.t. de TNF- $\alpha$  (0,1 pg/sítio), IL-1 $\beta$  (1 pg/sítio) ou SP (135 ng/sítio) através de uma agulha conectada à uma cânula de polietileno de bitola PE 30 conectada à uma seringa

Hamilton (Hamilton, Birmingham, Reino Unido). Os animais foram contidos manualmente e em seguida a agulha foi inserida no espaço subdural entre as vértebras L5 e L6. O volume injetado foi de 5  $\mu$ l, ao longo de aproximadamente 5 s. A avaliação da nocicepção iniciou-se imediatamente após a injeção i.t. e foi considerado comportamento nociceptivo o tempo (s) que o animal dispendeu lambendo e/ou mordendo os membros inferiores, cauda e regiões ventral e dorsal inferiores durante o tempo de 15 min (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ou 6 min (SP) (Baggio, Freitas *et al.*, 2008).

#### 4.7.1.4 Avaliação do efeito da inosina no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC)

O modelo de neuropatia induzida pela LPNC induz hiperalgesia mecânica logo após a realização da cirurgia. A indução e a manutenção desta sensibilização envolve de forma geral mecanismos inflamatórios e de sensibilização central. Com o objetivo de avaliar o efeito da inosina sobre estes mecanismos da dor neuropática, realizamos a LPNC e avaliamos hiperalgesia mecânica nos animais. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). A ligação parcial do nervo ciático foi realizada pela amarração de 1/2 até 1/3 da porção distal do nervo ciático, de acordo com o procedimento descrito previamente (Malmberg e Basbaum, 1998). Nos animais falso-operados, o nervo ciático foi exposto sem sofrer a ligação. A incisão foi fechada e coberta com solução de iodo. Os animais foram divididos em 4 grupos. Os animais operados receberam inosina (10 ou 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), enquanto os animais falso-operados receberam apenas veículo (10 ml/kg, i.p.), 7 dias após a cirurgia.

#### 4.7.1.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica foi mensurada como descrito previamente (Bortalanza, Ferreira *et al.*, 2002). A frequência de resposta de retirada foi avaliada em 10 aplicações do filamento de von Frey (2B, Itália) de força 0,4 g. A aplicação do filamento ocorreu na região plantar da pata ipsilateral. Cada vez que o animal retirou/suspendeu a pata após a aplicação do filamento, foi atribuído 10%, ou seja, caso um animal retirasse a pata 10 vezes, a resposta seria 100%. O intervalo entre cada aplicação no mesmo animal foi de no mínimo 30 s. Os animais foram aclimatados em compartimentos de acrílico individuais de dimensões 9 x 7 x 11 cm sobre uma grade acrílica, a qual permitia o acesso às patas dos animais para aplicação do filamento. A frequência de retirada foi avaliada antes (basal) e após a cirurgia LPNC. Para investigar o efeito crônico da inosina, os animais receberam injeções intraperitoneais do nucleosídeo duas vezes ao dia durante 21 dias, nas doses de 10 e 30 mg/kg. A avaliação foi realizada 1 h após o tratamento (tempo da inibição máxima observada no tratamento agudo). O tratamento se estendeu do 7° ao 21° dia, sendo interrompido entre o 16° e 20° dia para verificar possível efeito cumulativo ou de tolerância.

### 4.7.2 Resultados

#### 4.7.2.1 A inosina reduz a nocicepção crônica inflamatória induzida pela injeção de CFA na pata

A injeção de CFA 30% na pata dos camundongos induziu uma hiperalgesia mecânica que persistiu até o 21° dia, quando foi realizada a última avaliação. A figura 22 demonstra o decurso temporal do perfil da hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA a partir de 24 h após a injeção do agente flogístico (A) e no painel ao lado (B) demonstra o perfil hiperalgésico induzido pelo CFA até o 21° dia. A inosina administrada pela via i.p. 24 h após a injeção de

CFA reduziu de forma significativa a hiperalgesia até o período de 4 h após a injeção (A). O tratamento com inosina foi repetido diariamente até o 17º dia, quando foi interrompido e retornou no dia 21. Este tratamento crônico com a inosina foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo CFA na maioria das avaliações, que ocorreram a cada 2 dias. Quando houve a interrupção do tratamento com inosina, os animais deste grupo apresentaram um limiar nociceptivo semelhante ao grupo controle, ou seja, a hiperalgesia mecânica foi restabelecida na ausência de inosina. Quando o tratamento com inosina foi restabelecido no dia 21, mais uma vez o grupo tratado apresentou redução na resposta hiperalérgica.

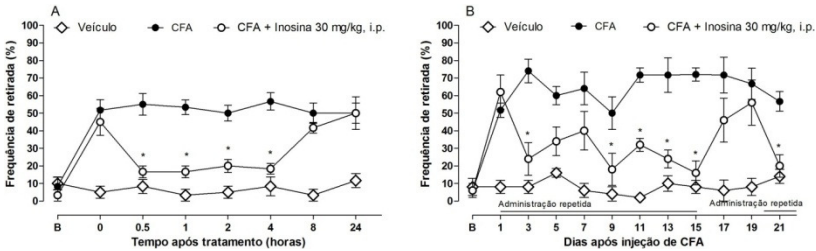


Figura 22. Efeitos da inosina sobre a nociceção induzida pelo CFA. No painel A, observa-se o efeito dependente do tempo da administração intraperitoneal aguda de inosina (30 mg/kg, i.p.) sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de CFA 30%. A resposta nociceptiva dos animais foi avaliada do tempo 0 até 24 h após a administração de inosina. No painel B, observa-se até o 21º dia o efeito do tratamento diário com inosina (30 mg/kg, i.p.) sobre a dor induzida pela injeção intraplantar de CFA 30%. Os valores são expressos como a média de cada ponto de análise  $\pm$  EPM. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo CFA tratado com inosina quando comparado com o grupo CFA tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de 2 vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. \* $P < 0,05$ . B, limiar basal de retirada. (n=6-10).

4.7.2.2 A inosina reduz os níveis locais da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , mas não altera os níveis das citocinas

## IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 após injeção de CFA na pata de camundongos

Neste experimento, avaliamos se a modulação (redução ou aumento) da síntese/liberação de citocinas pró ou anti-inflamatórias poderia estar envolvida no efeito antinociceptivo da inosina sobre a dor crônica inflamatória induzida por CFA (figura 23). Os animais que receberam CFA intraplantar apresentaram um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, quando comparamos os níveis de citocinas dos animais intactos. A inosina não foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6, mas reduziu de forma significativa os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  na pata dos animais (Figura 23B). Avaliou-se também os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, porém a inosina não alterou os níveis desta citocina quando comparado com o grupo controle.

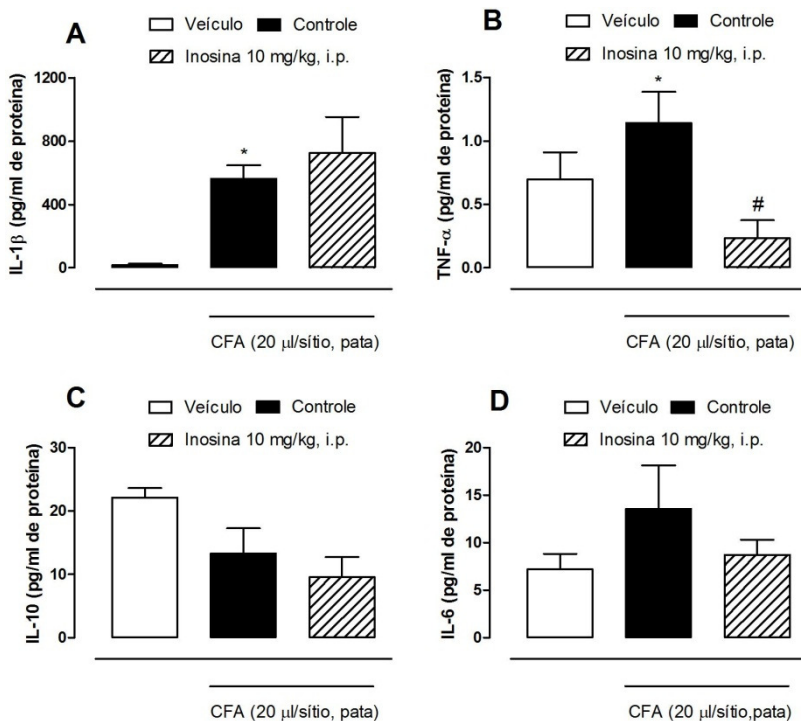


Figura 23. Efeitos da inosina sobre a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 induzida por CFA. Efeitos do pré-tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 quinze dias após a injeção de CFA 30 % (20  $\mu$ l) na pata de camundongos. Os valores são expressos como a média  $\pm$  EPM. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo controle (tratado com CFA e veículo) quando comparado com o grupo veículo (tratado com salina i.p. e veículo i.p.). O sustenido (#) representa níveis de diferença significativa entre o grupo tratado com inosina quando comparado com o grupo controle. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de 1 via seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls. \* e #  $P < 0,05$ . (n=6).

#### 4.7.2.3 A inosina reduz a nocicepção induzida por injeções intratecais de TNF- $\alpha$ e SP, mas não da IL-1 $\beta$

Conforme pode ser visto na figura 24, a inosina (10 mg/kg, i.p.) foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela injeção

intratecal da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e do peptídeo SP, mas não foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ .

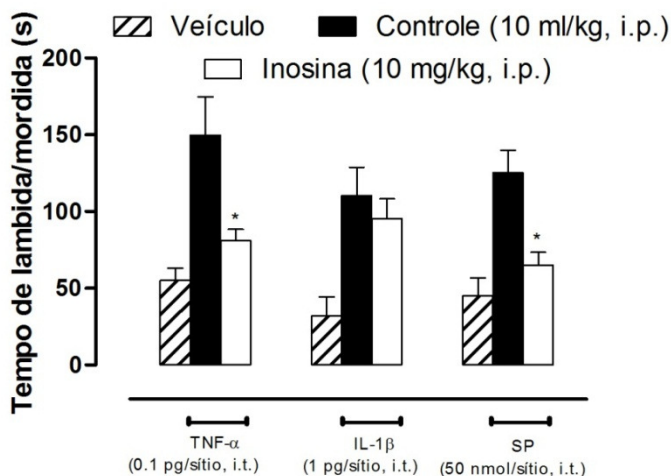


Figura 24. Efeito da inosina sobre a nocicepção induzida pela TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e SP. Efeito do pré-tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) sobre a nocicepção induzida por injeções intratecais de TNF- $\alpha$  (0,1 pg/sítio), IL-1 $\beta$  (1 pg/sítio) ou SP (50 nmol/sítio). Os valores são expressos como a média  $\pm$  EPM. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo tratado com a substância algogênica e inosina quando comparado com o grupo tratado com a substância algogênica e veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de 1 via seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls. \*P < 0,05. (n=8-11).

#### 4.7.2.4 A inosina reduz a nocicepção induzida pela LPNC

A cirurgia da LPNC induziu hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral à lesão, quando comparada com o grupo falso operado (Figura 25). A figura 25A mostra que o tratamento agudo com inosina (30 mg/kg, i.p.) reverteu a resposta nociceptiva quando avaliada no teste de von Frey, 7 dias após a cirurgia. Este efeito perdurou até 4 horas após o tratamento. Além disso, o tratamento

crônico com inosina, na dose de 30 (mas não de 10) mg/kg, i.p., administrada 2 vezes ao dia, reduziu a hiperalgesia mecânica produzida pelo LPNC até o 16º dia. No dia 17, o tratamento foi interrompido e a resposta hiperalgésica foi restabelecida, ou seja, os animais voltaram a responder com maior frequência de retirada ao filamento. No 20º dia, quando o tratamento com inosina foi reiniciado, o nucleosídeo voltou a produzir efeito anti-hiperalgésico semelhante ao que produzira anteriormente (Figura 25B).

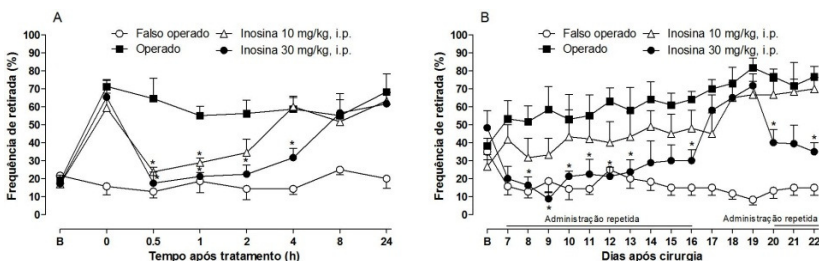


Figura 25. Efeitos da inosina sobre o modelo de dor neuropática induzido pela ligação parcial do nervo ciático (LPNC). No painel A, observa-se o efeito da administração aguda de inosina (10 e 30 mg/kg, i.p.) sobre a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de filamentos de von Frey. As respostas nociceptivas foram avaliadas do tempo 0 até o tempo 24 horas após administração de inosina, no 7º dia após a LPNC. No painel B, observa-se o efeito crônico da administração 2 vezes ao dia de inosina (10 e 30 mg/kg, i.p.) sobre a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de filamentos de von Frey. As respostas nociceptivas foram avaliadas desde o dia 7 até o dia 22 após a administração de CFA. Os valores são expressos como a média de cada ponto de análise  $\pm$  EPM. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo LPNC tratado com inosina quando comparado com o grupo LPNC tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de 2 vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. \* $P < 0,05$ . B, limiar basal de retirada. (n=6-9).



## 4.8 PARTE IV – INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO DAS ENZIMAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO SOBRE O EFEITO INOSINA

### 4.8.1 Metodologia

#### 4.8.1.1 Dosagem da adenosina desaminase (ADA) após administração da deoxicoformicina

Os animais foram tratados com DCF (50 mg/kg, i.p.) e após 30 min foi dosada a atividade da ADA no soro dos animais através da técnica de espectrofotometria. Os reagentes utilizados foram tampão fosfato (I), tampão de adenosina (II), solução estoque de sulfato de amônio (III), solução padrão de sulfato de amônio (IV), fenol/solução de nitroprussiato (V), solução alcalina de hipoclorito de sódio (VI). Inicialmente, as amostras foram padronizadas (volume final de 500  $\mu$ l) com concentrações diferentes de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e  $\text{NH}_3\text{SO}_4$  (15 mM) para obtenção de uma curva padrão na faixa de 10-50 U/L. O sangue foi coletado do plexo ocular, centrifugado e o soro obtido foi transferido para cubetas e a reação foi iniciada com a adição de solução de tampão fosfato com adenosina (pH 6.5, 500  $\mu$ l, composição:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e adenosina (0.5 mM). Após incubação por 1 h a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de uma solução de 1 ml de fenol (1mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (1 ml: NaOCl: 11mM). Esta solução foi adicionada às cubetas com amostras padrões de diferentes concentrações. Após isso, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. A atividade da ADA foi estimada pela interpolação da curva padrão (Liz, Pereira *et al*, 2010.). Os resultados foram expressos como UI/L.

#### 4.8.1.2 Influência da deoxicoformicina (DCF) na antinocicepção causada pela inosina e adenosina

Para avaliar se a inibição da enzima que converte a adenosina em inosina, a adenosina desaminase, altera o efeito antinociceptivo da inosina ou da adenosina, utilizamos a DCF em uma série de experimentos. Neste bloco experimental, os animais foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.) ou DCF (50 mg/kg, i.p.) 20 min antes de receberem veículo (5 ml/kg, i.p.), inosina (10 mg/kg, i.p.) ou adenosina (30 mg/kg, i.p.). Após 20 min os animais foram submetidos ao teste da formalina 2%.

#### 4.8.1.3 Influência da forodesina (FDS) na antinocicepção causada pela inosina

Para avaliar se a inibição da enzima que converte a inosina em hipoxantinas, a purina nucleosídeo fosforilase (PNP), altera o efeito antinociceptivo da inosina ou da adenosina, utilizamos a FDS neste bloco de experimentos. Os camundongos foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.) ou FDS (0,1 mg/kg, i.p.) 20 min antes de receberem veículo (5 ml/kg, i.p.) ou inosina (3 ou 10 mg/kg, i.p.). Após 20 min os animais foram submetidos ao teste da formalina 2%.

#### 4.8.1.4 Avaliação da atividade antinociceptiva da forodesina (FDS) e o seu envolvimento com o A1R

Para verificar se a FDS possui atividade antinociceptiva *per se* e se este efeito depende direta ou indiretamente do A1R, os animais foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.) ou com DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.). Após 20 min, os animais que foram pré-tratados com veículo receberam novamente veículo (5 ml/kg, i.p.) ou FDS (0,1 ou 1 mg/kg, i.p.), e os animais que haviam recebido DPCPX receberam FDS (1 mg/kg, i.p.). Após 20 min, todos foram submetidos ao teste da formalina 2%.

## 4.8.2 Resultados

### 4.8.2.1 Níveis plasmáticos da adenosina desaminase (ADA) após administração da DCF

A figura 26 mostra a atividade da ADA expressa em UI/L no sangue dos camundongos 30 min após injeção de DCF (50 mg/kg, i.p.). Pode-se verificar na figura que a DCF reduziu de forma significativa (37%) a atividade da ADA em comparação com o grupo controle o qual recebeu apenas veículo (5 ml/kg, i.p.).

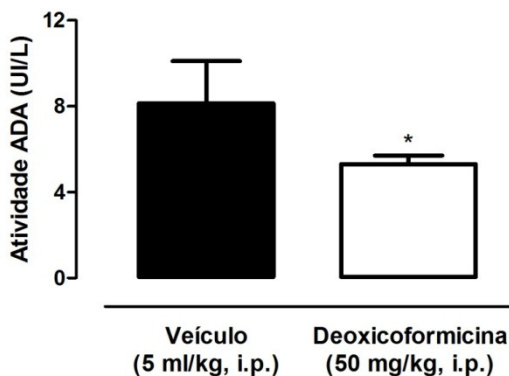


Figura 26. Dosagem da atividade da ADA no soro de animais tratados com DCF. A expressão da atividade enzimática é fornecida em unidades internacionais por litro (UI/L). Os valores estão expressos como média + EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa nível de diferença significativa entre os grupos analisados. O teste estatístico utilizado foi o teste T de Student não pareado. \*P < 0,05. (n=5).

### 4.8.2.2 A deoxicoformicina (DCF) altera os efeitos da inosina e da adenosina no teste da formalina

A figura 27 mostra a influência da DCF (50 mg/kg, i.p.) sobre os efeitos antinociceptivos das administrações de inosina e adenosina no teste da formalina. No painel A (comportamento de

recuo/elevação da pata), podemos observar que a DCF por si só não altera o limiar de nocicepção dos animais. Posteriormente, podemos perceber que a inosina (10 mg/kg, i.p.) induziu antinocicepção enquanto a adenosina (30 mg/kg, i.p.), não reduziu de forma significativa o número de recuo/elevações da pata. Ambos os dados corroboram com a figura 10. Quando os animais foram pré-tratados com DCF (50 mg/kg, i.p.), os animais que posteriormente receberam inosina não apresentaram diferença comportamental comparado ao grupo que recebeu apenas inosina. No entanto, o pré-tratamento com DCF nos animais tratados com adenosina, induziu um efeito sinérgico, ou seja, estes dois fármacos juntos induziram antinocicepção. No painel B (comportamento de lambida/mordida da pata), podemos verificar que novamente a DCF não alterou o limiar de nocicepção dos animais. Além disso, também repetindo os dados do experimento da figura 10, a inosina apresentou efeito antinociceptivo nas doses de 10 e 10 mg/kg, enquanto a adenosina apresentou efeito antinociceptivo apenas na dose de 10mg/kg, embora tenha reduzido o tempo de resposta nociceptiva. No entanto, quando os animais foram tratados com DCF anteriormente às administrações dos nucleosídeos, obtivemos resultados diferentes dos encontrados no painel A. Inicialmente, podemos observar que o pré-tratamento com DCF preveniu o efeito antinociceptivo da inosina no comportamento de lambida/mordida da pata. Por outro lado, diferentemente do ocorrido no painel A, o pré-tratamento com DCF não alterou significativamente a resposta nociceptiva nos animais tratados com adenosina, embora tenha apresentado um resultado bastante interessante, e por causa disso, terá o seu decurso temporal apresentado no item seguinte.

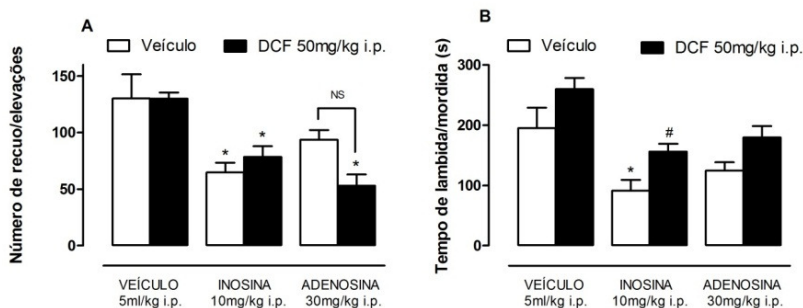


Figura 27. Influência da DCF sobre o efeito da inosina e da adenosina no teste da formalina. Avaliação da influência do pré-tratamento com DCF (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito da inosina (10 mg/kg, i.p.) e da adenosina (30 mg/kg, i.p.) em animais submetidos ao teste da formalina 2%. No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo em questão quando comparado com o grupo veículo pré-tratado com veículo. # indica um nível de reversão significativa ( $P < 0,05$ ) do grupo tratado com DCF + inosina em comparação com o grupo tratado com veículo + inosina. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ . (n=5-8).

#### 4.8.2.3 Decurso temporal da influência da deoxicofornicina (DCF) sobre os efeitos da adenosina no teste da formalina

A figura 28 (A, B) mostra o decurso temporal da influência da DCF sobre o efeito da adenosina desde o tempo 0 até 60 min após a injeção intraplantar de formalina. Estes resultados, principalmente o painel B, mostram um perfil surpreendente no grupo de animais pré-tratados com DCF antes de receber adenosina. Embora o gráfico de barras da figura 27B mostra que o tempo de lambida/mordida do grupo DCF + Adenosina não diferiu do grupo tratado com veículo e adenosina (Veículo+Adenosina), no gráfico de decurso temporal podemos observar que os animais do grupo DCF+Adenosina não

responderam até aproximadamente o tempo de 30 min. Entretanto, em torno do tempo de 40 min os animais começam a lamber/morder a pata injetada com formalina de forma intensa, que culmina com um pico de 50 s no tempo de 52 min, algo totalmente incomum neste modelo animal, o que se pode comprovar comparando com os decursos temporais dos outros grupos da mesma figura. Desta forma, avaliando o comportamento deste grupo durante a primeira meia hora, levantou-se a hipótese de que a associação de adenosina com DCF poderia induzir sono e/ou efeito sedativo. Em virtude disso, realizamos o experimento 4.8.2.6.

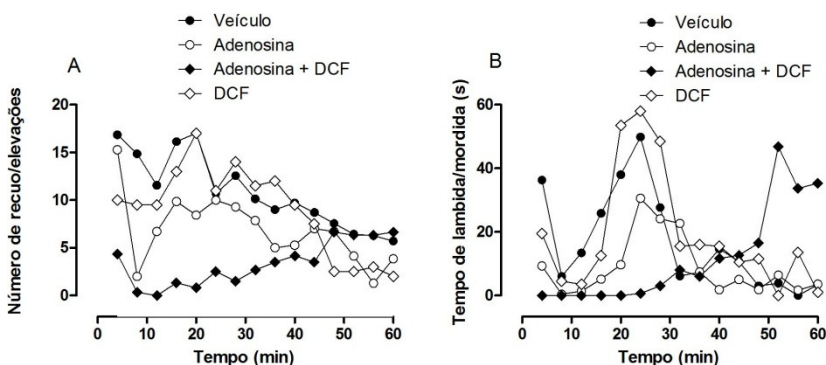


Figura 28. Decurso temporal da influência da DCF sobre o efeito da adenosina no teste da formalina. Avaliação do decurso temporal desde o tempo 0 até o tempo 60 min da influência da DCF (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito da adenosina (30 mg/kg, i.p.) no teste da formalina 2%. No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. Os valores estão expressos como a média simples do escore total de cada ponto analisado. (n=5-8).

#### 4.8.2.4 Dose sub-ativa de FDS em sinergia com dose sub-ativa da inosina induz antinocicepção no teste da formalina

Na figura 29 podemos observar a influência da FDS (0,1 mg/kg, i.p.) sobre a inosina (3 e 10 mg/kg, i.p.) no teste da formalina.

É possível verificar no painel A (comportamento de recuo/elevação da pata), que a inosina na dose de 3 mg/kg, i.p. não foi capaz de induzir antinocicepção, ao contrário da inosina na dose de 10 mg/kg, i.p., que induziu antinocicepção. Quando associou-se aos grupos inosina (3 e 10 mg/kg, i.p.) o pré-tratamento com FDS, verificou-se um efeito somatório entre FDS e inosina 3 mg/kg, i.p., pois em associação, estes dois fármacos induziram antinocicepção, o que não foi verificado quando ambos os fármacos foram administrados separadamente. Entretanto, quando administrado previamente ao grupo inosina 10 mg/kg, i.p., o FDS não induziu nenhuma potencialização ou somação no efeito previamente antinociceptivo. No painel B (comportamento de lambida/mordida da pata), os resultados foram bastante semelhantes ao painel A. Pode-se verificar que a inosina apenas apresentou efeito antinociceptivo na dose de 10 mg/kg, i.p. e não quando administrada na dose de 3 mg/kg, i.p..

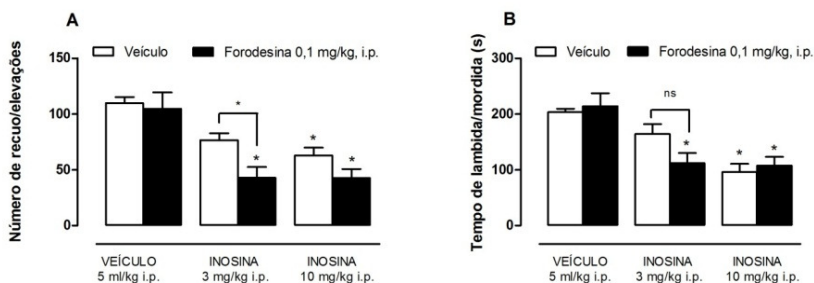


Figura 29. Influência da FDS sobre o efeito da inosina no teste da formalina. Avaliação da influência do pré-tratamento com FDS (0,1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito da inosina (3 e 10 mg/kg, i.p.) em animais submetidos ao teste da formalina 2%. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo em questão quando comparado com o grupo veículo pré-tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*P < 0,05. (n=5-8).

Posteriormente, nos animais que foram pré-tratados com FDS antes de receber inosina 3 mg/kg, i.p., verificou-se novamente um efeito somatório, ou seja, a associação de FDS com inosina induziu antinocicepção, embora não houve diferença estatística entre o grupo inosina 3 mg/kg, i.p. comparado com o grupo FDS + inosina 3 mg/kg, i.p.. Finalmente, o pré-tratamento dos animais do grupo inosina 10 mg/kg, i.p., com FDS, não foi capaz de potencializar ou intensificar a antinocicepção previamente causada pela administração apenas do nucleosídeo.

#### 4.8.2.5 A FDS induz antinocicepção per se e este efeito é mediado pelo A<sub>1</sub>R no teste da formalina

A figura 30 mostra a atividade antinociceptiva *per se* da FDS e o envolvimento do A<sub>1</sub>R neste efeito. Podemos verificar nos painéis A e B que a FDS na dose de 0,1 mg/kg, i.p., como demonstrado anteriormente, é desprovida de efeitos *per se* no teste da formalina. No entanto, a dose de 1 mg/kg, i.p. de FDS foi capaz de induzir pronunciada antinocicepção, a qual foi prevenida pelo antagonista seletivo do A<sub>1</sub>R, DPCPX.



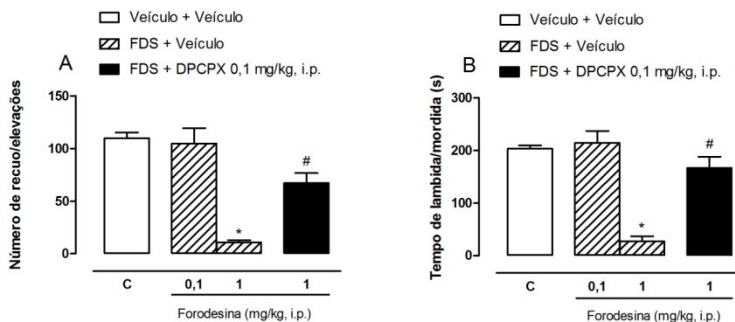


Figura 30. Avaliação do efeito antinociceptivo da FDS sobre o teste da formalina 2% e análise do envolvimento do AIR neste efeito. Os animais receberam FDS (0,1 – 1 mg/kg, i.p.) e foram submetidos ao teste da formalina 2 %. Após isso, outro grupo de animais foi pré-tratado com DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) e 20 min após tratado com FDS (1 mg/kg, i.p.) e submetidos ao teste da formalina 2 %. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). No painel A observa-se o comportamento de recuo/elevação da pata, no painel B observa-se o comportamento de lambida/mordida da pata. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo em questão quando comparado com o grupo veículo pré-tratado com veículo (C). O sustenido (#) representa nível de diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o grupo em questão comparado com o grupo FDS (1 mg/kg, i.p.). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ . (n=4-6).

#### 4.8.2.6 Avaliação do efeito sedativo da associação de DCF e adenosina e da associação de FDS e inosina

Como já mencionado anteriormente, durante o experimento para a avaliar a influência da DCF sobre a inosina e adenosina no teste da formalina, observou-se um comportamento sugestivo de sedação no grupo que recebeu DCF e posteriormente adenosina. Assim, acreditávamos que o efeito sinérgico entre DCF e adenosina apresentado na figura 27A, poderia ser na realidade um efeito sedativo e/ou indutor de déficit locomotor, ao invés de efeito antinociceptivo. Para elucidar esta questão, utilizamos o protocolo de

indução de sono por cetamina. Além disso, paralelamente avaliamos também se a associação de FDS com inosina ou apenas FDS (1mg/kg) poderia induzir ou alterar o sono induzido por cetamina.

#### 4.8.2.7 Indução de sono por cetamina

Os camundongos foram pré-tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.), DCF (50 mg/kg, i.p.) ou FDS (0,1 e 1 mg/kg, i.p.). Após 20 min os animais receberam veículo (5 ml/kg, i.p., grupo controle) adenosina (30 mg/kg, i.p.), inosina (3 mg/kg, i.p.) ou diazepam (0,5 mg/kg, i.p., grupo controle positivo) e 30 min depois todos os animais receberam uma injeção de cetamina (100 mg/kg, i.p.) (Mimura, Namiki *et al.*, 1990). Foram analisados 2 parâmetros: a latência para indução do sono e o tempo de duração do sono. O início do sono foi considerado como o momento da perda do reflexo corporal. O final do sono foi considerado o momento da recuperação do reflexo postural de endireitamento (Bastidas Ramirez, Navarro Ruiz *et al.*, 1998). O tempo foi cronometrado em segundos (s).

