

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**AÇÃO DA ADENOSINA EXTRACELULAR SOBRE UMA LINHAGEM DE CÉLULA
ESTRELADA HEPÁTICA TRATADA COM TNF- α :
PAPEL DO RECEPTOR A_{2B}**

Fernanda Rafaela Jardim

**Orientador
Elena Aida Bernard**

**Porto Alegre
2008**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**AÇÃO DA ADENOSINA EXTRACELULAR SOBRE UMA LINHAGEM DE CÉLULA
ESTRELADA HEPÁTICA TRATADA COM TNF- α :
PAPEL DO RECEPTOR A_{2B}**

Fernanda Rafaela Jardim

**Orientador
Elena Aida Bernard**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial da obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

**Porto Alegre
2008**

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe: minha grande amiga e conselheira, incansável e sempre presente. À minha mãe, que, mesmo não entendendo direito o que eu fazia, sempre acreditou que era para o meu bem. A ti, mãe, que sempre mostrou um sorriso quando eu precisei e que sempre esteve ao meu lado, eu dedico todos os meus esforços.

“Quando os ventos da mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras, outras constroem moinhos de vento”

Érico Veríssimo

“Depende de ti, agradecer ou praguejar, louvar ou reclamar, alcançar o topo da subida ou lamentar na baixada as dificuldades da ascensão, que afinal, todos sofrem e os corajosos superam.”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sabe de todas as dificuldades pelas quais passei

Agradeço ao Departamento de Bioquímica, por todos os recursos que nos disponibilizam, que me permitiram fazer boa parte desse trabalho

Agradeço ao pessoal da secretaria, da segurança e da limpeza também

Agradeço ao CNPq pelo investimento na pesquisa, minha e de muitos outros colegas

Agradeço à minha orientadora, Professora Elena A. Bernard, que me ensinou muito e que me recebeu em seu laboratório

Agradeço a todos os amigos que passaram pelo Lab. 23, desde minha época de IC, até agora.

Obrigada pelos momentos de descontração e risadas

Obrigado ao professor Rogério e à professora Fátima pelas discussões e pela disponibilidade em ouvir

Agradeço também ao meu “segundo lugar de trabalho”, o Lab. 21, que sempre me acolheu como, praticamente, seu integrante. Obrigada pelas conversas e pela amizade

Agradeço às conversas de fluxo, aos problemas enfrentados nos fins de tarde de sexta-feira ou na época de férias letivas

Agradeço, de um modo geral, a todos aqueles que conheci na Bioquímica e que me ajudaram, de uma maneira ou de outra

Agradeço ao meu namorado Marcos, o Marcos R., que antes de qualquer coisa, é meu grande amigo e companheiro, nas horas boas e ruins. Agradeço pela compreensão e por ser meu porto-seguro. Obrigada por me dizer o que eu preciso ouvir, que não é, necessariamente, o que eu quero ouvir. “A rosa pelo amor e a branca pela amizade e o carinho”

Obrigada à minha família: minha mãe, Laura, meu pai, Luiz e meu irmão, Lucas. Obrigada pelo apoio incondicional, pelas conversas de madrugada, pelas caronas, pelas risadas, pelas alvoradas, pelas brigas e conselhos. Por quererem meu bem e estarem sempre comigo.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
PARTE I.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. FIBROSE HEPÁTICA	5
1.1.1. A IMPORTÂNCIA DA CÉLULA ESTRELADA HEPÁTICA NA FIBROSE E O MODELO EXPERIMENTAL GRX	7
1.1.2. O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DAS METALOPROTEINASES, MMP-2 e MMP-9, NA FIBROSE HEPÁTICA	10
1.1.3. ADENOSINA EXTRACELULAR E TNF- α : PARTICIPAÇÃO NA FIBROSE HEPÁTICA E A IMPORTÂNCIA DAS HSC	14
2. OBJETIVO	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
PARTE II.....	20
CAPÍTULO I.....	21
CAPÍTULO II.....	28
CAPÍTULO IIa.....	29
CAPÍTULO IIb.....	55
CAPÍTULO IIc.....	63
CAPÍTULO IId.....	69
PARTE III	77
3. DISCUSSÃO.....	78
3.2. Apoptose e quiescência de células GRX	83
3.3. Regulação da produção de NO	84
3.4. Modulação de MMP-2 e MMP-9	88
4. CONCLUSÕES	93
5. PERSPECTIVAS	94
6. REFERÊNCIAS	95
7. LISTA DE FIGURAS	109
8. LISTA DE TABELAS	111

RESUMO

Fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular fibrótica, cuja presença danifica as funções do fígado. Células estreladas hepáticas (HSCs) participam ativamente deste processo, modificando seu fenótipo quiescente, rico em lipídios no citoplasma, para o fenótipo ativado, em resposta ao insulto fibrogênico. A regressão do processo fibrótico pode, inclusive, estar relacionada com a apoptose das HSCs e também com sua reversão fenotípica, do estado ativado ao estado quiescente. Adenosina tem papel hepatoprotetor bem conhecido e medeia várias ações antiinflamatórias em diferentes tipos celulares e condições patológicas. TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com importantes funções no início e perpetuação do processo fibrogênico. Tendo em vista o papel antiinflamatório da adenosina, este trabalho investigou, em linhagem de HSC em cultura - GRX -, as ações desse nucleosídeo em presença ou ausência dos sinais inflamatórios que acompanham o tratamento com TNF- α . Assim, foram analisados os efeitos da adenosina extracelular na síntese lipídica, avaliando a reversão fenotípica da GRX, e a apoptose em resposta à adenosina e/ou TNF- α . Além disso, a regulação dos níveis de adenosina extracelular, bem como a presença dos receptores de adenosina foram investigadas. O efeito de adenosina e/ou TNF- α sobre a produção de óxido nítrico (NO) e atividade e expressão de gelatinases (MMP-9 e -2), ambos importantes mediadores na fibrose hepática, também foram alvo deste estudo.

Nossos resultados mostram a presença do receptor de adenosina A_{2B} ($A_{2B}R$), e a regulação dos níveis extracelulares de adenosina por TNF- α , através do aumento da atividade ecto-adenosina deaminase. Além disso, demonstramos que adenosina extracelular não modifica a síntese de lipídios nas células GRX. Os dados ainda indicam que adenosina, em presença ou ausência de TNF- α , não resulta em apoptose, e que esta citocina também não induz à formação de corpos apoptóticos nas células tratadas. O estudo mostra que a produção de NO foi aumentada com TNF- α , com potencialização deste efeito na presença de adenosina, provavelmente mediado pelo $A_{2B}R$ e não por inosina, produto da hidrólise de adenosina. Com relação às gelatinases, o tratamento com adenosina diminui a atividade de MMP-9 tanto em ausência, quanto em presença de TNF- α , revertendo a ação da citocina, a níveis de controle, com o envolvimento do receptor $A_{2B}R$ mediando os efeitos do nucleosídeo. No entanto, a expressão da MMP-9 não foi afetada pelo tratamento com adenosina, porém, o nucleosídeo diminui os efeitos de TNF- α sobre a expressão da gelatinase. Com relação à MMP-2, ambos tratamentos com adenosina e com TNF- α , bem como o tratamento com adenosina, em presença da citocina, diminuem a atividade da gelatinase, sem efeitos aditivos. A expressão do mRNA de MMP-2 aumentou em resposta aos tratamentos com adenosina e TNF- α , isolados ou em associação, indicando a presença de mecanismo pós-transcricional de regulação para MMP-2.

Este trabalho mostra, claramente, que adenosina extracelular e TNF- α estão envolvidos na regulação da produção de NO e nas ações das gelatinases. Além disso, este estudo demonstrou que adenosina não atua através de conversão fenotípica via aumento da síntese de lipídios, bem como não estimula apoptose, junto com TNF- α . Estes resultados e a existência da regulação dos níveis de adenosina extracelular por TNF- α sugerem uma participação da adenosina em alguns aspectos importantes da fisiologia da HSC, talvez via A_{2B} .

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is characterized by fibrotic matrix accumulation, which damage the liver functions. Hepatic stellate cells (HSC) participate actively of this process, modifying their quiescent phenotype, with the cytoplasm rich in lipid droplets, to activated phenotype, in response to the fibrogenic insult. HSC can be responsible for the regression of fibrosis through mechanisms that involve their apoptosis, or even the phenotype reversion to quiescence. Adenosine has a well-know hepatoprotective role and mediates several anti-inflammatory actions in different cellular types and pathological conditions. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine with important functions in the beginning and perpetuation of that fibrogenic process. In view the antiinflammatory role of adenosine, this work investigated, in cultured hepatic stellate cell line - GRX -, the actions of this nucleoside in the presence or absence of inflammatory signs that come with treatment with TNF- α . So, the effects of extracellular adenosine and/or TNF- α on the lipid synthesis, evaluating the phenotypic reversion of GRX, and the apoptosis in response to adenosine and/or TNF- α were analysed. Moreover, the regulation of extracellular levels of adenosine, as well as the presence of adenosine receptors were studied in cultured GRX. The effects of adenosine and/or TNF- α production of nitric oxide (NO) and activity and expression of gelatinases - MMP-9 and -2 -, both important mediators presents in liver fibrosis, were also target of this study.

Our results show the presence of A_{2B} receptor (A_{2B}R) in GRX, and the regulation of extracellular hidrolysis of adenosine by TNF- α , through ecto-ADA activity improvement. Moreover, we demonstrate that extracellular adenosine does not modify the lipid synthesis in the GRX cells. The data still indicate that adenosine, at presence or absence of TNF- α , does not imply apoptosis, and that this cytokine does not induce the apoptotic bodies formation. The study shows that the production of NO was increased with TNF- α , with potentiation of this effect at the presence of adenosine, probably due to to A_{2B}R, and not mediated by inosine, the product of adenosine hydrolysis. About the gelatinases, the treatment with adenosine decreases the MMP-9 activity in the absence, as well as in the presence of TNF- α , reversing the action of cytokine, at control group levels, with involvement of A_{2B}R. However, the expression of MMP-9 was not affected by the treatment with adenosine, but the nucleoside reduces the effects of TNF- α on the expression of this gelatinase. About MMP-2, both treatment with adenosine and TNF- α , as well as the treatment with adenosine, in the presence of the cytokine, diminish the activity of gelatinase, without additive effects. The expression of MMP-2 mRNA increased in reponse to the treatments with adenosine and TNF- α , alone or in association, suggesting post-transcriptional mechanisms for the regulation of this enzyme.

Our results clearly indicate that extracellular adenosine and TNF- α are involved in the regulation of NO production and actions of gelatinases. Moreover, this study demonstrated that adenosine do not act in phenotype conversion, through lipid synthesis, as well as do not stimulate apoptosis, toghether with TNF- α . This results and the existence of regulation of extracellular of adenosine in response to TNF- α further support that adenosine modulate some important aspects of HSC phisiology, maybe through A_{2B} pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
Ecto-ADA	Adenosina deaminase extracelular
HSC	Célula estrelada hepática
TNF- α	Fator de Necrose tumoral
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas cinase ativadas por mitose
MMP	Metaloproteinase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NPP	Difosfohidrolase de nucleotídeo
NTPDase	Difosfohidrolase de nucleotídeo trifosfatado
PDGF	Fator de Crescimento derivado de plaquetas
PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase G
ROS	Espécies reativas de oxigênio
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinase
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
qRT-PCR reversa	Reação quantitativa em cadeia da polimerase, através de transcriptase reversa

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1. FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose hepática é uma desordem marcadamente inflamatória que, juntamente com a cirrose, foi a responsável por cerca de 2,51% das mortes na população brasileira, integrando o *ranking* dos dez principais líderes de mortalidade no Brasil, em 2004 (Painel de Indicadores do SUS, Ano 1, nº 1, 2006) .

Em condições normais, o fígado é ricamente perfundido e sua estrutura organizada permite a todas as células que o compõem um aporte metabólico através dos sinusóides hepáticos. A separação entre o lúmen dos sinusóides hepáticos e o espaço onde se encontram os componentes celulares restantes, é feita por células endoteliais sinusoidais, permeadas, em menor quantidade, por células de Kupffer (macrófagos hepáticos), e separadas entre si por pequenos espaços denominados fenestras, por onde ocorrem extensas trocas metabólicas entre o ambiente externo e as células residentes abaixo dele, no espaço de Disse. O espaço de Disse é a região entre os hepatócitos e as células endoteliais sinusoidais, e caracteriza-se pela presença de células estreladas hepáticas, entre artérias e ductos biliares, que estão em meio a um interstício abundante de matriz extracelular (Kmiec, 2001)(Figura 1).

A matriz extracelular do espaço de Disse é composta principalmente por colágeno do tipo IV, proteoglicanos de heparan sulfato, entre outros, que juntos conferem à mesma características de uma rede protéica frouxa e de baixa densidade, que desempenha importante função na comunicação entre as células hepáticas (Schuppan et al., 2001), sendo a sua produção coordenada, entre outros fatores, por enzimas que degradam proteínas dessa matriz (MMP) (Clark et al., 2008) e pelos seus inibidores (TIMP) (Stetler-Stevenson, 2008).