#### 4.8.2.8 Os tratamentos com DCF + adenosina e com FDS prolongam o tempo de sono induzido por cetamina

A figura 31 mostra o efeito da DCF, da adenosina, da FDS, da inosina e da associação destes fármacos no teste de indução de sono pela cetamina. Nos painéis A e C temos a latência para indução do sono e nos painéis B e D o tempo de duração do sono. Podemos observar nos painéis A e C que o diazepam reduziu a latência para o sono em comparação com o grupo controle (veículo) e que nenhum dos outros fármacos ou associações deles foi capaz de reduzir o tempo de latência. Nos painéis B e D, podemos observar que a associação de DCF (50 mg/kg, i.p.) com adenosina (30 mg/kg, i.p.) e a FDS 1 mg/kg, i.p. prolongaram o tempo de sono dos animais em

relação ao grupo controle, com valores semelhantes ao grupo tratado com diazepam (0,5 mg/kg, i.p.).

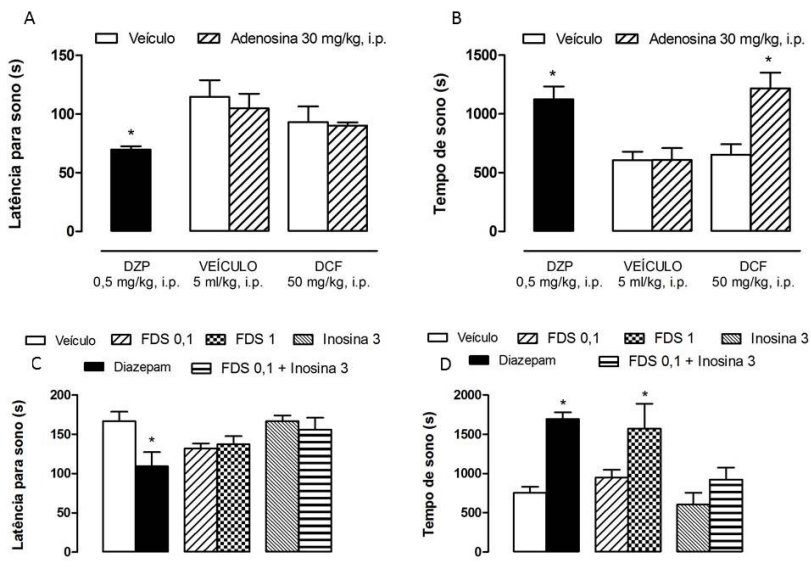


Figura 31. Efeitos da DCF, adenosina, FDS, inosina e associações no teste do sono induzido por cetamina. Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com DCF (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito da adenosina (30 mg/kg, i.p.) no teste do sono induzido pela cetamina. O diazepam (DZP, 0,5 mg/kg, i.p.) foi utilizado como grupo controle positivo. Nos painéis A e C, observa-se a latência para a indução do sono. Nos painéis B e D, observa-se a duração do sono previamente induzido. Todos os valores que constam nas legendas dos painéis C e D indicam a dose dos fármacos em mg/kg, i.p. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo em questão quando comparado com o grupo controle negativo (veículo pré-tratado com veículo). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$ . (n=6-9).

## 4.9 PARTE V – NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INOSINA E ADENOSINA

Nesta parte do trabalho, as seções 4.9.1.1, 4.9.1.2 e 4.9.2.1 foram realizadas em nosso laboratório. O restante das metodologias e resultados obtidos na parte V desta tese foram realizadas pelo pesquisador Gabriel Araújo, no LABMULT da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte.

### 4.9.1 Metodologia

#### 4.9.1.1 Avaliação do decurso temporal da atividade antinociceptiva da inosina e da adenosina no teste da formalina

Para verificar o decurso temporal (duração) da atividade antinociceptiva da inosina e da adenosina, os animais foram tratados com veículo (5 ml/kg, i.p.), inosina (10 mg/kg, i.p.) ou adenosina (10 mg/kg, i.p.). Após isso, os animais foram submetidos ao teste da formalina 2% nos tempos 30 min, 1, 2, 4 e 8 h após o tratamento.

#### 4.9.1.2 Análise temporal dos níveis plasmáticos de inosina e adenosina após administração única de cada substância

Os animais foram tratados pela via intraperitoneal com inosina ou adenosina (10 mg/kg) e após os tempos 30 min, 1, 2, 4 e 8 h tiveram o sangue coletado pelo plexo orbital. O sangue foi coletado com EDTA e após 2 minutos mantido no gelo. Após foi centrifugado a 3000 RPM durante 5 min na temperatura de 4°C. Foi retirado 200 µl do sobrenadante e adicionado 200 µl de PCA 8% e centrifugado a 12000 g durante 10 min sob temperatura de 4°C. Logo após, 250 µl do sobrenadante foram adicionados à 15 µl de 2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/6M KOH e centrifugado a 12000 g por 10 min sob 4°C. Após a centrifugação, 100 µl do sobrenadante foram adicionados à 100 µl de tampão

fosfato de potássio 50 mM (87,7 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M + 12,3 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , diluído 100 mL + 300 mL água ultrapura). Finalmente, as amostras foram conservadas a  $-80^\circ\text{C}$ , até o momento em que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4.9.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Tanto para separação e identificação dos padrões, como para quantificação da adenosina e seus metabólitos em amostras desproteinizadas, uma alíquota de 25  $\mu\text{l}$  das mesmas foi injetada no cromatógrafo de alta eficiência (VARIAN Prostar®, Palo Alto CA), equipado com uma coluna ODS-2 C18 (5 mm) 250 x 1.0 mm (Phenomenex, Palo Alto, CA), uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e um mostrador automático (VARIAN Prostar 410®). Para a separação foi usado um gradiente linear de 50 mM de fosfato de potássio (fase A) e metanol (Fase B) (v/v). O gradiente iniciou em 100 % (0 – 2 min. – fase A); com aumento linear de 88 % (2 – 10 min.); 88% (10 -12 min. – fase A); 100% (12 – 17 min.) com estabilização de 2 min. O fluxo ficou em 1,0 ml/min. O detector de arranjo de diodos, registrou os cromatogramas em 250 nm. Os cromatogramas foram registrados e analisados com auxílio do software Galaxie v.1 (Palo Alto, CA). A área dos picos foi calculada e utilizada para determinação da concentração dos compostos identificados.

#### *Confecção da curva padrão*

Para determinação das concentrações de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico nas amostras de plasma, curvas com concentrações crescentes dos padrões em plasma sanguíneo, foram realizadas. As concentrações crescentes das mesmas foram de 1,125 pM a 40 pM para a adenosina e inosina e de 3,125 pM a 100 pM para a xantina e o ácido úrico e detectadas por CLAE. As concentrações dos nucleosídeos presentes nas amostras foram determinadas por interpolação dos valores obtidos, na curva de calibração.

### *Identificação dos picos nas amostras*

A validação do método foi realizada por duas metodologias distintas, devido ao baixo sinal analítico apresentado pelas amostras, e a estas foram adicionados os padrões em concentração conhecida, elevando assim o sinal analítico e possibilitando a quantificação. Assim como, por se tratar de um método de avaliação do metabolismo, utilizou-se a cafeína, uma xantina metoxilada, como padrão interno. Sendo todos os resultados avaliados a partir da relação entre a área do analito pela área do padrão interno. Todos os padrões apresentaram-se lineares dentro da faixa de trabalho, de modo que o método se mostrou reprodutível.

A identificação foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras e dos padrões, já conhecidos. Além disso, foram também comparados o espectro de absorção UV dos compostos suspeitos nas amostras, com os dos padrões. Em todas as análises foi utilizado a cafeína como padrão interno, por se tratar de uma xantina, devido ao pKa e UV.

## **4.9.2 Resultados**

### 4.9.2.1 Avaliação do decurso temporal da atividade antinociceptiva da inosina e da adenosina no teste da formalina

A figura 32 mostra o decurso temporal do perfil antinociceptivo da inosina e da adenosina no teste da formalina após administrações únicas de cada substância. Podemos observar que ambas as substâncias apresentam efeito antinociceptivo 30 min após a administração. A inosina possui efeito antinociceptivo também no tempo de 1 h, em ambos os comportamentos, e no tempo de 2 h no comportamento de lambida/mordida da pata. A adenosina induziu antinocicepção também no tempo de 2 h no comportamento de lambida/mordida da pata.

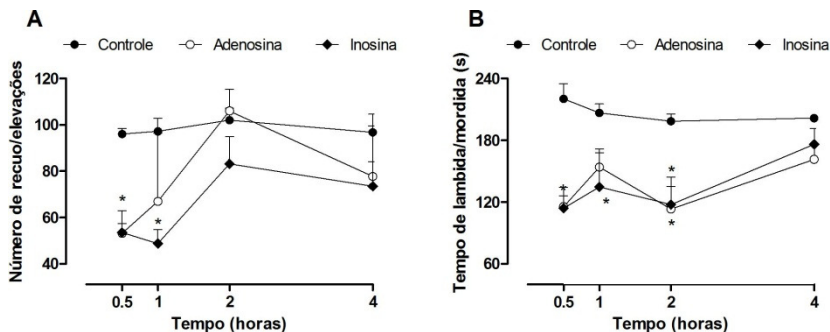


Figura 32. Decurso temporal do efeito da inosina e adenosina no teste da formalina. Avaliação do decurso temporal das administrações de inosina (10 mg/kg, i.p.) e adenosina (10 mg/kg, i.p.) no teste de nocicepção induzido pela formalina 2%. Os valores são expressos como a média de cada ponto de análise  $\pm$  EPM. O asterisco (\*) representa níveis de diferença significativa do grupo tratado com inosina ou adenosina quando comparado com o grupo controle, tratado com veículo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de 2 vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. \* $P < 0,05$ . (n=4-5).

#### 4.9.2.2 Padronização da metodologia para dosagem dos níveis sanguíneos de inosina e adenosina pelo método de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)

A figura 33 demonstra o cromatograma com identificação dos picos referentes aos padrões de ácido úrico, xantina, inosina, adenosina e cafeína (utilizada como padrão interno do método) isoladamente (A) e acrescidos à amostra de plasma sanguíneo (B). Foi possível observar que os padrões, quando adicionados à amostra, apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção em comparação com os padrões em solução. Confirmando que é possível sua detecção em amostras de plasma e permitindo a realização de curvas de calibração dos padrões em amostra. Todos os padrões foram separados em uma corrida de 16 min. e a identificação dos picos de cada um, bem como a sua pureza, foi confirmada comparando o

tempo de retenção e espectro de absorção ultravioleta (UV) dos mesmos.

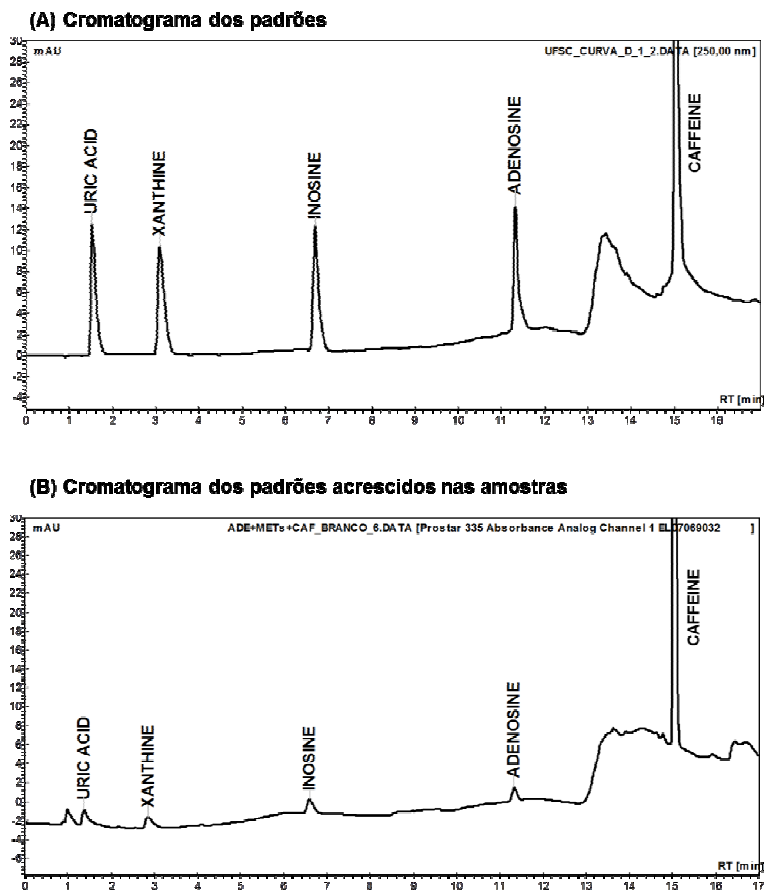


Figura 33. Cromatogramas dos padrões para adenosina, inosina, xantina e ácido úrico (A) e padrões acrescentados nas amostras para a curva de calibração (B). A cafeína foi utilizada como controle interno do método. Os cromatogramas foram obtidos em 250 nm e registrados em mili unidade de absorbância por segundo (mAU).

Os resultados descritos na figura 34 demonstraram que as curvas de calibração, realizadas por adição de padrão na amostra,



apresentaram uma linearidade ( $R^2$  em torno de 0,99) entre os diferentes pontos, que para a adenosina e inosina representam concentrações que variam de 1,125 pmol à 40 pmol. Em adição, para a xantina e ácido úrico estas concentrações variaram de 3,125 pM à 100 pM. As concentrações da adenosina e seus metabólitos foram obtidas por interpolação dos dados obtidos no cromatograma, na curva padrão.

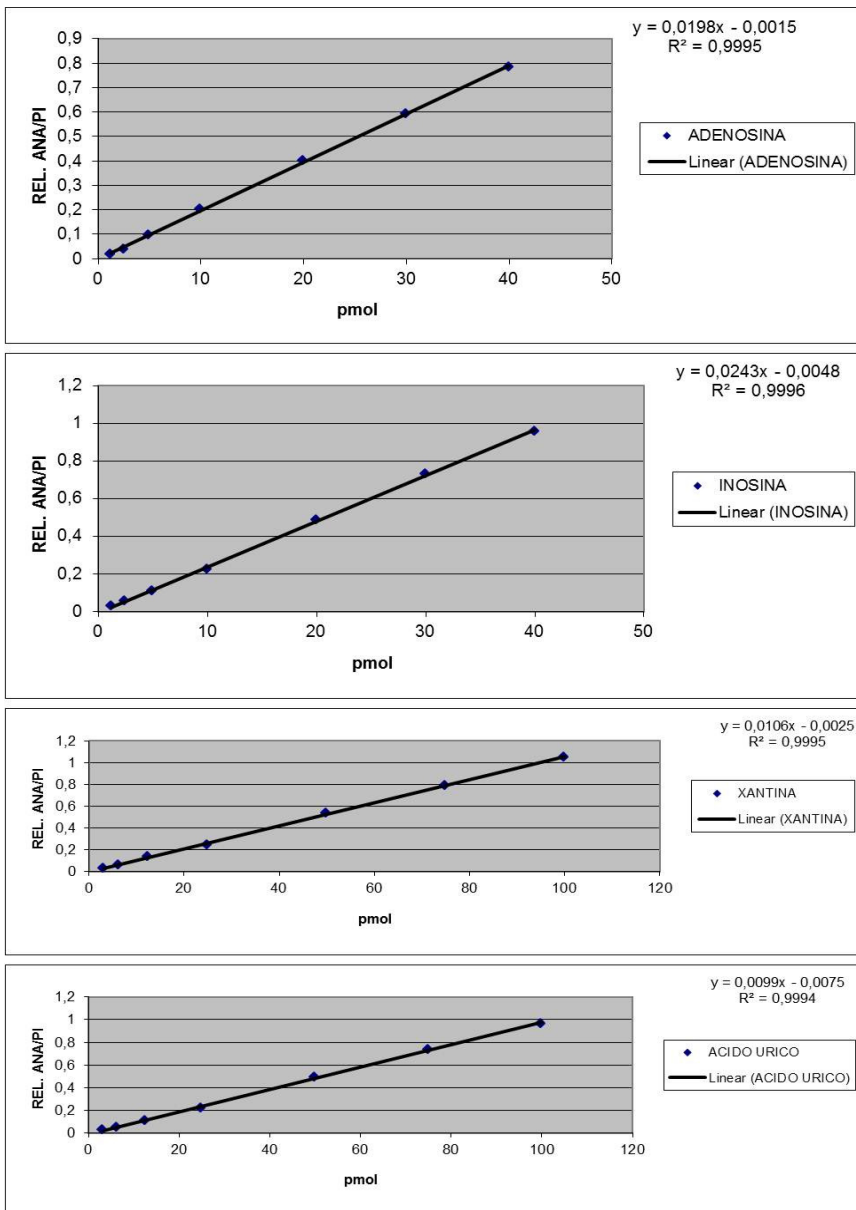


Figura 34. Curvas de calibração para detecção e quantificação sérica da adenosina, inosina, xantina e ácido úrico.

A figura 35 demonstra que os espectros de UV para a adenosina, inosina, xantina, ácido úrico e cafeína, são característicos para cada nucleosídeo e confirmam os picos e pureza dos padrões identificados nos cromatogramas.

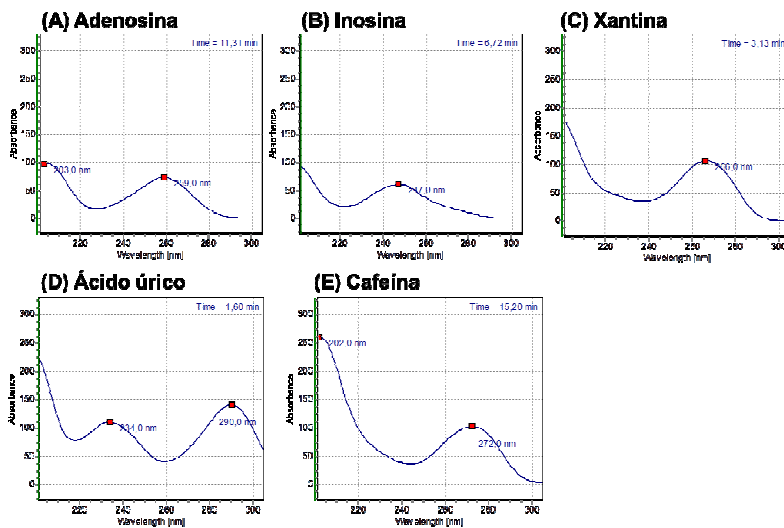


Figura 35. Espectro de absorção UV, obtidos dos cromatogramas para (A) adenosina; (B) inosina; (C) xantina; (D) ácido úrico e (E) cafeína.

#### 4.9.2.3 Avaliação do decurso temporal dos níveis sanguíneos de inosina e adenosina após administração única de cada substância

A figura 36 mostra os níveis plasmáticos de adenosina, inosina, xantina e ácido úrico após administrações únicas de adenosina ou inosina (10 mg/kg, i.p.) em camundongos. Podemos observar que os níveis basais de adenosina e inosina foram em torno de 2 pM, enquanto os níveis basais de xantina e ácido úrico são em torno de 3 e 6 pM, respectivamente. Em geral, 1 h após a administração de adenosina ou inosina observou-se picos de ácido

úrico e xantina, sendo que o ácido úrico atingiu o pico de cerca de 18 pM quando a adenosina foi administrada e a xantina atingiu um pico de aproximadamente 9 pM 30 min após a administração de inosina.

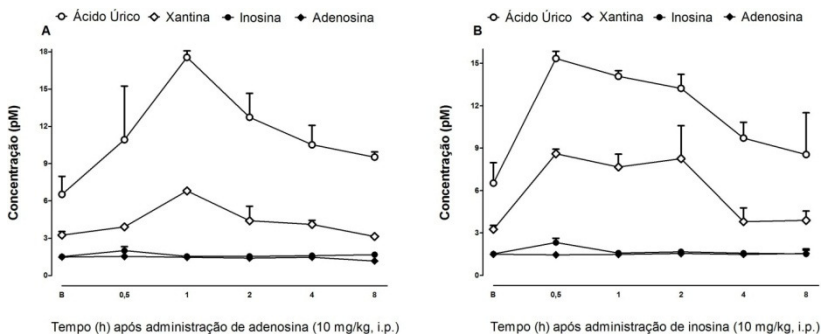


Figura 36. Análise do decurso temporal dos níveis plasmáticos de purinas após administrações de adenosina e inosina. Dosagem por CLAE dos níveis plasmáticos de ácido úrico, xantina, inosina e adenosina até 8 h após administrações de adenosina e inosina (10 mg/kg, i.p.) em camundongos. (n=4).

A figura 37 mostra em detalhe o decurso temporal dos níveis plasmáticos de adenosina e inosina após administrações destas duas substâncias pela via i.p. Observa-se que 30 min após a administração de adenosina ou de inosina, ocorrem picos de inosina, enquanto os níveis de adenosina se mantém basais. Uma hora após a administração de qualquer um dos nucleosídeos, observamos apenas níveis basais de ambas as substâncias.

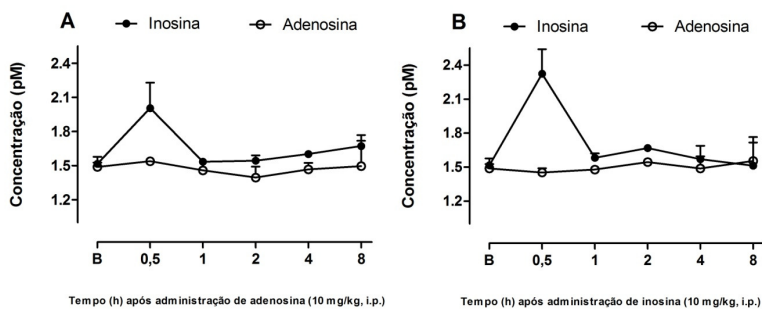


Figura 37. Análise do decurso temporal dos níveis plasmáticos de nucleosídeos após administrações de adenosina e inosina. Dosagem por CLAE dos níveis plasmáticos de inosina e adenosina até 8 h após administrações de adenosina e inosina (10 mg/kg, i.p.) em camundongos. (n=4).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PARTE I - ENVOLVIMENTO DO A1R NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA

Recentemente, nosso grupo demonstrou que administrada por diferentes vias, a inosina causa importante efeito antinociceptivo de maneira dependente da dose em camundongos (Nascimento, Figueredo et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que o A1R está envolvido no efeito antinociceptivo da inosina. Assim, o presente trabalho pretende confirmar a participação do A1R no efeito antinociceptivo da inosina através de diferentes metodologias. Embora alguns trabalhos demonstrem farmacologicamente que antagonistas A1R revertem os efeitos da inosina (Hasko, Kuhel et al., 2000; Assaife-Lopes, Wengert et al., 2009) e que este nucleosídeo pode promover uma redução da produção do AMPc (Rittiner, Korboukh et al., 2012), até o momento não se havia demonstrado que a inosina pudesse se ligar ao A1R com afinidade expressiva (Jin, Shepherd et al., 1997; Fredholm, Irenius et al., 2001).

Diferentemente de nosso estudo prévio, os experimentos realizados nas partes I, IV e V do presente trabalho foram conduzidos com camundongos *C57black/6*. Desta forma, o primeiro objetivo deste bloco de experimentos foi avaliar se a inosina seria eficaz na linhagem *C57black/6* assim como fora na linhagem *Swiss*. Demonstramos que a inosina foi efetiva em reduzir a nocicepção causada pela formalina nas duas linhagens de camundongos utilizados, *Swiss* e *C57/black*. Estes dados subsidiam a utilização dos camundongos *C57/black* nos experimentos realizados nas partes I, IV e V deste estudo.

No entanto, é importante salientar que não houve diferença estatística significante entre os efeitos causados pelas doses de 10 e 100 mg/kg na linhagem *C57/black*, diferentemente do que ocorreu no estudo com camundongos *Swiss*, quando a dose de 100 mg/kg foi mais eficaz que a dose de 10 mg/kg (Nascimento, Figueredo et al.,

2010). Por outro lado, este possível efeito “teto” da inosina na dose de 10 mg/kg, vai de encontro com os resultados obtidos em outros modelos de dor aguda, como o ácido acético e o glutamato (Nascimento, Figueredo et al., 2010).

Bastia e colaboradores demonstraram que o agonista do A1R, CCPA, induziu antinocicepção em camundongos no teste da placa quente na dose de 0,03 mg/kg, i.p., enquanto que a dose de 0,1 mg/kg deste mesmo fármaco não foi capaz de aumentar a antinocicepção em comparação com a dose anterior (Bastia, Varani et al., 2002). Em outro estudo, o agonista do A1R, CPA, apresentou ação antinociceptiva no teste de hiperalgesia térmica em animais com neuropatia, com efeitos semelhantes nas doses de 160 e 320 µg/kg, intravenosa (i.v.) (Curros-Criado e Herrero, 2005). Considerando a possibilidade que a inosina possa ativar os A1R, estes estudos sugerem, assim como os nossos dados, que doses elevadas de inosina podem saturar o A1R ou ainda atuar sobre outros mecanismos ou receptores de adenosina, como o A3R (Jin, Shepherd et al., 1997; Fredholm, Irenius et al., 2001). Sendo assim, mesmo com doses elevadas de agonistas de A1R, sua ativação poderia modular parcialmente o comportamento nociceptivo. Obviamente, há vários vieses nestas comparações, como a linhagem do animal, o teste ou o fármaco utilizados, entre outros. Além disso, a inosina poderia atuar em outros receptores, enzimas ou até sistemas nos quais ainda não foram relacionados aos efeitos da inosina (Jin, Shepherd et al., 1997; Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko, Sitkovsky et al., 2004). Seria interessante comparar o possível “teto” do A1R com outro estudo comportamental utilizando a inosina, no entanto, não encontramos na literatura algum estudo semelhante que pudesse fazer esta comparação.

A adenosina também apresentou atividade antinociceptiva no teste da formalina. Em ambos os comportamentos avaliados (recuo/elevação e lambida/mordida da pata) a curva dose-resposta da adenosina apresentou um formato em “U”, ou seja, as doses intermediárias foram as que apresentaram maiores efeitos, embora

apenas a dose de 10 mg/kg foi significativamente eficaz no comportamento de recuo/elevação da pata, e a dose de 30 mg/kg no comportamento de lambida/mordida. Várias hipóteses poderiam explicar este perfil da adenosina, dentre elas podemos citar as mesmas sugeridas para o possível efeito “teto” da inosina sobre o A1R. No entanto, a ativação de diferentes receptores pela adenosina pode ajudar também a explicar este perfil em “U”. Dentre os quatro tipos de receptores de adenosina, a ativação do A1R induz antinocicepção, porém, a ativação do A2BR e A3R pode induzir dor, enquanto que a ativação do A2AR pode resultar em efeitos antinociceptivos ou pró-nociceptivos (para revisão ver Sawynok, 1998; Sawynok e Liu, 2003).

A adenosina tem uma afinidade duas vezes maior pelo A1R do que pelo A2AR e aproximadamente 90 vezes maior pelo A1R em comparação com os receptores A2BR e A3R (Fredholm, Ap et al., 2001). Desta forma, pode-se cogitar que doses baixas e intermediárias de adenosina como, por exemplo, a dose de 10 mg/kg, ativaria preferencialmente o A1R, enquanto doses mais elevadas poderiam ativar o A2AR ou outros receptores de adenosina e assim, induzir a ativação da via da AC/AMPC, resultando na facilitação da dor. Além disso, em outro trabalho de nosso grupo, quando a adenosina foi administrada em animais submetidos ao modelo de dor pós-operatória, este nucleosídeo reduziu a resposta nociceptiva, mas também em forma de “U” (Moré, 2012), fenômeno que pode também estar envolvendo o A2AR, por exemplo. Esta hipótese, de ativação inicialmente do A1R e após ativação do A2AR, pode ser reforçada por uma recente publicação, a qual demonstrou que em doses baixas a adenosina reduziu o acúmulo de AMPC em células renais embrionárias humanas (HEK293), mas aumentou o acúmulo de AMPC em doses mais elevadas, provavelmente devido à ativação do A2R acoplados a proteínas G<sub>s</sub>, que também são expressos pelas células HEK (Rittiner, Korboukh et al., 2012).

Com relação às vias de administração, demonstramos que a inosina possui efeito antinociceptivo quando administrada sistêmica



e localmente. Além disso, demonstramos que os A1R centrais estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina. Por outro lado, periféricamente, outros mecanismos além da ativação do A1R parecem ser mais relevantes para a antinocicepção induzida pela inosina. Esses dados corroboram os resultados obtidos com animais nocaute para o A1R, nos quais a inosina não foi capaz de produzir antinocicepção quando administrada pelas vias intraperitoneal e intratecal. No entanto, quando administrada pela via intraplantar, a inosina foi capaz de induzir antinocicepção nos animais nocaute. Podemos concluir que os A1R localizados centralmente, i.e. na medula espinhal, e supraespinhal (Dixon, Gubitzi et al., 1996; Schulte e Fredholm, 2003) são os principais responsáveis pela antinocicepção causada pela inosina, pois, utilizando tanto abordagens farmacológicas quanto genéticas, esses receptores foram essenciais para mediar o efeito causado pela inosina.

Surpreendentemente, os A1R parecem não estar envolvidos na antinocicepção causada pela inosina periféricamente, ou pelo menos, não são os principais responsáveis por este efeito causado pela inosina. Estudos prévios demonstraram que agonistas do A1R causam antinocicepção local quando administrados na pata dos animais (Lima, Souza et al., 2010; Taiwo e Levine, 1990; Doak e Sawynok, 1995). Todavia, nossos resultados demonstram que periféricamente outros mecanismos são mais relevantes para promover a antinocicepção induzida pela inosina do que a ativação dos A1R, que são expressos em neurônios sensoriais primários (Sawynok, 1998; Carruthers, Sellers et al., 2001; Cairns, 2009). Uma possibilidade de um viés no estudo com os animais nocaute é uma possível compensação de outros receptores de adenosina na periferia que poderiam ser expressos em maior densidade devido à supressão da expressão dos A1R. Porém, caso isso ocorresse, provavelmente não haveria antinocicepção induzida pela inosina, pois está bem estabelecido que a ativação dos outros receptores de adenosina periféricamente reduz o limiar de ativação dos nociceptores (Li, Hao et al., 2010; Bura, Nadal et al., 2008). Além disso, os dados do

presente estudo indicam que as duas abordagens utilizadas (farmacológica e genética) corroboram entre si, sugerindo fortemente que na periferia a inosina pode atuar em outros alvos além dos receptores de adenosina para induzir antinocicepção, como outros receptores ou enzimas. Ou ainda, podem ocorrer na periferia heterodimerizações do A2AR e A2BR com receptores canabinóides, dopaminérgicos entre outros, o que é relativamente comum (Fredholm, Ap et al., 2011). No entanto, como demonstrado que a inosina é agonista A3R, mas não A2AR ou A2BR, e que dimerizações de receptores A3R são bem raras, estudos adicionais são necessários para sugerir como a inosina poderia causar antinocicepção periférica.

Outra abordagem utilizada para avaliar o envolvimento do A1R na antinocicepção causada pela inosina, foi a técnica de tratamento com oligodeoxinucleotídeo antisentido (AS-ODN), que permite reduzir a expressão de, por exemplo, determinada enzima ou proteína em animais do tipo selvagens, já adultos. Para este experimento, em virtude dos resultados obtidos citados nos parágrafos anteriores, onde os A1R periféricos não medeiam a antinocicepção induzida pela inosina, focamos nossa abordagem apenas nos receptores espinhais de adenosina. Assim, utilizando animais com expressão reduzida de A1R na medula espinhal, confirmamos que os A1R espinhais são essenciais para o efeito antinociceptivo da inosina administrada sistemicamente.

Desta forma, demonstramos através de várias metodologias que os A1R são fundamentais para o efeito antinociceptivo da inosina. No entanto, achamos importante determinar se o efeito da inosina dependia de uma ação direta ou indireta sobre este receptor. Para isso realizamos ensaio de ligação específica da inosina e adenosina com o A1R. Neste ensaio, a inosina e a adenosina foram capazes de deslocar o ligante específico 3H-DPCPX do A1R em baixas concentrações ( $CI_{50} = 36$  nM e 113 nM, respectivamente) semelhante àquelas em que são encontradas endogenamente. Ballarin e colegas demonstraram através de microdiálise que no espaço

extracelular estriatal de ratos, a concentração encontrada de adenosina foi em torno de 200 nM e de inosina 110 nM (Ballarin, Fredholm et al., 1991). Outro estudo avaliou que ratos possuíam níveis basais de inosina em 1,4  $\mu\text{M}$  no estriado e 1,9  $\mu\text{M}$  no hipocampo (Dux, Fastbom et al., 1990) ou ainda 0,8  $\mu\text{M}$  e 0,21  $\mu\text{M}$  (inosina) e 0,4  $\mu\text{M}$  e 0,33  $\mu\text{M}$  (adenosina) no núcleo caudado de ratos anestesiados e não anestesiados, respectivamente (Zetterstrom, Vernet et al., 1982). Logo, os dados do presente estudo nos permitem concluir que a inosina é capaz de se ligar diretamente ao A1R, em concentrações e afinidades semelhantes à adenosina. Embora o ensaio de ligação específica demonstre apenas afinidade, ou seja, geralmente, uma substância que se liga a um receptor pode ser tanto um agonista como um antagonista, nosso resultado somado a resultados recentemente publicados, que demonstram que a inosina reduz o acúmulo de AMPc (Rittiner, Korboukh et al., 2012), ajudamos a explicar todos os outros resultados apresentados nesta parte do trabalho. Assim, além da inosina ser capaz de se ligar aos A3R (Jin, Shepherd et al., 1997; Fredholm, Irenius et al., 2001), demonstramos que a inosina é um ligante endógeno (agonista) do A1R, assim como a adenosina e o AMP (Rittiner, Korboukh et al., 2012).

Coletivamente os dados deste bloco nos levam a uma hipótese interessante sobre a ação da adenosina e inosina. Pudemos observar que adenosina e inosina apresentaram eficácias semelhantes no teste de nocicepção induzida pela formalina. Este resultado vai ao encontro dos resultados encontrados no ensaio de ligação de ambas as moléculas pelo A1R. No entanto, em doses maiores, a adenosina perde parte de seu efeito, enquanto que a inosina mantém este efeito. Assim, sabendo que a adenosina apresenta uma afinidade em torno de 2 vezes maior pelo A1R em relação ao A2AR, sugerimos que quando o A2AR começa a ser ativado em maior proporção, este receptor induz a produção de AMPc, resultando na ativação da PKA e reduzindo o efeito da adenosina. A inosina por sua vez, parece ser uma molécula que ou não se liga aos receptores A2AR/A2BR (Jin, Shepherd et al., 1997; Fredholm, Irenius et al., 2001) ou possui uma

baixíssima afinidade por estes receptores, o que explicaria os efeitos diferentes da inosina em relação à adenosina em doses elevadas.

Concluimos nesta parte, que os A1R centrais, principalmente do corno dorsal da medula espinhal são essenciais para a antinocicepção induzida pela inosina quando administrada sistêmica ou centralmente. Além disso, demonstramos que o envolvimento dos A1R se dá devido à ligação direta da inosina a este receptor. No entanto, localmente, outros mecanismos estão envolvidos no efeito antinociceptivo da inosina. Além disso, sugerimos que ao contrário da adenosina, a inosina não se liga ou liga-se com baixíssima afinidade ao A2AR ou A2BR (figura 38).

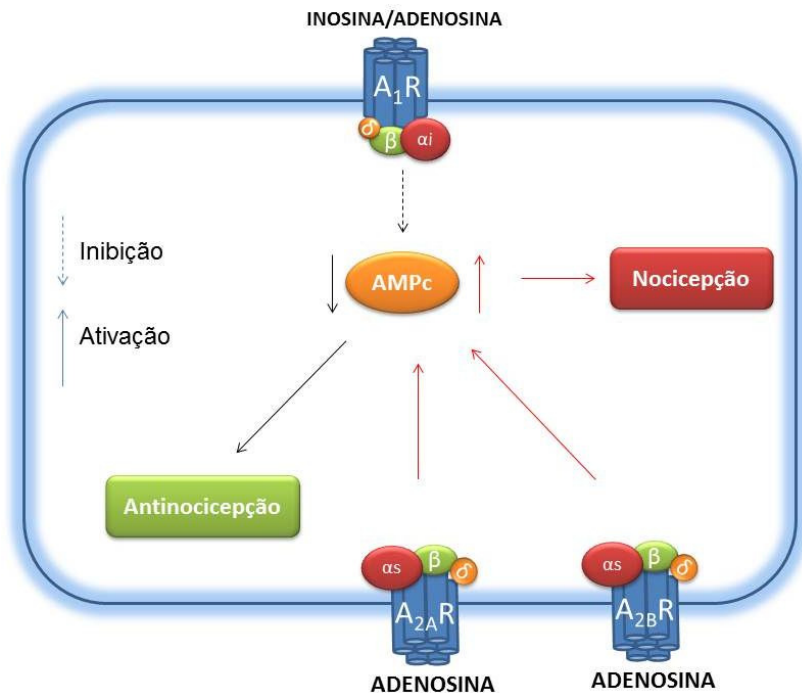


Figura 38. Sugestão do envolvimento do A1R no efeito antinociceptivo induzido pela inosina no teste da formalina. A inosina e a adenosina são capazes de ativar o A1R causando redução da produção de AMPc, resultando na inibição de vias intracelulares e na indução da antinociceção. Por outro lado, os receptores A2AR e A2BR seriam ativados basicamente apenas pela adenosina, o que induziria um aumento da produção de AMPc, facilitando a transmissão nociceptiva. A1R, receptor para adenosina do tipo 1; A2AR, receptor para adenosina do subtipo A2A; A2BR, receptor para adenosina do subtipo A2B; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico.

## 5.2 PARTE II - MECANISMO DE AÇÃO INTRACELULAR DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INOSINA

Muitos fármacos que são utilizados na clínica atuam via receptores acoplados a proteínas G e sensíveis à toxina pertussis, dentre eles os opióides, agonistas gabaérgicos, agonistas  $\alpha$ -2 e outros (Hoehn, Reid et al., 1988). A toxina pertussis inativa a proteína  $G_{i/o}$  através da ribosilação da subunidade  $\alpha$  ancorada ao receptor. Assim, a proteína  $G_{i/o}$  torna-se inativa e não é mais capaz de inibir a adenilil ciclase, a enzima responsável por aumentar a produção do AMPc intracelular. Logo, a inativação da proteína  $G_{i/o}$  pela toxina Pertussis permite um aumento dos níveis de AMPc intracelular (Dolphin e Prestwich, 1985).

Neste estudo, demonstramos que o pré-tratamento com toxina pertussis foi capaz de prevenir a antinocicepção induzida pela morfina (usada como um controle positivo) e pela inosina. Esses dados sugerem que a antinocicepção causada pela inosina é mediada por receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ , o que corrobora nossos resultados prévios que demonstram a participação do A1R neste efeito. Sabe-se que o A1R é acoplado a proteínas  $G_{i/o}$ . Assim, podemos sugerir que o A1R é o principal receptor responsável por desencadear a antinocicepção induzida pela inosina, pois o A2AR, não é acoplado a proteínas  $G_{i/o}$ , mas sim a proteínas  $G_{s/olf}$  (Ralevic e Burnstock, 1998; Jacobson e Gao, 2006). A ativação dos receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  pode promover a abertura de alguns tipos de canais de  $K^+$ . Por exemplo, agonistas opióides, adrenérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos, canabinóides e adenosinérgicos são capazes de abrir canais de  $K^+$  e conseqüentemente reduzir a nocicepção (Ocana e Baeyens, 1993; Robles, Barrios et al., 1996; Sanchez, Gonoï et al., 1998; Ocana, Cendan et al., 2004).

Os canais de  $K^+$  são classificados de acordo com suas estruturas protéicas e suas relações filogenéticas, os quatro tipos principais incluem os canais de  $K^+$  operados por voltagem ( $K_v$ ), ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) e os canais de

dois poros ( $K_{2P}$ ) (Gutman, Chandy et al., 2003; Ocana, Cendan et al., 2004). Vários analgésicos clássicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), tais como tramadol, diclofenaco e meloxicam, assim como a inosina, reduzem a fase inflamatória do teste da formalina. E de acordo com estes estudos e a classificação dos canais de  $K^+$ , a ação analgésica destes fármacos pode ser parcialmente explicada pela ativação de canais de  $K^+$  distintos. Além disso, o diclofenaco e outros AINES causam analgesia pela inibição das enzimas ciclooxigenases e também por causar a ativação da via NO/GMPc/canais de  $K^+$  (Ortiz, Torres-Lopez et al., 2002; Ocana, Cendan et al., 2004; Ortiz, Castaneda-Hernandez et al., 2005; Yalcin e Aksu, 2005; Ortiz, Lozano-Cuenca et al., 2008). Neste trabalho, mostramos que o efeito antinociceptivo da inosina foi bloqueado pelo pré-tratamento com tetraetilamônio (TEA) e 4-aminopiridina (4-AP), ambos bloqueadores não-seletivos dos canais de  $K^+$  operados por voltagem ( $K_v$ ), sugerindo que a abertura deste tipo de canal é importante para a antinocicepção induzida pela inosina.

Além disso, demonstramos que a administração intratecal de caribdotoxina (bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância), mas não apamina (bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa condutância), também preveniu o efeito antinociceptivo produzido pela inosina, sugerindo a participação dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância no efeito causado pela inosina. Entretanto, é preciso relatar que possivelmente a caribdotoxina também bloqueie os canais de  $K^+$  operados por voltagem (Rodriguez De La Vega, Merino et al., 2003). Ainda, a administração intratecal de glibenclamida também previniu o efeito antinociceptivo da inosina, sugerindo que os canais de  $K^+$  sensíveis à ATP também estão envolvidos no efeito antinociceptivo da inosina. Este resultado vai ao encontro dos dados obtidos por Song e colaboradores, que demonstraram que o bloqueio dos canais de  $K^+$  sensíveis à ATP reverteu a antinocicepção induzida pelo R-PIA (agonista A1R) em um modelo de dor neuropática em ratos (Song, Hahm et al., 2011).

Além disso, é importante destacar que Regaya e colaboradores (2004) demonstraram que a antinocicepção induzida pelo agonista A2AR, CGS21680, também é dependente da ativação de canais de  $K^+$ .

É importante salientar que quando administrados de forma isolada e nas concentrações utilizadas em nossos experimentos, os bloqueadores dos canais de  $K^+$  (TEA, 4-aminopiridina, caribdotoxina, apamina e glibenclamida) não modificaram o limiar de dor induzida pela formalina. Contudo, é interessante destacar que, a hiperpolarização resultante da ativação dos subtipos de canais de  $K^+$ , especialmente os ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância, reduzem a quantidade de neurotransmissores liberados por encurtar a duração da despolarização que permite o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por voltagem (VGCC, *voltage-gated calcium channels*) (Hu, Shao et al., 2001). Por exemplo, a ação analgésica de alguns fármacos importantes, como a morfina, que ativa canais de  $K^+$ , pode também ser parcialmente explicada pelo fechamento dos VGCC e consequente redução do influxo de  $Ca^{2+}$ .

Os VGCC são divididos em 2 categorias: os canais ativados por alta voltagem, incluindo os tipos L, N, P/Q e R que requerem forte despolarização e ativação; e os canais do tipo T de baixa voltagem que podem ser disparados por uma despolarização mais suave (Vanegas e Schaible, 2000; Mcgivern e Mcdonough, 2004). No sistema nervoso central, estes canais realizam uma variedade de ações, regulando a expressão gênica, transmissão sináptica e excitabilidade neuronal. Os VGCC mais detalhadamente estudados na nocicepção são os canais de  $Ca^{2+}$  do tipo N, P/Q e T (Vanegas e Schaible, 2000; Mcgivern e Mcdonough, 2004; Yaksh, 2006). Está bem estabelecido que um aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular tem uma importante função na liberação de neurotransmissores, na excitabilidade da membrana celular, na ativação de proteínas celulares e na redução do limiar de dor (Prado, 2001; Cervero e Laird, 2003; Ward, 2004).



Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N e T são os que participam da via de sinalização dos aferentes primários. Os canais do tipo T de baixa voltagem estão localizados principalmente próximo às terminações nervosas livres, ao longo das fibras nociceptivas e no GRD. Esses canais estão envolvidos principalmente na geração e frequência de potenciais de ação (Iftinca e Zamponi, 2009; Zamponi, Lewis et al., 2009). Os VGCC do tipo N são densamente distribuídos nos terminais pré-sinápticos nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Potenciais de ação gerados ao longo das fibras C e A $\delta$  induzem a abertura de canais pré-sinápticos de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N, os quais em seguida iniciam a liberação de transmissores como glutamato, SP e CGRP sobre interneurônios espinhais e projeções neuronais (Zamponi, Lewis et al., 2009). De fato, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é regulada por vários mecanismos, um destes mecanismos é o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via VGCC através da membrana plasmática. Os canais VGCC são inibidos por receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ . Conseqüentemente, os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  são reduzidos e há um aumento do limiar da dor (Zamponi e Snutch, 1998).

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos camundongos com  $\text{CaCl}_2$  preveniu o efeito antinociceptivo induzido pela inosina, sugerindo que os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  estão envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina. Acreditamos que a inosina não esteja atuando diretamente sobre os VGCC, mas pode estar modulando os VGCC indiretamente. Esses canais regulam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e podem ter função na detecção do estímulo nociceptivo e também na transmissão deste estímulo. Assim, o efeito da inosina via AIR poderia reduzir a geração de potenciais de ação nas fibras aferentes primárias (onde estão localizados os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T) inibindo as sinapses entre estas fibras e os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (onde se encontram canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N em grande densidade). Além disso, o aumento do nível intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ativar a PKC (Chen e Tian, 2011; Ji e Woolf, 2001), proteína envolvida na

facilitação de respostas nociceptivas. Ou seja, o aumento do nível intracelular de  $Ca^{2+}$ , pode produzir nocicepção via ativação da PKC.

Em outro experimento, avaliamos o envolvimento da PKA e PKC na antinocicepção induzida pela inosina. Essas proteínas são ativadas pelas vias da AC/AMPC e PLC/IP3/DAG, respectivamente (Jacobson e Gao, 2006), e podem causar facilitação de respostas nociceptivas através da ativação de canais iônicos, receptores de membrana ou transcrição gênica. Observamos que a inosina administrada intraperitonealmente foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por miristato de acetato de forbol (PMA, ativador direto da PKC) e por bradicinina (BK, ativador indireto da PKC). Alguns mediadores inflamatórios produzem nocicepção por sensibilização periférica e central através da ativação de proteínas quinases, tais como PKA, PKC e MAPK (Kawabata, 2011; Cheng e Ji, 2008; Ingram e Traynor, 2009). A PKC é uma proteína importante na mediação de efeitos nociceptivos oriundos de diferentes estímulos ou vias da nocicepção. A PKC pode ser estimulada via ativação da PLC em decorrência do aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Além disso, a ativação da PLC eleva os níveis de DAG, que juntamente com os níveis elevados de  $Ca^{2+}$  ativa a PKC. A PKC uma vez ativada, pode fosforilar enzimas, canais iônicos e receptores ligados à membrana que favorecem a sensibilização e ativação dos nociceptores (para revisão ver Chen e Tian, 2011; Millan, 1999; Ji e Woolf, 2001). Importantes mediadores inflamatórios, como a BK e a histamina estão implicados na ativação da PKC (Mizumura, Koda et al., 2000).

Assim, os dados do presente estudo sugerem fortemente o envolvimento da PKC, mas não da PKA, na antinocicepção induzida pela inosina. Essa conclusão deriva dos dados onde a inosina inibiu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida tanto pela injeção de PMA como pela injeção de BK. É importante relatar que a bradicinina após se ligar ao receptor B2, causa uma ativação direta da PKC (Ferreira, Triches et al., 2005), sugerindo que as isoformas da PKC estão envolvidas na transdução do sinal do receptor B2. Por outro lado, a

inosina não reduziu a hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub> ou forskolina, que são ambas substâncias que ativam PKA (Kawabata, 2011; Parada, Reichling et al., 2005).

No entanto, de acordo a transdução intracelular clássica do A1R, este receptor quando ativado, inibe a AC, que reduz a produção de AMPc que por sua vez reduz a ativação da PKA (Schulte e Fredholm, 2003; Jacobson e Gao, 2006). Assim, esse resultado não era esperado devido ao não envolvimento da PKA na ação antinociceptiva da inosina. Por outro lado, o modelo utilizado neste experimento é um modelo inflamatório, e já foi demonstrado pelo trabalho de Dowd e colaboradores (1998), que em ratos que receberam injeção de CFA, agente promotor de inflamação, o A1R mediou excitação de aferentes nociceptivos, ou seja, o A1R exerceu uma função contrária à que normalmente exerce, fato que pode ocorrer em situações de sensibilização periférica, como foi o nosso experimento (Dowd, McQueen, et al., 1998).

Por outro lado, foi demonstrado que a PKA e uma isoforma da PKC, a PKC $\epsilon$ , participam ambas da sensibilização nociceptiva em modelos de hiperalgesia, sendo a PKA mais atuante na indução do estado hiperalгésico e a PKC na manutenção deste estado, ou seja, a ativação da PKA pode resultar numa ativação indireta da PKC (Sachs, Villarreal et al., 2009). Assim, os resultados encontrados no presente estudo, de certa forma surpreenderam-nos, porém, nos modelos utilizados a inosina parece depender mais de uma inibição da PKC do que da PKA para induzir a ação antihiperalгésica.

Assim, nesta etapa pode-se demonstrar que a inosina exibe uma ação antinociceptiva significativa durante a fase inflamatória da dor induzida pela formalina em camundongos. Este efeito requer receptores acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> sensíveis à toxina Pertussis, canais de K<sup>+</sup> operados por voltagem, ativados por Ca<sup>2+</sup> de alta condutância e sensíveis à ATP, mas não envolve os canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de baixa condutância. Além disso, a antinocicepção promovida pela inosina também depende dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> e da inibição da PKC (figura 39).

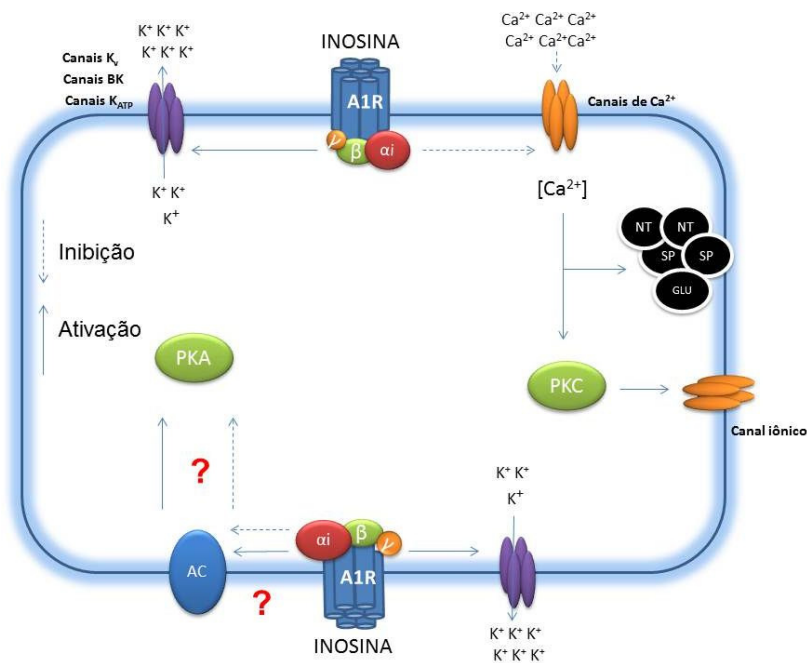


Figura 39. Sugestão de mecanismos intracelulares envolvidos na antinocicepção induzida pela inosina. A inosina atua via A1R, receptor acoplado a proteínas G<sub>i</sub>. Após ativado, o A1R ativa canais de K<sup>+</sup> e bloqueia canais de Ca<sup>2+</sup> e conseqüentemente reduz a liberação de mediadores nociceptivos e neurotransmissores. Além disso, a redução dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> também reduziria a ativação da PKC. Todos esses eventos induzem antinocicepção. Por outro lado, teoricamente a ativação do A1R pela inosina deveria inibir a AC e reduzir a produção de AMPc, inibindo a PKA. No entanto, nossos resultados não foram claros quanto a ativação ou inibição da PKA via inosina. AC, adenilil ciclase; A1R, receptor A1R para adenosina; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína quinase C; NT, neurotransmissores; SP, substância P; Glu, glutamato; α<sub>i</sub>, β e γ, subunidades da proteína G<sub>i</sub>.

### 5.3 PARTE III - EFEITO DA INOSINA EM MODELOS DE DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA

Clinicamente, a dor crônica de origem inflamatória ou neuropática causa uma grande redução da qualidade de vida e frequentemente retira muitas pessoas do mercado de trabalho. Assim, a dor crônica é um problema socialmente relevante e de saúde pública. Muitos desses pacientes, infelizmente não respondem ou respondem muito pouco aos tratamentos disponíveis atualmente (Watson, Gilron et al., 2010). Em relação ao sistema adenosinérgico, sabe-se que o A1R possui relevante envolvimento na analgesia induzida pela adenosina na dor neuropática (Sowa, Voss et al., 2010; Sawynok, 1998). Além disso, o uso de adenosina em animais e em humanos confirma este envolvimento na dor crônica (Guiéu 1996a,b). Recentemente, um interessante estudo pré-clínico também demonstrou que a ativação do A2AR diminuiu a dor neuropática (Loram, Harrison et al., 2009), enquanto outro estudo demonstrou que ativando este receptor havia um aumento do limiar de dor em um modelo de neuropatia. (Bura, Nadal et al., 2008).

O modelo de dor crônica inflamatória utilizado foi a injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA). A forma completa, chamado de CFA é composto de uma micobactéria inativada, normalmente o *M. tuberculosis*. O CFA é efetivo em estimular a imunidade mediada por células e pode induzir a produção de algumas imunoglobulinas de acordo com o método e o animal utilizados (Qin, Sadelain et al., 1993). Além disso, o CFA é muito utilizado como uma substância algogênica, ou seja, capaz de induzir nocicepção em animais. Quando injetado intraplantarmente, este adjuvante induz hiperalgisia mecânica e térmica em roedores, sendo observado este comportamento nas patas ipsi e contralateral. O CFA induz uma inflamação crônica sustentada, estimulando a resposta imune mediada por síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios (Zhang, Li et al., 2011). Além disso, o perfil inflamatório característico do CFA inclui edema e migração

leucocitária. Assim, este modelo caracteriza-se como um modelo animal de dor crônica inflamatória, o qual aumenta a sensibilidade à estímulos mecânicos e térmicos do tecido afetado (Sommer e Kress, 2004). De forma geral, estes efeitos são mediados pela sensibilização local do nociceptor e sensibilização central, além de um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (Samad, Moore et al., 2001).

A injeção periférica de CFA aumenta a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6. Entretanto, os níveis sanguíneos dessas citocinas parecem não estar elevados nas primeiras 24 horas após a injeção intraplantar de CFA. Assim, por este motivo, quando avaliado o comportamento nociceptivo induzido pelo CFA em nosso experimento, as análises iniciaram-se um dia após a injeção quando os animais enfim apresentam um quadro pronunciado de hiperalgesia (Samad, Moore et al., 2001). O CFA administrado intraplantarmente também é capaz de induzir um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica 5 dias após injeção i.p. Foi demonstrado também, que em alguns casos o aumento precoce dos níveis de citocinas não se dá apenas localmente, mas também centralmente, após injeção de CFA. Pois observou-se um aumento dos níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias no SNC (Reiber, Suckling et al., 1984; Raghavendra, Tanga et al., 2004).

O CFA administrado perifericamente também induz ativação das células gliais, as quais podem aumentar a transmissão da informação nociceptiva. Um possível mecanismo para as células gliais induzirem hiperalgesia seria através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Sabe-se que tanto astrócitos como microglia, podem liberar essas citocinas quando ativados (Aloisi, 1999; Guo, Wang et al., 2007). Nesses casos, normalmente a ativação astrocitária ocorre antes da ativação microglial e da expressão das citocinas pró-inflamatórias (Raghavendra, Tanga et al., 2004). Além disso, alguns trabalhos já demonstraram que o decurso temporal da ativação microglial e o pico de expressão de citocinas pró-inflamatórias corresponde com o

início da hiperalgesia durante a fase aguda da inflamação periférica induzida por CFA. Ainda, a ativação astrocitária, pode ter uma função na manutenção do comportamento de hipersensibilidade durante as fases mais tardias da inflamação periférica induzida pelo CFA (Raghavendra, Tanga et al., 2004; Zhang e An, 2007).

Em relação à dor neuropática, normalmente há, um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos nervos lesionados que podem alterar as funções axonais. O bloqueio destas citocinas pró-inflamatórias ou a administração de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 ou IL-4, em muitos casos reduz a hiperalgesia em modelos animais (Sommer e Schafers, 1998; Schafers, Brinkhoff et al., 2001; Sommer e Kress, 2004). O modelo utilizado para a indução de dor neuropática foi a ligação parcial do nervo ciático (LPNC). A LPNC induz uma dor intensa e persistente por muitas semanas (Ueda, 2006). Modelos animais de neuropatia induzem muitas mudanças funcionais e bioquímicas no sítio da lesão, mas também em outras áreas envolvidas e afetadas pelo nervo ciático, como a medula espinhal e encéfalo (Bridges, Thompson et al., 2001; Inoue, Rashid et al., 2004; Ueda, 2006). Logo após a cirurgia, ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos. Essas substâncias induzem sensibilização e redução do limiar de dor, induzindo a dor neuropática. Sobre o aspecto neurobiológico, há um aumento de descargas de longa duração em fibras sensoriais primárias causado pelos mediadores inflamatórios. Além disso, há várias mudanças fenotípicas de células neurogliais e neuroimunes (para revisão ver Ji e Woolf, 2001). Alguns estudos tem demonstrado que a inosina possui potencial em estudos de regeneração neural, como já citado na introdução deste trabalho (Benowitz, Goldberg et al., 1999; Benowitz, Goldberg et al., 2002; Chen, Goldberg et al., 2002). Assim, nossos resultados estendem os dados referentes a estas ações da inosina.

Assim, está bem estabelecido que as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  reduzem os limiares nociceptivos mecânicos (Ferreira, Lorenzetti et al., 1988; Cunha, Poole et al., 1992) de uma forma dependente de

prostaglandina e que antagonistas destas citocinas são capazes de reduzir a hiperalgesia induzida por carragenina (agente inflamatório) (Cunha, Cunha et al., 2000). De fato, é evidente que a ativação dos receptores destas citocinas é fundamental para o desenvolvimento da dor inflamatória e da dor neuropática (Ferreira, Lorenzetti et al., 1988; Cunha, Poole et al., 1992; Raghavendra, Tanga et al., 2004; Zhang e An, 2007). Como é comum nas citocinas, o TNF- $\alpha$  é sintetizado e liberado por vários tipos celulares, inclusive por células de Schwann após lesão nervosa. Isto indica que o TNF- $\alpha$  possui função específica na dor neuropática (Wagner e Myers, 1996). Quando injetado subcutaneamente, o TNF- $\alpha$  reduz o limiar mecânico de ativação de fibras C no nervo sural de ratos (Junger e Sorkin, 2000). Corroborando a informação anterior, pesquisadores demonstraram que o bloqueio da ação do TNF- $\alpha$  reduz a hiperalgesia em modelos de dor neuropática, evidenciando que o TNF- $\alpha$  está implicado na indução e manutenção da dor neuropática (Andrade, Visser-Vandewalle et al., 2012; Spicarova, Nerandzic et al., 2011; Wagner e Myers, 1996). Semelhante ao TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e o receptor para IL-1 do tipo 1 (IL1R1) são encontrados no GRD de nervos periféricos, sugerindo que a IL-1 $\beta$  possui uma atividade parácrina ou autócrina no processo sensorial (Copray, Mantingh et al., 2001). A IL-1 $\beta$  através da ativação de uma via de sinalização em cascata que produz óxido nítrico, BK e prostaglandina podem produzir efeitos hiperalgésicos periféricos (para revisão ver Zhang e An, 2007).

Os resultados aqui apresentados demonstram que a inosina foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pelo CFA e pela LPNC. Assim, especulamos quais poderiam ser os mecanismos que levariam a inosina a reduzir estes quadros de hiperalgesia. Em função deste resultado, e baseando-se em dados do grupo do professor Haskó que demonstram que a inosina possui propriedades de inibição de citocinas pró-inflamatórias em modelos de sepse e inflamação intestinal (Haskó, Kuhel et al., 2000; Garcia Soriano, Liaudet et al., 2001; Marton, Pacher et al., 2001), o próximo passo foi avaliar se o tratamento com inosina seria capaz de reduzir os níveis de citocinas



pró-inflamatórias no local da injeção, e este ser um dos prováveis mecanismos para a atividade deste nucleosídeo.

A inosina reduziu os níveis locais do TNF- $\alpha$  após a injeção de CFA. No entanto, a inosina não reduziu os níveis das demais citocinas inflamatórias, tampouco alterou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. A dosagem dessas citocinas ocorreu 15 dias após a administração do CFA, em virtude dos dados obtidos na hiperalgesia mecânica, onde podemos observar que no décimo quinto dia foi quando a inosina apresentou a maior efetividade em reduzir o comportamento nociceptivo dos animais. Além disso, o objetivo desta abordagem foi avaliar o perfil crônico, tanto dos níveis de citocinas no grupo controle, como o nível das citocinas pró-inflamatórias em animais submetidos ao tratamento diário com inosina, diferentemente de abordagens que buscam avaliar o decurso temporal dos níveis dessas citocinas (Stammers, Liu et al., 2012).