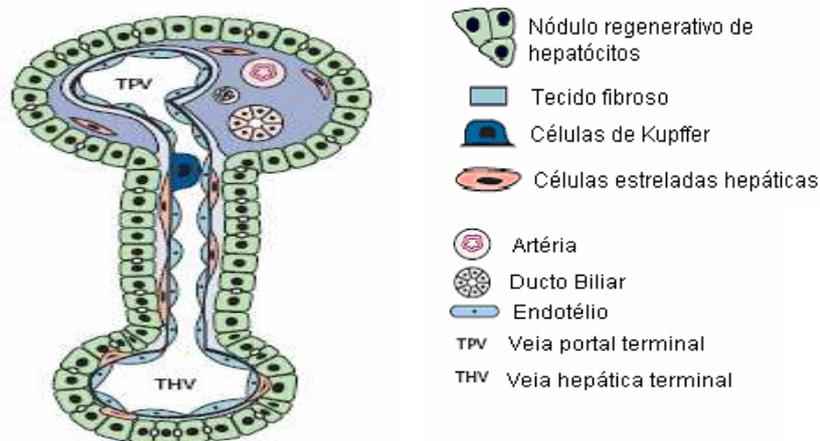


Figura II: Desenho esquemático de fígado em condição fisiológica e seus principais tipos celulares e componentes. Adaptado de *Lancet* 2008; 371: 838-51.

Na fibrose hepática, a arquitetura do fígado é distorcida, em consequência da obliteração do espaço de Disse, da diminuição das fenestras entre as células endoteliais, modificação da natureza das comunicações celulares e, principalmente, do início da substituição gradual da matriz extracelular existente por outra, mais densa e fibrosa, composta principalmente por colágeno do tipo I (Bataller and Brenner, 2005; Guo and Friedman, 2007; Iredale, 2007; Poli, 2000; Saile and Ramadori, 2007; Tsukada et al., 2006). Além dessas consequências, as células endoteliais sinusoidais passam a produzir endotelina-1, cujos efeitos culminam na hipertensão portal (Kawada et al., 1993; Noguchi et al., 2006).

A fibrose hepática pode ser desencadeada por diversos estímulos, incluindo álcool (Vera and Nieto, 2006), vírus (Weisberg et al., 2007), doenças auto-imunes (Schramm and Lohse, 2005) e parasitoses (Bartley et al., 2006), entre outros. Embora a natureza dos seus agentes causadores possa ser tão distinta, as principais modificações hepáticas resultantes dos diferentes danos são bastante semelhantes entre si. Se o estímulo persiste, seja de natureza química ou biológica, a fibrose hepática pode evoluir para cirrose (Schuppan and Afdhal, 2008) e até mesmo para um hepatocarcinoma

celular (Mazzanti et al., 2008). Além disso, complicações como hipertensão portal (Gonzalez-Abraldes et al., 2001; Gonzalez-Abraldes et al., 2002) e diminuição da função hepática, decorrente de todas essas alterações, são conseqüências freqüentes dessa condição patológica.

Muitos pesquisadores têm estudado extensivamente a possibilidade de regressão da fibrose hepática (Knittel et al., 2000; Roderfeld et al., 2007), ou seja, uma vez cessado o estímulo fibrogênico, processos como apoptose (Elsharkawy et al., 2005; Iredale, 2001; Iredale et al., 1998) e reversão fenotípica da célula estrelada hepática (HSC) poderiam auxiliar na restauração da funcionalidade e arquitetura hepática.

1.1.1. A IMPORTÂNCIA DA CÉLULA ESTRELADA HEPÁTICA NA FIBROSE E O MODELO EXPERIMENTAL GRX

As células estreladas hepáticas representam cerca de 5 a 8% das células hepáticas em um fígado normal, além disso, participam ativamente no metabolismo de retinóides, cuja característica lipossolúvel fez com que essa célula mantivesse em seu citoplasma grande quantidade de lipídios, tornando-a autofluorescente. Essas características morfológicas conferem à HSC um fenótipo dito quiescente ou lipocítico, cujas propriedades contribuem para a homeostase dos processos metabólicos do fígado (Blomhoff et al., 1990; Hautekeete et al., 1998; Hellemans et al., 2003; Higashi et al., 2005; Senoo, 2004). Além disso, sua localização – em contato íntimo com as células sinusoidais hepáticas -, seu aspecto morfológico peculiar – com longos processos citoplasmáticos – e características como baixa contratilidade, auxiliam seu papel na hemodinâmica sinusoidal, em condições fisiológicas (Reynaert et al., 2002; Rockey, 1997; Rockey, 2001; Rockey et al., 1993; Sims, 1991). HSC também desempenham papel importante na manutenção da matriz extracelular normal, produzindo alguns

componentes que fazem parte dessa rede e secretando metaloproteinases, bem como inibidores dessas enzimas (Benyon and Arthur, 2001).

Em resposta a determinado estímulo, agudo ou crônico e danoso ao fígado, essas células sofrem um processo de transdiferenciação ou ativação, no qual perdem seus estoques de vitamina A e lipídios, adquirindo um fenótipo ativado, cujas características fazem da célula estrelada hepática um dos tipos celulares estreitamente responsáveis pela iniciação e progressão da fibrose (DeLeve, 2007; Eng and Friedman, 2000; Friedman, 2000; Li et al., 2008).

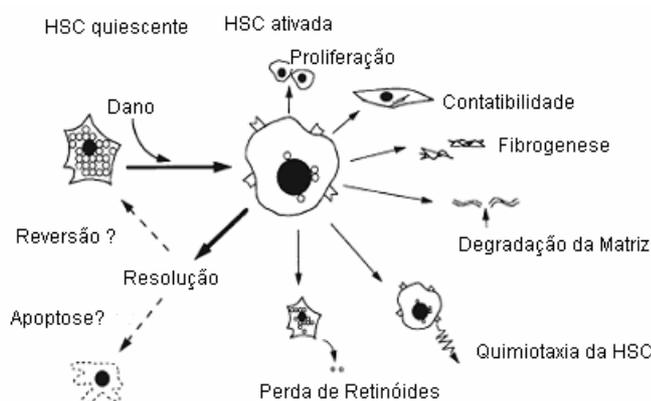


Figura I2: Desenho esquemático do processo de transdiferenciação da célula estrelada hepática: suas causas e conseqüências. Adaptado de *J Gastroenterol* 2008; 43:419–428

O fenótipo ativado da HSC é semelhante, morfológicamente, a um miofibroblasto, e expressa certas proteínas de membrana consideradas marcadores desse estado, como, por exemplo, α -SMA, cuja expressão está relacionada ao aumento da contratilidade dessas células ativadas (Rockey et al., 1992; Tanaka et al., 1991). Além disso, a capacidade de migração até o local de injúria (Chang et al., 2008) e o aumento da proliferação celular nesse local são outras características marcantes em resposta a um dano hepático. Adicionalmente, essas células são as principais produtoras de matriz

extracelular, principalmente colágeno do tipo I, que contribui para a formação da cicatriz fibrótica característica dessa condição patológica, que delimita o dano hepático, mas também contribui para perda de área hepática funcional.

A importância da HSC não se limita apenas à progressão e iniciação da fibrose. Conforme mencionado anteriormente, muitos trabalhos têm estudado a possibilidade de regressão dessa desordem patológica, atribuindo importante papel à HSC, devido à possibilidade de apoptose dessas células. Entretanto, com relação à apoptose, a grande maioria dos trabalhos se limita a estudos *in vivo*, levantando uma questão importante: quem substituiria as HSC nas funções desempenhadas pelas mesmas? A alternativa para esse problema seria a reversão da estrelada hepática ao fenótipo lipocítico.

Devido à importância da HSC na fibrose hepática, muitos modelos celulares já foram estabelecidos e utilizados na literatura para estudar a fisiologia da estrelada hepática (Gutierrez-Ruiz and Gomez-Quiroz, 2007; Herrmann et al., 2007). A descoberta de que as HSC, depois de isoladas, ativavam-se espontaneamente quando cultivadas em plástico, apresentando-se em estado de transição no quarto dia de cultura e sendo ativada no sétimo dia (Rockey et al., 1992), expandiu ainda mais o estabelecimento de modelos que não estivessem sujeitos a essas variações. Um dos primeiros modelos celulares estabelecidos foram as células GRX. Isoladas de um granuloma do fígado de camundongo infectado com *Schistosoma mansoni*, e caracterizadas como um modelo imortal e com crescimento sem inibição por contato, essa linhagem celular encontra-se em um fenótipo intermediário (Borojevic et al., 1990; Borojevic et al., 1985), podendo ser induzido a expressar o fenótipo lipocítico, mediante tratamento com retinol ou indometacina (Margis and Borojevic, 1989). Além disso, células GRX também podem expressar um fenótipo mais ativado, em resposta ao

tratamento com TNF- α , tornando-se um importante modelo que mimetiza alguns aspectos da fisiologia da HSC *in vivo*.

1.1.2. O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DAS METALOPROTEINASES, MMP-2 e MMP-9, NA FIBROSE HEPÁTICA

O óxido nítrico (NO) é uma molécula rapidamente difusível, produzida a partir de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) que utilizam arginina como substrato. Na literatura, essas enzimas estão divididas em dois grandes grupos: induzível (iNOS) e constitutivas (eNOS e nNOS), produzindo diferentes níveis de NO (Aktan, 2004; Davis et al., 2001; Murad, 1999). Óxido nítrico sintases constitutivas, como NOS endoteliais (eNOS) e neuronais (nNOS), são responsáveis pela produção basal de NO, dependente dos níveis intracelulares de cálcio. Por sua vez, a ativação de iNOS, coordenada diretamente pela modulação da sua expressão gênica, é responsável pela produção de grandes níveis de NO, modulada por citocinas e/ou endotoxinas, como TNF- α e LPS, respectivamente (Davis et al., 2001).

A coordenação dos efeitos do NO envolve diversos fatores como sua concentração e as enzimas antioxidantes presentes no local de ação, a sua capacidade de difusão e a distância atingida, as condições que iniciam sua produção e os mecanismos envolvidos nas suas ações (Kroncke et al., 1997; Michel and Feron, 1997), tais como a ativação da cascata de cGMP e PKG (Koesling et al., 2004) e a nitrosilação protéica (Hess et al., 2001; Stamler et al., 2001). No âmbito da fibrose hepática, a participação do NO é bem reportada na literatura. Em modelos animais que receberam intraperitonealmente CCl₄, seguidos de injeção de LPS, os níveis de NO produzidos pelo fígado aumentaram, demonstrado através da formação de complexos nitrosilados, cuja produção foi revertida com a administração de inibidor de NOS (L-NMA), sugerindo ao óxido nítrico um papel regulador na hepatotoxicidade produzida por esse

modelo (Chamulitrat et al., 1995; Leung et al., 2008). Posteriormente, alguns autores demonstraram que NO, produzido principalmente por cNOS, participa na regulação da hipertensão portal, freqüentemente associada a doenças hepáticas crônicas, através de suas propriedades vasoativas que se opõem aos efeitos de endotelina-1 (Gonzalez-Abraldes et al., 2002; Leung et al., 2008). Em modelos de doença hepática induzida pela ingestão de etanol, a diminuída produção de NO pelas células não-parenquimais pode contribuir para o dano hepático e sua produção compensatória por hepatócitos pode causar dano hepático centrilobular (Nanji et al., 1995). Além disso, a inibição de iNOS prejudica a recuperação hepática do dano causado pela administração de tioacetamida em ratos, atribuindo um papel claramente pró-fibrótico aos inibidores de iNOS (Lukivskaya et al., 2008).

Conforme mencionado anteriormente, os fatores que gerenciam os efeitos do NO são muitos. A capacidade de combinação com ânions superóxido, produzindo a espécie altamente tóxica peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman et al., 1990; Rubbo et al., 1994), pode estar envolvida no aumento do dano hepático em modelos animais tratados com LPS e submetidos à isquemia de reperfusão (Ma et al., 1995). A deficiência produzida na iNOS, em camundongos, pode reduzir a fibrose hepática, aumentando a expressão de MMP-2 e MMP-9, atribuindo um papel deletério a essa enzima (Aram et al., 2008). Por outro lado, recentemente, foi mostrado que camundongos nocautes para o gene iNOS não conferem proteção contra administração de CCl_4 , agente conhecidamente fibrogênico, não diferindo em nada dos resultados obtidos com camundongos *wild-type*, em relação aos níveis de colágeno, bilirrubinas e transaminases aumentados. Apesar disso, nos camundongos nocaute os níveis de peroxidação lipídica foram maiores, entretanto os autores postulam que iNOS não participa da fibrose induzida por CCl_4

(Moreno and Muriel, 2006). Como pode ser observado nesses e em outros estudos, os efeitos de NO, na fibrose hepática, ainda estão por ser elucidados.