O resultado citado anteriormente sugere que um dos mecanismos pelo qual a inosina estaria reduzindo a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA, e provavelmente também pela LPNC, seria a inibição da produção do TNF- $\alpha$ . Para confirmar estes dados, utilizamos um modelo de dor aguda pela administração de citocinas pró-inflamatórias. Neste caso, além da injeção de TNF- $\alpha$ , injetamos também IL-1 $\beta$  e o peptídeo SP. A produção de SP pode ser estimulada pela IL-1 $\beta$ , sendo este peptídeo também capaz de induzir hiperalgesia e comportamento de dor (Zhang e An, 2007). A SP é, após o glutamato, o mediador nociceptivo/inflamatório mais encontrado em mecanismos dolorosos, seguidos de lesão ou qualquer estímulo nocivo capaz de ativar nociceptores. Neste caso, os nociceptores ativados podem liberar peptídeos, entre eles a SP, que facilita a produção de outros mediadores inflamatórios e pode também promover a liberação de fatores não-neuronais, indutores da inflamação e facilitadores da transmissão nociceptiva (Basbaum, 1999).

Nesta série de experimentos, corroborando com os dados obtidos na dosagem de citocinas, a inosina foi capaz de prevenir a

nociceção induzida pela injeção intratecal de TNF- $\alpha$ . Além disso, a inosina preveniu também a nociceção induzida pela SP, no entanto, não preveniu a nociceção induzida pela IL-1 $\beta$ . De acordo com estudos que demonstram uma cascata de liberação de citocinas, sendo que o TNF- $\alpha$  é considerado o “gatilho” para a liberação da citocina IL-1 $\beta$ , que conseqüentemente estimulará a liberação de peptídeos e prostanóides (Sommer e Kress, 2004; Cunha, Verri et al., 2005; Zhang e An, 2007). Assim, podemos considerar que o efeito da inosina em reduzir a hiperalgesia induzida pelo CFA se dá basicamente pela redução da produção do TNF- $\alpha$ , que desta forma, reduz também a liberação das outras substâncias citadas anteriormente. Neste caso, a inosina atuaria justamente no “gatilho” da cascata de citocinas pró-inflamatórias, o que de certa forma, facilitaria a redução da hiperalgesia induzida pelo CFA, embora em nosso experimento, não tenhamos observado a redução dos níveis de outras citocinas pró-inflamatórias.

Nossos resultados corroboram pelo menos parte do trabalho do professor Haskó, onde ele e seus colaboradores demonstraram que a inosina além de inibir a produção de TNF- $\alpha$ , também inibiu a produção de IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  (as duas últimas não foram avaliadas neste trabalho) em macrófagos imunoestimulados e em células de baço. Neste estudo, os autores demonstram que o efeito da inosina foi dependente da ativação do A1R e A2AR, e independentes da ativação de vias das MAPK como p38 ou p42/44 ou c-JUNK (Haskó, Kuhel et al., 2000). Ainda, no referido estudo, semelhante ao nosso resultado, a inosina não alterou a produção da citocina pró-inflamatória, IL-10 (Haskó, Kuhel et al., 2000).

Em virtude da inosina reduzir níveis de TNF- $\alpha$  e esse efeito ter sido bloqueado por antagonistas dos receptores de adenosina, de acordo com o presente estudo e dados da literatura (Haskó, Kuhel et al., 2000), sugerimos que os receptores de TNF- $\alpha$ , TNFR1 e TNFR2, parecem não estar envolvidos na antinociceção causada pela inosina.

Uma hipótese que precisa ser relatada, seria uma possível ativação do A3R pela inosina, que resultaria na redução do TNF- $\alpha$ . Jin e colaboradores demonstraram que a inosina pode se ligar ao A3R presente em tecidos correlacionados com o sistema imune (Jin, Shepherd et al., 1997); e Bar-Yehuda e colegas sugerem que a ativação do A3R está correlacionado com a redução de TNF- $\alpha$  e fator nuclear  $\kappa$ B (NF-Kb) em animais submetidos a um modelo de osteoartrite (Bar-Yehuda, Rath-Wolfson et al., 2009). Outro estudo demonstrou que agonistas A3R reduziram a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos e monócitos induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (Sajjadi, Takabayashi et al., 1996). Assim, o A3R poderia estar envolvido neste efeito de inibição do TNF- $\alpha$ .

Assim, conforme pode-se observar na figura 40, demonstramos que a inosina é capaz de reduzir a dor crônica inflamatória induzida por CFA na pata e a dor crônica neuropática induzida pela LPNC. Pode-se sugerir, que pelo menos em parte, a redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória que atua como “gatilho” para indução de outras citocinas e peptídeos, pode ser um dos mecanismos pelo qual a inosina poderia estar causar este efeito.

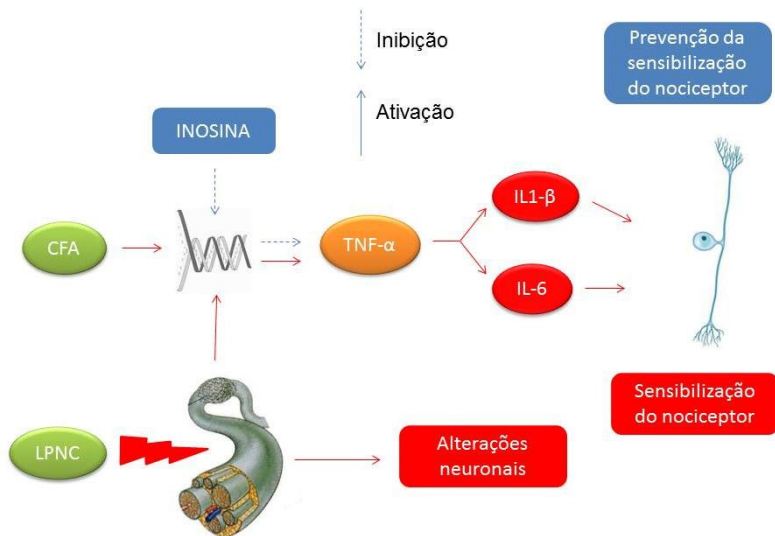


Figura 40. Sugestão de mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo da inosina nos modelos do CFA e da LPNC. A inosina reduz o comportamento nociceptivo induzido pelo modelo de dor crônica inflamatória (CFA) e pelo modelo de dor neuropática (LPNC) devido à redução dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , que consequentemente pode reduzir também a ativação de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6. CFA, adjuvante completo de Freund; LPNC, ligação parcial do nervo ciático.

#### 5.4 PARTE IV - INFLUÊNCIA DAS ENZIMAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA INOSINA SOBRE O SEU EFEITO ANTINOCICEPTIVO

O primeiro trabalho demonstrando que a inibição da AK reduzia o comportamento associado à dor foi publicado no início dos anos 90 (Keil e Delander, 1992). Este efeito ocorre devido ao aumento dos níveis de adenosina quando a AK é inibida. Inibidores de AK são capazes de reduzir a dor quando administrados tanto periféricamente como sistemicamente (Sawynok, 1998; Kowaluk, Kohlhaas *et al.*, 1999; Lynch, Jarvis *et al.*, 1999). Além disso, estes inibidores são eficazes contra dor aguda e crônica induzidas em animais (Poon e Sawynok, 1998; Lynch, Jarvis *et al.*, 1999; Kowaluk, Mikusa *et al.*, 2000; Suzuki, Stanfa *et al.*, 2001; McGaraughty, Cowart *et al.*, 2005).

Outra enzima que regula os níveis de adenosina é a ADA, que converte a adenosina em inosina (Sawynok e Liu, 2003). Porém, o efeito antinociceptivo causado pela inibição da ADA não está muito claro. Foi demonstrado que inibidores da ADA podem causar analgesia *per se* em determinados modelos animais (Poon e Sawynok, 1999), mas não em outros (Keil e Delander, 1992; 1994). Em outro trabalho, mostrou-se que o efeito da adenosina é sinergicamente aumentado pela coadministração de um inibidor de ADA (Keil e Delander, 1994). No entanto, Keil e DeLander avaliaram a dor no modelo de *tail flick*, modelo este que avalia apenas o limiar de retirada da cauda do animal em resposta à aplicação de calor, ou seja, é um modelo fásico, escapável. Desta forma, este modelo não avalia um comportamento de dor, mas sim, um limiar de dor. Além disso, diferentes efeitos entre inibidores da AK e ADA podem ocorrer devido à maior afinidade que a adenosina possui pela AK do que pela ADA (Arch e Newsholme, 1978). Por este ponto de vista, AK poderia ser a enzima mais importante para regular níveis endógenos de adenosina.

Devido aos resultados divergentes encontrados na literatura sobre a função da ADA no controle da nocicepção, somados aos nossos resultados que demonstram que a inosina é uma molécula ativa em modelos animais de nocicepção, avaliamos se a manipulação da atividade da ADA poderia interferir nos efeitos causados pela inosina e adenosina. Após confirmarmos que a injeção de 50 mg/kg de DCF reduzia em aproximadamente pela metade a atividade da ADA, avaliamos se o DCF poderia afetar os efeitos da inosina e adenosina. Em virtude disso, utilizamos a dose de 10 mg/kg de inosina, uma dose efetiva, para verificar se a redução dos níveis endógenos de inosina poderia dificultar o efeito causado por este nucleosídeo. Por outro lado, escolhemos a dose de 30 mg/kg de adenosina, por ser uma dose supra-efetiva, para avaliar se o aumento dos níveis de adenosina induzido pela DCF poderia se somar à adenosina administrada exogenamente e assim induzir antinocicepção.

Podemos constatar com os resultados obtidos, que o DCF reduz a atividade da ADA aumentando os níveis de adenosina e reduzindo os níveis endógenos de inosina. Assim, podemos concluir que devido a este aumento dos níveis de adenosina, houve o efeito sinérgico entre adenosina e DCF no comportamento de recuo/elevação da pata. No outro comportamento avaliado, lambida/mordida da pata, o DCF foi capaz de impedir que a inosina induzisse efeito antinociceptivo, sugerindo que o efeito da inosina exógena é pelo menos em parte, favorecido pela inosina endógena proveniente da quebra da adenosina.

No entanto, neste experimento constatamos dados muito contraditórios entre os dois comportamentos avaliados, o que normalmente não ocorre. Um fato que nos deixou bastante intrigados foi o grupo de animais pré-tratado com DCF e que também recebeu adenosina, este grupo apresentou resultados muito distintos. Cabe a pergunta: se neste grupo houve a inibição da formação da inosina, obviamente houve o aumento dos níveis de adenosina, então porque este aumento do nível de adenosina não induziu antinocicepção no

comportamento de lambida/mordida assim como induzira no comportamento de recuo/elevação da pata? A resposta está na observação comportamental dos animais durante o experimento. Durante a primeira meia hora do teste, observou-se que os animais estavam aparentemente sedados ou até mesmo dormindo. Desta forma, cogitamos a possibilidade de ao invés desta associação de fármacos (DCF + adenosina) estar induzindo antinocicepção, estaria na verdade induzindo sedação, e por este motivo os animais não estariam apresentando nenhum comportamento característico de dor. Em virtude desta possibilidade, realizamos o experimento de indução de sono por cetamina. Os resultados mostraram que a associação de DCF e adenosina induz efeito sedativo, o que nos permite concluir que concentrações elevadas de adenosina causam sedação. Este efeito provavelmente se dá em virtude da ativação de grande número dos A1R, o qual já foi relatado que pode ser um mediador de efeitos sedativos e redutores do estado de vigília (Sawynok, 1998; Maemoto, Tada *et al.*, 2004). Lembremos também que, bloqueando o A1R, há um aumento do estado de vigília, produzido por exemplo, pela cafeína (Huang, Urade *et al.*, 2011; Snel e Lorist, 2011). Desta forma, acreditamos que o estudo de Keil e DeLander de 1994 não observou a atividade locomotora dos animais, visto que, o teste utilizado foi *tail flick*, um teste fásico (limiar) de nocicepção térmica, ou seja, é um teste escapável.

Outra informação relevante observada durante este teste foi que, em média, apenas após o 50° minuto os animais começavam intensamente a realizar o comportamento de lambida/morder a pata, evento que normalmente ocorre imediatamente após a injeção de formalina. Este fato ocorreu com *todos* os animais que receberam injeções de DCF e adenosina. O perfil de comportamento apresentado pelos animais a partir do 50° minuto é muito semelhante ao comportamento que ocorre durante a primeira fase (0 – 8 min) do teste da formalina. Este comportamento é bastante raro e chama-se resposta nociceptiva atrasada (DNR, *Delayed Nociceptive Response*). Dois trabalhos do grupo do professor Melzack demonstram este

fenômeno em ratos. Nestes trabalhos, os animais foram submetidos a um modelo de estresse, o Nado em Água Gelada (CWS, *cold water swim*) que comumente é utilizado como um modelo que produz analgesia induzida por estresse (Truesdell e Bodnar, 1987). No entanto, foi observado que o CWS não induziu analgesia no teste da formalina, mas retardou a resposta nociceptiva (Fuchs, Kerr *et al.*, 1996; Fuchs e Melzack, 1997).

Semelhante aos resultados encontrados em nosso experimento, o início da resposta nociceptiva também ocorreu por volta de 50 minutos após a injeção intraplantar de formalina. Nestes estudos, ainda foi demonstrado que a ressubmissão dos animais ao CWS permitiu o aparecimento do DNR apenas 3 horas após a injeção da formalina. Além disso, foi demonstrado que a temperatura corporal e da pata não influenciavam o DNR e que o pré-tratamento com MK-801, antagonista dos receptores para NMDA, preveniu o aparecimento da DNR. Assim, as poucas conclusões que podem ser tiradas sobre a DNR é que provavelmente haja um envolvimento de plasticidade central nesta resposta, e que mesmo 50 ou 60 minutos após a entrada sensorial do estímulo nocivo ainda há ativação de substratos neurais envolvidos nos mecanismos da dor. O problema em questão é que a DNR encontrada por Fuchs e colaboradores foi induzida por um modelo de estresse, enquanto que a DNR encontrada em nosso trabalho foi induzida por fármacos (DCF e adenosina) que não possuem na literatura nenhuma menção à indução de estresse comportamental. Assim, ainda estamos muito longe de entender os mecanismos envolvidos na DNR induzida pela associação de adenosina e DCF, um fenômeno que nos intrigou e que demonstra o quanto ainda a biologia e a natureza podem nos surpreender.

Após as evidências citadas de que a inosina seja o real efetor de alguns efeitos atribuídos à adenosina, fomos avaliar se seria a inosina a responsável pelo efeito antinociceptivo quando ela é administrada aos animais, ou se poderia ser um metabólito da inosina, por exemplo, a xantina ou o ácido úrico. Sendo assim,



demonstramos que a inosina é realmente ativa contra a nocicepção, pois a FDS, inibidora da PNP (enzima que degrada a inosina), apresentou um efeito sinérgico quando adicionado à uma dose subativa de inosina. No entanto, quando a FDS foi associada à uma dose ativa de inosina, não houve somação dos efeitos, o que nos leva a mencionar novamente o suposto efeito “teto” da inosina na dose de 10 mg/kg, i.p. no teste da formalina.

Posteriormente, avaliamos se a FDS em uma dose maior, seria capaz de induzir antinocicepção *per se*. Observamos que na dose de 1 mg/kg, i.p., a FDS reduziu ambos os comportamentos de dor avaliados no teste da formalina. O acúmulo de inosina originado pela administração de FDS deve ser o responsável pelo efeito antinociceptivo, ou seja, o inibidor da PNP causaria um efeito antinociceptivo indireto. Baseando-se nos nossos resultados que demonstram que a inosina se liga aos A1R para induzir antinocicepção, realizamos um pré-tratamento com o antagonista do A1R DPCPX. Observou-se que o A1R medeia a antinocicepção causada pela FDS, o que reforça mais uma vez a evidência que o efeito é realizado pela inosina.

Durante a realização dos experimentos com animais que receberam FDS 1mg/kg, observou-se nos animais uma leve sedação que se iniciava normalmente 5 minutos após a administração do fármaco e persistia aproximadamente até o 15º minuto. Aparentemente, seria uma sedação mais leve do que a induzida pela associação entre DCF e adenosina. Além disso, nestes animais não ocorreu a DNR e a primeira fase da formalina ocorreu normalmente. Então, decidimos também avaliar os efeitos da FDS sozinha ou em associação com a inosina no teste de indução do sono pela cetamina. Pudemos verificar que a FDS na dose de 0,1 mg/kg e a inosina na dose de 3 mg/kg ou ambas em associação, não diminuiriam a latência para o sono e nem prolongaram o tempo de sono em relação ao grupo controle (cetamina + veículo). No entanto, a FDS na dose de 1 mg/kg prolongou o tempo de sono induzido pela cetamina, com resultados muito semelhantes ao do diazepam, que é um fármaco

ansiolítico e sedativo. Assim, podemos concluir que o efeito antinociceptivo induzido pela FDS 1 mg/kg, semelhante ao efeito da associação DCF e adenosina, também é antes disso, um efeito sedativo e que pode induzir também déficit locomotor, impedindo a correta avaliação do comportamento nociceptivo. Além disso, devido à prevenção deste efeito pelo DPCPX, antagonista A1R, podemos concluir que este efeito sedativo/indutor de sono também se dá pela ativação de grande número de A1R.

Uma informação interessante sobre a FDS, é que podemos sugerir que a ação farmacológica dela ocorra de uma maneira alternativa devido à sua estrutura química. A molécula da forodesina é muito semelhante às estruturas da adenosina e da inosina (figura 41).



Figura 41. Estruturas químicas da adenosina, inosina e forodesina.

Assim, é possível que a FDS seja capaz de se ligar ao A1R, e então os efeitos farmacológicos desta molécula ocorram por dois mecanismos, atuando como inibidor da PNP e também como ativador do A1R. No entanto, esta hipótese ainda precisa ser confirmada através de estudos específicos.

Concluimos, que a inosina é um metabólito ativo na indução da antinociceção e a produção endógena deste nucleosídeo, proveniente da quebra da adenosina, sugere que a inosina atue como um modulador endógeno da dor. Concentrações elevadas de

adenosina ou inosina induzem efeitos sedativos mediados pelo A1R (figura 42). Sugere-se que a FDS, poderia atuar também como agonista A1R, porém estudos mais específicos são necessários.

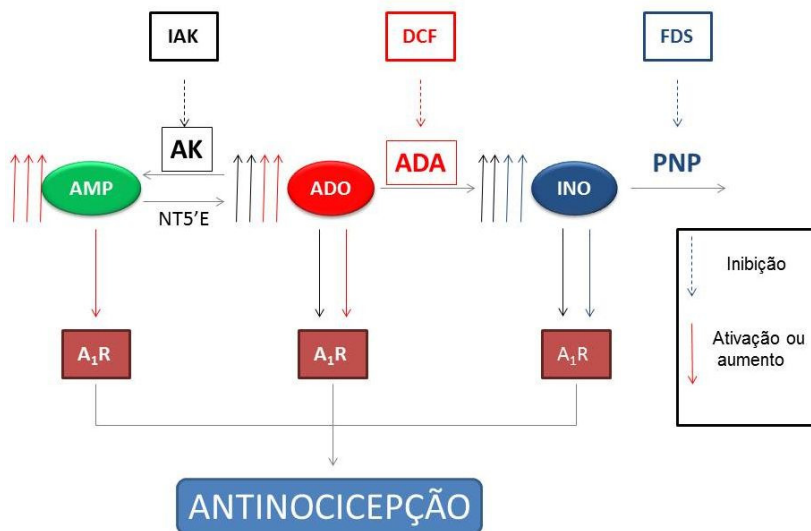


Figura 42. Sugestão da influência dos inibidores das enzimas AK, ADA e PNP sobre a antinocicepção induzida pela inosina, adenosina e AMP. A administração de FDS eleva os níveis de inosina, que ativa o A1R induzindo antinocicepção. A administração de DCF eleva os níveis de adenosina e AMP, ambos ativam o A1R induzindo antinocicepção. A administração de inibidores de AK eleva os níveis de adenosina e inosina, ambas ativam o A1R induzindo antinocicepção. AK, adenosina quinase; IAK, inibidor de adenosina quinase; ADA, adenosina desaminase; DCF, deoxicoformicina; PNP, purina nucleosídeo fosforilase; FDS, forodesina; NT5'E, 5-nucleotidade; AMP, monofosfato de adenosina; ADO, adenosina; INO, inosina; A1R, receptor de adenosina do subtipo 1.

## 5.5 PARTE V – EFEITO ANTINOCICEPTIVO DEPENDENTE DO TEMPO E NÍVEIS SANGUÍNEOS DE INOSINA E ADENOSINA

Poucos são os estudos sobre o perfil farmacocinético das purinas de forma geral, inclusive da adenosina e da inosina. No entanto, sabe-se que a adenosina possui uma meia-vida extremamente curta, em torno de 10 s (Moser, Schrader *et al.*, 1989; Hasko, Linden *et al.*, 2008), mesmo assim, são atribuídos a este nucleosídeo diversas funções biológicas. Sobre a farmacocinética da inosina, os estudos são mais escassos ainda. Assim, investigamos, nesta parte do trabalho, o perfil farmacocinético dessas duas substâncias e sua possível correlação com efeitos *in vivo*.

Várias são as similaridades entre a inosina e a adenosina, como por exemplo, as estruturas químicas e peso molecular. Além disso, nossos resultados demonstram que ambas as moléculas apresentam resultados semelhantes em modelos animais, além de apresentarem praticamente a mesma afinidade pelo A1R entre as duas moléculas. Assim, algumas perguntas nos motivaram nesta parte do trabalho. Qual seria o tempo que cada uma destas substâncias estaria disponível na circulação sanguínea? Os efeitos farmacológicos que observamos através de modelos animais são realmente efetuados pela substância que foi administrada? Quanto tempo as ações destes nucleosídeos durariam?

Analisando os dados descritos na figura 36, observamos que a administração de adenosina e inosina altera de forma pronunciada os níveis de xantina e ácido úrico até 2 e 8 horas, respectivamente. Por outro lado, 30 min após a injeção de adenosina os níveis deste nucleosídeo retornaram a níveis basais, ou seja, nos tempos avaliados não observamos diferenças nas concentrações endógenas de adenosina, demonstrando e confirmando dados da literatura, que relatam que a meia-vida da adenosina é extremamente curta. No entanto, podemos observar picos de inosina no tempo de 30 min, tanto nas amostras de animais que foram tratados com inosina ou

adenosina. Isto nos permite concluir que a inosina possui uma meia-vida superior à adenosina e que logo após a administração da adenosina, esta foi metabolizada em inosina.

Pode-se imaginar que os efeitos antinociceptivos causados pela administração dos dois nucleosídeos ocorra devido aos níveis elevados de xantina e ácido úrico. Schmidt e colaboradores demonstraram que o alopurinol, inibidor da enzima XO, responsável pela degradação da xantina, induziu antinocicepção em camundongos (Schmidt, Bohmer *et al.*, 2009). Além disso, neste mesmo trabalho o efeito antinociceptivo do alopurinol foi bloqueado pela administração de DPCPX, antagonista A1R. Segundo estes autores, o efeito se daria pelo acúmulo de adenosina devido à inibição desta via de degradação. No entanto, na época desta publicação, não haviam dados reportando efeito antinociceptivo nem da inosina e nem do AMP. Contudo, não podemos descartar totalmente um possível efeito direto da xantina sobre os A1R, no entanto, acreditamos que isto seja bastante difícil de ocorrer em virtude da sua estrutura química. A xantina não possui a ribose em sua estrutura, sendo portanto bastante diferente das outras purinas citadas. Além disso, os resultados apresentados na parte IV deste trabalho, onde demonstramos que a inibição da PNP aumenta o efeito antinociceptivo da inosina, é mais uma evidência da atividade *per se* da inosina e exclusão de possíveis efeitos antinociceptivos pelas xantinas. Com relação ao ácido úrico, que possui uma estrutura química semelhante à xantina, também não há estudos na literatura que citem ou cogitem que ele possa exercer efeito antinociceptivo. Pelo contrário, o acúmulo de ácido úrico nas articulações está ligado a reações inflamatórias e consequentemente induz dor, quadro muito típico em pacientes que possuem artrite (para revisão ver Vanltallie, 2010).

Interessante destacar que a duração do efeito farmacológico induzido pela adenosina ou inosina parece não ter relação direta com os seus próprios níveis plasmáticos. Assim, as vias intracelulares que foram ativadas e resultaram na redução do efeito antinociceptivo

permanecem atuando ou induzindo efeitos por algum tempo após o início de sua ativação, como por exemplo, inibição de vias que envolvem proteínas quinases (Schulte e Fredholm, 2003; Jacobson e Gao, 2006; Sawynok, 2007).

Outra questão que deve ser citada neste estudo, é a possibilidade da adenosina após ser administrada aos animais, sofrer fosforilação pela AK e convertida em AMP. Sabe-se que AK possui uma maior afinidade pela adenosina do que a ADA (Arch e Newsholme, 1978). Assim, muito possivelmente a administração de adenosina aos animais tenha levado a um aumento dos níveis endógenos de AMP. Em consequência disso, parte dos efeitos antinociceptivos observados nos animais podem ter sido efetuados pelo AMP, que sabe-se agora, também é um agonista do A1R (Rittiner, Korboukh *et al.*, 2012).

Finalmente, nesta parte do trabalho demonstramos que a inosina e a adenosina apresentam efeitos antinociceptivos que perduram em média até 2 horas após sua administração. No entanto, estes efeitos *in vivo* não se correlacionam totalmente com os níveis plasmáticos destes nucleosídeos, por fatores sugeridos nos parágrafos anteriores (figura 43). Além disso, sabemos que mais estudos são necessários para esclarecer muitos pontos abordados nesta parte do trabalho. Por exemplo, análises dos níveis plasmáticos das substâncias purinérgicas em intervalos de tempos mais curtos, e a dosagem também de outras purinas, como o AMP, ajudarão a entender melhor alguns dos efeitos desencadeados pelas purinas.

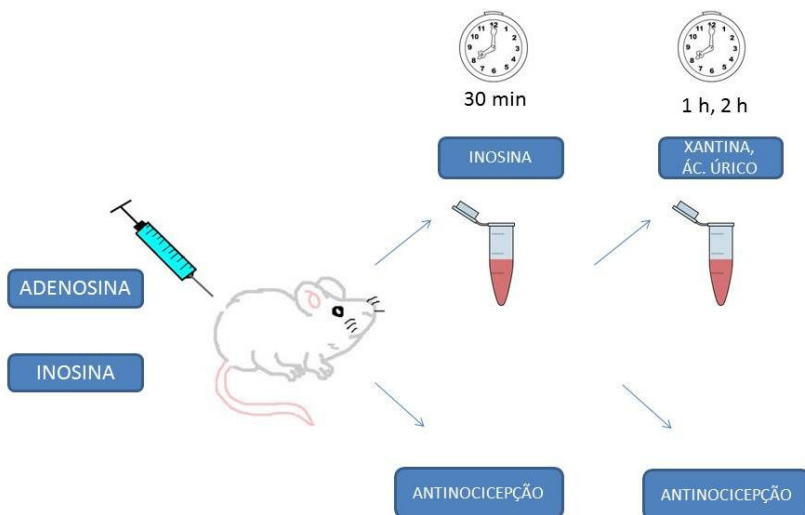


Figura 43. Esquema resumindo os níveis plasmáticos das purinas inosina, adenosina, xantina e ácido úrico em camundongos e sua correlação com o efeito antinociceptivo induzido pela administração de adenosina e inosina. Trinta minutos após a administração de adenosina e inosina, a nocicepção é reduzida e os níveis de inosina, xantina e ácido úrico estão acima dos basais. Uma hora e 2 horas após a administração de adenosina e inosina ainda há efeito antinociceptivo, porém apenas os níveis de xantina e ácido úrico estão elevados acima dos níveis basais.





## 6 CONCLUSÕES

- Os A1R são essenciais para a antinocicepção induzida pela inosina quando administrada sistêmica e centralmente. Perifericamente, os A1R não medeiam a antinocicepção induzida pela inosina.
- A inosina foi capaz de deslocar o ligante radioativo do A1R em ensaio de ligação específica em concentração similar à sua concentração endógena. Assim, a inosina pode ser considerado um ligante endógeno do A1R.
- Os receptores acoplados a proteínas G sensíveis à toxina pertussis, os canais de  $K^+$ , os canais de  $Ca^{2+}$  e a PKC estão envolvidos na antinocicepção causada pela inosina.
- A redução dos níveis de  $TNF-\alpha$  induzida pela inosina deve ser um dos mecanismos pelo qual a inosina reduz a dor crônica inflamatória e neuropática em camundongos.
- A inibição da adenosina desaminase reduz o efeito antinociceptivo da inosina, enquanto a inibição da purina nucleosídeo fosforilase potencializa o efeito antinociceptivo deste nucleosídeo.
- Após administração sistêmica, grande parte da adenosina é rapidamente convertida em inosina na corrente sanguínea de camundongos.



## CONSIDERAÇÃO FINAL

A inosina, por muito tempo foi considerada coadjuvante do sistema purinérgico, imaginando tratar-se de uma molécula inócua. Porém, principalmente a partir dos anos 2000, tem sido demonstrado que este nucleosídeo possui diversas funções fisiológicas. Considerando estes achados da última década, somados aos nossos resultados, os quais demonstram que a inosina possui atividade antinociceptiva por atuar como agonista endógeno do A1R, acreditamos que, assim como o ATP e a adenosina, a inosina pode ser considerada uma “prot-agonista” do sistema purinérgico.



## REFERÊNCIAS

- Abbracchio, M. P., R. Brambilla, *et al.* G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. Mol Pharmacol, v.48, n.6, Dec, p.1038-45. 1995.
- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. Pharmacol Rev, v.58, n.3, Sep, p.281-341. 2006.
- Abo-Salem, O. M., A. M. Hayallah, *et al.* Antinociceptive effects of novel A2B adenosine receptor antagonists. J Pharmacol Exp Ther, v.308, n.1, Jan, p.358-66. 2004.
- Ally, A. I. e K. Nakatsu. Adenosine inhibition of isolated rabbit ileum and antagonism by theophylline. J Pharmacol Exp Ther, v.199, n.1, Oct, p.208-15. 1976.
- Aloisi, F. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. Adv Exp Med Biol, v.468, p.123-33. 1999.
- Andrade, P., V. Visser-Vandewalle, *et al.* The thalidomide analgesic effect is associated with differential TNF-alpha receptor expression in the dorsal horn of the spinal cord as studied in a rat model of neuropathic pain. Brain Res, Feb 22. 2012.
- Arch, J. R. e E. A. Newsholme. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. Biochem J, v.174, n.3, Sep 15, p.965-77. 1978.
- Argoff, C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. Curr Med Res Opin, v.27, n.10, Oct, p.2019-31. 2011.
- Armstrong, S. e C. E. Ganote. Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: evidence of A3 receptor involvement. Cardiovasc Res, v.28, n.7, Jul, p.1049-56. 1994.
- Assaife-Lopes, N., M. Wengert, *et al.* Adenosine deamination to inosine in isolated basolateral membrane from kidney proximal tubule: implications for modulation of the membrane-associated protein kinase A. Arch Biochem Biophys, v.486, n.1, Jun 1, p.44-50. 2009.

Aviado, D. M. Effects of fluorocarbons, chlorinated solvents, and inosine on the cardiopulmonary system. Environ Health Perspect, v.26, Oct, p.207-15. 1978.