Apesar da difusão do óxido nítrico a razoáveis distâncias, a evidência da sua produção por parte das HSC proporcionou grande importância para a sinalização autócrina e parácrina dessas células. Em células estreladas em cultura, foi evidenciada a presença funcional de transportadores de aminoácidos catiônicos, responsivos a citocinas, proporcionando a entrada de arginina para o funcionamento de óxido nítrico sintases (Ookawauchi et al., 1998). Outros grupos demonstraram que células estreladas, isoladas de fígado humano normal, expressam canais de K^+ - ativados por cálcio que modulam os efeitos do óxido nítrico (Gasull et al., 2001); além disso, a presença de mRNA para iNOS já foi reportada, mostrando que citocinas, em conjunto com endotoxinas, aumentam sua expressão (Casini et al., 1997). Nas HSC, os efeitos do óxido nítrico são bastante variados. Em células estreladas quiescentes, isoladas de ratos, a ativação de iNOS, através do tratamento com citocinas e endotoxinas, induz à contratilidade dessas células (Rockey and Chung, 1995). Outros trabalhos mostram que o óxido nítrico funciona como um *scavenger* de ânions superóxido, diminuindo a proliferação celular resultante do tratamento com doadores de ROS tanto em HSC cultivadas por até três dias, quanto em estreladas hepáticas isoladas de fígado fibrótico (Svegliati-Baroni et al., 2001). Além disso, NO também está envolvido na ativação de HSC por mecanismos dependentes e independentes de cGMP, na inibição da migração de HSC estimuladas por PDGF (Lee et al., 2005) e na promoção da apoptose caspase-independente dessas células, através do tratamento com doadores de NO e da superexpressão de eNOS (Langer et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que células hepáticas sinusoidais diferenciadas previnem a ativação de HSC e promovem a

reversão fenotípica dessas células, através da produção de NO estimulada por VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Deleve et al., 2008).

Inúmeros trabalhos já evidenciaram que a reestruturação da matriz extracelular desencadeia sinais que colaboram com o início da fibrose hepática (Chan et al., 2006; Iimuro and Brenner, 2008), logo, a regulação e execução desses sinais são de importância nessa desordem patológica. Metaloproteinases são enzimas dependentes de zinco que degradam matriz extracelular, tanto em condições fisiológicas, como em condições patológicas. As MMPs são secretadas como pró-enzimas inativas, cuja ativação depende da clivagem do pró-domínio N-terminal, que interage com sítio catalítico dessas enzimas, suprimindo a atividade proteolítica (Parks et al., 2004; Yan and Boyd, 2007). Na literatura, a classe de metaloproteinases denominada gelatinase (MMP-9 e -2) tem particular importância na fibrose hepática. MMP-9 e -2 degradam colágeno do tipo IV, presente em condições hepáticas fisiológicas, auxiliando no desenvolvimento da destruição tecidual e migração de células, como HSC, ao local do dano (Yan et al., 2008). No entanto, as gelatinases também degradam colágeno intersticial desnaturado (*gelatinas*), resultado da ação inicial de outras metaloproteinases e presentes em grande quantidade na fibrose, colaborando para a remoção de parte da matriz extracelular existente no fígado fibrótico (Benyon and Arthur, 2001). Em culturas primárias de HSC isoladas de ratos e cultivadas por 2 e 6 dias, expressando fenótipos quiescente e ativado, respectivamente, a expressão de ambas gelatinases já havia sido demonstrada, evidenciando que essas células secretam principalmente MMP-2 e baixas quantidades de MMP-9, cuja atividade diminui conforme os dias de ativação da HSC (Knittel et al., 1999). Nas HSC cultivadas em matriz de colágeno do tipo I, a produção de MMP-2 e sua ativação foram estimuladas (Li et al., 1999; Wang et al., 2003). Além disso, em células estimuladas com composto herbal (Sho-saiko-to), que

previne a fibrose *in vivo*, a atividade de MMP-2 foi aumentada (Sakaida et al., 2004). Alguns autores sugerem que MMP-2 medeia proliferação e invasão das HSC (Olaso et al., 2001), mediante diferentes estímulos, como estresse oxidativo, entre eles (Galli et al., 2005). Com relação à MMP-9, alguns trabalhos relatam seu envolvimento com a cascata de ativação/transdiferenciação das HSC (Han et al., 2007), inclusive mostrando, recentemente, que, em subpopulações de HSC de fígado fibrótico, MMP-9 colocaliza-se com α -SMA (Han et al., 2004). Entretanto seu envolvimento não se resume à ativação, mas também à apoptose das HSC, conforme mostram estudos com recombinante ativo de MMP-9 (Zhou et al., 2004).

A regulação da atividade das metaloproteinases é bastante ampla (Chakraborti et al., 2003; Fu et al., 2008). A respeito da MMP-2, ocorre principalmente através de um processo mediado por metaloproteinase do tipo-membrana (MT1-MMP ou MMP-14) e TIMP-2 (Sato et al., 1996; Strongin et al., 1995), diferentemente do processo de ativação de MMP-9, que envolve uma cascata de outras metaloproteinases, como a MMP-13 (Ram et al., 2006). Além disso, a ocorrência de dímeros e até mesmo multímeros, homo e heterogêneos, cuja combinação pode ter implicações diversas, é bastante comum (Kjeldsen et al., 1993; Malla et al., 2008).

1.1.3. ADENOSINA EXTRACELULAR E TNF- α : PARTICIPAÇÃO NA FIBROSE HEPÁTICA E A IMPORTÂNCIA DAS HSC

A adenosina extracelular é um nucleosídeo purinérgico que medeia vários efeitos em diversos tipos celulares, dependendo da condição em estudo (Hasko et al., 2006; Nemeth et al., 2007; Zhong et al., 2005). Em modelos de aorta torácica de ratos, o tratamento com adenosina protege o endotélio contra o dano induzido por H₂O₂, funcionando como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio através do aumento da atividade de óxido nítrico sintase, com conseqüente aumento na produção de óxido

nítrico (Lu et al., 2007), e, em diversos tipos celulares, adenosina regula a síntese de citocinas como TNF- α (Kreckler et al., 2006; Ryzhov et al., 2008).

Na fibrose hepática, a adenosina tem função hepatoprotetora amplamente demonstrada. Em modelos animais com cirrose induzida através de administração de CCl₄, o tratamento com adenosina diminui os níveis de colágeno tipo I no fígado, através do aumento da atividade colagenolítica. Além disso, a administração de adenosina também aumenta a proliferação celular, auxiliando na regeneração hepática (Hernandez-Munoz et al., 2001). O benefício da adenosina extracelular também está relacionado à preservação da função mitocondrial e à manutenção do potencial redox das células hepáticas (Hernandez-Munoz et al., 1994; Hernandez-Munoz et al., 1997), entre outros efeitos protetores (Chagoya de Sanchez et al., 1995; Odashima et al., 2005).

Os níveis extracelulares de adenosina podem ser regulados por transportadores de nucleosídeos e por enzimas ligadas à membrana plasmática, como fosfatases ou difosfohidrolases de nucleotídeos (NPP), difosfohidrolases de nucleotídeos trifosfatados (NTPDases), ecto-5'-nucleotidase (que cliva AMP, produzindo adenosina) e ecto-adenosina deaminase (ecto-ADA), que hidrolisa adenosina à inosina (Yegutkin, 2008). Na HSC, a presença de NTPDases funcionais, cuja expressão varia de acordo com o estado de ativação *in vitro* dessas células, já foi demonstrada (Dranoff et al., 2004). Em células GRX, a expressão de NTPDases foi evidenciada, além disso, tanto a expressão, como a atividade de ecto-5'-nucleotidase foram detectadas (Andrade et al., 2008), indicando a capacidade dessas células em hidrolisar purinas extracelulares.

Os efeitos da adenosina extracelular podem ser mediados através de quatro tipos de receptores, A₁ e A₃, cujos efeitos são mediados via proteína G_i, e receptores do tipo A_{2A} e A_{2B}, ligados à proteína G_s, que estão relacionados a vias dependentes de cAMP e proteína quinase A (PKA) (Fredholm et al., 2000; Klinger et al., 2002; Klotz,

2000). Além dos mecanismos relativos ao cAMP, é importante ressaltar que o receptor A_{2B} também age via G_q , ativando rotas que envolvem inositol trifosfato (IP_3) (Linden et al., 1999). Receptores para nucleotídeos purinérgicos do tipo P_2 já haviam sido identificados por Dranoff *et al* (2004) anteriormente, seguindo trabalhos anteriores que sugeriam a presença dos mesmos na HSC em cultura, que respondia a ATP, ADP, UTP e UDP com aumento das concentrações de cálcio intracelular, aumento do metabolismo de inositol trifosfato e aumento da contratilidade dessas células (Takemura et al., 1994). Dranoff *et al* também demonstraram a expressão desses receptores, os quais também são dependentes do estado de ativação das HSC (Dranoff et al., 2004). Apesar disso, só recentemente os receptores para adenosina foram identificados na HSC em cultura. Em modelos de célula estrelada hepática isolada de rato e humano, a ocupação de receptores do tipo A_{2A} promoveu produção de colágeno e camundongos nocautes para esse receptor apresentaram proteção contra fibrose estimulada por CCl_4 ou tioacetamida (Chan et al., 2006). Trabalhos posteriores também atribuíram ao receptor A_{2A} os efeitos na quimiotaxia induzida por PDGF inibida por adenosina, sugerindo uma função de “sinal de parada” para esse nucleosídeo (Hashmi et al., 2007). Apesar deste último trabalho demonstrar a expressão dos outros tipos de receptores de adenosina, nenhum trabalho, até o momento, questionou a função dos mesmos. Além disso, esses mesmos autores mostraram diferenças no perfil de expressão dos receptores de adenosina, indicando a necessidade de mais estudos sobre esse nucleosídeo.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, responsável por ações deletérias em diversos tipos celulares. No fígado, TNF- α é secretado pelas células de Kupffer (Jing et al., 2008; Tomita et al., 2006) e pelas HSC (Thirunavukkarasu et al., 2006), em resposta a um insulto patológico. A produção exacerbada dessa citocina está relacionada ao desenvolvimento de desordens hepáticas alcoólicas (McClain et al., 1998) e a

administração de anticorpos anti-TNF α a ratos alimentados com etanol atenua a necrose e inflamação hepática resultante (Iimuro et al., 1997). TNF- α pode mediar seus efeitos via superfamília de receptores que se dividem em dois grandes grupos, TNFR1 e TNFR2, separados de acordo com sua associação a domínios de morte. TNFR1, Fas (CD95 ou APO-1) e P75 possuem tais domínios, ao contrário de TNFR2 e CD40 (Akazawa and Gores, 2007). As HSCs expressam ambos receptores, e em cultura, TNF- α aumenta a produção de proteínas de matriz extracelular e estimula a expressão de α -SMA, indicando que esta citocina tem papel importante na ativação dessas células (Knittel et al., 1997). Paradoxalmente, essa citocina é anti-fibrogênica, diminuindo a expressão de pro-colágeno I em diversos modelos de HSC (Armendariz-Borunda et al., 1992; Varela-Rey et al., 2002). Em células GRX em cultura, TNF- α está envolvido na proliferação (da Silva et al., 2003) e na regulação dos níveis de lipoperoxidação e na modulação da atividade da catalase (Guimaraes et al., 2006). As células estreladas hepáticas possuem receptores para esta citocina, no entanto, curiosamente, no estado lipocítico, essas células não são responsivas aos efeitos de TNF- α mediados pela via do NF- κ B, devido à falha na fosforilação da parte inibitória desse complexo, I κ B (Hellerbrand et al., 1998).

TNF- α também está envolvido na modulação da apoptose de HSC. Em HSC isoladas de fígado de rato, cultivadas por 7 dias em placa de poliestireno, TNF- α diminui significativamente os níveis de apoptose (Saile et al., 1999). Outros trabalhos mostram que falhas na ativação de NF- κ B, seja por transfecção celular com I κ B deficiente (Qu et al., 2007) ou através de inibidores de I κ k (enzima que fosforila a parte inibitória do NF- κ B, I κ B) (Oakley et al., 2005) levam HSC à apoptose, sugerindo que NF- κ B mediará a resistência das HSC à apoptose induzida por TNF- α . Taimr P *et al* (2003), analisaram linhagens de HSC humanas, LX-2, e demonstraram que essas células

expressam o receptor para ligantes indutores de apoptose relacionada ao TNF (TRAIL) e que esses ligantes induzem apoptose na LX-2 (Taimr et al., 2003). Esses dados, juntamente com outros estudos, indicam que a família de receptores de TNF não está envolvida somente com efeitos anti-apoptóticos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando os dados reportados pela literatura a respeito da participação da adenosina e TNF- α no metabolismo das HSCs e suas implicações na iniciação, manutenção, perpetuação e regressão da fibrose hepática, estudos a respeito dos mecanismos de ação α do TNF- α e, principalmente, da adenosina sobre fatores importantes da fibrose são de extrema importância. O foco principal em relação à adenosina vem dos estudos mostrando resultados ainda não esclarecidos a respeito de um papel benéfico ou deletério em relação à célula estrelada hepática. Sendo assim, o envolvimento da adenosina extracelular, em presença ou ausência de TNF- α , na modulação de alguns fatores importantes na fibrose hepática e, principalmente, no metabolismo das células estrelada hepática, foi investigado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a regulação dos níveis extracelular de adenosina em culturas de GRX, em presença ou ausência de TNF- α , bem como investigar a presença de receptores de adenosina nesse tipo celular;
- Verificar a influência do tratamento com adenosina na conversão lipocítica das células GRX, bem como estudar os efeitos de adenosina e/ou TNF- α na apoptose dessas células em cultura;

- Avaliar o efeito dos tratamentos com adenosina extracelular e/ou TNF- α na produção de óxido nítrico;
- Estudar a regulação da atividade e expressão das gelatinases, MMP-9 e -2, em resposta ao estímulo com adenosina extracelular e/ou TNF- α .