Baggio, C. H., C. S. Freitas, *et al.* Antinociceptive effects of (1-->3),(1-->6)-linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. J Pain, v.11, n.10, Oct, p.965-71.

Ballarin, M., B. B. Fredholm, *et al.* Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. Acta Physiol Scand, v.142, n.1, May, p.97-103. 1991.

Bar-Yehuda, S., L. Rath-Wolfson, *et al.* Induction of an antiinflammatory effect and prevention of cartilage damage in rat knee osteoarthritis by CF101 treatment. Arthritis Rheum, v.60, n.10, Oct, p.3061-71. 2009.

Basbaum, A. I. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. Reg Anesth Pain Med, v.24, n.1, Jan-Feb, p.59-67. 1999.

Bastia, E., K. Varani, *et al.* Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. Neurosci Lett, v.328, n.3, Aug 16, p.241-4. 2002.

Bastidas Ramirez, B. E., N. Navarro Ruiz, *et al.* Anticonvulsant effects of *Magnolia grandiflora* L. in the rat. J Ethnopharmacol, v.61, n.2, Jun, p.143-52. 1998.

Benowitz, L. I., D. E. Goldberg, *et al.* Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS. Prog Brain Res, v.137, p.389-99. 2002.

\_\_\_\_\_. Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.23, Nov 9, p.13486-90. 1999.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1610-5. 1999.

Bilkei-Gorzo, A., O. M. Abo-Salem, *et al.* Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.377, n.1, Mar, p.65-76. 2008.

Bodin, P. e G. Burnstock. Purinergic signalling: ATP release. Neurochem Res, v.26, n.8-9, Sep, p.959-69. 2001.

- Boison, D., J. F. Chen, *et al.* Adenosine signaling and function in glial cells. Cell Death Differ, v.17, n.7, Jul, p.1071-82. 2010.
- Borea, P. A., S. Gessi, *et al.* A3 adenosine receptor: pharmacology and role in disease. Handb Exp Pharmacol, n.193, p.297-327. 2009.
- Borghi, V., B. Przewlocka, *et al.* Formalin-induced pain and mu-opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A1 and A2a adenosine agonists in mice. Brain Res, v.956, n.2, Nov 29, p.339-48. 2002.
- Bortalanza, L. B., J. Ferreira, *et al.* Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. Eur J Pharmacol, v.453, n.2-3, Oct 25, p.203-8. 2002.
- Bridges, D., S. W. Thompson, *et al.* Mechanisms of neuropathic pain. Br J Anaesth, v.87, n.1, Jul, p.12-26. 2001.
- Brundage, J. M., L. Diao, *et al.* The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. Neuropharmacology, v.36, n.9, Sep, p.1201-10. 1997.
- Bura, S. A., X. Nadal, *et al.* A 2A adenosine receptor regulates glia proliferation and pain after peripheral nerve injury. Pain, v.140, n.1, Nov 15, p.95-103. 2008.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. Pharmacol Rev, v.24, n.3, Sep, p.509-81. 1972.
- \_\_\_\_\_. Purinergic receptors. London ; New York: Chapman and Hall. 1981. ix, 365 p. p. (Receptors and recognition. Series B)
- \_\_\_\_\_. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol Rev, v.87, n.2, Apr, p.659-797. 2007a.
- \_\_\_\_\_. Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci, v.64, n.12, Jun, p.1471-83. 2007b.
- \_\_\_\_\_. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. Nat Rev Drug Discov, v.7, n.7, Jul, p.575-90. 2008.
- \_\_\_\_\_. Purinergic signalling: past, present and future. Braz J Med Biol Res, v.42, n.1, Jan, p.3-8. 2009.
- Burnstock, G., B. B. Fredholm, *et al.* Adenosine and ATP receptors in the brain. Curr Top Med Chem, v.11, n.8, p.973-1011. 2011.

Burnstock, G. e C. Kennedy. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? Gen Pharmacol, v.16, n.5, p.433-40. 1985.

Burnstock, G. e G. E. Knight. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. Int Rev Cytol, v.240, p.31-304. 2004.

Burnstock, G., U. Krugel, *et al.* Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. Prog Neurobiol, v.95, n.2, Oct, p.229-74. 2011.

By, Y., J. Condo, *et al.* Intracerebroventricular injection of an agonist-like monoclonal antibody to adenosine A(2A) receptor has antinociceptive effects in mice. J Neuroimmunol, v.230, n.1-2, Jan, p.178-82. 2011.

Cairns, B. E. Peripheral receptor targets for analgesia : novel approaches to pain treatment. Hoboken, N.J.: Wiley. 2009. xiii, 541 p., [8] p. of plates p.

Carminati, G. M. [Demonstration of the cardiotropic action of inosine on the hypofunctioning isolated heart]. Boll Soc Ital Biol Sper, v.39, Apr 30, p.468-70. 1963.

Carruthers, A. M., L. A. Sellers, *et al.* Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. Mol Pharmacol, v.59, n.6, Jun, p.1533-41. 2001.

Cervero, F. e J. M. Laird. Role of ion channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. Curr Opin Pharmacol, v.3, n.6, Dec, p.608-12. 2003.

Chen, P., D. E. Goldberg, *et al.* Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.13, Jun 25, p.9031-6. 2002.

Chen, Y. e Q. Tian. The role of protein kinase C epsilon in neural signal transduction and neurogenic diseases. Front Med, v.5, n.1, Mar, p.70-6. 2011.

Cheng, J. K. e R. R. Ji. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. Neurochem Res, v.33, n.10, Oct, p.1970-8. 2008.

Choca, J. I., R. D. Green, *et al.* Adenosine A1 and A2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. J Pharmacol Exp Ther, v.247, n.2, Nov, p.757-64. 1988.

Coggeshall, R. E. e S. M. Carlton. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. Brain Res Brain Res Rev, v.24, n.1, Jun, p.28-66. 1997.



- Copray, J. C., I. Mantingh, *et al.* Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. J Neuroimmunol, v.118, n.2, Aug 30, p.203-11. 2001.
- Corsini, F., G. Grazia, *et al.* [Observations on the utilization of inosine on the part of the normal erythrocyte]. Clin Pediatr (Bologna), v.46, n.11, Nov, p.931-43. 1964.
- Cunha, F. Q., S. Poole, *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, v.107, n.3, Nov, p.660-4. 1992.
- Cunha, J. M., F. Q. Cunha, *et al.* Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. Br J Pharmacol, v.130, n.6, Jul, p.1418-24. 2000.
- Cunha, R. A., S. Ferre, *et al.* Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. Curr Pharm Des, v.14, n.15, p.1512-24. 2008.
- Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.5, Feb 1, p.1755-60. 2005.
- Curros-Criado, M. M. e J. F. Herrero. The antinociceptive effects of the systemic adenosine A1 receptor agonist CPA in the absence and in the presence of spinal cord sensitization. Pharmacol Biochem Behav, v.82, n.4, Dec, p.721-6. 2005.
- Daly, J. W., P. Butts-Lamb, *et al.* Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. Cell Mol Neurobiol, v.3, n.1, Mar, p.69-80. 1983.
- De Oliveira, C. M., R. K. Sakata, *et al.* Cytokines and pain. Rev Bras Anestesiol, v.61, n.2, Mar-Apr, p.255-9, 260-5, 137-42. 2011.
- Dixon, A. K., A. K. Gubitza, *et al.* Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. Br J Pharmacol, v.118, n.6, Jul, p.1461-8. 1996.
- Doak, G. J. e J. Sawynok. Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. Eur J Pharmacol, v.281, n.3, Aug 15, p.311-8. 1995.
- Dolphin, A. C., S. R. Forda, *et al.* Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. J Physiol, v.373, Apr, p.47-61. 1986.

Dolphin, A. C. e S. A. Prestwich. Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. Nature, v.316, n.6024, Jul 11-17, p.148-50. 1985.

Drury, A. N. e A. Szent-Gyorgyi. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J Physiol, v.68, n.3, Nov 25, p.213-37. 1929.

Dunwiddie, T. V. e S. A. Masino. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu Rev Neurosci, v.24, p.31-55. 2001.

Dutra, R., M. Cola, *et al.* Inhibitor of PI3Kgamma ameliorates TNBS-induced colitis in mice by affecting the functional activity of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells. Br J Pharmacol, v.163, Jan 19, p.358-374. 2011.

Dux, E., J. Fastbom, *et al.* Protective effect of adenosine and a novel xanthine derivative propentofylline on the cell damage after bilateral carotid occlusion in the gerbil hippocampus. Brain Res, v.516, n.2, May 21, p.248-56. 1990.

Fedorova, I. M., M. A. Jacobson, *et al.* Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. Cell Mol Neurobiol, v.23, n.3, Jun, p.431-47. 2003.

Feoktistov, I. e I. Biaggioni. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. Adv Pharmacol, v.61, p.115-44. 2011.

Ferreira, J., M. M. Campos, *et al.* Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. Neuropharmacology, v.41, n.8, Dec, p.1006-12. 2001.

Ferreira, J., K. M. Triches, *et al.* Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. Pain, v.117, n.1-2, Sep, p.171-81. 2005.

Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti, *et al.* Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. Nature, v.334, n.6184, Aug 25, p.698-700. 1988.

Fredholm, B. B., I. J. Ap, *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev, v.53, n.4, Dec, p.527-52. 2001.

\_\_\_\_\_. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. Pharmacol Rev, v.63, n.1, Mar, p.1-34. 2011.

Fredholm, B. B., K. Battig, *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacol Rev, v.51, n.1, Mar, p.83-133. 1999.

Fredholm, B. B., R. A. Cunha, *et al.* Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. Curr Top Med Chem, v.3, n.4, p.413-26. 2003.

Fredholm, B. B., E. Irenius, *et al.* Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Biochem Pharmacol, v.61, n.4, Feb 15, p.443-8. 2001.

Fuchs, P. N., B. Kerr, *et al.* Delayed nociceptive response following cold-water swim in the formalin test: possible mechanisms of action. Exp Neurol, v.139, n.2, Jun, p.291-8. 1996.

Fuchs, P. N. e R. Melzack. Repeated cold water swim produces delayed nociceptive responses, but not analgesia, for tonic pain in the rat. Exp Neurol, v.145, n.1, May, p.303-7. 1997.

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

Ghosh, N. R. Active Transport and Transfer of Energy. Nature, v.200, Oct 12, p.175-6. 1963.

Godfrey, L., L. Yan, *et al.* Modulation of paracetamol antinociception by caffeine and by selective adenosine A2 receptor antagonists in mice. Eur J Pharmacol, v.531, n.1-3, Feb 15, p.80-6. 2006.

Goldman, N., M. Chen, *et al.* Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. Nat Neurosci, v.13, n.7, Jul, p.883-8. 2010.

Gomez, G. e M. V. Sitkovsky. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. Blood, v.102, n.13, Dec 15, p.4472-8. 2003.

Gong, Q. J., Y. Y. Li, *et al.* Differential effects of adenosine A1 receptor on pain-related behavior in normal and nerve-injured rats. Brain Res, v.1361, Nov 18, p.23-30. 2010.

Greenberg, G. R. De novo synthesis of hypoxanthine via inosine-5-phosphate and inosine. J Biol Chem, v.190, n.2, Jun, p.611-31. 1951.

Greer, K. R. e J. W. Hoyt. Pain: theory, anatomy, and physiology. Crit Care Clin, v.6, n.2, Apr, p.227-34. 1990.

Guieu, R., F. Couraud, *et al.* Adenosine and the nervous system: clinical implications. Clin Neuropharmacol, v.19, n.6, Dec, p.459-74. 1996.

Guieu, R., J. C. Peragut, *et al.* Adenosine and neuropathic pain. Pain, v.68, n.2-3, Dec, p.271-4. 1996.

Guo, W., H. Wang, *et al.* Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. J Neurosci, v.27, n.22, May 30, p.6006-18. 2007.

Gutman, G. A., K. G. Chandy, *et al.* International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. Pharmacol Rev, v.55, n.4, Dec, p.583-6. 2003.

Haas, H. L. e O. Selbach. Functions of neuronal adenosine receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.362, n.4-5, Nov, p.375-81. 2000.

Hargreaves, K., R. Dubner, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain, v.32, n.1, Jan, p.77-88. 1988.

Hasko, G., D. G. Kuhel, *et al.* Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. J Immunol, v.164, n.2, Jan 15, p.1013-9. 2000.

Hasko, G., J. Linden, *et al.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat Rev Drug Discov, v.7, n.9, Sep, p.759-70. 2008.

Hasko, G., M. V. Sitkovsky, *et al.* Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.3, Mar, p.152-7. 2004.

Hoehn, K., A. Reid, *et al.* Pertussis toxin inhibits antinociception produced by intrathecal injection of morphine, noradrenaline and baclofen. Eur J Pharmacol, v.146, n.1, Jan 27, p.65-72. 1988.

Hollins, C. e T. W. Stone. Adenosine inhibition of gamma-aminobutyric acid release from slices of rat cerebral cortex. Br J Pharmacol, v.69, n.1, May, p.107-12. 1980.

- Horiuchi, H., T. Ogata, *et al.* Adenosine A1 receptor agonists reduce hyperalgesia after spinal cord injury in rats. Spinal Cord, v.48, n.9, Sep, p.685-90. 2010.
- Hu, H., L. R. Shao, *et al.* Presynaptic Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. J Neurosci, v.21, n.24, Dec 15, p.9585-97. 2001.
- Huang, Z. L., Y. Urade, *et al.* The role of adenosine in the regulation of sleep. Curr Top Med Chem, v.11, n.8, p.1047-57. 2011.
- Hunskar, S., O. B. Fasmer, *et al.* Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. J Neurosci Methods, v.14, n.1, Jun, p.69-76. 1985.
- Hunt, S. P. e P. W. Mantyh. The molecular dynamics of pain control. Nat Rev Neurosci, v.2, n.2, Feb, p.83-91. 2001.
- Hussey, M. J., G. D. Clarke, *et al.* Reduced response to the formalin test and lowered spinal NMDA glutamate receptor binding in adenosine A2A receptor knockout mice. Pain, v.129, n.3, Jun, p.287-94. 2007.
- Hwang, J. H., G. S. Hwang, *et al.* Morphine can enhance the antiallodynic effect of intrathecal R-PIA in rats with nerve ligation injury. Anesth Analg, v.100, n.2, Feb, p.461-8. 2005.
- Iftinca, M. C. e G. W. Zamponi. Regulation of neuronal T-type calcium channels. Trends Pharmacol Sci, v.30, n.1, Jan, p.32-40. 2009.
- Ingram, S. L. e J. R. Traynor. Role of protein kinase C in functional selectivity for desensitization at the mu-opioid receptor: from pharmacological curiosity to therapeutic potential. Br J Pharmacol, v.158, n.1, Sep, p.154-6. 2009.
- Inoue, M., M. H. Rashid, *et al.* Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. Nat Med, v.10, n.7, Jul, p.712-8. 2004.
- Jacobson, K. A. e Z. G. Gao. Adenosine receptors as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, Mar, p.247-64. 2006.
- Ji, R. R. e C. J. Woolf. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. Neurobiol Dis, v.8, n.1, Feb, p.1-10. 2001.

Jin, X., R. K. Shepherd, *et al.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. J Clin Invest, v.100, n.11, Dec 1, p.2849-57. 1997.

Johansson, B., L. Halldner, *et al.* Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.16, Jul 31, p.9407-12. 2001.

Jordan, W. K. e G. Oster. On the Nature of the Interaction Between Actomyosin and ATP. Science, v.108, n.2799, Aug 20, p.188-90. 1948.

Juhasz-Nagy, A. e D. M. Aviado. Inosine as a cardiotoxic agent that reverses adrenergic beta blockade. J Pharmacol Exp Ther, v.202, n.3, Sep, p.683-95. 1977.

Julius, D. e A. I. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

Junger, H. e L. S. Sorkin. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. Pain, v.85, n.1-2, Mar, p.145-51. 2000.

Karlsten, R., T. Gordh, *et al.* Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. Pharmacol Toxicol, v.70, n.6 Pt 1, Jun, p.434-8. 1992.

Kasakov, L. e G. Burnstock. The use of the slowly degradable analog, alpha, beta-methylene ATP, to produce desensitisation of the P2-purinoceptor: effect on non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig urinary bladder. Eur J Pharmacol, v.86, n.2, Dec 24, p.291-4. 1982.

Kawabata, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. Biol Pharm Bull, v.34, n.8, p.1170-3. 2011.

Keil, G. J., 2nd e G. E. Delander. Spinally-mediated antinociception is induced in mice by an adenosine kinase-, but not by an adenosine deaminase-, inhibitor. Life Sci, v.51, n.19, p.PL171-6. 1992.

\_\_\_\_\_. Adenosine kinase and adenosine deaminase inhibition modulate spinal adenosine- and opioid agonist-induced antinociception in mice. Eur J Pharmacol, v.271, n.1, Dec 12, p.37-46. 1994.

Khakh, B. S. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. Nat Rev Neurosci, v.2, n.3, Mar, p.165-74. 2001.

- Khakh, B. S., G. Burnstock, *et al.* International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. Pharmacol Rev, v.53, n.1, Mar, p.107-18. 2001.
- Kidd, B. L., A. Photiou, *et al.* The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. Novartis Found Symp, v.260, p.122-33; discussion 133-8, 277-9. 2004.
- Kleinzeller, A. Adenosine- and inosine-nucleotides in the phosphorus metabolism of muscle. Biochem J, v.36, n.10-12, Dec, p.729-36. 1942.
- Knyihar, E. e B. Csillik. Plasticity of nociception: recent advances in function-oriented structural pain research. Ideggyogy Sz, v.59, n.3-4, Mar 20, p.87-97. 2006.
- Kowaluk, E. A., K. L. Kohlhaas, *et al.* Characterization of the effects of adenosine kinase inhibitors on acute thermal nociception in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.63, n.1, May, p.83-91. 1999.
- Kowaluk, E. A., J. Mikusa, *et al.* 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 with analgesic and anti-inflammatory properties. II. In vivo characterization in the rat. J Pharmacol Exp Ther, v.295, n.3, Dec, p.1165-74. 2000.
- Krebs, H. A. e R. Hems. Some reactions of adenosine and inosine phosphates in animal tissues. Biochim Biophys Acta, v.12, n.1-2, Sep-Oct, p.172-80. 1953.
- Lamotte, R. H., S. G. Shimada, *et al.* Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. Exp Dermatol, v.20, n.10, Oct, p.778-82. 2011.
- Latini, S. e F. Pedata. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J Neurochem, v.79, n.3, Nov, p.463-84. 2001.
- Le Bars, D., M. Gozariu, *et al.* Animal models of nociception. Pharmacol Rev, v.53, n.4, Dec, p.597-652. 2001.
- Li, L., J. X. Hao, *et al.* Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. Neuroscience, v.170, n.3, Oct 27, p.923-8. 2010.
- Liaudet, L., J. G. Mabley, *et al.* Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.7, Oct 1, p.1213-20. 2001.

Lima, F. O., G. R. Souza, *et al.* Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. Pain, v.151, n.2, Nov, p.506-15. 2010.

Liz, R., D. F. Pereira, *et al.* Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. Int Immunopharmacol, v.11, n.12, Dec, p.1991-9.

Loeser, J. D. e R. Melzack. Pain: an overview. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1607-9. 1999.

Loeser, J. D. e R. D. Treede. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain, v.137, n.3, Jul 31, p.473-7. 2008.

Londos, C., D. M. Cooper, *et al.* Subclasses of external adenosine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.5, May, p.2551-4. 1980.

Loram, L. C., J. A. Harrison, *et al.* Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain. J Neurosci, v.29, n.44, Nov 4, p.14015-25. 2009.

Lottsfeldt, F. I., R. F. Labbe, *et al.* Effect of inosine on heme synthesis in experimental porphyria. JAMA, v.178, Dec 2, p.928-9. 1961.

Lynch, J. J., 3rd, M. F. Jarvis, *et al.* An adenosine kinase inhibitor attenuates tactile allodynia in a rat model of diabetic neuropathic pain. Eur J Pharmacol, v.364, n.2-3, Jan 8, p.141-6. 1999.

Lynch, M. E., A. J. Clark, *et al.* Intravenous adenosine alleviates neuropathic pain: a double blind placebo controlled crossover trial using an enriched enrolment design. Pain, v.103, n.1-2, May, p.111-7. 2003.

Macdonald, R. L., J. H. Skerritt, *et al.* Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. J Physiol, v.370, Jan, p.75-90. 1986.

Maemoto, T., M. Tada, *et al.* Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A1 receptors. J Pharmacol Sci, v.96, n.1, Sep, p.42-52. 2004.

Malmberg, A. B. e A. I. Basbaum. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. Pain, v.76, n.1-2, May, p.215-22. 1998.



- Marton, A., P. Pacher, *et al.* Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. Int J Mol Med, v.8, n.6, Dec, p.617-21. 2001.
- Mayne, M., J. Fotheringham, *et al.* Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. Ann Neurol, v.49, n.6, Jun, p.727-35. 2001.
- Mcgaraughty, S., M. Cowart, *et al.* Anticonvulsant and antinociceptive actions of novel adenosine kinase inhibitors. Curr Top Med Chem, v.5, n.1, p.43-58. 2005.
- Mcgovern, J. G. e S. I. McDonough. Voltage-gated calcium channels as targets for the treatment of chronic pain. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, v.3, n.6, Dec, p.457-78. 2004.
- Mcmahon, S. B. e M. Koltzenburg. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. Trends Neurosci, v.13, n.6, Jun, p.199-201. 1990.
- Megson, A. C., J. M. Dickenson, *et al.* Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. Br J Pharmacol, v.115, n.8, Aug, p.1415-24. 1995.
- Meotti, F. C., A. P. Luiz, *et al.* Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.316, n.2, Feb, p.789-96. 2006.
- Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol, v.57, n.1, Jan, p.1-164. 1999.
- Milne, G. R. e T. M. Palmer. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. Scien World J, v.11, n.3, Feb, p.320-39. 2011.
- Mimura, M., A. Namiki, *et al.* Antagonistic effect of physostigmine on ketamine-induced anesthesia. Psychopharmacology (Berl), v.102, n.3, p.399-403. 1990.
- Mizumura, K., H. Koda, *et al.* Possible contribution of protein kinase C in the effects of histamine on the visceral nociceptor activities in vitro. Neurosci Res, v.37, n.3, Jul, p.183-90. 2000.

Moser, G. H., J. Schrader, *et al.* Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. Am J Physiol, v.256, n.4 Pt 1, Apr, p.C799-806. 1989.

Moré, A. O. O. **Efeito da acupuntura no modelo de dor pós-operatória em camundongos: investigação do sistema adenosinérgico utilizando a farmacopuntura.** 2012. 73 f. Dissertação (mestrado em neurociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Muller, C. E. e K. A. Jacobson. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. Biochim Biophys Acta, v.1808, n.5, May, p.1290-308. 2011.

NASCIMENTO, F. P. **Atividade antinociceptiva da inosina em camundongos: participação dos receptores A1 e A2A.** 2008. 85 f. Dissertação (mestrado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev, v.82, n.4, Oct, p.1013-67. 2002.

Ocana, M. e J. M. Baeyens. Differential effects of K<sup>+</sup> channel blockers on antinociception induced by alpha 2-adrenoceptor, GABAB and kappa-opioid receptor agonists. Br J Pharmacol, v.110, n.3, Nov, p.1049-54. 1993.

Ocana, M., C. M. Cendan, *et al.* Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. Eur J Pharmacol, v.500, n.1-3, Oct 1, p.203-19. 2004.

Ortiz, M. I., G. Castaneda-Hernandez, *et al.* Pharmacological evidence for the activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by meloxicam in the formalin test. Pharmacol Biochem Behav, v.81, n.4, Aug, p.725-31. 2005.

Ortiz, M. I., J. Lozano-Cuenca, *et al.* Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.91, n.1, Nov, p.32-7. 2008.

Ortiz, M. I., J. E. Torres-Lopez, *et al.* Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. Eur J Pharmacol, v.438, n.1-2, Mar 1, p.85-91. 2002.

Osikowicz, M., J. Mika, *et al.* Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain. Pain, v.139, n.1, Sep 30, p.117-26. 2008.

Otuki, M. F., J. Ferreira, *et al.* Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.313, n.1, Apr, p.310-8. 2005.

Padua, R., J. D. Geiger, *et al.* 2'-Deoxycoformycin inhibition of adenosine deaminase in rat brain: in vivo and in vitro analysis of specificity, potency, and enzyme recovery. J Neurochem, v.54, n.4, Apr, p.1169-78. 1990.

Palmer, T. M., T. W. Gettys, *et al.* Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. J Biol Chem, v.270, n.28, Jul 14, p.16895-902. 1995.

Parada, C. A., D. B. Reichling, *et al.* Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. Pain, v.113, n.1-2, Jan, p.185-90. 2005.

Pardridge, W. M., T. Yoshikawa, *et al.* Blood-brain barrier transport and brain metabolism of adenosine and adenosine analogs. J Pharmacol Exp Ther, v.268, n.1, Jan, p.14-8. 1994.

Peakman, M. C. e S. J. Hill. Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. Br J Pharmacol, v.111, n.1, Jan, p.191-8. 1994.

Poon, A. e J. Sawynok. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. Pain, v.74, n.2-3, Feb, p.235-45. 1998.

\_\_\_\_\_. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor. Eur J Pharmacol, v.384, n.2-3, Nov 19, p.123-38. 1999.

Prado, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. Braz J Med Biol Res, v.34, n.4, Apr, p.449-61. 2001.

Price, M., S. C. Lee, *et al.* Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.24, Dec, p.10171-5. 1989.

Qin, H. Y., M. W. Sadelain, *et al.* Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol, v.150, n.5, Mar 1, p.2072-80. 1993.

Qu, X., G. Cooney, *et al.* Short-term metabolic and haemodynamic effects of GR79236 in normal and fructose-fed rats. Eur J Pharmacol, v.338, n.3, Nov 12, p.269-76. 1997.

Raghavendra, V., F. Y. Tanga, *et al.* Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. Eur J Neurosci, v.20, n.2, Jul, p.467-73. 2004.

Ralevic, V. e G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.

Randall, L. O. e J. J. Selitto. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.111, n.4, Sep 1, p.409-19. 1957.

Rane, K., R. Karlsten, *et al.* Spinal cord morphology after chronic intrathecal administration of adenosine in the rat. Acta Anaesthesiol Scand, v.43, n.10, Nov, p.1035-40. 1999.

Rane, K., M. Segerdahl, *et al.* Intrathecal adenosine administration: a phase 1 clinical safety study in healthy volunteers, with additional evaluation of its influence on sensory thresholds and experimental pain. Anesthesiology, v.89, n.5, Nov, p.1108-15; discussion 9A. 1998.

Reeve, A. J., A. H. Dickenson, *et al.* Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. J Neurophysiol, v.79, n.3, Mar, p.1494-507. 1998.

Regaya, I., T. Pham, *et al.* Small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels, SkCa, but not voltage-gated K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>) channels, are implicated in the antinociception induced by CGS21680, a A<sub>2A</sub> adenosine receptor agonist. Life Sci, v.76, n.4, Dec 10, p.367-77. 2004.

Reiber, H., A. J. Suckling, *et al.* The effect of Freund's adjuvants on blood-cerebrospinal fluid barrier permeability. J Neurol Sci, v.63, n.1, Jan, p.55-61. 1984.

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

Rittiner, J. E., I. Korboukh, *et al.* AMP Is an Adenosine A1 Receptor Agonist. J Biol Chem, v.287, n.8, Feb 17, p.5301-9. 2012.

Robles, L. I., M. Barrios, *et al.* Effects of K<sup>+</sup> channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Eur J Pharmacol, v.295, n.2-3, Jan 11, p.181-8. 1996.

Rocha, A. C., E. S. Fernandes, *et al.* Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. Br J Pharmacol, v.148, n.5, Jul, p.688-95. 2006.

Rodriguez De La Vega, R. C., E. Merino, *et al.* Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.5, May, p.222-7. 2003.

Rosenberg, P. A. e Y. Li. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. Brain Res, v.692, n.1-2, Sep 18, p.227-32. 1995.

Sachs, D., F. Q. Cunha, *et al.* Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.10, Mar 9, p.3680-5. 2004.

Sachs, D., C. Villarreal, *et al.* The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated hypernociception. Br J Pharmacol, v.156, n.5, Mar, p.826-34. 2009.

Sajjadi, F. G., K. Takabayashi, *et al.* Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A<sub>3</sub> adenosine receptors. J Immunol, v.156, n.9, May 1, p.3435-42. 1996.

Sala-Newby, G. B., A. C. Skladanowski, *et al.* The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. J Biol Chem, v.274, n.25, Jun 18, p.17789-93. 1999.

Salvatore, C. A., M. A. Jacobson, *et al.* Molecular cloning and characterization of the human A<sub>3</sub> adenosine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.21, Nov 1, p.10365-9. 1993.

Samad, T. A., K. A. Moore, *et al.* Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Nature, v.410, n.6827, Mar 22, p.471-5. 2001.

Sanchez, J. A., T. Gonoï, *et al.* Modulation of reconstituted ATP-sensitive K(+) channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. J Physiol, v.507 ( Pt 2), Mar 1, p.315-24. 1998.

Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. Eur J Pharmacol, v.347, n.1, Apr 17, p.1-11. 1998.

\_\_\_\_\_. Adenosine and ATP receptors. Handb Exp Pharmacol, n.177, p.309-28. 2007.

Sawynok, J. e X. J. Liu. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. Prog Neurobiol, v.69, n.5, Apr, p.313-40. 2003a.

\_\_\_\_\_.The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. Reviews in Analg, v.7, n.2, Apr, p.145-63. 2003b.

Schafers, M., J. Brinkhoff, *et al.* Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. Neurosci Lett, v.310, n.2-3, Sep 14, p.113-6. 2001.

Schaible, H. G., A. Ebersberger, *et al.* Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. Arthritis Res Ther, v.13, n.2, p.210. 2011.

Schmidt, A. P., A. E. Bohmer, *et al.* Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. Br J Pharmacol, v.156, n.1, Jan, p.163-72. 2009.

Schneider, L., M. Pietschmann, *et al.* Inosine reduces microcirculatory disturbance and inflammatory organ damage in experimental acute pancreatitis in rats. Am J Surg, v.191, n.4, Apr, p.510-4. 2006.

Schulte, G. e B. B. Fredholm. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. Cell Signal, v.15, n.9, Sep, p.813-27. 2003.

Shibasaki, H. Central mechanisms of pain perception. Suppl Clin Neurophysiol, v.57, p.39-49. 2004.

Shneyvays, V., T. Zinman, *et al.* Analysis of calcium responses mediated by the A3 adenosine receptor in cultured newborn rat cardiac myocytes. Cell Calcium, v.36, n.5, Nov, p.387-96. 2004.

Silberberg, S. D., M. Li, *et al.* Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. Neuron, v.54, n.2, Apr 19, p.263-74. 2007.

Sneddon, P. e G. Burnstock. ATP as a co-transmitter in rat tail artery. Eur J Pharmacol, v.106, n.1, Oct 30, p.149-52. 1984.

Sneddon, P. e D. P. Westfall. Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. J Physiol, v.347, Feb, p.561-80. 1984.