PARTE II

CAPÍTULO I
MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular de GRX

Células GRX foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram mantidas em garrafas de cultura celular de 25cm², na presença de meio de cultura Dulbecco (DMEM) com 2 g/l tampão HEPES (ambos Sigma Chemical Company), suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), pH 7.4, em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂ até atingirem confluência, quando GRX foram tripsinizadas e plaqueadas para os seguintes experimentos.

Análise de apoptose: coloração com DAPI e ensaio cometa

As células, a uma densidade de 3×10^4 células/ 1,88 cm², foram plaqueadas sobre lamínula redonda de vidro estéril, dispostas no interior dos poços da placa de cultura, e mantidas em DMEM 5% SFB até semiconfluência, quando foram tratadas com adenosina 100 µM em presença ou ausência de TNF-α 75 U/mL (ambos Sigma Chemical Company) durante 24 horas, ou em presença de adenosina 1 mM por 24 ou 48 horas (com troca de meio a cada 24 horas). Para analisar os níveis de apoptose através do corante fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) (Sigma Chemical Company) (Mermelstein et al., 2006), as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, acrescentado ao meio de incubação. Após 10 minutos, a 37° C, o conteúdo total foi retirado e paraformaldeído 4% foi acrescentado. Após 30 minutos, a 37°C, as células foram incubadas com PBS-Triton 0,5% por três vezes de 10 minutos, à temperatura ambiente. DAPI 0,2 µg/ mL (preparado em NaCl 0,9%) foi acrescentado posteriormente, por 3 a 5 min, à temperatura ambiente. As células foram lavadas com NaCl 0,9% por 5 min e as lamínulas foram retiradas e dispostas em uma lâmina de microscopia, em presença de FluorSave (Calbiochem). A presença de cromatina

condensada foi analisada através de microscopia de fluorescência. Para o ensaio cometa, as células tratadas foram tripsinizadas com tripsina/EDTA e manipuladas com suavidade para evitar estresse mecânico. Após inibição da tripsina com soro fetal bovino, o conteúdo foi centrifugado e o pellet celular foi ressuspenso em PBS. Lâminas foram preparadas através da mistura de 50 µL da suspensão de GRX com 70 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0.75%). A mistura células/agarose foi transferida a uma lâmina de microscópio, e coberta com agarose 1% (ponto de fusão normal). Após a solidificação, a cobertura de agarose foi removida e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA dissódico e 10 mM Tris, pH 10.0, com Triton X-100 1% e dimetil sulfoxido, adicionados na hora) por 12 horas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução nova tampão (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 12.6) por 10 min e separadas por eletroforeses. Após isso, as lâminas foram imersas em tampão neutralizante (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 4 °C) por 5 min, antes de adicionar 50 µL brometo de etídio 5 µg/mL às lâminas e deixá-las no escuro, por 20 min, para corar o DNA. Controles positivos e negativos foram usados para cada corrida eletroforética, para assegurar a confiabilidade do procedimento. Imagens de 100 núcleos (50 núcleos de cada replicata), escolhidos ao acaso, foram analisadas para cada tratamento. Os núcleos foram visualmente pontuados para o tamanho da calda do cometa, baseados em uma escala arbitrária de 0 a 4, isto é, variando da ausência de dano até o dano intenso ao DNA, respectivamente. Sendo assim, o índice de dano de um grupo poderia variar de 0 (núcleos sem calda, 100×0) a 400 (todos os núcleos com calda de tamanho máximo, 100×4) (dos Santos et al., 2006). As lâminas foram vistas em microscópio invertido Nikon usando um acessório de fluorescência TE-FM Epi. As imagens foram capturadas e transferidas para o computador com uma câmera digital (Sound Vision Inc.). Agradecemos à aluna Ana Cristina Andrezza e ao professor

Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, que tornaram possível a execução desta técnica e interpretação de seus dados.

Síntese lipídica

Células GRX foram cultivadas em DMEM 5% SFB a uma densidade de 15×10^4 células/ $9,4 \text{ cm}^2$, e mantidas com trocas de meio até semiconfluência, quando foram tratadas por 3 ou 6 horas na presença ou ausência de adenosina $100 \mu\text{M}$. Durante as últimas 3 horas de tratamento com adenosina, acetato [^{14}C] ($1 \mu\text{Ci/mL}$) (Amershan) foi adicionado. Terminado este período, as células foram raspadas em PBS, de onde uma alíquota foi retirada para dosagem protéica. O homogeneizado celular foi submetido ao método de partição de Folch (Folch et al., 1957) para extração de lipídios neutros. Alíquotas foram retiradas para contagem de radioatividade total, utilizando-se líquido de cintilação OptiPhase HiSafe (PerkinElmer). O volume restante foi misturado a uma solução de clorofórmio:metanol: água (3:2:1) e centrifugado por 5 min, a 700g. A fase inferior foi coletada e separada. A fase superior foi misturada, na proporção 1:1, à fase inferior teórica (clorofórmio:metanol:água, na proporção 86:14:1) e centrifugada novamente, por 5 min a 700 g. As fases inferiores foram então reunidas e misturadas à fase superior teórica (Clorofórmio:metanol:água, na proporção 3:48:47). Após isso, o conteúdo foi centrifugado, a 700g por 5 min, e a fase inferior foi evaporada, com o auxílio de nitrogênio, a 37°C . O pellet lipídico foi ressuscitado em solução de clorofórmio:metanol, na proporção 2:1, e aplicado em sílica para separação lipídica por cromatografia em camada delgada (CCD) em sistema hexano: éter sulfúrico: ácido acético (90:10:1). A CCD foi impressionada em filme autoradiográfico por 2 semanas a -70°C e então revelada. A síntese de lipídios também foi estudada em resposta ao tratamento com adenosina por 30 min, durante 7 dias, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima ao término deste período.

Quantificação da produção de nitrito

Para determinar a produção de óxido nítrico secretado pelas células GRX em cultura, o meio de incubação foi utilizado para quantificação do produto final estável do óxido nítrico em solução, nitrito (NO_2^-), usando reagente de Griess (Ignarro et al., 1993). Células GRX em cultura foram incubadas por 24 h em DMEM com 5% SFB, em presença ou ausência de adenosina e/ou $\text{TNF-}\alpha$. Após incubação, alíquotas do meio foram misturadas ao reagente de Griess (Reagente A: 0,1% diidrocloreto de naftiletilenodiamino em água destilada; Reagente B: 1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico), na proporção 1:1, por 15 minutos e a quantidade de nitrito foi medida a uma absorvância de 540 nm. Para investigar a participação do receptor de adenosina do tipo $\text{A}_{2\text{B}}$ e de inosina na produção de nitrito, as células GRX foram pré-incubadas durante 15 e 30 minutos em presença de antagonista do receptor $\text{A}_{2\text{B}}$, MRS1706 (Tocris) e inibidor de ecto-adenosina deaminase, Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) 10 μM (Sigma Chemical Company), respectivamente, seguidos de incubação com adenosina e/ou $\text{TNF-}\alpha$, durante 24 horas.

Zimografia – Atividade de gelatinases

Atividade de MMP-9 e -2 foram analisadas por zimografia (Wang et al., 2003), com adaptações. Células GRX foram plaqueadas a uma densidade de $15 \times 10^4/9,4 \text{ cm}^2$ em DMEM 5% SFB, e mantidas com trocas regulares de meio a cada 24 horas. Após atingirem confluência, as células foram lavadas três vezes com solução salina, livre de cálcio e magnésio (CMF), e incubadas com DMEM 0,2% albumina bovina sérica (BSA) (Gibco), em presença e ausência de $\text{TNF-}\alpha$ e/ou adenosina, durante 24 horas. Após esse período, as células foram utilizadas para extração de RNA e posterior análise com RT PCR em tempo real, de acordo com o seguinte tópico. O meio condicionado de incubação foi recolhido e centrifugado, a 700 g, por 15 min, para eliminar debris

celulares. O sobrenadante foi tratado com 4 volumes de acetona gelada, a 0°C, por 30 min, e centrifugado novamente, por 15min a 700g. O sobrenadante foi descartado e o pellet protéico ressuspendido em 1/5 do volume inicial em água destilada. Alíquotas de 20 µL, acrescidas de tampão de amostra 4 x concentrado (Tris 0,062 M, glicerol (v/v) 10%, SDS 1% e azul de bromofenol 0,001%, pH 6,8), foram submetidas à eletroforese gel-substrato em gel de acrilamida 10% (acrilamida 10%, bis-acrilamida 0,25%, Tris 0,25M, SDS 0,06%, Temed 10.5µL e Persulfato de sódio 0,056%) e gelatina 0,3%, com gel de entrada 5%(acrilamida 5%, bis-acrilamida 0,13%, Tris 0,09M, SDS 0,07%, Temed 6µL e Persulfato de Sódio 0,07%). Eventualmente, os géis de separação apresentaram concentração de 6% (acrilamida 6%, bis-acrilamida 0,15%, Tris 0,25M, SDS 0,06%, Temed 10.5µL e Persulfato de sódio 0,056%) , com gel de entrada 4% (acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,10%, Tris 0,09M, SDS 0,07%, Temed 6µL e Persulfato de Sódio 0,07%). Os géis foram submetidos à corrida prévia, em ausência de amostra, para eliminação de gelatina e acrilamida não polimerizada. Após eletroforese, a 0°C em tampão (Tris 0,025M, Glicina 0,192M, SDS 0,1%, pH 8,3), os géis de separação foram lavados duas vezes com Triton X-100 2,5% e incubadas em tampão (50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl), a 37°C, por 24 horas. Finalmente, os géis foram corados com 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 em 7.5% ácido acético e 12.5% etanol, por 40 min, e descorados em 10% ácido acético e 45% metanol, até obtenção de contraste ideal entre a zona digerida pela enzima e o fundo azul do gel. Os géis foram secos em papel celofane apropriado e escaneados. A área das bandas foi quantificada por densitometria, através do programa IMAGE J. Os cálculos foram feitos em relação à média do controle igual a 1. Para verificação dos pesos moleculares das proteínas, padrão de peso molecular foi utilizado, com distância de duas canaletas entre as amostras.

Extração de RNA total, síntese de cDNA e qRT-PCR em tempo real

RNA foi extraído das células, usando TRizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente 1µg de RNA foi usado, por 30 µl de volume de reação para a síntese de DNA complementar (cDNA), feita a 70°C (anelamento) por 5 min e 42 °C (atividade da transcriptase reversa) for 1 h, using the primer T23V [5' - ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttv - 3']. O cDNA foi diluído a uma proporção de 1:50 e uma alíquota foi usada para as análises utilizando qRT-PCR. Os seguintes conjuntos de primers foram utilizados: MMP-9 [5' - cattcgcgtggataaggagt - 3' (esquerda) and 5' - cactgcaggaggtcgtaggt - 3' (direita)], MMP-2 [5' - atgccatccctgataacctg - 3'(esquerda) e 5' - tgtgcagcgatgaagatgat - 3' (direita)] e β-actina [5' - tactcctgcttgctgatccacat - 3'(esquerda) e 5' - tatgccaacacagtgtctctgg - 3' (direita)] As análises foram feitas em quadruplicatas, em ciclador de tempo real Applied-Biosystem 7500. A programação de reação foi composta de desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 10 s a 94 °C, 15 s a 62 °C, 15 s a 75 °C e 35 s a 62 °C. As amostras foram mantidas por 2 min a 62°C para anelamento e então aquecidas de 55 a 99 °C com uma variação de 0.1 °C/s para adquirir dados para produzir a curva de desnaturação dos produtos amplificados. Todos os resultados foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). β-actina foi utilizada como controle interno para todos os cálculos de expressão relativa. Para critério de comparação de expressões, na figura II9C os cálculos foram feitos considerando os dados de expressão de MMP-9 do grupo controle como referência, ainda utilizando o gene β-actina como controle interno.

Quantificação protéica

Todos os resultados foram padronizados com os respectivos conteúdos protéicos, determinados através do método de Lowry (Lowry et al., 1951).

CAPÍTULO II
RESULTADOS

CAPÍTULO IIa

**MANUSCRITO A SER SUBMETIDO A MOLECULAR AND CELLULAR
BIOCHEMISTRY**

**“REGULATION OF EXTRACELLULAR LEVELS OF ADENOSINE IN
THE HEPATIC STELLATE CELL LINE GRX: PARTICIPATION OF
TNF- α AND PRESENCE OF ADENOSINE A_{2B} RECEPTOR”**

Regulation of extracellular levels of adenosine in the hepatic stellate cell line

GRX: participation of TNF- α and presence of A_{2B} adenosine receptor

Jardim FR, de Souza LF, Andrade CM, Margis R, Guma FC and Bernard EA*

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Porto Alegre, RS, Brasil

*** Corresponding author: elenbern@ufrgs.br**

+0555133085547

ABSTRACT

We investigated the release of extracellular purine and the effect of inhibition of Ado hydrolysis and transport, and the rate of purinergic release, on TNF- α stimulated HSC cell line, GRX. The extracellular hydrolysis of ATP and adenosine, the presence of adenosine receptors in these cells were also studied. Purinergic release and adenosine/ATP hydrolysis were assayed through HPLC method, in presence or absence of TNF- α . The presence of adenosine receptors was investigated by RT-PCR analysis. Control and cytokine stimulated cells did not showed significant secretion of purines, and TNF- α decreased levels of adenosine through the regulation of ecto-ADA activity. Rate of extracellular hydrolysis of both ATP and adenosine was low and GRX presented only A_{2B} receptor. We showed that GRX cells have its extracellular adenosine levels regulated in presence of conditions evoked by TNF- α . The presence of only A_{2B} adenosine receptor suggest that extracellular adenosine could mediate its actions through this receptor, in GRX cells.

Keywords: Adenosine A_{2B} receptor, ATP, ecto-ADA, extracellular adenosine, Hepatic stellate cells, GRX cells, nucleoside transport, TNF- α .

1. INTRODUCTION

Extracellular adenosine (Ado) has a key role as regulator of many physiological processes in several cell types (1, 2). Recent studies suggest that adenosine is a potent regulator of the inflammatory response (3-5) and, as such, fulfill a homeostatic and protective role in pathological conditions such as pulmonary injury (6), cardiovascular disorders (7, 8) and liver fibrosis (9, 10). Since either acute or chronic liver injury, leading to hepatic fibrosis, have consequent inflammatory reactions, it was investigated the effect of adenosine in an experimental model of rats, with slowly reversible cirrhosis, and it was described that extracellular Ado decreases collagen type I levels in the liver, stimulating collagenolytic activity helping to the hepatic regeneration by the increase of proliferation (11), among other protective actions (12-14). Hepatic stellate cells (HSCs) are nonparenchymal cells that has an important role in the pathogenesis of fibrosis (15, 16). In the normal liver, they are quiescent cells, whose main functions is to store vitamin A and probably maintain the normal basement membrane-type matrix. Following liver injury, HSC undergo an "activation" process in which they lose vitamin A, become highly proliferative, and synthesize "fibrotic" matrix rich in type I collagen (17-21). Numerous reports have studied mechanism responsible for adenosine's effect on inflammation and found, among other actions, the inhibition of TNF- α synthesis (22-24). TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that, in liver, is released mainly by Kupffer cells (25) and, in a minor proportion, by hepatic stellate cells themselves, in response to liver injury. Intracellular signaling pathways for this cytokine are extremely complex and, in hepatic environment, TNF- α is closely related to deleterious effects. The development of alcoholic liver injury has been linked to this cytokine overproduction (26), and the anti-TNF- α antibody administration to ethanol-fed rats attenuates the resulting necrosis and hepatic inflammation (27). More specifically in HSC, TNF- α

increases the production of extracellular matrix proteins as well as α -SMA mRNA, an activation marker of these cells (28).

Several cellular models have been used to mimic some aspects of HSC physiology (29, 30), and GRX cells line are one of them (31). These cells present an intermediary phenotype that may become more active with TNF- α treatment or quiescent (lipocyte) upon stimulation with retinol/indomethacin (32).

In cultured GRX cells, TNF- α is involved in proliferation (33) and regulation of levels of lipoperoxidation and catalase activity (34). As commented before, in some cells as macrophages, the regulation of TNF- α production by extracellular adenosine has been already described (23, 24), but very little information about the regulation of extracellular nucleoside levels by this cytokine was reported, and there is not information about this action in HSC.

The extracellular pool of adenosine can be regulated by nucleoside transporters and by the activity of enzymes such as nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP), nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases), ecto-5' nucleotidase and ecto-adenosine deaminase (ecto-ADA). On HSC, NTPDases and ecto-5' nucleotidase control the ATP and AMP extracellular levels, respectively, and the production of adenosine (35); moreover, the NTPDases activities depending on the activation state of these cells. In GRX cells, both expression and activity of ecto-5' nucleotidase and alkaline phosphatase were reported (36). E-NTPDases and E-NPPs expression also were demonstrated, indicating that these cells express multiple ecto-nucleotidases with the potential to hydrolyze nucleotides-triphosphates to their respective nucleosides [personal communication, *de Andrade, CMB*]. This cellular lineage presented greater ecto-ADA activity in the myofibroblast phenotype than that observed in lipocytic phenotype, when this cells was converted into fat-storing cells by retinol treatment (36),

supporting the importance of the extracellular adenosine levels in these cells, however, the regulation of this enzyme remain poorly understood. The physiological actions of extracellular Ado are mainly attributed to the activation of adenosine receptors, four different adenosine receptors are recognized, designated A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 (37, 38). Recently, it was demonstrated that rat and human HSCs cell line express A_{2A} adenosine receptor, and the lack of this receptor protects mice from hepatic fibrosis induced by thioacetamide. The same group also showed that stimulation of A_{2A} receptor increases collagen I levels in HSC lines, derived from rat or human (39). These results are in contrast to that observed in liver from animals with slowly reversible cirrhosis (11), already commented previously, in which extracellular adenosine plays an anti-inflammatory and anti-fibrogenic role. Subsequent studies, using different cellular models for HSC, also evidenced a similar involvement of A_{2A} receptor in hepatic fibrosis (40, 41). Diverses studies have shown one of another adenosine receptors in HSC of different source, with opposite results about the profile of these receptors in the various cellular models.

Because of the important anti-fibrogenic role of adenosine, on the present study, it was investigated whether GRX cells release purines to the extracellular medium and evaluated if $TNF-\alpha$ regulates this release. Besides, it was studied the metabolism of extracellular ATP and Ado, as well as the role of $TNF-\alpha$ on these metabolisms. In order to understand this metabolism, it was used nucleoside transport or ecto-adenosine deaminase inhibitors. Additionally, the identification of adenosine receptors in cultured GRX cells was also performed.

2. METHODS

2.1. GRX cellular culture

GRX cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were maintained in cell culture flasks of 25cm² in presence of Dulbecco's culture medium (DMEM) with 2 g/l HEPES buffer (both from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), pH 7.4, in a humidified atmosphere with 5% CO₂ until reach the confluence, when GRX were trypsinized and plated for the following experiments.

2.2. Determination of purines release into medium and extracellular adenosine hydrolysis assay

To determine the purines release into incubation medium, cultured GRX at density of $1,5 \times 10^4$ cells/cm² were maintained until reach the confluence, when were gently washed three times to remove medium and any dead or dying cells, and then incubated with HBSS (without phenol red, 15mM HEPES) for 0, 15, 30, 60 and 90 minutes in 5% CO₂ at 37 °C. After incubation, the medium was removed and centrifuged to eliminate debris, and then lyophilized using speedy-vaccum. The resulting powder was resuspended in a tenth of the original volume. Aliquots of 50 µl were analysed by HPLC to determine the purine content, as previously described by Gelain *et al* (42).

To determine the metabolism of adenosine and ATP, cultured GRX cells were incubated with adenosine or ATP (both from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), both 25µM, in HBSS (without phenol-red, 15mM HEPES) for the times showed in figures 1A and 1B.

In the experiments to determine the influence of TNF-α (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) in extracellular degradation of adenosine, control and TNF-α 75U/mL cells

were treated for 30 min. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) 10 μ M (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) or dypiridamole/nitrobenzylthioinosine (NBTI), both 10 μ M, were also used. The hydrolysis of adenosine and ATP were measured by HPLC as described above.

2.3. Total RNA extraction, qRT-PCR and product sequencing

RNA was extracted from the cells, using TRizol® (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), following the manufacturer's protocol. 1 μ g of RNA was used per 30 μ l reaction volume to the complementary DNA (cDNA) synthesis, together with specific primers (from Apha DNA, Montreal, Quebec, QC) for adenosine receptors A₁R [5'-ctggactctcctgaggaca-3' (Left), 5'-ccacagggcttcacaatctt-3' (Right)], A_{2A}R [5'-tcaacagcaacctgcagaac-3' (Left), 5'-gttgctctccatctgcttc-3' (Right)], A_{2B} [5' - cccgactaccccagtaga - 3' (Left), 5' - agtcaatccaatgccaag - 3' (Right)] and A₃R [5'-ctgcctttcatgtcctgtg-3' (Left), 5'-gcgcaacaagaagagaacc-3'(Right)]. The cDNA was diluted at a proportion 1:50 and 5 μ l of this was added in 20 μ l of RT-PCR reaction. The products of this reaction were separated by 2.0% agarose (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. RNA proceeding from rat testes and RAW 264.7 cells were used as positive control for A₁/A₃ and A_{2A} adenosine receptors, respectively. To further characterise the identity of the receptors investigated, we also used primers constructed from another gene regions: A_{2A}R [5'-ttccatcttcagcctcttg -3' (Left), 5'-cgcaggtctttgtggagttc -3' (Right)], A_{2B} [5' - ttggcattggattgactc - 3' (Left), 5' - tatgagcagtggaggaag- 3' (Right)] and A₃R [5'-ctgcctttcatgtcctgtg - 3' (Left), 5'-ttctattccagccaacatgg - 3'(Right)]. HSC A_{2B} PCR product were confirmed by direct sequencing using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates obtained from the real-time PCR reactions were

purified with a PCR clean-up system (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA,) and 30 to 45 ng were labeled with 3.2 pmol of specific forward or reverse primer and 2 μ l of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. PCR samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 μ L formamide, denatured at 95°C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electro injected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems).

2.4. Protein quantification

All the results were standardized with respect to protein content, determined as described by Lowry.

2.5. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate or quadruplicate. Data represent mean \pm standard error of mean (SEM). Differences were assessed by ANOVA, followed by Duncan's test, using the statistical program, SPSS 8.0 for Windows. The values obtained in the assays were considered statically different when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Purine release into the medium in TNF-alpha treated cells

In order to study the effect of this cytokine on purinergic release by cultured GRX, incubation medium of control and TNF-alpha treated cells was processed as described in Materials and Methods. Our results show that the levels of extracellular purines were very low (under the detection limit of HPLC), and that this fact was not affected by TNF- α treatment during the times analysed (0', 15', 30', 60' and 90') (data not shown).

3.2. Extracellular degradation of ATP and adenosine

The concentration of extracellular adenosine is clearly important to determine the adenosinergic effects. Adenosine concentration at its receptors are determined by a variety of processes, which included extracellular and intracellular adenosine generation, adenosine release from cells, cellular reuptake and metabolism (2). One of major pathways that contribute to high extracellular adenosine concentrations is released of precursor adenine nucleotides from the cell, followed by extracellular degradation to adenosine, by a cascade of ectonucleotidases. Adenosine accumulation is limited by its catabolism to inosine by adenosine deaminase (35). In order to investigate these pathways, we studied the hydrolysis of ATP and of adenosine by cultured GRX cells. As seen in fig.1A, ATP was metabolized very slowly reaching 15% of hydrolyses during the first 15 min, and remaining at the same level from this time on (or at 1h). Extracellular ATP were sequentially hydrolysed to ADP, AMP and adenosine. The levels of other products under the detection limit.

Similarly, adenosine was degraded by 13%; metabolites detected in the culture medium were adenosine and small quantities of inosine (Fig. 1B).

3.3. Extracellular adenosine metabolism in presence or absence of TNF-alpha: nucleoside transport and adenosine deaminase inhibitors action.

We then examined the effect of TNF- α on the hydrolysis of extracellular adenosine in cultured GRX cells. As depicted in fig. 2A and 2B, the stimulation of these cells by TNF- α decreases the levels of adenosine while increase the inosine levels, suggesting a positive modulation of the activity of ecto-ADA. In the presence of EHNA, the rate of production of inosine was significantly reduced, even if the cell were preincubated with TNF- α . These results indicate that of effect of this cytokine is on ADA activity. On the other hand, blockade of adenosine transport (by NBTI/dipyridamole) had inconsistent effects on basal levels of adenosine as well as over the action of TNF- α .