Snel, J. e M. M. Lorst. Effects of caffeine on sleep and cognition. Prog Brain Res, v.190, p.105-17. 2011.

Sollevi, A., M. Belfrage, *et al.* Systemic adenosine infusion: a new treatment modality to alleviate neuropathic pain. Pain, v.61, n.1, Apr, p.155-8. 1995.

Sommer, C. e M. Kress. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci Lett, v.361, n.1-3, May 6, p.184-7. 2004.

Sommer, C. e M. Schafers. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. Brain Res, v.784, n.1-2, Feb 16, p.154-62. 1998.

Song, J. G., K. D. Hahm, *et al.* Adenosine triphosphate-sensitive potassium channel blockers attenuate the antiallodynic effect of R-PIA in neuropathic rats. Anesth Analg, v.112, n.6, Jun, p.1494-9. 2011.

Sousa, V. C., N. Assaife-Lopes, *et al.* Regulation of hippocampal cannabinoid CB1 receptor actions by adenosine A1 receptors and chronic caffeine administration: implications for the effects of Delta9-tetrahydrocannabinol on spatial memory. Neuropsychopharmacology, v.36, n.2, Jan, p.472-87. 2011.

Sowa, N. A., B. Taylor-Blake, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits. J Neurosci, v.30, n.6, Feb 10, p.2235-44. 2010.

Sowa, N. A., M. K. Voss, *et al.* Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A1 receptor activation. Mol Pain, v.6, p.20. 2010.

Spicarova, D., V. Nerandzic, *et al.* Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor alpha in a model of peripheral neuropathy. J Neuroinflammation, v.8, p.177. 2011.

Spicer, S. S. e W. J. Bowen. Reactions of inosine- and adenosinetriphosphates with actomyosin and myosin. J Biol Chem, v.188, n.2, Feb, p.741-51. 1951.

Stammers, A. T., J. Liu, *et al.* Expression of inflammatory cytokines following acute spinal cord injury in a rodent model. J Neurosci Res, v.90, n.4, Apr, p.782-90. 2012.

Suzuki, R., L. C. Stanfa, *et al.* The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurones following carrageenan inflammation and peripheral nerve injury. Br J Pharmacol, v.132, n.7, Apr, p.1615-23. 2001.

Taiwo, Y. O. e J. D. Levine. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. Neuroscience, v.38, n.3, p.757-62. 1990.

Tincani, G. P. e A. Traldi. [Treatment of Myocardial Insufficiency with Utp and Inosine]. Minerva Cardioangiol, v.11, Sep, p.553-6. 1963.

Truedell, L. S. e R. J. Bodnar. Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. Physiol Behav, v.39, n.6, p.727-31. 1987.

Tsai, Y. J., L. C. Lin, *et al.* Pharmacokinetics of adenosine and cordycepin, a bioactive constituent of Cordyceps sinensis in rat. J Agric Food Chem, v.58, n.8, Apr 28, p.4638-43. 2010.

Uceyler, N., J. P. Rogausch, *et al.* Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. Neurology, v.69, n.1, Jul 3, p.42-9. 2007.

Ueda, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. Pharmacol Ther, v.109, n.1-2, Jan, p.57-77. 2006.

Van Calker, D., M. Muller, *et al.* Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. Nature, v.276, n.5690, Dec 21-28, p.839-41. 1978.

\_\_\_\_\_. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. J Neurochem, v.33, n.5, Nov, p.999-1005. 1979.



- Vanegas, H. e H. Schaible. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. Pain, v.85, n.1-2, Mar, p.9-18. 2000.
- Vanlallie, T.B. Gout: epitome of painful arthritis. Metabolism. Oct; 59 Suppl 1:S32-6. 2010
- Verri, W. A., Jr., T. M. Cunha, *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? Pharmacol Ther, v.112, n.1, Oct, p.116-38. 2006.
- Vial, C., J. A. Roberts, *et al.* Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.9, Sep, p.487-93. 2004.
- Wagner, R. e R. R. Myers. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. Neuroscience, v.73, n.3, Aug, p.625-9. 1996.
- Ward, D. T. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. Cell Calcium, v.35, n.3, Mar, p.217-28. 2004.
- Watson, C. P., I. Gilron, *et al.* A qualitative systematic review of head-to-head randomized controlled trials of oral analgesics in neuropathic pain. Pain Res Manag, v.15, n.3, May-Jun, p.147-57. 2010.
- Wu, L. G. e P. Saggau. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. Trends Neurosci, v.20, n.5, May, p.204-12. 1997.
- Wu, M. M., S. W. You, *et al.* Effects of inosine on axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. Neurosci Lett, v.341, n.1, Apr 24, p.84-6. 2003.
- Wu, W. P., J. X. Hao, *et al.* Decreased inflammatory pain due to reduced carrageenan-induced inflammation in mice lacking adenosine A3 receptors. Neuroscience, v.114, n.3, p.523-7. 2002.
- \_\_\_\_\_. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. Pain, v.113, n.3, Feb, p.395-404. 2005.
- Yaksh, T. L. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. J Pain, v.7, n.1 Suppl 1, Jan, p.S13-30. 2006.

Yalcin, I. e F. Aksu. Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. Pharmacol Biochem Behav, v.80, n.1, Jan, p.69-75. 2005.

Yamagiwa, T., T. Shimosegawa, *et al.* Inosine alleviates rat caerulein pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. J Gastroenterol, v.39, n.1, Jan, p.41-9. 2004.

Yoon, M. H., H. B. Bae, *et al.* Antinociception of intrathecal adenosine receptor subtype agonists in rat formalin test. Anesth Analg, v.101, n.5, Nov, p.1417-21. 2005.

Zamponi, G. W., R. J. Lewis, *et al.* Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. Brain Res Rev, v.60, n.1, Apr, p.84-9. 2009.

Zamponi, G. W. e T. P. Snutch. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. Curr Opin Neurobiol, v.8, n.3, Jun, p.351-6. 1998.

Zetterstrom, T., L. Vernet, *et al.* Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. Neurosci Lett, v.29, n.2, Apr 16, p.111-5. 1982.

Zhang, J. M. e J. An. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin, v.45, n.2, Spring, p.27-37. 2007.

Zhang, Y., A. Li, *et al.* Rostral ventromedial medulla mu, but not kappa, opioid receptors are involved in electroacupuncture anti-hyperalgesia in an inflammatory pain rat model. Brain Res, v.1395, Jun 13, p.38-45. 2011.

Zhou, Q. Y., C. Li, *et al.* Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.16, Aug 15, p.7432-6. 1992.

Zylka, M. J. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. Trends Mol Med, v.17, n.4, Apr, p.188-96. 2011.

## **ANEXOS**



## **ANEXO 1 - PUBLICAÇÕES DE PARTE DOS RESULTADOS EM PERIÓDICO CIENTÍFICO INTERNACIONAL**

**Nascimento FP**, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF, Macedo SJ Jr, Lima DA, Almeida RC, Ostroski RM, Rodrigues AL, Santos AR. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 334(2):590-8.

Macedo-Júnior SJ, **Nascimento FP**, Luiz-Cerutti M, Santos ARS (no prelo). Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K<sup>+</sup> channels and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the antinociceptive effect of inosine. *Purinergic Signalling*, 2012.

# Inosine Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> Receptor Subtypes and Protein Kinase C Pathways

Francisney P. Nascimento, Sonia M. Figueredo, Rodrigo Marcon, Daniel F. Martins, Sérgio J. Macedo Jr., Denise A. N. Lima, Rúbia C. Almeida, Rosana M. Ostroski, Ana Lúcia S. Rodrigues, and Adair Roberto Soares Santos

Departamentos de Farmacologia (F.P.N., R.M., A.R.S.S.), Ciências Fisiológicas (S.M.F., D.F.M., S.J.M., D.A.N.L., R.C.A., R.M.O., A.R.S.S.), and Bioquímica (A.L.S.R.), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Brazil

Received January 25, 2010; accepted May 13, 2010

## ABSTRACT

Inosine, an endogenous purine, is the first metabolite of adenosine in a reaction catalyzed by adenosine deaminase. This study aimed to investigate the antinociceptive effects of inosine against several models of pain in mice and rats. In mice, inosine given by systemic or central routes inhibited acetic acid-induced nociception. Furthermore, inosine also decreased the late phase of formalin-induced licking and the nociception induced by glutamate. Inosine produced inhibition (for up to 4 h) of mechanical allodynia induced by complete Freund's adjuvant (CFA) injected into the mouse's paw. Given chronically for 21 days, inosine reversed the mechanical allodynia caused by CFA. Moreover, inosine also reduced the thermal (cold stimuli) and mechanical allodynia caused by partial sciatic nerve ligation (PSNL) for 4 h; when inosine was chronically administered, it decreased the mechanical allodynia induced by PSNL for 22 days. Antinociception caused by inosine in the acetic acid test was attenuated by treatment of

mice with 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX; a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist), 8-phenyltheophylline (8-PT; a nonselective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist), and 4-[2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl]phenol (ZM241385; a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist). In rats, inosine inhibited the mechanical and heat hyperalgesia induced by bradykinin and phorbol 12-myristate 13-acetate, without affecting similar responses caused by prostaglandin E<sub>2</sub> or forskolin. These results indicate that inosine induces antinociceptive, antiallodynic, and antihyperalgesic effects in rodents. The precise mechanisms through which inosine produces antinociception are currently under investigation, but involvement of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors and blockade of the protein kinase C pathway seem to largely account for inosine's antinociceptive effect.

The purinergic system, including ATP and its metabolite adenosine, plays a relevant physiological role in the control of pain at the peripheral and central levels (Sawynok, 1998). Adenosine is converted to inosine by the action of the enzyme

adenosine deaminase (Sawynok and Liu, 2003). Inosine is an endogenous nucleoside with anti-inflammatory effects, and it can be considered a natural trigger of adenosine receptors, which are widely distributed through organs and cell types (Haskó et al., 2000; Gomez and Sitkovsky, 2003). There are four known subtypes of adenosine receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub>), and each one contains its own pharmacological profile, tissue distribution, and coupling effectors (Fredholm et al., 2001; Sawynok and Liu, 2003).

Inosine inhibits the release of proinflammatory cytokines and chemokines in activated macrophages (Haskó et al.,

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior. F.P.N. and A.R.S.S. received fellowship support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.  
doi:10.1124/jpet.110.166058.

**ABBREVIATIONS:** CFA, complete Freund's adjuvant; ANOVA, analysis of variance; PSNL, partial sciatic nerve ligation; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; DPMA, N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylphenylethyl)]adenosine; HEMADO, 2-hexyn-1-yl-N<sup>6</sup>-methyladenosine; CHA, N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; ZM241385, 4-[2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl]phenol; 8-PT, 8-phenyltheophylline; BK, bradykinin; MRS-377, 2-phenoxy-6-(cyclohexylamino)purine hemioxalate; DMSO, dimethyl sulfoxide; CGS 21680, 3-[4-[2-[6-amino-9-[[2R,3R,4S,5S]-5-(ethylcarbonyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid.

2000; Garcia Soriano et al., 2001) and protects against lung tissue damage and skeletal muscle reperfusion injury in mice. It is also known that this molecule exerts powerful anti-inflammatory effects against murine endotoxic shock (Garcia Soriano et al., 2001) and other models of inflammation. It also has immunomodulatory and neuroprotective effects (Gomez and Sitkovsky, 2003). Thus, inosine might have wide-ranging biological effects with potentially beneficial implications in humans, underscoring the need to understand the molecular mechanisms of inosine action *in vivo*.

Prolonged inflammation or nerve injury in humans often leads to a sensory nociceptor sensitization called hyperalgesia or allodynia. Neuropathic pain is a kind of chronic pain that can persist for days, months, or even years after nerve injury. It has been demonstrated that neuropathic pain is attenuated by adenosine in humans (Belfrage et al., 1995). Furthermore, adenosine analogs and adenosine kinase inhibitors produce effects in animal models of neuropathic pain (Sawynok, 1998). Several studies have extensively reported the effect of adenosine against nociception (Sawynok, 1998; Sawynok and Liu, 2003); however, no evidence has been shown about the antinociceptive effect of inosine. For this reason, we aimed to investigate the antinociceptive effects of inosine against writhing, formalin, and glutamate tests. In addition, this study addressed the effects of inosine in neuropathic and inflammatory chronic pain in mice and hyperalgesic pain in rats. Finally, we evaluated the role played by the adenosine receptors by using selective adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub> receptor agonists and antagonists in mice.

## Materials and Methods

**Animals.** Experiments were conducted with male Swiss mice (25–35 g) and male Wistar rats (250–350 g) obtained from the Universidade Federal de Santa Catarina's animal facility. Animals were housed at 22 ± 2°C under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 6:00 AM) and had access to food and water *ad libitum*. Animals were acclimated to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experiments were performed after approval of the protocol by the Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Santa Catarina and carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

**Abdominal Constriction Response Caused by Intraperitoneal Injection of Acetic Acid.** Abdominal constriction is a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs in response to an intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid at the time of the test (Koster et al., 1959). Mice were pretreated with inosine intraperitoneally (0.1–100 mg/kg) or orally (10–300 mg/kg) 30 and 60 min before the irritant injection, respectively. Other groups of animals were treated with inosine intracerebroventricularly (0.1–10 µg/site) or intrathecally (0.01–10 µg/site) 15 min before the irritant injection. In these studies, control mice received an equal volume of vehicle or saline. After the challenge, mice were individually placed into glass cylinders 20 cm in diameter, and abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal constrictions compared with those of the control group. In addition, we investigated the time course of the antinociceptive effect of inosine given intraperitoneally (10 mg/kg) or orally (100 mg/kg) 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h before acetic acid administra-

tion. Control mice received an equal volume of vehicle and were observed at the same time intervals.

**Formalin-Induced Nociception.** The procedure used was essentially the same as that described previously (Hunskar et al., 1985) with minor modifications. Animals received 20 µl of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) made up in saline, injected intraplantarly in the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and 15 to 30 min (inflammatory phase). Animals received inosine (0.1–100 mg/kg *i.p.*) 30 min beforehand. Control animals received vehicle (10 ml/kg *i.p.*). After the intraplantar injection of formalin, animals were immediately placed in a glass cylinder 20 cm in diameter. The time they spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and considered as indicative of nociception.

**Glutamate-Induced Nociception.** To provide more direct evidence concerning the interaction of inosine with the glutamatergic system, we investigated whether inosine was able to antagonize glutamate-induced licking of the mouse paw. The procedure used was similar to that described previously (Beirith et al., 2002). A volume of 20 µl of glutamate (10 µmol/paw prepared in saline) was injected intraplantarly in the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed individually for 15 min after glutamate injection. The time they spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception. Animals were treated with inosine (0.01–10 mg/kg *i.p.*) 30 min before glutamate injection. Control animals received a similar volume of vehicle intraperitoneally (10 ml/kg).

**Measurement of Locomotor Activity.** The open-field test was used to rule out the possibility that the antinociceptive action of inosine could be related to nonspecific disturbances of the locomotor activity of the animals. The ambulatory behavior was assessed in an open-field test as described previously (Rodrigues et al., 2002). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40 × 60 × 50 cm. The floor of the arena was divided into 16 squares. The number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in a 6-min session. Mice were treated with inosine (1–100 mg/kg *i.p.*) or vehicle (10 ml/kg *i.p.*) 30 min beforehand. The apparatus was cleaned with a solution of 10% ethanol between tests to hide animal clues.

**Partial Sciatic Nerve Ligation.** Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 10 mg/kg xylazine and 80 mg/kg ketamine. A partial ligation of the sciatic nerve was performed by tying the distal 1/3 to 1/2 of the dorsal portion of the sciatic nerve, according to the procedure in mice described by Malmberg and Basbaum (1998). In sham-operated mice, sciatic nerves were exposed without ligation. The wound was closed and covered with iodine solution. The animals were divided into four groups. The sham-operated mice received inosine (10 or 30 mg/kg *i.p.*) or vehicle (10 ml/kg *i.p.*), and sham-operated animals received only vehicle (10 ml/kg *i.p.*) 7 days after surgery. The mechanical (von Frey monofilaments) and thermal (cold stimuli) allodynia responses were recorded before (baseline) and after (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h) treatment to verify the time-course effect of inosine in inhibiting the allodynia responses. To investigate the effects of the long-term treatment on mechanical allodynia, inosine (10 or 30 mg/kg *i.p.*) was administered to mice twice a day (every 12 h). The allodynia response was evaluated 1 h after the first treatment (time with maximal inhibition observed in the acute treatment). The repeated treatment extended from the 7th to the 22nd day after partial sciatic nerve ligation (PSNL), and then it was interrupted for 3 days. Next, the treatment was reinstated to assess the development of possible tolerance effect of inosine.

**Measurement of Thermal (Cold Stimuli) Allodynia.** For assessment of allodynia by cold stimulus in mice with PSNL, the Cold/Hot Plate Analgesia Meter (Columbus Instruments, Columbus, OH) was used. Mice were placed on the cold plate (2°C), and the time until the shake of the hind paw was recorded. The cutoff latency for this test was 30 s. Animals were habituated 7 days before surgery,

and the presurgery baseline was measured 1 day before the partial ligation of the sciatic nerve (Osikowicz et al., 2008).

**Measurement of Mechanical Allodynia.** The mechanical allodynia was measured as described previously (Bortolanza et al., 2002). The withdrawal response frequency to 10 applications of 0.4 g of von Frey filaments (Stoelting Co., Wood Dale, IL) were recorded as the nociceptive percentile value. Mice were further acclimatized in individual clear boxes ( $9 \times 7 \times 11$  cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the ventral surface of the hind paws. The frequency of withdrawal was determined before and after PSNL.

**Complete Freund's Adjuvant-Induced Chronic Inflammatory Pain.** Mice were injected with 20  $\mu$ l of 30% complete Freund's adjuvant (CFA) (*Mycobacterium tuberculosis*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (intraplantar) as described by Ferreira et al. (2001) with minor modifications. The sham group received 20  $\mu$ l of phosphate buffer saline in the ipsilateral paw. CFA produced significant hind paw swelling and hyperalgesia. To assess the effects of the acute treatment of inosine against CFA-induced chronic inflammatory pain, animals received inosine (30 mg/kg i.p.) 24 h after CFA intraplantar injection. Development of mechanical allodynia was evaluated at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after treatment to verify the time-course effect of inosine in inhibiting the allodynia responses (Bortolanza et al., 2002). To investigate the effects of the long-term treatment on mechanical allodynia, inosine (30 mg/kg i.p.) was administered in mice once a day. The allodynia response was evaluated 4 h after the treatment (time with maximal inhibition observed in the acute treatment). The repeated treatment extended from the 1st to the 22nd day after CFA injection, and it was interrupted for 4 days. Next, the treatment was reintiated to assess the development of a possible tolerance effect of inosine.

**Bradykinin-, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-, Prostaglandin E<sub>2</sub>, or Forskolin-Induced Mechanical and Thermal Hyperalgesia Response.** The possible antihyperalgesic effect of inosine was evaluated as described previously (Randall and Selitto, 1957; Hargreaves et al., 1988; Otuki et al., 2005). The animals were pretreated intraperitoneally with inosine (10 mg/kg) or vehicle (10 ml/kg; control group) 30 min before injection of 100  $\mu$ l of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 0.1 nmol/paw), bradykinin (BK; 3 nmol/paw), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; 10 nmol/paw), forskolin (1  $\mu$ mol/paw), or saline only into the right hind paw. The hyperalgesia was evaluated 30 min later. When bradykinin was used, animals were pretreated with captopril (5 mg/kg s.c.), an angiotensin-converting enzyme inhibitor, 1 h before the experiments to prevent its degradation (Otuki et al., 2005; Parada et al., 2005).

**Measurement of Mechanical and Thermal (Hot Stimuli) Hyperalgesia.** The nociceptive threshold (of squeak response or paw withdrawal) was assessed by applying increasing pressure or temperature to the dorsal site of inflamed or control rat paws, using an analgesy meter and a thermal withdraw apparatus (both Ugo Basile, Comerio, Italy) as described previously (Randall and Selitto, 1957; Hargreaves et al., 1988) with minor modifications. The weight on the analgesy meter ranged from 0 to 750 g, and the threshold was expressed as load (g) tolerated. For the thermal threshold, rats were habituated to the environment for approximately 30 min before testing. Withdrawal latencies were measured automatically with photocell light. A cutoff time was set at 20 s to avoid tissue damage. Light intensity was preset to obtain baseline latency between 10 and 15 s.

**Involvement of Adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub> Receptors.** To investigate the role played by the adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub> receptors in the antinociceptive effect of inosine in the acetic acid test, mice were pretreated with vehicle (10 ml/kg i.p.), 1,3-dipropyl-8-cyclopropylxanthine (DPCPX; a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist) (0.1 mg/kg i.p.), 8-phenyltheophylline (8-PT; a nonselective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist) (3 mg/kg i.p.), 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM241385; a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist) (3 mg/kg i.p.), alloxazine (a selective adenosine A<sub>2B</sub>

receptor antagonist) (3 mg/kg i.p.), and 2-phenoxy-6-(cyclohexylamino)purine hemioxalate (MRS-3777; a selective adenosine A<sub>3</sub> receptor antagonist) (5 mg/kg i.p.). After 20 min, every group received an injection of inosine (10 mg/kg i.p.), N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine (CHA; a selective adenosine A1 receptor agonist) (0.1 mg/kg i.p.), N<sup>6</sup>-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylphenyl)ethyl]adenosine (DPMA; a nonselective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist) (1 mg/kg i.p.), 2-hexyn-1-yl-N<sup>6</sup>-methyladenosine (HEMADO; a selective adenosine A<sub>3</sub> receptor agonist) (1 mg/kg i.p.), or vehicle (10 ml/kg i.p.), and 30 min later they were subjected to the acetic acid test. The doses of the drugs used were based on literature data (Garcia Soriano et al., 2001; Bastia et al., 2002; Schmidt et al., 2009) and previous results from our laboratory.

**Drugs.** Acetic acid, formalin, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany), inosine, L-glutamic acid hydrochloride, CHA, bradykinin, CFA, captopril, PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), xylazine, ketamine (Vetbrands International, São Paulo, Brazil), morphine sulfate (Cristalia Ind., São Paulo, Brazil), PMA, alloxazine, HEMADO, and MRS-3777 (Toctris Bioscience, Ellisville, MO) were dissolved in saline (0.9% NaCl). DPMA, 8-PT, forskolin (Sigma-Aldrich), DPCPX, and 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)-phenol (ZM241385) (Toctris Bioscience) were dissolved in saline with 5% DMSO. The final concentration of DMSO did not exceed 5% and did not cause any effect per se.

**Statistical Analysis.** The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., except for ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of inosine reducing the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their 95% confidence limits. The ID<sub>50</sub> values were determined by nonlinear regression analysis from individual experiments using Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The statistical significance of differences between groups was detected by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test or two-way ANOVA followed by Bonferroni test. *P* values less than 0.05 were considered indicative of significance.

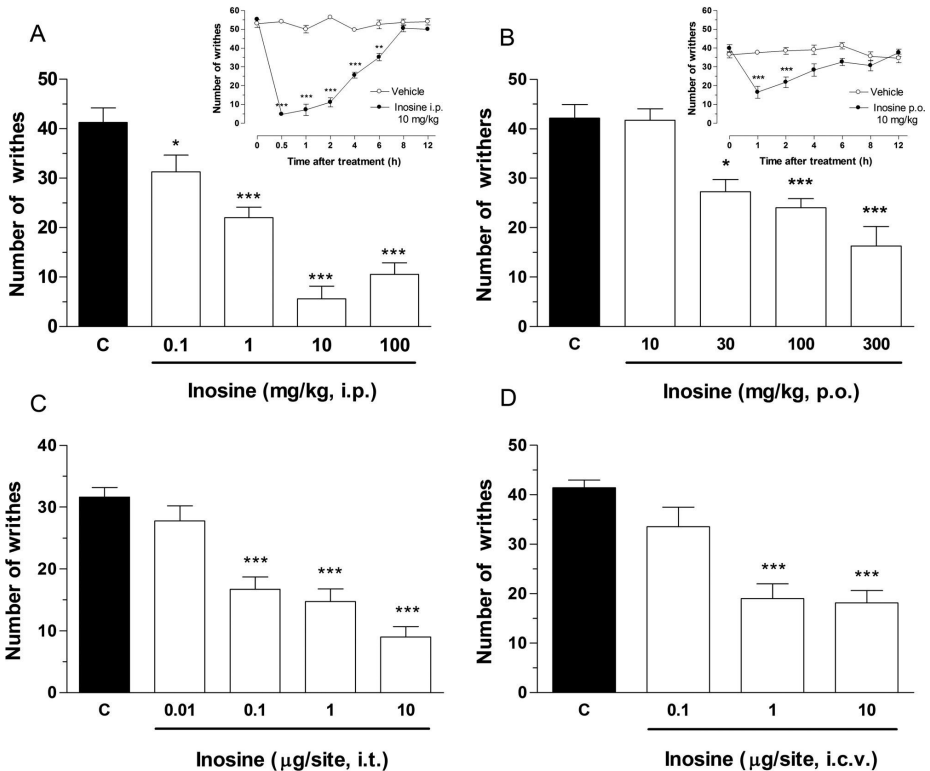
## Results

**Abdominal Constriction Response Caused by Intraperitoneal Injection of Acetic Acid.** The results depicted in Fig. 1A show that inosine, given intraperitoneally 30 min before testing, produced dose-related inhibition of the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice with a mean ID<sub>50</sub> value (and 95% confidence limits) of 5.78 (2.66–12.53) mg/kg, and the inhibition observed was 80  $\pm$  8% for the dose of 10 mg/kg. Furthermore, given orally 60 min before testing, inosine also produced dose-related inhibition of the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice with a mean ID<sub>50</sub> value of 101.00 (71.83–142.10) mg/kg and inhibitions of 70  $\pm$  5% for the dose of 300 mg/kg (Fig. 1B). Hence, inosine was approximately 20-fold more potent in preventing the nociception caused by acetic acid when it was given intraperitoneally than when given orally. A time-course analysis of the antinociceptive effect of inosine given intraperitoneally or orally is shown in Fig. 1, A and B, insets. Inosine produced marked antinociception as early as 30 min after intraperitoneal administration, an action that remained significant up to 6 h after administration. When inosine was administered orally, its effect was significant until 2 h after administration. Thus, the administration of inosine intraperitoneally (30 min before testing) was chosen for all further studies with independent groups of animals.

The results presented in Fig. 1, C and D show that inosine, administered intrathecaly or intracerebroventricularly 15 min before testing, produced dose-related



## Writhing test



**Fig. 1.** Effects of inosine administered intraperitoneally (A), orally (B), intrathecally (C), and intracerebrally (D) on the abdominal constriction caused by intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid in mice. Each column represents the mean of eight animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Column C indicates the control values (animals treated with the vehicle), and the asterisks denote significance levels compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test; \*\*\*,  $p < 0.001$  and \*,  $p < 0.05$ ). The insets in A and B represent the time course of the antinociceptive effect of inosine in the acetic acid test. Inosine (●) was administered intraperitoneally (10 mg/kg) and orally (100 mg/kg) 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h before acetic acid injection. Each point represents the mean of eight animals, and the error bars indicate the S.E.M. Control values (○) indicate the animals injected with vehicle, and the asterisks denote the significance levels compared with control groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni test; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ ). In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

inhibition of the acetic acid-induced writhing in mice with mean  $ID_{50}$  values of 0.44 (0.16–1.20) and 2.68 (0.64–11.14)  $\mu\text{g}/\text{site}$  and inhibition of  $71 \pm 5$  and  $56 \pm 6\%$ , respectively, for the dose of 10  $\mu\text{g}/\text{site}$ . Hence, inosine was approximately 6-fold more potent in preventing the nociception caused by acetic acid when it was given intrathecally than when given intracerebroventricularly.

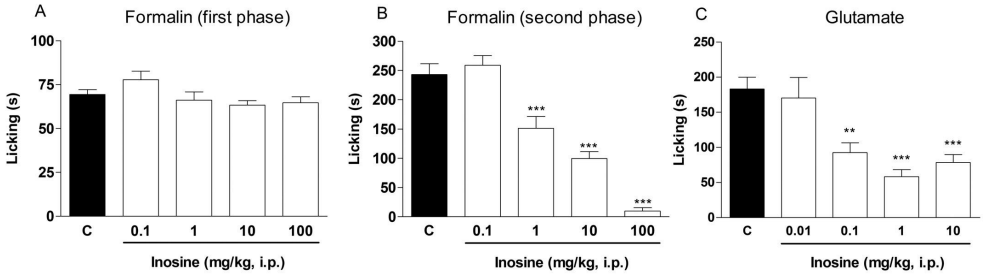
**Formalin-Induced Nociception.** The treatment of animals with inosine 30 min before the test did not decrease the time that the mice spent licking or biting the injected paw in the early phase of the formalin test (Fig. 2A). However, in the late phase of the formalin test, inosine significantly diminished the nociceptive response compared with mice treated with vehicle ( $p < 0.001$ ). The mean  $ID_{50}$  value was 2.59 (1.15–5.88) mg/kg, and the percentage of inhibition was 91  $\pm$  3% (Fig. 2B).

**Glutamate-Induced Nociception.** The results presented in Fig. 2C show that inosine, given intraperitoneally, caused a significant and dose-related inhibition of the glutamate-induced nociception compared with mice treated with vehicle ( $p < 0.001$ ) with a mean  $ID_{50}$  value of 0.72 (0.22–2.36) mg/kg and inhibition of  $57 \pm 6\%$  for the dose of 1 mg/kg.

**Measurement of Locomotor Activity.** Inosine treatment (1–100 mg/kg i.p.) did not alter the locomotor activity of mice in the open-field test compared with animals that received vehicle (control group) until 8 h after treatment. The means  $\pm$  S.E.M. of crossing numbers 30 min after administration were  $188.0 \pm 7.1$ ,  $188.9 \pm 5.4$ ,  $191.6 \pm 7.8$ , and  $175.9 \pm 6.6$  for the control group and groups receiving 1, 10, and 100 mg/kg inosine, respectively (data not shown).

**Neuropathic Pain-Like Behavior After Partial Sciatic Nerve Ligation.** The PSNL, a neuropathic pain model,

### Licking tests



**Fig. 2.** Effects of inosine administration on the formalin- and glutamate-induced nociception in mice. A and B, the total time spent licking the hind paw was measured in the early phase (0–5 min; A) and late phase (15–30 min; B) after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean of eight animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. C, effects of inosine administered intraperitoneally on glutamate-induced nociception in mice. The total time spent licking the hind paw was measured 0 to 15 min after intraplantar injection of glutamate. Column C indicates the control values (animals treated with the vehicle), and the asterisks denote significance levels compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test; \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

reduced the basal threshold of cold and mechanical allodynia in the ipsilateral hind paw compared with the nonoperated group ( $p < 0.05$ ). Figure 3, A and B shows that acute treatment with inosine (30 mg/kg i.p.) reduced both cold ( $81 \pm 8\%$ ) and mechanical ( $54 \pm 7\%$ ) allodynia responses produced by PSNL 30 min after treatment. Its action remained significant up to 4 h after its administration in both tests.