3.4. Identification of adenosine receptors in GRX cell line

In order to investigated if adenosine receptors are expressed on the GRX cells, a RT-PCR reaction was performed using specified primers for the A_{2A}, A_{2B}, A₁ and A₃ receptors. As presented in the fig. 3, cultured GRX cells contained mRNA only for A_{2B} receptor. These data were confirmed by the use of primers constructed from other regions of corresponding adenosine receptors genes (data not shown) and through the use of positive controls for A₁/A₃ (testis) and A_{2A} (RAW 264.7). To further confirm the identity of A_{2B} adenosine receptor, we sequencing the product reaction as described in Materials and Methods, indicating the correspondence to that found in mouse.

4. DISCUSSION

Until we know, there is not report about the modulation of ecto-Ada by TNF- α . The effect of cytokines over the activity of ecto-ADA has been described in lymphocytes, where this enzyme has a direct involvement on T cells activation and coordination of the extracellular quantity of adenosine. In these cells, this enzyme is regulated by some cytokines such as IL-2 and IL-12, but not by TNF- α , through mechanisms that does not involve mRNA translation, gene transcription or circulating ADA (43).

The present study demonstrated, for the first time, that TNF- α regulates extracellular adenosine concentration in cultured GRX cells through the increase in activity of ecto-adenosine deaminase, with consequent decrease in adenosine levels and increment in the production of inosine. TNF- α is linked to injurious actions and hepatic damage (44), thus, decrease in extracellular levels of adenosine could be important to the mechanism of action of this cytokine, since this nucleoside, in liver, is related to beneficial actions, and thus, oppose the pro-inflammatory effects of TNF- α . On the other hand, the production of inosine could be important in response to the injury elicited by the TNF- α treatment. Inosine plays an antiinflammatory role in pathological conditions such as experimental accute pancreatitis in rats, improving the microcirculatory disturbance by the prophylatic administration of this nucleoside (45). Additionally, inosine suppressed LPS-induced lung inflammation in vivo and reduced the toxicity of cytokines in lung cells in vitro. These effects were atributted to the binding of inosine to the A₃ adenosine receptor, because the abundance of this receptor in lung homogenates from rodents (46). The improvement in the survival of mice exposed to a lethal dose of LPS after the inosine treatment was also reported and the reduction in the TNF- α production from peritoneal macrophages treated with inosine was significantly abrogated through the use of A₁ and A₂ adenosine receptors

antagonists, DPCPX and DMPX, respectively, while this cytokine production can not be prevented by dipyridamole (47). These results are important because neither A₁ nor A₃ receptors were detected in GRX cells. Although the use of an antagonist to A₂ receptor have been prevented the effect of inosine in that work, the data about the selectivity of DMPX to A_{2A} or A_{2B} is not clear.

Our study also shows that both, control and TNF- α treated GRX cells do not release purines into the extracellular medium in detectable levels, indicating that these cells, probably, take advantage from purines released from neighboring cells. In human hepatoma HepG2 cells, it was described that the addition of fibrogenic stimuli as ethanol or methotrexate stimulate the release of adenosine (39), this suggest that in these cases, hepatocytes can be a possible source of adenosine useful for adjacent cells, like HSC. Adenine nucleotide are released by many cell types and the released of this serves to autocrine and paracrine functions (48, 49). Therefore, we studied, if, in these cells, extracellular ATP can participate in the production of adenosine through its breakdown products. In spite of the small ATP hydrolysis we can not discard this source of extracellular adenosine. ATP can be hydrolysed by extracellular enzymes, such as NTPDases, that result in the production of AMP, which in turn, can be converted to adenosine, through ecto-5'-nucleotidase/CD73 (35). In the hepatic environment, some studies have given attention to the role of hydrolysis of AMP in the production of adenosine(50). In GRX cells, it was demonstrated AMP hydrolysis leads to production of adenosine and inosine, suggesting that this nucleotide is a source for the extracellular production of adenosine (36), supporting the possibility of extra cellular ATP contribution on the nucleoside levels.

When we investigate the possible effectors of the action of adenosine in the GRX cells, our study demonstrated the presence of mRNA only for A_{2B} adenosine receptor, this

result was confirmed with sequencing A_{2B} adenosine receptor product of PCR reaction (data not shown). This result is different of that reported in immortalized rat hepatic stellate cells (HSC-T6) and LX-2 human hepatic stellate cell, and in thioacetamide-treated mice which presented more types of adenosine receptors (39). Several experimental models have been developed over the years in an effort to understand HSC physiology and not all of these cell types share the same features in their isolation and establishment process, which includes the transformation with SV40T, isolation from experimental diseases, spontaneously immortalization through the cultures, and others (29, 30). GRX comes from a local damaged, a granulomatous hepatic lesion produced by a *Schistosoma mansoni*-induced mice fibrosis, where the injury is limited (51). Thus, differences in experimental conditions could reflect differences about profile of adenosine receptor expression. In agreement with this, the same group that evidenced various types of adenosine receptors in hepatic stellate cells, also shows discrepancies between mouse HSC primary culture, that display mRNA for A₃ but not for A₁ receptor, and LX-2, which display mRNA for A₁ but not for A₃ receptor (40). The A_{2A} adenosine receptor, in HSC, is involved in hepatic fibrosis progression, because its stimulation with a selective agonist increases the production of collagen type I and adenosine A_{2A} receptor-deficient mice are resistant to thioacetamide-induced hepatic fibrosis (39), but the existence of more receptors in HSC, upon dependence the cell type, suggest that other functions, even beneficial, can be assigned to other adenosine receptors. In other cells types involved in fibrotic conditions, such as cardiac fibroblast, the overexpression of A_{2B} receptors decreases the basal levels of collagen and protein synthesis, while the underexpression of this receptor yields the contrary effects (52). Further, the long-term stimulation of A_{2B} receptors improves the cardiac function after myocardial infarction (7). Although in pulmonary fibrosis this receptor has deleterious actions (53), its

functions in GRX need to be investigated. In parallel, our results shows that the activity of ecto-ADA is surprisingly low in the control cells, in contrast to that observed in other cells (54), where the extracellular hydrolysis of adenosine is characterized by the high speed of appearance of metabolites. This is an interesting fact, in view the well-known propertie of A_{2B} adenosine receptor, termed low-affinity receptor (55). In lymphocytes, ecto-ADA increases the affinity of A_{2B} receptor for agonist NECA, and this receptor works such as an anchoring-protein for this membrane-type enzyme (56, 57).

In conclusion, this study showed that GRX cells are responsives to both extracellular adenosine and TNF- α , with regulation of the extracellular levels of this nucleoside by the cytokine. This result clearly demonstrates the importance of this regulation to coordinate the amount of adenosine available to mediate its effects, which could be through receptor A_{2B}, identified in this cells and showed in this work.

5. LEGENDS

Figure 1: ATP and adenosine metabolism in cultured GRX cells. The cells were incubated with HBSS without phenol red in presence of ATP 25 μ M (A) or adenosine 25 μ M (B) at the indicated times above. The concentrated incubation medium was analysed for purines content through HPLC as described in Materials and Methods. Relative concentrations of ATP or adenosine and their hydrolysis products are expressed as initial concentration percentage of ATP (A) or adenosine (B), respectively.

Figure 2: Effect of ecto-ADA and nucleoside transport inhibitors on TNF- α stimulated adenosine hidrolysis in cultures of GRX. Confluent GRX was pre-incubated with nucleoside transport inhibitors (dypiridamole/ NBTI (both 10 μ M) or ecto-ADA inhibitor (EHNA 10 μ M) for 10 min, followed by incubation with adenosine and/or TNF- α 75U/ml for 30 min. The incubation medium was analysed for purines content through HPLC as described in Materials and Methods. Values shown are means \pm S.E. for 3 independent experiments expressed as percentage of non-hydrolysed adenosine (A) and inosine produced (B). Different letters means statistical difference from the other groups.

Figure 3: Adenosine receptors on the surface of cultured GRX cells. Total RNA was extracted from GRX cells cultured in DMEM 5% SFB and the RT-PCR reaction was performed as described in Materials and Methods. The arrow indicates the size product which correspond to the adenosine A_{2B} receptor.

Figura 1

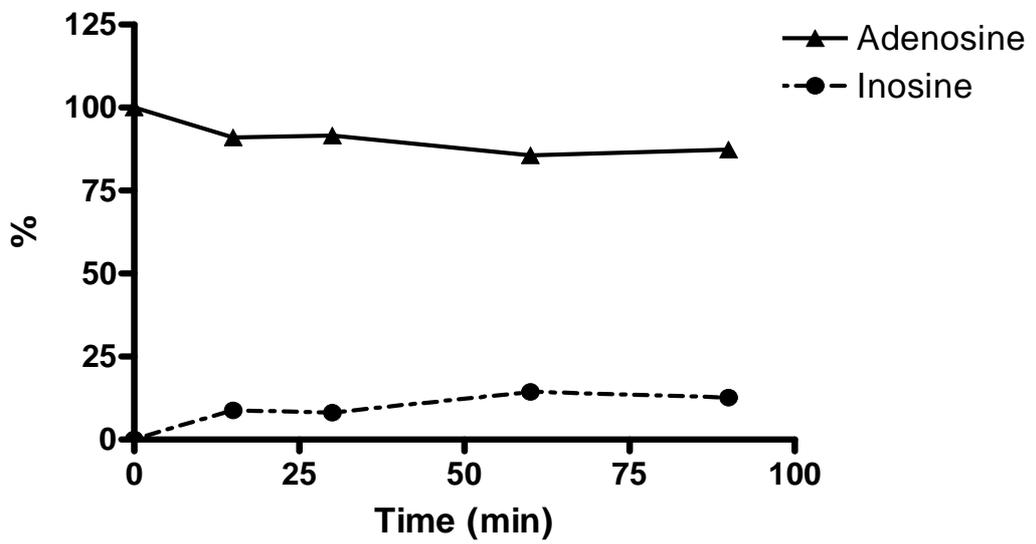
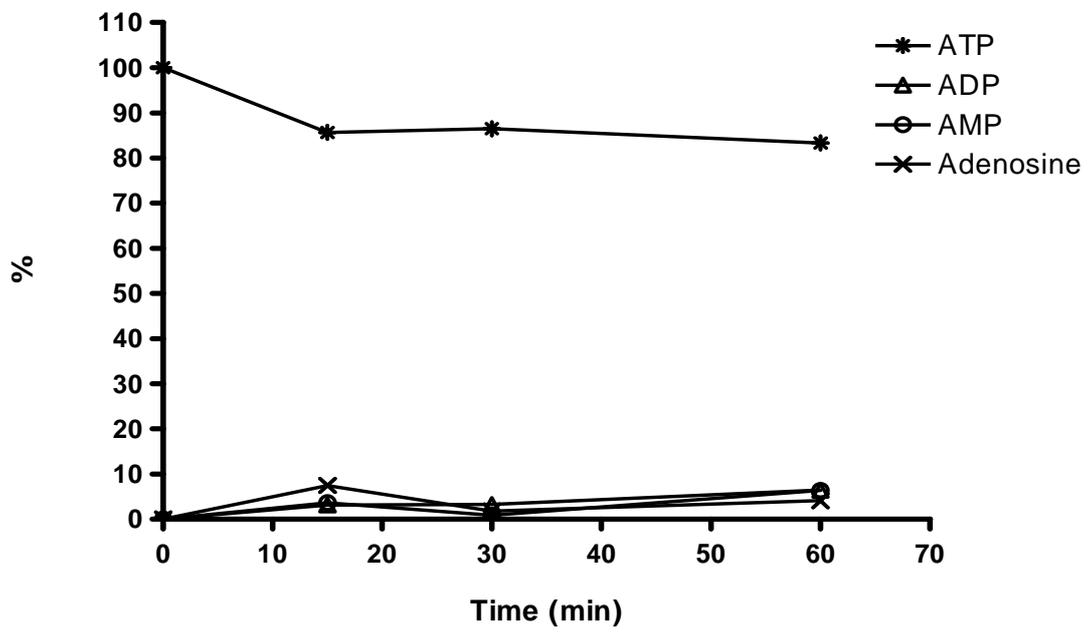