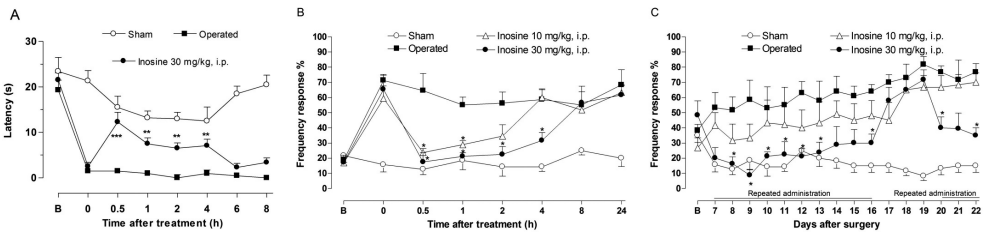
The long-term treatment of animals with inosine (30 mg/kg i.p.) twice a day markedly decreased the mechanical allodynia response produced by PSNL, and this effect was evident until the 17th day of treatment. When the treatment was suspended for 3 days, the mechanical allodynia response was re-established. On the 20th day, inosine treatment was restarted, and inosine once again significantly reduced the mechanical allodynia response such as in the acute treatment, showing that the inosine did not induce tolerance (Fig. 3C).

**CFA-Induced Chronic Inflammatory Pain.** Results depicted in Fig. 4A show that inosine given intraperitoneally (30 min before testing) produced a significant and time-dependent inhibition of the mechanical allodynia induced by

intraplantar injection of CFA in the right paw with maximal inhibition of  $82 \pm 12\%$ . Inosine produced pronounced antinociception as early as 30 min after intraperitoneal administration and remained significant up to 4 h. When inosine was chronically administered (once a day) for 21 days, it also significantly reduced the mechanical allodynia induced by CFA (Fig. 4B). This effect was evident until day 15 of treatment (inhibition of  $87 \pm 11\%$  on the 15th day). When the treatment was interrupted for 4 days, the mechanical allodynia was re-established. When treatment was restarted on the 20th day, inosine once again significantly reduced the mechanical allodynia.

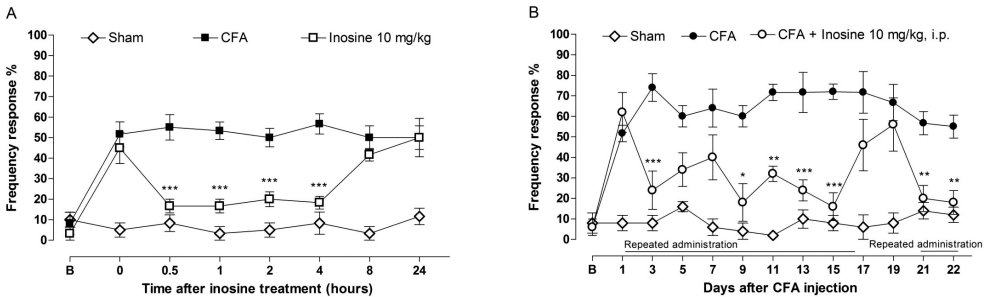
**Bradykinin-, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-, Prostaglandin E<sub>2</sub>-, or Forskolin-Induced Mechanical and Thermal Hyperalgesia.** Results of Fig. 5 show that intraplantar administration of bradykinin (3 nmol/paw), PMA (0.1 nmol/paw), PGE<sub>2</sub> (10 nmol/paw), and forskolin (1 μmol/paw) significantly increased ( $p < 0.01$ ) the sensitivity to mechanical stimuli (hyperalgesia) in rats when assessed by the Randall-Selitto test. Furthermore, the treatment of rats with inosine (10 mg/kg i.p., 30 min before testing) reversed

### Neuropathic pain



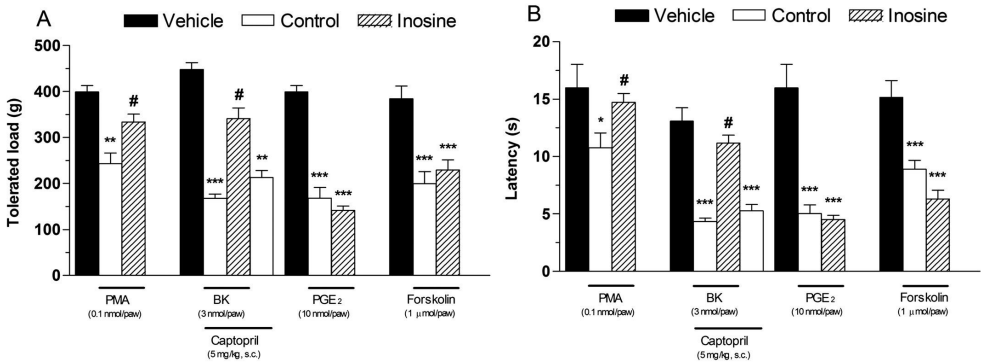
**Fig. 3.** Effects of inosine on partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain. A, effect of treatment with inosine (30 mg/kg i.p.) given 7 days after the partial sciatic nerve injury on the thermal hyperalgesia test (cold plate) in mice. The nociceptive responses of animals were measured from 0 to 8 h after administration of inosine. B, effect of acute administration of inosine (10 and 30 mg/kg i.p.) on mechanical hyperalgesia induced by PSNL in ipsilateral paws in mice. The nociceptive responses of animals were measured from 0 to 24 h after administration of inosine. C, in chronic analysis the nociceptive responses of animals were measured from the 7th to the 22nd day. Each point represents the mean of eight animals. Two-way ANOVA followed by Bonferroni test, significantly different from the sham-operated mouse group; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*,  $P < 0.05$ . B, baseline withdrawal threshold.

## Inflammatory chronic pain



**Fig. 4.** Effects of inosine on CFA-induced nociception. **A**, effect of acute administration of inosine (10 mg/kg i.p.) on mechanical hyperalgesia induced by CFA injection in the ipsilateral paws of mice. The nociceptive responses of animals were measured from 0 to 24 h after administration of inosine. **B**, in chronic analysis the nociceptive responses of animals were measured until the 22nd day. Each point represents the mean of eight animals. Two-way ANOVA followed by Bonferroni test, significantly different from the sham-operated mouse group; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*,  $P < 0.05$ . **B**, baseline withdrawal threshold. In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

## Hyperalgesic pain



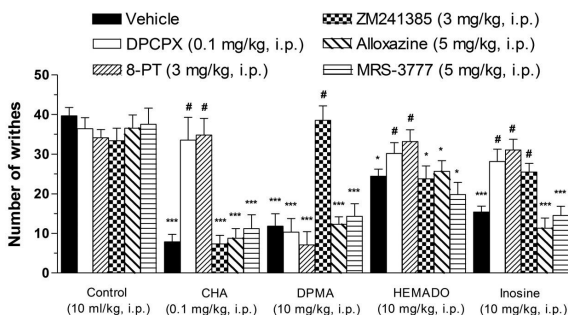
**Fig. 5.** Effects of inosine against mechanical and thermal hyperalgesia in rats. Effect of intraperitoneal administration of inosine (10 mg/kg), against PMA-, BK-, prostaglandin E<sub>2</sub>- or forskolin-induced mechanical (**A**) and thermal (**B**) hyperalgesia in rats. Each column represents the mean of eight rats, and the error bars indicate the S.E.M. The symbols denote significance levels: #,  $p < 0.05$  compared with PMA or BK versus inosine plus PMA or BK (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test); \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; and \*,  $p < 0.05$  compared with corresponding control values (animals pretreated with vehicle alone).

the mechanical hyperalgesia caused by intraplantar injection of PMA and bradykinin compared with rats treated with vehicle with inhibitions of  $51 \pm 8$  and  $62 \pm 8\%$ , respectively, but neither reversed PGE<sub>2</sub>- or forskolin-induced mechanical hyperalgesia (Fig. 5A). When thermal (hot stimuli) hyperalgesia was assessed, inosine (10 mg/kg i.p., 30 min before testing) also significantly reversed the thermal hyperalgesia caused by PMA and bradykinin, but did not reverse the hyperalgesia caused by PGE<sub>2</sub> or forskolin compared with rats treated with vehicle. The values of the inhibitions observed were  $77 \pm 13$  and  $78 \pm 11\%$ , respectively (Fig. 5B).

**Analysis of Mechanism of Action of Inosine.** The results depicted in Fig. 6 show that previous treatment of mice with DPCPX (a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist; 0.1 mg/kg i.p.) and 8-PT (a nonselective adeno-

sine A<sub>1</sub> receptor antagonist; 3 mg/kg i.p.), given 20 min before testing, significantly reversed the antinociception caused by CHA (a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist; 0.1 mg/kg i.p.), HEMADO (a selective adenosine A<sub>3</sub> receptor agonist; 1 mg/kg i.p.), and inosine (10 mg/kg i.p.) when assessed in the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. Figure 6 also shows that the pretreatment of animals with ZM241385 (a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist; 3 mg/kg i.p.), given 20 min before testing, completely reversed the antinociception caused by DPMA (a nonselective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist; 1 mg/kg i.p.) and partially reversed the antinociception caused by inosine (10 mg/kg i.p.) against acetic acid-induced pain. Moreover, the pretreatments of animals with MRS-3777 (a selective adenosine A<sub>3</sub> receptor antag-

## Involvement of adenosine receptors



**Fig. 6.** Involvement of adenosine receptors in antinociceptive effect of inosine. Effect of intraperitoneal administration of inosine (10 mg/kg), CHA (0.1 mg/kg), DPMA (10 mg/kg), HEMADO (10 mg/kg), or vehicle (10 ml/kg) in animals previously treated with vehicle (10 ml/kg), DPCPX (0.1 mg/kg), 8-PT (3 mg/kg), ZM241385 (3 mg/kg), alloxazine (5 mg/kg), or MRS-3777 (5 mg/kg) against the acetic acid-induced writhing in mice. Each column represents the mean of eight animals, and the vertical lines indicate the S.E.M. Asterisks denote significance levels compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test); \*,  $P < 0.05$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ . #,  $P < 0.05$  compared with agonists (inosine, CHA, DPMA, or HEMADO alone).

onist; 5 mg/kg i.p.) and alloxazine (a selective adenosine  $A_{2B}$  receptor antagonist; 5 mg/kg i.p.) did not change the antinociception caused by any agonist or inosine.

## Discussion

Purine nucleosides such as adenosine and its primary metabolite inosine participate as extracellular signaling molecules, influencing synaptic transmission and modulating the activity of the nervous system (Cunha, 2001). In addition, it is recognized that adenosine and its analogs participate in several systems and have a significant role in the perception of pain at both peripheral and central sites in a variety of pain models in human and animals, including acute, neuropathic, and inflammatory pain (Sawynok, 1998; Sawynok and Liu, 2003). Results reported here indicate, to our knowledge for the first time, that systemic (intraperitoneal or oral) or central (intrathecal or intracerebroventricular) administration of inosine produced marked and dose-related antinociception when assessed in acetic acid-induced visceral nociception. Moreover, our results also show that inosine decreased the nociception during the second phase of the formalin test and reduced the nociceptive response caused by glutamate, which involves peripheral, spinal, and supraspinal sites (Beirith et al., 2002). Together, these results suggest that the antinociceptive action of inosine in acetic acid-, formalin-, and glutamate-induced pain could be caused by the inhibition of the release of proinflammatory mediators, such as prostaglandins, glutamate, histamine, and others. In addition, it has been shown that adenosine inhibits the release of cytokines and chemokines in activated macrophages and increases the production of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (Haskó et al., 2000; Garcia Soriano et al., 2001; Németh et al., 2005).

At present, few drugs are effective in treating chronic pain, and thus the search for new mechanisms that could be applied in chronic pain therapy has been essential. We also demonstrated that acute treatments of animals with inosine are effective in preventing mechanical and thermal allodynia caused by PSNL in mice. Chronically, inosine also presents antinociceptive action in mechanical allodynia induced by PSNL. The nociceptive response induced by PSNL occurs because of the release of multiple inflammatory and nociceptive mediators, producing an increased long-lasting discharge of primary sensory fibers that modifies neuronal,

neuro-glial, and neuro-immune cell phenotype and function in the central nervous system and induces hyperalgesia and allodynia (Ji and Woolf, 2001). The purine nucleoside adenosine plays an important role in pain modulation and might play an important role in neuropathic pain (Sawynok, 1998; Dunwiddie and Masino, 2001). Adenosine alleviates spontaneous pain in patients with neuropathic pain (Belfrage et al., 1995). Thus, our findings demonstrate that inosine, similar to adenosine, reduces neuropathic pain, and its effect could depend on the activation of  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors. In addition, we injected CFA into the paw of mice, and inosine decreased the nociception induced by CFA. Our results show that acute or chronic treatment of animals with inosine was effective in preventing the persistent mechanical allodynia caused by CFA. This effect probably involves the inhibition of protein kinases and anti-inflammatory properties of this nucleoside.

Another interesting finding of the present study was the demonstration, also for the first time, that inosine, given intraperitoneally, was able to reverse PMA- and bradykinin-induced mechanical and thermal hyperalgesia in the rat paw. Several inflammatory mediators produce nociception by peripheral and spinal sensory fibers sensitization through protein kinase activation, including protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA), and mitogen-activated kinases (Scholz and Woolf, 2002). Results of the present study also strongly suggest the involvement of protein kinase C, but not protein kinase A, in the antinociception caused by inosine. This notion was derived from data showing that inosine inhibited the overt mechanical and thermal hyperalgesia caused by intraplantar PMA injection (a PKC activator). Other evidence that supports this view involved the results demonstrating that inosine suppressed the mechanical and thermal hyperalgesia induced by bradykinin. Some studies propose that in nociception bradykinin binds to the  $B_2$  receptor, causing a direct activation of PKC (Ferreira et al., 2004), suggesting that PKC isoforms are involved in signal transduction of the  $B_2$  receptor. In contrast, inosine did not reduce nociception induced by prostaglandin  $E_2$  or forskolin, both indirect activators of protein kinase A (Parada et al., 2005).

In the present study, the involvement of  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors in the antinociceptive action of inosine in the writhing test is clearly demonstrated. Our results show that pretreatment of animals with DPCPX, 8-PT, or ZM241385 at doses that did not cause any effect by themselves significantly

reversed the antinociception caused by inosine. In addition, we observed that the antagonism of the adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptor by DPCPX or 8-PT and ZM241385 significantly inhibited the antinociception induced by adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptor agonists CHA and DPMA, respectively. In addition, HEMADO (an adenosine  $A_3$  receptor agonist) partially inhibited the antinociception induced by acetic acid. In this case, HEMADO could be acting on the  $A_1$  receptor, because DPCPX and 8-PT reversed this effect. Thus, our finding is in agreement with those reported by other authors, indicating that adenosine  $A_1$  receptor agonists produce a pronounced antinociception (Bastia et al., 2002; Sawynok and Liu, 2003).

Nevertheless, the role of the receptor  $A_{2A}$  in nociception has been intensely debated. Moreover, it has been demonstrated that  $A_{2A}$  receptor antagonists showed consistent antinociceptive activity (Doak and Sawynok, 1995), and hypoalgesia in mice lacking the adenosine  $A_{2A}$  receptor was observed (Ledent et al., 1997). In the formalin test, CGS 21680 [3-[4-[2-[[6-amino-9-((2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl)]purin-2-yl]aminol ethyl]phenyl]propanoic acid; agonist  $A_{2A}$ ] has been shown to produce both antinociceptive (Borghetti et al., 2002) and pronociceptive actions in rats (Doak and Sawynok, 1995). However, some authors have shown that the activation of the adenosine  $A_{2A}$  receptor has an antinociceptive role against the chemical (writhing test) and thermal model of pain beyond inflammatory and neuropathic pain tests (Lee and Yaksh, 1996; Poon and Sawynok, 1998; Pechlivanova and Georgiev, 2002; Loram et al., 2009). The antinociceptive effect of adenosine  $A_{2A}$  receptor activation could be at least in part caused by potassium channel activation (Regaya et al., 2004). In addition, DPMA, an  $A_2$  receptor agonist, produces antinociceptive action in the writhing test (Pechlivanova and Georgiev, 2002).

We demonstrated that DPCPX and 8-PT did not reverse the effect caused by DPMA, clearly demonstrating that the  $A_{2A}$  receptor is involved in antinociception induced by inosine. Our result disagrees with other studies showing that the antinociceptive effect of  $A_{2A}$  agonists occurs only in very high doses, when there is also activation of the  $A_1$  receptor (Ferré et al., 2007). Thus, involvement of the  $A_{2A}$  receptor could depend on the intensity and modality of the stimulus. Additional studies are required to determine precisely the role of the adenosine  $A_{2A}$  receptor in distinct locales (i.e., peripheral, spinal, or supraspinal) and under different situations. Although our results are in agreement with a study by Haskó et al. (2000) that shows that inosine inhibits inflammatory cytokines production and this effect was partially reversed by blockade of adenosine  $A_1$  and  $A_3$  receptors, we cannot affirm unequivocally that inosine binds to  $A_1$  and  $A_{2A}$  adenosine receptors. Another explanation for the antinociceptive effect caused by inosine would be an increase of adenosine's production after inosine administration, caused by a change on purinergic metabolism caused by inhibition of enzymes adenosine deaminase or ectoadenosine kinase. This action could lead to a greater supply of adenosine that activates their respective receptors. However, the effect caused by inosine is an interesting avenue of investigation and merits further study.

Our results also demonstrated that the  $A_{2B}$  receptor did not participate in the antinociceptive effect caused by inosine, because alloxazine (an antagonist  $A_{2B}$  receptor) did not

change the effect induced by inosine. In pain tests,  $A_3$  adenosine receptor knockout mice showed a decreased sensitivity to some painful stimuli (Fedorova et al., 2003) or did not differ compared with wild-type mice in their mechanical and heat sensitivity (Wu et al., 2002). Furthermore, an injection of  $A_3$  agonists produced transient pain-like behaviors and paw edema (Sawynok et al., 1999). Our study shows that the adenosine  $A_3$  receptor is not involved in the antinociceptive effect of inosine in the writhing test, because MRS-3777, a selective antagonist  $A_3$  receptor, was not capable of reducing the antinociception caused by inosine.

In conclusion, the present results indicate that inosine produces a pronounced effect against the nociception induced by acetic acid, formalin, and glutamate. In addition, inosine reduced the mechanical and thermal (cold stimuli) allodynia induced by PSNL and mechanical allodynia induced by CFA in mice. Moreover, inosine reduced mechanical and thermal (heat stimuli) hyperalgesia caused by algogenic substances (bradykinin and PMA) in rats. The mechanisms through which inosine exerts its action are currently under investigation, but an involvement of adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors and blockade of the PKC pathway seem largely to contribute to the antinociceptive effect of inosine.

#### Acknowledgments

We thank Dr. F. C. Meotti for the English revision of the manuscript.

#### References

- Bastia E, Varani K, Monopoli A, and Bertorelli R (2002) Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. *Neurosci Lett* **328**:241–244.
- Beirith A, Santos AR, and Calixto JB (2002) Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* **924**:219–228.
- Belfrage M, Sollevi A, Segerdahl M, Sjöland KF, and Hansson P (1995) Systemic adenosine infusion alleviates spontaneous and stimulus-evoked pain in patients with peripheral neuropathic pain. *Anesth Analg* **81**:713–717.
- Borghetti V, Przewlocka B, Labuz D, Maj M, Ilona O, and Pavone F (2002) Formalin-induced pain and mu-opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by  $A_1$  and  $A_{2A}$  adenosine agonists in mice. *Brain Res* **956**:339–348.
- Bortalanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache F, Yunes RA, and Calixto JB (2002) Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur J Pharmacol* **453**:203–208.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources, and different receptors. *Neurochem Int* **38**:107–125.
- Doak GJ and Sawynok J (1995) Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. *Eur J Pharmacol* **281**:311–318.
- Dunwiddie TV and Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**:31–55.
- Fedorova IM, Jacobson MA, Basile A, and Jacobson KA (2003) Behavioral characterization of mice lacking the  $A_3$  adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* **23**:431–447.
- Ferré S, Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SM, Huang ZL, Urade Y, and Kitchen I (2007) Adenosine  $A_2A$  receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol* **83**:332–347.
- Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, and Calixto JB (2001) Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **41**:1006–1012.
- Ferreira J, da Silva GL, and Calixto JB (2004) Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* **141**:787–794.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, and Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**:527–552.
- García Soriano F, Liaudet L, Marton A, Haskó G, Batista Lorigados C, Deitch EA, and Szabó C (2001) Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxemic shock. *Crit Care Med* **29**:703–708.
- Gomez G and Sitkovsky MV (2003) Differential requirement for  $A_2A$  and  $A_3$  adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood* **102**:4472–4478.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, and Joris J (1988) A new and sensitive

- method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**: 77–88.
- Haskó G, Kuhel DG, Németh ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, and Szabó C (2000) Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* **164**:1013–1019.
- Hunskaar S, Fasmer OB, and Hole K (1985) Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* **14**:69–76.
- Ji RR and Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* **8**:1–10.
- Koster R, Anderson M, and Beer EJ (1959) Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* **18**:412.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, and Parmentier M (1997) Aggressiveness, hyperalgesia, and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**:674–678.
- Lee YW and Yaksh TL (1996) Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antialloodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:1642–1648.
- Loram LC, Harrison JA, Sloane EM, Hutchinson MR, Sholar P, Taylor FR, Berkelhammer D, Coats BD, Poole S, Milligan ED, et al. (2009) Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain. *J Neurosci* **29**:14015–14025.
- Malmberg AB and Basbaum AI (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76**: 215–222.
- Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, and Haskó G (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* **175**:8260–8270.
- Osikowicz M, Mika J, Makuch W, and Przewlocka B (2008) Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* **139**:117–126.
- Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos AR, Yunes RA, and Calixto JB (2005) Antinociceptive properties of mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:310–318.
- Parada CA, Reichling DB, and Levine JD (2005) Chronic hyperalgesia priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKC $\epsilon$  second messenger pathways. *Pain* **113**:185–190.
- Pechlivanova DM and Georgiev VP (2002) Interaction of angiotensin II and adenosine A1 and A2A receptor ligands on the writhing test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **72**:23–28.
- Poon A and Sawynok J (1998) Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain* **74**:235–245.
- Randall LO and Seltito JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**:409–419.
- Regaya I, Pham T, Andreotti N, Sauze N, Carrega L, Martin-Eauclaire MF, Jouirou B, Peragut JC, Vacher H, Rochat H, et al. (2004) Small conductance calcium-activated K $^{+}$  channels, SKCa, but not voltage-gated K $^{+}$  (Kv) channels, are implicated in the antinociception induced by CGS21680, an A2A adenosine receptor agonist. *Life Sci* **76**:367–377.
- Rodrigues AL, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB, and Santos AR (2002) Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* **70**:1347–1358.
- Sawynok J (1998) Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* **347**:1–11.
- Sawynok J and Liu XJ (2003) Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* **69**:313–340.
- Sawynok J, Reid A, and Liu XJ (1999) Acute paw oedema induced by local injection of adenosine A(1), A(2), and A(3) receptor agonists. *Eur J Pharmacol* **386**:253–261.
- Schmidt AP, Böhmer AE, Antunes C, Schallenberg C, Porciúncula LO, Elisabethsky E, Lara DR, and Souza DO (2009) Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. *Br J Pharmacol* **156**:163–172.
- Scholz J and Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* **5**:1062–1067.
- Wu WP, Hao JX, Halldner-Henriksson L, Xu XJ, Jacobson MA, Wiesenfeld-Hallin Z, and Fredholm BB (2002) Decreased inflammatory pain due to reduced carrageenan-induced inflammation in mice lacking adenosine A3 receptors. *Neuroscience* **114**:523–527.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**:109–110.

---

**Address correspondence to:** Adair R. S. Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: arssantos@ccb.ufsc.br

---

# Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K<sup>+</sup> channels, and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the antinociceptive effect of inosine

Sérgio José Macedo-Junior · Francisney Pinto Nascimento ·  
Murilo Luiz-Cerutti · Adair Roberto Soares Santos

Received: 19 January 2012 / Accepted: 26 June 2012  
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

**Abstract** Inosine is the first metabolite of adenosine. It exerts an antinociceptive effect by activating the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. We have previously demonstrated that inosine exhibits antinociceptive properties in acute and chronic mice models of nociception. The aim of this study was to investigate the involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled receptors, as well as K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels, in the antinociception promoted by inosine in the formalin test. Mice were pretreated with pertussis toxin (2.5 µg/site, i.t., an inactivator of G<sub>i/o</sub> protein); after 7 days, they received inosine (10 mg/kg, i.p.) or morphine (2.5 mg/kg, s.c., used as positive control) immediately before

the formalin test. Another group of animals received tetraethylammonium (TEA) or 4-aminopyridine (4-AP) (1 µg/site, i.t., a non-specific voltage-gated K<sup>+</sup> channel blockers), apamin (50 ng/site, i.t., a small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker), charybdotoxin (250 pg/site, i.t., a large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker), glibenclamide (100 µg/site, i.t., an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker) or CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/site, i.t.). Afterwards, the mice received inosine (10 mg/kg, i.p.), diclofenac (10 mg/kg, i.p., a positive control), or morphine (2.5 mg/kg, s.c., a positive control) immediately before the formalin test. The antinociceptive effect of inosine was reversed by the pre-administration of pertussis toxin (2.5 µg/site, i.t.), TEA, 4-aminopyridine, charybdotoxin, glibenclamide, and CaCl<sub>2</sub>, but not apamin. Further, all K<sup>+</sup> channel blockers and CaCl<sub>2</sub> reversed the antinociception induced by diclofenac and morphine, respectively. Taken together, these data suggest that the antinociceptive effect of inosine is mediated, in part, by pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptors and the subsequent activation of voltage-gated large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels or inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. Finally, small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are not involved in the antinociceptive effect of inosine.

S. J. Macedo-Junior · F. P. Nascimento · M. Luiz-Cerutti ·  
A. R. S. Santos (✉)  
Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação,  
Departamento de Ciências Fisiológicas,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Campus Trindade,  
Florianópolis, SC 88040-900, Brazil  
e-mail: arssantos@ccb.ufsc.br

S. J. Macedo-Junior · F. P. Nascimento · A. R. S. Santos  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Campus Trindade,  
Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

M. Luiz-Cerutti  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Campus Trindade,  
Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

**Keywords** Inosine · Pain · Potassium channels · Calcium channels · Pertussis toxin · Formalin test

## Introduction

Inosine, a metabolite of the purinergic system, is an endogenous nucleoside produced through the breakdown of adenosine in intracellular and extracellular spaces [1–3]. Purine

54 nucleosides, such as adenosine and its primary metabolite,  
 55 inosine, are low-molecular-weight molecules that participate  
 56 in a wide variety of intracellular biochemical processes.  
 57 Nucleosides also have important roles as extracellular sig-  
 58 naling molecules [4]. Inosine acts directly on the coronary  
 59 artery, causing relaxation [5] and reducing the total peripheral  
 60 resistance [6, 7]. Besides cardiovascular effects, inosine also  
 61 exhibits immunomodulatory and neuroprotective effects,  
 62 stimulating the production of the anti-inflammatory cytokine,  
 63 IL-10 [8]. Inosine potently inhibits the release of inflammatory  
 64 cytokines and chemokines [9], reduces the migration of human  
 65 monocytes and neutrophils in vitro, and decreases TNF- $\alpha$   
 66 production [10].

67 We have previously demonstrated that inosine exhibits  
 68 antinociceptive properties in acute and chronic rodent  
 69 models of nociception. Furthermore, we have shown that  
 70 the antinociceptive action of inosine involves the activa-  
 71 tion of the  $A_1$  and  $A_{2A}$  adenosine receptors, but not the  
 72  $A_{2B}$  receptor [11].

73 Notably, the activation of adenosine receptors involves  
 74 various intracellular transduction mechanisms, including  
 75 pathways activated by  $G_{i/o}$  and  $G_{s/q}$ .  $A_1$  receptor is cou-  
 76 pled to  $G_{i/o}$  protein family. Most of the biological effects  
 77 induced by  $A_1$  receptor activation, including antinocicep-  
 78 tive effect, are due to inhibition of cAMP second mes-  
 79 senger, consequence of the inhibition of adenylate cyclase  
 80 activity by the  $\alpha$  inhibitory G-protein subunit [12–14].  
 81 Furthermore,  $A_1$  receptor agonists can directly activate  $K^+$   
 82 channels, promoting the hyperpolarization of the cell  
 83 membrane and reduction of neuronal excitability.  $A_{2A}$   
 84 receptor is coupled to  $G_s$  protein family.  $A_{2A}$  receptor  
 85 activation induces cAMP increased production due to  
 86 increased activity of the enzyme adenylate cyclase pro-  
 87 moted by the  $\alpha$  excitatory G-protein subunit. With the  
 88 enhancement in cAMP intracellular levels, PKA becomes  
 89 able to activate several pathways through PKC, calcium  
 90 channels, cAMP responsive element-binding (CREB),  
 91 MAPK, PLC activation, which are all involved in the  
 92 activation of pain response. Furthermore,  $A_{2A}$  receptor  
 93 agonists can directly open  $K^+$  channels, promoting the  
 94 hyperpolarization of the cell membrane and reduction of  
 95 neuronal excitability, which are all involved in the inhi-  
 96 bition of pain response [12, 13, 15, 16]. Thus, the role of  
 97  $A_1R$  in pain control is well described; however, there are  
 98 conflicting results regarding the role of the  $A_{2A}R$  in pain  
 99 and nociception.

100 According to the above, several studies have shown  
 101 that agonists, especially the  $G_{i/o}$ -protein, of several G-  
 102 protein-coupled receptors such as adenosine receptors  
 103 open specific  $K^+$  channels and inhibit voltage-gated  
 104  $Ca^{2+}$  channels in neurons; this inhibition reduces  $Ca^{2+}$   
 105 influx and thereby decreases the  $Ca^{2+}$  intracellular con-  
 106 centration to produce antinociception [17–19]. For this

reason, development of new antinociceptive drugs has  
 begun targeting  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels themselves. Be-  
 cause inosine exerts its effects through the activation of  
 adenosine receptors, the purpose of the present study  
 was to investigate the role of pertussis toxin-sensitive  
 G-protein coupled receptors as well as the participation  
 of different types of  $K^+$  channels and voltage-gated  $Ca^{2+}$   
 channels in the antinociception caused by inosine. Fur-  
 thermore, this study used morphine and diclofenac as  
 positive controls because many literature data have indi-  
 cated that its antinociceptive effects involve, at least in  
 part, the mechanisms here investigated.

## Materials and methods

*Animals* Experiments were conducted using male Swiss  
 mice (25–35 g) maintained at  $22 \pm 2$  °C with free access  
 to water and food and housed under a 12:12 h light:dark  
 cycle. Animals were acclimatized to the laboratory for at  
 least 1 h before testing and were used only once through-  
 out the experiments. All experiments were approved by  
 the Ethics Committee for Animal Research of the Uni-  
 versidade Federal de Santa Catarina (Protocol No.  
 PP00484), and all efforts were made to minimize animal  
 suffering and to reduce the number of animals used in the  
 experiments.

*Drugs* Reagents were purchased from suppliers as indi-  
 cated: formalin (Merck, Darmstadt, Germany), inosine  
 and pertussis toxin (Sigma Chemical Co., St. Louis,  
 USA), diclofenac (Medley S/A, São Paulo, Brazil), mor-  
 phine hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany), tet-  
 raethylammonium (TEA), 4-aminopyridine, charybdotoxin,  
 apamin, and glibenclamide (Tocris Cookson Inc., Ellisville,  
 USA). Diclofenac and glibenclamide were dissolved in saline  
 with 5 % Tween 80, whereas all the other drugs were dis-  
 solved in isotonic (0.9 % NaCl) saline solution immediately  
 before use.

*Drug administration* Pertussis toxin,  $K^+$  channel blockers  
 and  $CaCl_2$  were administered by intrathecal (i.t.) injec-  
 tion in a volume of 5  $\mu$ l per mouse. To perform an i.t.  
 drug injection, a 30½-gauge stainless needle attached to  
 a 50- $\mu$ l Hamilton microsyringe was inserted between  
 the L5 and L6 vertebrae of conscious mice, and 5  $\mu$ l  
 of drug solution was injected into the subarachnoid  
 space (modified from Hylden and Wilcox [20]). Inosine  
 (10 mg/kg) and diclofenac (10 mg/kg, used as a positive  
 control) were administered by i.p. injection in a volume  
 of 10 ml/kg body weight. Morphine (2.5 mg/kg, s.c.,  
 used as a positive control) was injected by s.c. injection  
 in a volume of 10 ml/kg body weight. All procedures,



155 doses, and administration routes of the various drugs  
 156 were chosen on the basis of previous studies [22–25, 36] or  
 157 in preliminary experiments carried out in our laboratory (data  
 158 not shown).

159 **Formalin test** The procedure used was essentially the  
 160 same as that described previously [21] with minor mod-  
 161 ifications. Animals received 20 µl of a 2.5 % formalin  
 162 solution (0.92 % formaldehyde) made up in saline,  
 163 injected intraplantarly (i.pl.) into the ventral surface of  
 164 the right hindpaw. Animals were observed from 0–  
 165 5 min (neurogenic phase) and from 15–30 min (inflam-  
 166 matory phase). Animals received inosine (10 mg/kg,  
 167 i.p.), diclofenac (10 mg/kg, i.p.) or morphine (2.5 mg/  
 168 kg, s.c.) 30 min beforehand. Control animals received  
 169 vehicle (10 ml/kg, i.p.). After the i.pl. formalin injec-  
 170 tion, animals were immediately placed in a glass cylin-  
 171 der 20 cm in diameter. The time each spent licking the  
 172 injected paw was recorded with a chronometer and  
 173 considered indicative of nociception. In the current  
 174 study, we noticed the behavior only in the inflammatory  
 175 phase of the formalin test due to the occurrence of  
 176 antinociception caused by inosine solely in this phase  
 177 [11].

178 **Role of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled**  
 179 **receptors**

180 To determine the involvement of G<sub>i/o</sub> protein-coupled recep-  
 181 tors in the antinociceptive action of inosine, mice were pre-  
 182 treated with pertussis toxin (2.5 µg/site, i.t.), an inactivator  
 183 of G<sub>i/o</sub> protein. A control group was pretreated with saline  
 184 (5 µl/site, i.t.). The experiment was carried out as described  
 185 by Meotti et al. [22]. Seven days after the pretreatment, mice  
 186 received vehicle (10 ml/kg), inosine (10 mg/kg, i.p.), or  
 187 morphine (2.5 mg/kg, s.c.) as a positive control. After  
 188 30 min, the animals received an injection of formalin  
 189 2.5 % (20 µl/site, i.pl.).

190 **Role of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels on the antinociceptive effect**  
 191 **of inosine**

192 We also investigated the possible role played by different  
 193 types of potassium and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the  
 194 antinociceptive action of inosine during the second phase of  
 195 the formalin test. Animals were pretreated by intrathecal  
 196 (i.t.) route with TEA (1 µg/site, a non-selective blocker of  
 197 voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels), 4-aminopyridine (1 µg/site,  
 198 a non-selective blocker of voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels),  
 199 apamin (50 ng/site, a blocker of small (or low)-conductance  
 200 Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels), charybdotoxin (250 pg/site, a  
 201 blocker of large (or fast)-conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>  
 202 channels), glibenclamide (100 µg/site, a blocker of ATP-

sensitive K<sup>+</sup> channels), and CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/site). After  
 203 15 min, they received inosine (10 mg/kg, i.p.), diclofenac  
 204 (10 mg/kg, i.p.), or morphine (2.5 mg/kg, s.c.). The noci-  
 205 ceptive responses to formalin were recorded 30 min after the  
 206 administration of inosine, diclofenac, or morphine (used as  
 207 positive control).  
 208

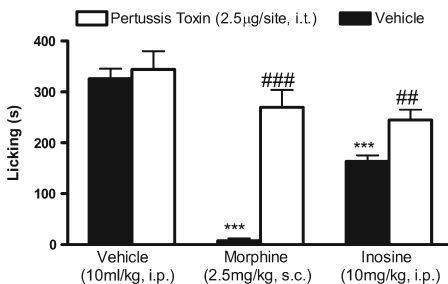
209 **Statistics**

The results are presented as the mean (S.E.M.) obtained  
 210 using GraphPad software (GraphPad software, San Diego,  
 211 CA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by  
 212 the Newman–Keuls test. *P* values less than 0.05 were con-  
 213 sidered significant.  
 214

215 **Results**

216 **Involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled**  
 217 **receptors in the inosine antinociceptive effect**

218 To perform the following experiments, we used inosine  
 219 10 mg/kg, i.p. The dose was selected based on our recently  
 220 published study [11]. The results illustrated in Fig. 1 shows  
 221 that the intrathecal administration of pertussis toxin, an  
 222 inactivator of G<sub>i/o</sub> protein (2.5 µg/site, i.t. for 7 consecutive days,  
 223 resulted in complete inhibition of morphine (2.5 mg/  
 224 kg, s.c.)-induced antinociception when assessed in formalin-  
 225 induced nociception. Under the same conditions, pertussis  
 226 toxin partially, but significantly, inhibited the antinociceptive  
 227 effect promoted by inosine (10 mg/kg, i.p.).



**Fig. 1** Effect of pertussis toxin pretreatment on the antinociception induced by inosine. Mice were pretreated by intrathecal injection of pertussis toxin 7 days before intraperitoneal administration of inosine or diclofenac. Values are expressed as the mean+SEM. The asterisks denote significance levels when compared with the vehicle-treated group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test). \*\**P*< 0.01; \*\*\**P*<0.001. Number sign indicates a significant reversal of inosine or diclofenac antinociceptive effects

228 Involvement of potassium channels in the inosine  
 229 antinociceptive effect

230 The results depicted in Fig. 2a–e show the effect of the K<sup>+</sup>  
 231 channel blockers in the antinociceptive effect promoted by  
 232 inosine. Intrathecal pretreatment of mice with TEA (1 μg/site)  
 233 and 4-aminopyridine (1 μg/site) significantly reversed the  
 234 antinociceptive effect of inosine (Fig. 2a, b). Figure 2c, d  
 235 shows that charybdotoxin (250 pg/site), but not apamin  
 236 (50 ng/site), prevented the antinociception caused by inosine.  
 237 Figure 2e shows that glibenclamide (100 μg/site) reversed the  
 238 antinociceptive effect of inosine. However, pretreatment of  
 239 mice with TEA, 4-aminopyridine, charybdotoxin, apamin,  
 240 and glibenclamide prevented the antinociceptive action caused  
 241 by diclofenac (10 mg/kg, i.p.) (see [23] and Fig. 2a–e).  
 242 Moreover, when administered individually, none of the K<sup>+</sup>  
 243 channel blockers affected formalin-induced pain.

244 Involvement of calcium channels in the inosine  
 245 antinociceptive effect

246 Pretreatment with CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/site, i.t.) prevented the  
 247 antinociceptive effect of inosine and morphine on formalin-  
 248 induced pain (Fig. 3). When administered individually,  
 249 CaCl<sub>2</sub> did not affect the nociception caused by formalin.

250 **Discussion**

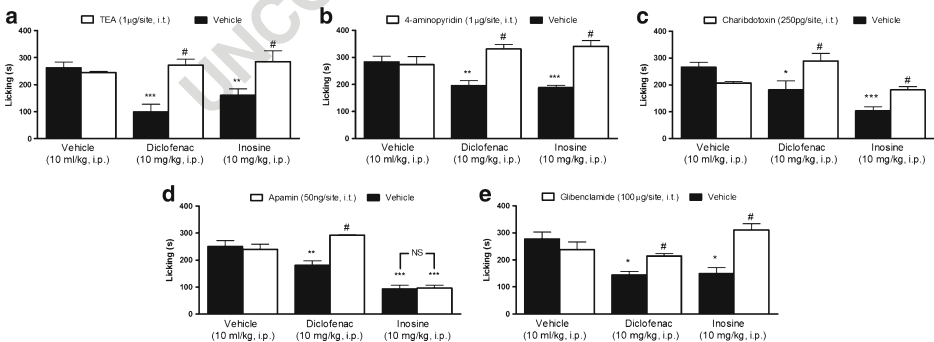
251 In our recent study, we demonstrated that inosine effectively  
 252 reduces acetic acid-, glutamate-induced pain and the

inflammatory phase of the formalin test through the activa-  
 tion of the A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors [11]. The present  
 study extends the knowledge of inosine actions and shows  
 that pertussis toxin-sensitive G<sub>i/o</sub>-protein coupled receptors,  
 K<sup>+</sup> channels and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels are involved  
 in the antinociceptive effect of inosine.

Many chemical drugs, such as opioids, GABAergic ago-  
 nists, and α-2 agonists among others, are ligands and acts  
 via pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptors  
 [24]. Of note, a ligand binding to its receptor activates the  
 coupled G-protein, dissociating the inhibitory subunit αi  
 from the initial trimer formed by the subunits αβγ. This  
 dissociation between the subunits Gαi and Gβγ initiates an  
 orchestrated cascade of intracellular events responsible for  
 the antinociceptive effect of the ligand, like morphine for  
 example [25–27].

Pertussis toxin inactivates the inhibitory G<sub>i/o</sub>-protein via  
 ribosylation of the α-subunit. The inactivated G<sub>i/o</sub> protein is  
 not able to inhibit adenylate cyclase, the enzyme responsible  
 for the elevation of intracellular cAMP. Thus, inactivation of  
 the G<sub>i/o</sub> protein by pertussis toxin causes an increase in  
 intracellular cAMP levels [28]. Therefore, the pertussis toxin  
 is able to prevent activation of the intracellular cascade of  
 events responsible for the antinociceptive effect of morphine  
 or another ligand of pertussis toxin-sensitive G-protein cou-  
 pled receptors.

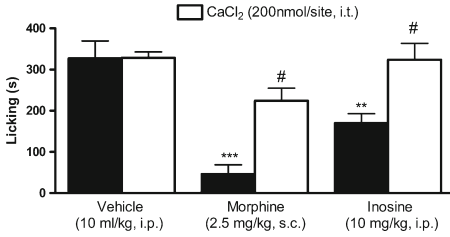
In the current study, we found that pertussis toxin pre-  
 treatment was able to reverse morphine- (used as a positive  
 control) and inosine-induced antinociception. These data  
 suggest that inosine-induced antinociception is mediated  
 by pertussis toxin-sensitive G<sub>i/o</sub>-protein coupled receptors.



**Fig. 2** Effect of the voltage-dependent K<sup>+</sup> channel blockers, tetraethylammonium (TEA, panel a) and 4-aminopyridine (4-AP, panel b); the large- and small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blockers, charybdotoxin (panel c) and apamin (panel d), and the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel inhibitor, glibenclamide (panel e), on the antinociception induced by inosine. Mice were pretreated with an intrathecal injection of 4-AP, TEA, apamin, charybdotoxin, or glibenclamide

15 min before intraperitoneal administration of inosine or diclofenac. Values are expressed as the mean ± SEM. The asterisks denote significance levels when compared with vehicle group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test). \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. Number sign indicates a significant reversal of inosine or diclofenac antinociceptive effects

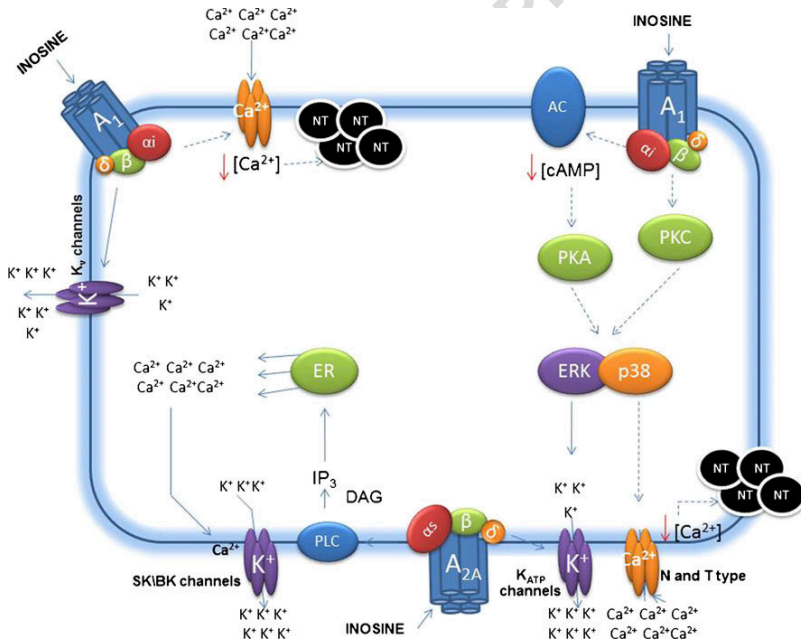
Purinergic Signalling



**Fig. 3** Effect of pretreatment with CaCl<sub>2</sub> (200 nmol/site) on the antinociceptive induced by inosine. Mice were pretreated with an intrathecal injection of CaCl<sub>2</sub> 15 min before intraperitoneal administration of inosine or subcutaneous administration of morphine. Values are expressed as the mean±SEM. The asterisks denote significance levels when compared with vehicle group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test). \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001. Number sign indicates a significant reversal of inosine and morphine antinociceptive effects

Based on our previous data, we further suggest that the A<sub>1</sub> adenosine receptor is the main G-protein coupled receptor responsible for transducing the antinociceptive effect of inosine. Activation of G<sub>i/o</sub>-protein coupled receptors can promote the opening of some types of K<sup>+</sup> channels. Agonists of G-protein coupled receptors such as opioid, adrenergic, serotonergic, GABAergic, cannabinoid, and adenosinergic receptors are able to open K<sup>+</sup> channels and consequently decrease nociception [29–32]. K<sup>+</sup> channels are classified by their protein structures and their phylogenetic relationships; the four types include voltage-gated (K<sub>v</sub>), calcium-activated (K<sub>Ca</sub>), inward rectifier (K<sub>ir</sub>), and two-pore (K<sub>2P</sub>) K<sup>+</sup> channels [29, 33]. Several classical analgesics and NSAIDs, such as tramadol, diclofenac, meloxicam, and ketorolac, also inhibit the inflammatory phase of the formalin test. In light of the classification of the K<sup>+</sup> channels, the analgesic action of these drugs may be partially explained by the opening of distinct K<sup>+</sup> channels [29, 34–36].

284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301



**Fig. 4** Probable intracellular mechanisms involved in the inosine effect, from receptor interaction through modulation of ion channels. The continuous arrow indicates activation, and the dot arrow indicates inhibition. A<sub>1</sub> (A<sub>1</sub> Adenosine receptor); A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub> Adenosine receptor); αi, αs, β, and δ (G-protein subunits); K<sub>v</sub> channels (voltage-dependent potassium channels); SK/BK channels (small- and large-conductance Ca<sub>2+</sub>-activated potassium channels); K<sub>ATP</sub> channels

(ATP-sensitive potassium channels); N and T types (N and T voltage-dependent calcium channels); AC (adenylate cyclase); PLC (phospholipase C); cAMP (cyclic adenosine monophosphate); IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate); DAG (diacylglycerol); PKA (protein kinase A); PKC (protein kinase C); ERK and p38 (mitogen-activate protein kinases); ER (endoplasmic reticulum); K<sup>+</sup> (potassium ion); Ca<sub>2+</sub> (calcium ion); and NT (neurotransmitter)

302 Several studies have demonstrated that activation of L-  
 303 arginine-NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway is involved in the  
 304 antinociceptive effect of diclofenac and other NSAIDs  
 305 [37–40]. L-arginine is used as a substrate for NOS in order  
 306 to produce NO. NO, in turn, is able to activate the enzyme  
 307 guanylate cyclase, stimulating the synthesis of cGMP. Finally,  
 308 cGMP can interact with different targets, among them, K<sup>+</sup>  
 309 channels, promoting the opening these channels [for review  
 310 see 41]. The opening of K<sup>+</sup> channels leads to hyperpolariza-  
 311 tion of the cell membrane hindering the transmission of noci-  
 312 ceptive stimulus along the CNS. Considering this signaling  
 313 pathway, the opening of K<sup>+</sup> channels represents the final step  
 314 involved in the antinociceptive effect of diclofenac. Therefore,  
 315 blockage of different types of K<sup>+</sup> channels using different  
 316 blockers can reduce the analgesic effect promoted by diclofenac,  
 317 indicating that its analgesic effect depends on the open-  
 318 ing of K<sup>+</sup> channels.

319 The present investigation showed that the antinociceptive  
 320 effect of inosine was blocked by pretreatment with intrathecal  
 321 TEA and 4-aminopyridine, non-selective voltage-gated K<sup>+</sup>  
 322 channel inhibitors, suggesting that the opening of this kind  
 323 of K<sup>+</sup> channel is important for the antinociception induced by  
 324 inosine. Moreover, the intrathecal administration of charyb-  
 325 dotoxin, but not apamin, a small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated  
 326 K<sup>+</sup> channel blocker, prevented the antinociceptive effect pro-  
 327 duced by inosine, suggesting the participation of a large-  
 328 conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in the effect caused  
 329 by inosine. Charybdotoxin also inhibits intermediate-  
 330 conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels [42]. Therefore, the  
 331 blockade of the inosine-induced antinociceptive effect by  
 332 charybdotoxin suggests that inosine may induce its antinoci-  
 333 ceptive effect through the activation of intermediate- and  
 334 large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. However, be-  
 335 cause it is possible that charybdotoxin also blocks voltage-  
 336 gated K<sup>+</sup> channels [43], we cannot unequivocally affirm that  
 337 large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are involved in  
 338 inosine-induced antinociception in the formalin test. Intrathe-  
 339 cal administration of glibenclamide reversed the antinocicep-  
 340 tive effect of inosine, suggesting that inosine activates ATP-  
 341 sensitive K<sup>+</sup> channels to reduce formalin-induced pain. Alone  
 342 and at the concentrations used in this work, the K<sup>+</sup> channel  
 343 blockers (TEA, 4-aminopyridine, charybdotoxin, apamin, and  
 344 glibenclamide) did not modify the pain threshold induced by  
 345 formalin.

346 Notably, hyperpolarization resulting from the activation  
 347 of K<sup>+</sup> channel subtypes, especially the large-conductance  
 348 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, reduces the amount of neuro-  
 349 transmitters released by shortening the duration of depo-  
 350 larization that allows Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-gated  
 351 Ca<sup>2+</sup> channels [44].

352 The analgesic action of some important drugs, like mor-  
 353 phine and Prilist<sup>®</sup>, can be partially explained by the closing  
 354 of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (VGCCs) and subsequent

355 reduction of Ca<sup>2+</sup> influx. The VGCCs are divided into  
 356 two categories: high-voltage-activated channels, including  
 357 L-, N-, P/Q- and R-type Ca<sup>2+</sup> channels that require strong  
 358 depolarization for activation, and low-voltage-activated  
 359 T-type Ca<sup>2+</sup> channels that can be triggered by much milder  
 360 depolarization. In the central nervous system, these channels  
 361 carry out a variety of actions, regulating activity-dependent  
 362 gene expression, synaptic transmission and neuronal excit-  
 363 ability. The VGCCs most extensively studied in nociception  
 364 are the N-, P/Q- and T-type Ca<sup>2+</sup> channels [45–47].

365 It is well established that an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>  
 366 has an important role in neurotransmitter release, cell mem-  
 367 brane excitability, activation of intracellular proteins, and  
 368 reduction of the pain threshold [48–50]. The concentration  
 369 of intracellular Ca<sup>2+</sup> is regulated by several mechanisms;  
 370 one such mechanism is the influx of Ca<sup>2+</sup> via VGCCs  
 371 through the plasma membrane. The VGCC channels are  
 372 inhibited by G<sub>i/o</sub>-protein-coupled receptors. Consequently,  
 373 intracellular Ca<sup>2+</sup> levels are reduced and the pain threshold  
 374 decreases [19]. Our results demonstrated that the pretreat-  
 375 ment of mice with CaCl<sub>2</sub> prevented the antinociceptive  
 376 effect promoted by inosine, suggesting the participation of  
 377 voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the effect caused by inosine.  
 378 Figure 4 shows the probable mechanism involved in the  
 379 antinociceptive effect of inosine, from receptor activation  
 380 through the modulation of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels.

## 381 Conclusion

382 Our results confirm and extend previous data that show that  
 383 inosine exhibits a significant antinociceptive action during  
 384 the inflammatory phase of formalin-induced pain in mice.  
 385 Furthermore, this effect requires pertussis toxin G<sub>i/o</sub>-protein  
 386 coupled receptors, voltage-gated K<sup>+</sup> channels, large-  
 387 conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup>  
 388 channels, but does not involve the opening of small-  
 389 conductance K<sup>+</sup> channels. Inosine-induced antinociception  
 390 also involves the inhibition of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels.  
 391

392 **Acknowledgements** This work was supported by grants from Con-  
 393 selho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
 394 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior  
 395 (CAPES), Brazil. F.P. Nascimento is a Ph.D. student in Pharmacology;  
 396 S. J. Macedo-Junior Msc. student in Pharmacology and M. Luiz-Cerutti  
 397 Msc. student in Neuroscience. They thank CNPq and CAPES for finan-  
 398 cial support. Dr. A.R.S. Santos is a CNPq recognized researcher (IC  
 399 category) and has additional financial support from CNPq.

## 400 References

- 402 1. Barankiewicz J, Cohen A (1985) Purine nucleotide metabolism in  
 403 resident and activated rat macrophages in vitro. Eur J Immunol  
 404 15:627–631

- 405 2. Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Haskó G, Marton A,  
406 Szabo C, Salzman AL (2003) Inosine reduces inflammation and  
407 improves survival in a murine model of colitis. *Am J Physiol*  
408 *Gastrointest Liver Physiol* 284:138–144
- 409 3. Sawynok J, Liu XJ (2003) Adenosine in the spinal cord and  
410 periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*  
411 69:313–340
- 412 4. Haskó G, Sitkovsky MV, Szabó C (2004) Immunomodulatory and  
413 neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 25:152–  
414 157
- 415 5. Aviado DM (1983) Inosine: a naturally occurring cardiotoxic  
416 agent. *J Pharmacol* 4:47–71
- 417 6. Jones CE, Thomas JX Jr, Devous MD, Norris CP, Smith EE (1977)  
418 Positive inotropic response to inosine in the in situ canine heart.  
419 *Am J Physiol* 233:438–443
- 420 7. Seesko RC, Zimmer GH (1990) Hemodynamic effects of  
421 inosine in combination with positive and negative inotropic  
422 drugs: studies on rats in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:  
423 249–256
- 424 8. Gomez G, Sitkovsky MV (2003) Differential requirement for A<sub>2A</sub>  
425 and A<sub>3</sub> adenosine receptors for the protective effect of inosine in  
426 vivo. *Blood* 102:4472–4478
- 427 9. Garcia Soriano F, Liaudet L, Marton A, Haskó G, Batista Lorigados  
428 C, Deitch EA, Szabó C (2001) Inosine improves gut permeability  
429 and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care*  
430 *Med* 29:703–708
- 431 10. Marton A, Pacher P, Murthy KG, Németh ZH, Haskó G,  
432 Szabó C (2001) Anti-inflammatory effects of inosine in human  
433 monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. *Int J Mol Med*  
434 8:617–621
- 435 11. Nascimento FP, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF, Macedo  
436 SJ Jr, Lima DAN, Almeida RC, Ostroski RM, Rodrigues ALS,  
437 Santos ARS (2010) Inosine reduces pain-related behavior in  
438 mice: involvement of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor subtypes  
439 and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 334:590–  
440 598
- 441 12. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol*  
442 *Life Sci* 64:1471–1483
- 443 13. Jacobson KA, Gao GZ (2006) Adenosine receptors as therapeutic  
444 targets. *Nat Rev Drug Discov* 5:247–264
- 445 14. Sawynok J (1998) Adenosine receptor activation and nociception.  
446 *Eur J Pharmacol* 347:1–11
- 447 15. Cunha RA, Ferré S, Vaugeois JM, Chen JF (2008) Potential  
448 therapeutic interest of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in psychiatric  
449 disorders. *Curr Pharm Des* 14:1512–1524
- 450 16. Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P (2003) Pharmacology  
451 of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and therapeutic applications. *Curr Top*  
452 *Med Chem* 3:413–426
- 453 17. North RA (1989) Drug receptors and the inhibition of nerve cells.  
454 *Br J Pharmacol* 98:13–28
- 455 18. Perez-Reyes E (2010) G protein-mediated inhibition of Ca<sub>v</sub>3.2  
456 T-type channels revisited. *Mol Pharmacol* 77:136–138
- 457 19. Zamponi GW, Snutch TP (1998) Modulation of voltage-  
458 dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol*  
459 8:351–356
- 460 20. Hylden JL, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice. A new  
461 technique. *Eur J Pharmacol* 67:313–316
- 462 21. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K (1985) Formalin test in mice, a  
463 useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*  
464 14:69–76
- 465 22. Meotti FC, Fachineto R, Maffi LC, Missau FC, Pizzolatti MG,  
466 Rocha JBT, Santos ARS (2007) Antinociceptive action of myricitrin:  
467 involvement of the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol*  
468 567:198–205
- 469 23. Ortiz MI, Lozano-Cuenca J, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández  
470 G (2008) Additive interaction between peripheral and central  
mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 91:32–37
24. Hoehn K, Reid A, Sawynok J (1988) Pertussis toxin inhibits antinociception produced by intrathecal injection of morphine, noradrenaline and baclofen. *Eur J Pharmacol* 146:65–72
25. Prather PL, Loh HH, Law PY (1994) Interaction of delta-opioid receptors with multiple G proteins: a non-relationship between agonist potency to inhibit adenylyl cyclase and to activate G proteins. *Mol Pharmacol* 45:997–1003
26. Smart D, Hirst RA, Hirota K, Grand DK, Lambert DG (1997) The effects of recombinant rat mu-opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and adenylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 120:1165–1171
27. Rodrigues AR, Duarte ID (2000) The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>) channels. *Br J Pharmacol* 129:110–114
28. Dolphin AC, Prestwich SA (1985) Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature* 316:148–150
29. Ocaña M, Cendán CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM (2004) Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol* 500:203–219
30. Sanchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T, Seino S (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol* 507:315–324
31. Ocaña M, Baeyens JM (1994) Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in antinociception induced by R-PIA, an adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch pharmacol* 350:57–62
32. Robles LI, Barrios M, Del Pozo E, Dordal A, Baeyens JM (1996) Effects of K<sup>+</sup> channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 295:181–188
33. Gutman GA, Chandry KG, Aldeman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuchi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology: XLII. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583–586
34. Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Granados-Soto V (2005) Pharmacological evidence for the activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by meloxicam in the formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 81:725–731
35. Yalcin I, Asku F (2005) Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. *Pharmacol Biochem Behav* 80:69–75
36. Ortiz MI, Torres-López JE, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V (2002) Pharmacological evidence for the activation of K<sup>+</sup> channels by diclofenac. *Eur J Pharmacol* 438:85–91
37. Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V (2001) Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 426:39–44
38. Alves D, Duarte I (2002) Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrene. *Eur J Pharmacol* 444:47–52
39. Ortiz MI, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G (2003) The NOcGMP-K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 76:187–195
40. Dégica-Campos M, López-Muñoz FJ (2004) Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel

537 cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *Eur J Pharmacol* 484:193–199

538

539 41. Soares AC, Duarte ID (2001) Dibutyl-*cyclic* GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. *Br J Pharmacol* 134:127–131

540

541

542 42. Price M, Lee SC, Deutsch C (1989) Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 86:10171–10175

543

544

545 43. Possani LD, Selisko B, Gurrola GB (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels. *Perspect Drug Disc Des* 15(16):15–40

546

547

548 44. Hu H, Shao LR, Chavoshy S et al (2001) Presynaptic Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 21:9585–9597

549

550

551

567

45. McGivern JG, McDonough SI (2004) Voltage-gated calcium channels as targets for the treatment of chronic pain. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:457–478

552

553

554

555 46. Vanegas H, Schaible H (2000) Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 85:9–18

556

557

558 47. Yaksh TL (2006) Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 7:S13–S30

559

560 48. Prado WA (2001) Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res* 34:449–461

561

562 49. Cervero F, Laird JMA (2003) Role of ions channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. *Curr Opin Pharmacol* 3:608–612

563

564 50. Ward DT (2004) Calcium receptor-mediated intracellular signaling. *Cell Calcium* 35:217–228

565

566

UNCORRECTED PROOF

## **ANEXO 2 - OUTRAS PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTA TESE DE DOUTORADO**

### **Capítulo de Livro (1)**

**Nascimento, FP; Macedo-Júnior, SJ; Santos, ARS (2012).** The Involvement of Purinergic System in Pain: Adenosine Receptors and Inosine as Pharmacological Tools in Future Treatments, Pharmacology, Dr. Luca Gallelli (Ed.), ISBN: 978-953-51-0222-9, InTech.





### ANEXO 3 - OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Figueredo SM\*, **Nascimento FP\***, Freitas CS, Baggio CH, Soldi C, Pizzolatti MG, de Ibarrola Mdel C, de Arrua RL, Santos AR. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(3):603-9. \*Ambos são primeiro autores

Martins DF, Mazzardo-Martins L, Gadotti VM, **Nascimento FP**, Lima DA, Speckhann B, Favretto GA, Bobinski F, Cargin-Ferreira E, Bressan E, Dutra RC, Calixto JB, Santos AR. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain.* 2011;152(11):2653-61.

Martins DF, Rosa AO, Gadotti VM, Mazzardo-Martins L, **Nascimento FP**, Egea J, López MG, Santos AR. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. *J Pain.* 2011; 12(3):315-22.

Marcon R, Luiz AP, Werner MF, Freitas CS, Baggio CH, **Nascimento FP**, Soldi C, Pizzolatti MG, Santos AR. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate. *Brain Res.* 2009; 27;1295:76-88.

Ribas CM, Meotti FC, **Nascimento FP**, Jacques AV, Dafre AL, Rodrigues AL, Farina M, Soldi C, Mendes BG, Pizzolatti MG, Santos AR. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 103(1):43-7.