Figure 2

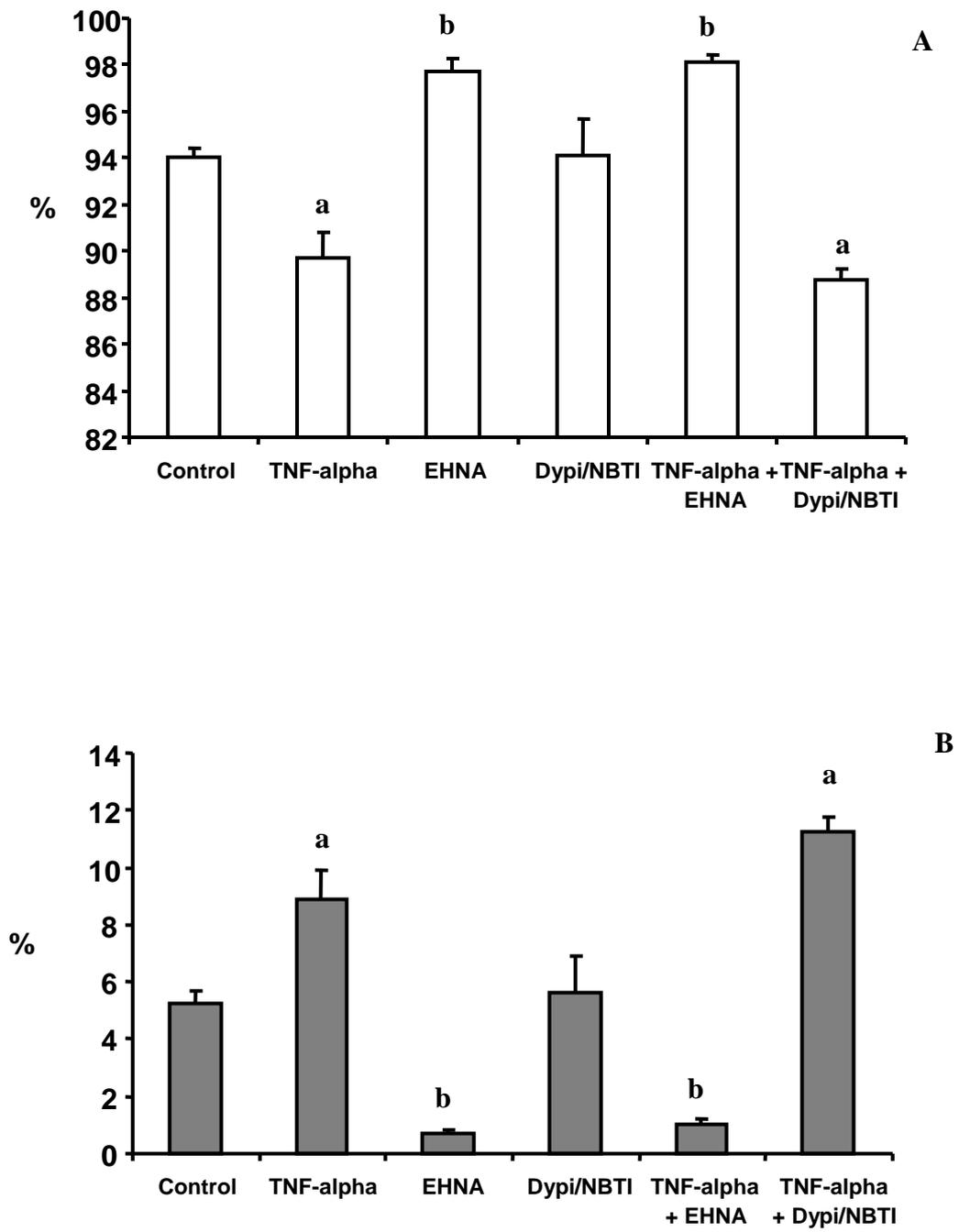
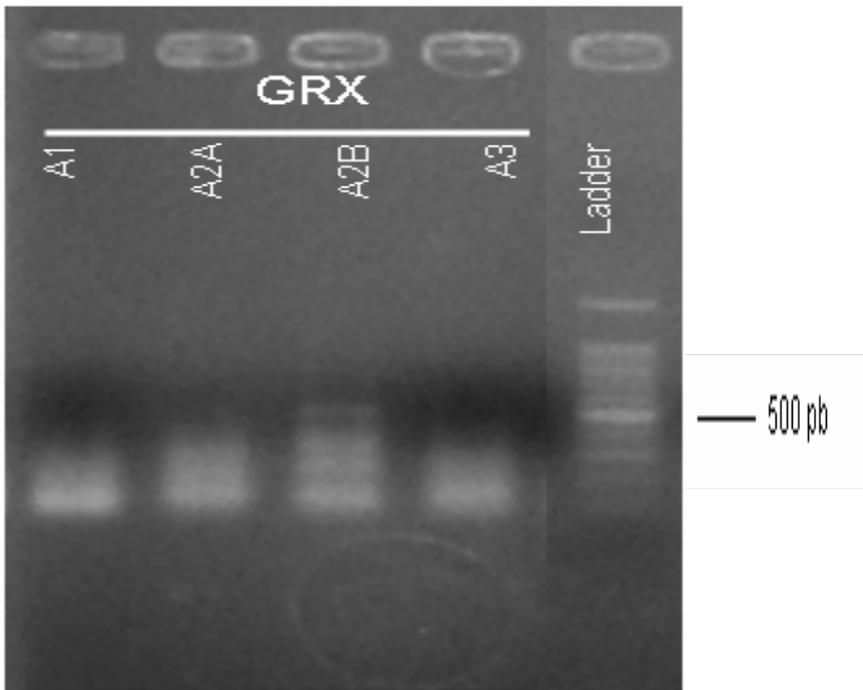


Figura 3



6. REFERENCES

1. Ramkumar V, Hallam DM and Nie Z: Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. *Jpn J Pharmacol* 86: 265-74, 2001.
2. Linden J: Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 775-87, 2001.
3. Hasko G and Cronstein BN: Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33-9, 2004.
4. Linden J: New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 116: 1835-7, 2006.
5. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB and Robson SC: Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257-65, 2007.
6. Hasko G, Xu DZ, Lu Q, Nemeth ZH, Jabush J, Berezina TL, Zaets SB, Csoka B and Deitch EA: Adenosine A2A receptor activation reduces lung injury in trauma/hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 34: 1119-25, 2006.
7. Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N and Kitakaze M: Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* 114: 1923-32, 2006.
8. Toufektsian MC, Yang Z, Prasad KM, Overbergh L, Ramos SI, Mathieu C, Linden J and French BA: Stimulation of A2A-adenosine receptors after myocardial infarction suppresses inflammatory activation and attenuates contractile dysfunction in the remote left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1410-8, 2006.

9. Le Moine O, Quertinmont E, Gulbis B and Deviere J: Blunted anti-inflammatory response to adenosine in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 31: 457-63, 1999.
10. Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsushashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J and Watanabe S: Selective A2A adenosine agonist ATL-146e attenuates acute lethal liver injury in mice. *J Gastroenterol* 40: 526-9, 2005.
11. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, Yanez L and De Sanchez VC: Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 34: 677-87, 2001.
12. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Lopez V, Lopez-Barrera F, Yanez L, Vidrio S, Aranda-Fraustro A and Chagoya de Sanchez V: Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology* 26: 1100-10, 1997.
13. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez J and Chagoya de Sanchez V: Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 12: 242-8, 1990.
14. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M and Chagoya de Sanchez V: Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim Biophys Acta* 1200: 93-9, 1994.
15. Friedman SL: Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134: 1655-69, 2008.
16. Friedman SL: Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology*: 2008.

17. Sato M, Suzuki S and Senoo H: Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 28: 105-12, 2003.
18. Senoo H: Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 37: 3-15, 2004.
19. Senoo H, Kojima N and Sato M: Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* 75: 131-59, 2007.
20. Friedman SL: Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88: 125-72, 2008.
21. Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275: 2247-50, 2000.
22. Lee JY, Jhun BS, Oh YT, Lee JH, Choe W, Baik HH, Ha J, Yoon KS, Kim SS and Kang I: Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF- α production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF- κ B activation in murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* 396: 1-6, 2006.
23. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD and Auchampach JA: Adenosine inhibits tumor necrosis factor- α release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 172-80, 2006.
24. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A and Szabo C: Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *Faseb J* 14: 2065-74, 2000.
25. Jing Y, Shishkov A and Ponnappa BC: Inhibition of tumor necrosis factor α secretion in rat Kupffer cells by siRNA: in vivo efficacy of siRNA-liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1780: 34-40, 2008.

26. McClain CJ and Cohen DA: Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 9: 349-51, 1989.
27. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H and Thurman RG: Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26: 1530-7, 1997.
28. Knittel T, Muller L, Saile B and Ramadori G: Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 27: 1067-80, 1997.
29. Herrmann J, Gressner AM and Weiskirchen R: Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11: 704-22, 2007.
30. Gutierrez-Ruiz MC and Gomez-Quiroz LE: Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int* 27: 434-9, 2007.
31. Borojevic R, Guaragna RM, Margis R and Dutra HS: In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 361-8, 1990.
32. Margis R and Borojevic R: Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). *Biochim Biophys Acta* 1011: 1-5, 1989.
33. da Silva FM, Guimaraes EL, Grivicich I, Trindade VM, Guaragna RM, Borojevic R and Guma FC: Hepatic stellate cell activation in vitro: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell motility. *J Cell Biochem* 90: 387-96, 2003.
34. Guimaraes EL, Franceschi MF, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R and Guma FC: Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int* 26: 477-85, 2006.

35. Yegutkin GG: Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-94, 2008.
36. Andrade CM, Roesch GC, Wink MR, Guimaraes EL, Souza LF, Jardim FR, Guaragna RM, Bernard EA, Margis R, Borojevic R, Battastini AM and Guma FC: Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased during phenotype conversion of a hepatic stellate cell line. *Life Sci* 82: 21-9, 2008.
37. Klotz KN: Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 382-91, 2000.
38. Klinger M, Freissmuth M and Nanoff C: Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 14: 99-108, 2002.
39. Chan ES, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, Yee H, Reiss AB, Pillinger MH, Chen JF, Schwarzschild MA, Friedman SL and Cronstein BN: Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol* 148: 1144-55, 2006.
40. Hashmi AZ, Hakim W, Kruglov EA, Watanabe A, Watkins W, Dranoff JA and Mehal WZ: Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G395-401, 2007.
41. Che J, Chan ES and Cronstein BN: Adenosine A2A receptor occupancy stimulates collagen expression by hepatic stellate cells via pathways involving protein kinase A, Src, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling cascade or p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Pharmacol* 72: 1626-36, 2007.
42. Gelain DP, de Souza LF and Bernard EA: Extracellular purines from cells of seminiferous tubules. *Mol Cell Biochem* 245: 1-9, 2003.

43. Cordero OJ, Salgado FJ, Fernandez-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R and Nogueira M: Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 70: 920-30, 2001.
44. McClain CJ, Barve S, Barve S, Deaciuc I and Hill DB: Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 248S-252S, 1998.
45. Schneider L, Pietschmann M, Hartwig W, Marcos SS, Hackert T, Gebhard MM, Uhl W, Buchler MW and Werner J: Inosine reduces microcirculatory disturbance and inflammatory organ damage in experimental acute pancreatitis in rats. *Am J Surg* 191: 510-4, 2006.
46. Liaudet L, Mabley JG, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Marton A, Hasko G, Deitch EA and Szabo C: Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. *Ann Surg* 235: 568-78, 2002.
47. Hasko G, Kuhel DG, Nemeth ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virag L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL and Szabo C: Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol* 164: 1013-9, 2000.
48. Takemura S, Kawada N, Hirohashi K, Kinoshita H and Inoue M: Nucleotide receptors in hepatic stellate cells of the rat. *FEBS Lett* 354: 53-6, 1994.
49. Brake AJ and Julius D: Signaling by extracellular nucleotides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 519-41, 1996.
50. Peng Z, Fernandez P, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Chan ES and Cronstein BN: Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *Faseb J* 22: 2263-72, 2008.

51. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourao PA, Emonard H, Grimaldi G, Jr. and Grimaud JA: Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol* 21: 382-90, 1985.
52. Chen Y, Epperson S, Makhsudova L, Ito B, Suarez J, Dillmann W and Villarreal F: Functional effects of enhancing or silencing adenosine A2b receptors in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2478-86, 2004.
53. Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, Molina JG, Belardinelli L, Zeng D and Blackburn MR: Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest* 116: 2173-2182, 2006.
54. Casali EA, de Souza LF, Gelain DP, Kaiser GR, Battastini AM and Sarkis JJ: Changes in ectonucleotidase activities in rat Sertoli cells during sexual maturation. *Mol Cell Biochem* 247: 111-9, 2003.
55. Feoktistov I and Biaggioni I: Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* 49: 381-402, 1997.
56. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C and Franco R: CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9583-8, 2005.
57. Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C and Franco R: Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 59: 127-34, 2001.

CAPÍTULO III

**“ESTUDO DA AÇÃO DA ADENOSINA NA SÍNTESE LIPÍDICA E SOBRE
APOPTOSE DE CÉLULAS GRX TRATADAS COM ADENOSINA EM
PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE TNF- α ”**

Influência do tratamento com adenosina na conversão lipocítica de células GRX em cultura

No estado fisiológico, as células estreladas hepáticas possuem fenótipo quiescente ou lipocítico, caracterizado pela presença de gotas lipídicas em seu citoplasma, cuja perda se dá em resposta a um dano (Friedman, 2008). Uma das hipóteses na regressão da fibrose é a reversão fenotípica dessas células, que pode ser acompanhada do aumento na síntese de lipídios, resultando na volta daqueles depósitos em seu citoplasma. Para estudar a influência da adenosina na síntese de lipídios nas células GRX, as culturas foram tratadas conforme Materiais e Métodos. Como visto nas figuras III1 e II2, nem o tratamento de 3 ou de 6 horas, em presença de adenosina, alterou significativamente o perfil de lipídios produzidos por essas células, indicando que, durante esses períodos, o nucleosídeo não modula a síntese de lipídios neutros produzidos pela GRX. A quantidade de radioatividade total dos extratos lipídicos também não foi alterada em presença de adenosina durante os períodos estudados (Tabela II). Conforme mencionado anteriormente, o tratamento com adenosina, com duração mais longa também foi realizado para avaliar a síntese de lipídios, no entanto, o tratamento durante 7 dias, com pulsos diários de 30 min, não resultou em modulação da síntese lipídica (dado não mostrado).

Análise do índice apoptótico em células estimuladas com adenosina e TNF- α

Alguns trabalhos mostram que adenosina extracelular regula apoptose em alguns tipos celulares (El-Darahali et al., 2005; Hashemi et al., 2005), e apoptose de HSC pode auxiliar na regressão de fibrose hepática (Kisseleva and Brenner, 2006). Além disso, a participação de TNF- α nos processo de apoptose é bastante conhecida, no entanto, em relação à HSC, os dados na literatura ainda são contraditórios. Os experimentos seguintes foram feitos com o objetivo de analisar a influência do TNF- α e adenosina

sobre a apoptose das células GRX em cultura. O tratamento de 24h com adenosina 100 μM , em presença ou ausência de $\text{TNF-}\alpha$, não estimula a formação de cromatina condensada, característico da presença de apoptose (Figura II3). Concentrações maiores de adenosina, associadas a tempos maiores de incubação, também foram utilizadas para avaliar a influência do nucleosídeo na apoptose das células GRX. Conforme figura II4, podemos observar que não há formação de corpos apoptóticos, semelhante ao grupo controle. Os resultados foram confirmados com ensaio cometa (dado não mostrado).

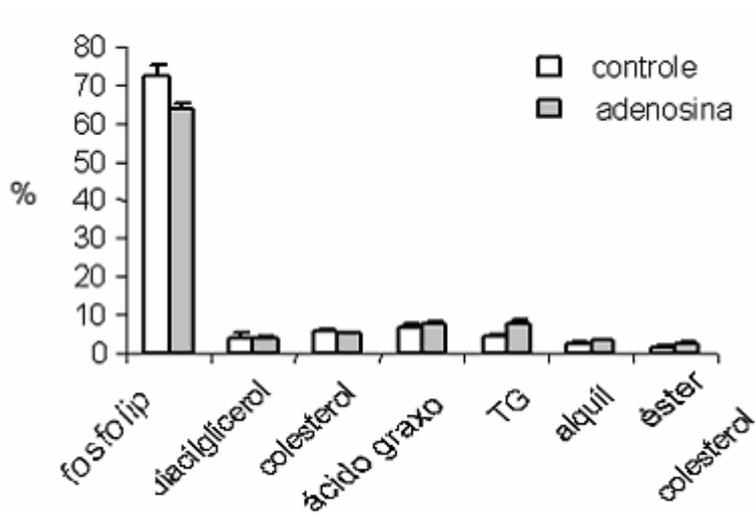


Figura III: Efeitos do tratamento com adenosina na incorporação de [¹⁴C] acetato em lipídios totais. As células foram tratadas com adenosina 100uM, incubadas com [¹⁴C] acetato (1uCi/mL) durante 3 horas. Após serem raspadas, as células foram sonicadas e utilizadas para extração de lipídios totais. Os lipídios totais foram separados por CCD, que foi impressionada em filme autoradiográfico. O filme foi analisado por densitometria, e a área das bandas resultantes foi quantificada. Os valores representam percentual de incorporação de [¹⁴C] acetato. Resultados em média ± ep. CCD: cromatografia em camada delgada; Fosfolip.: Fosfolipídios; TG: triacilglicerol.

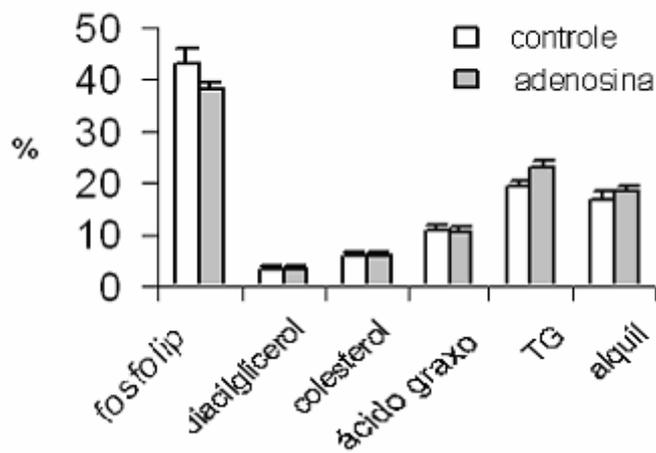


Figura II2: Efeitos do tratamento com adenosina po 6 horas na incorporação de $[^{14}\text{C}]$ acetato em lípidios totais. As células foram tratadas com adenosina $100\ \mu\text{M}$ durante 6 horas, em presença de $[^{14}\text{C}]$ acetato ($1\ \mu\text{Ci/mL}$) durante as 3 últimas hora. Após serem raspadas, as células foram sonicadas e utilizadas para extração de lípidios totais. Lípidios totais de alíquotas foram extraídos e separados por CCD, que foi impressionada em filme autorradiográfico. O filme radiográfico foi analisado por densitometria e a área das bandas resultantes foi quantificada. Os valores representam percentual de incorporação de $[^{14}\text{C}]$ acetato. Resultados em média \pm ep. CCD: cromatografia em camada delgada; fosfolip.: fosfolídeos; TG: triacilglicerol.

Tabela I1: Incorporação de [¹⁴C]acetato em lipídios totais nas células GRX. As células foram tratadas com adenosina 100uM, durante 3 e 6 horas, e incubadas com [¹⁴C] acetato (1uCi/mL) durante as três últimas horas do experimento. Após serem raspadas, as células foram sonicadas. A radioatividade total foi medida com auxílio de contador de cintilação líquida. Resultados expressos em média de cpm/mg proteína ± ep.

	CPM/ mg proteína	
	3 horas	6 horas
Controle	22204,9 ± 3930	40047,2 ± 5788
Adenosina	23722,4 ± 4261	446656,0 ± 9283

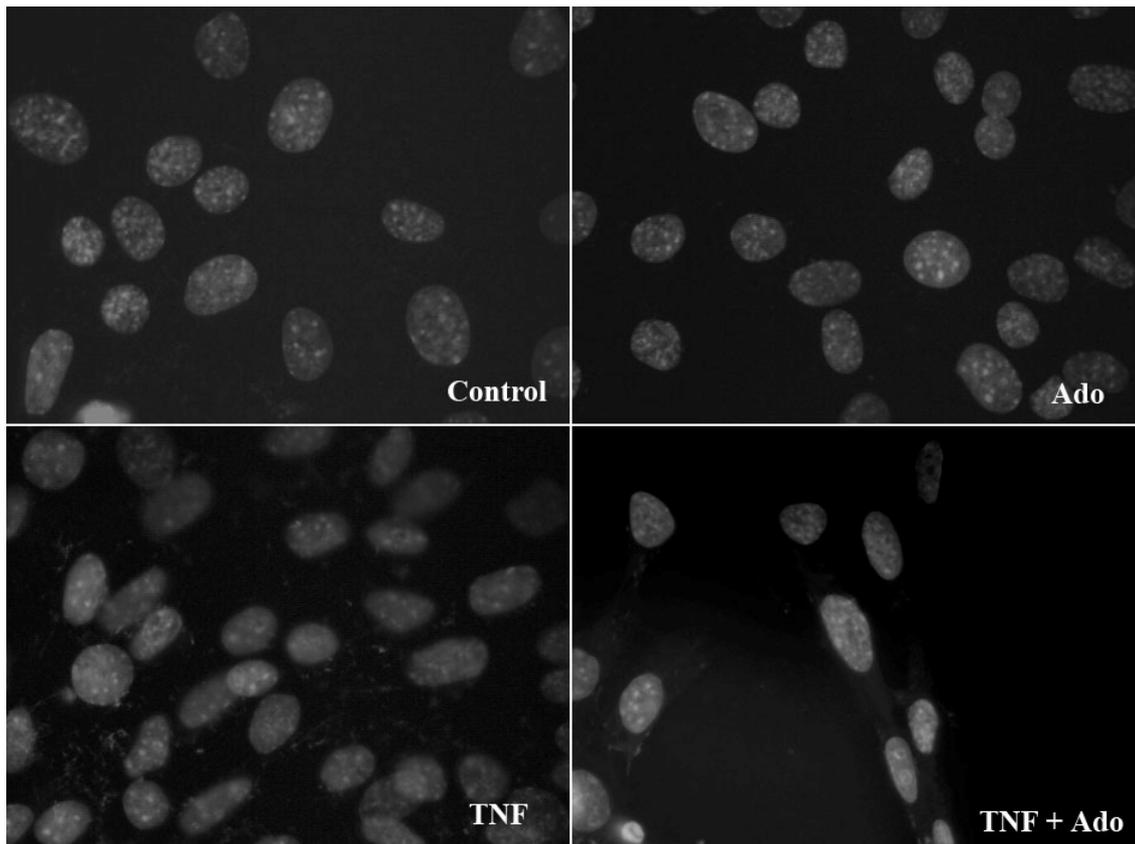


Figura II3: Efeito do tratamento de TNF- α , em presença ou ausência de adenosina, sobre a apoptose de culturas de GRX tratadas por 24 horas. As células foram tratadas com TNF- α 75 U/mL e/ou adenosina 100 μ M, e coradas com DAPI, de acordo com Materiais e Métodos. A visualização de cromatina condensada foi feita através de microscopia de fluorescência. ADO: adenosina. Control: Controle.

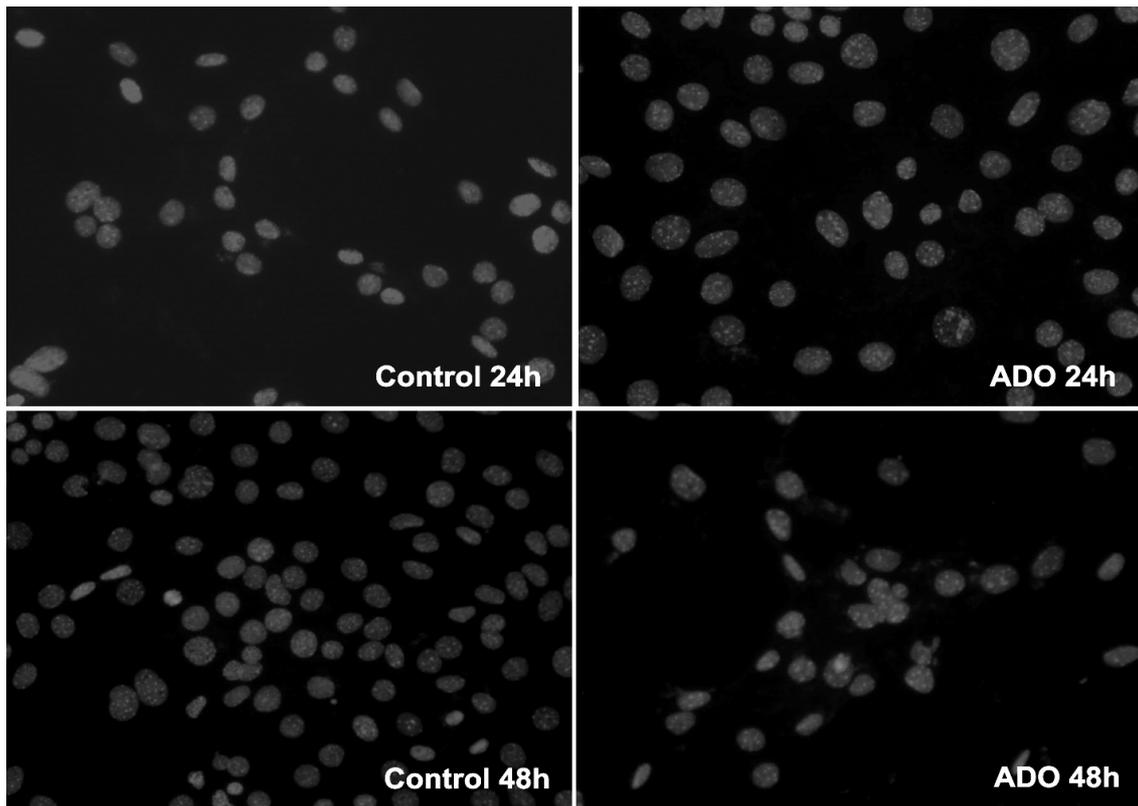


Figura II4: Efeito do tratamento de adenosina 1mM na apoptose de culturas de GRX tratadas por 24 e 48 horas. As células foram tratadas com adenosina 1mM, durante 24 ou 48 horas, e coradas com DAPI, de acordo com Materiais e Métodos. A visualização de cromatina condensada foi feita através de microscopia de fluorescência. ADO: adenosina; Control: Controle.

CAPÍTULO IIc

**“PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS GRX TRATADAS COM
ADENOSINA E/OU TNF- α ”**

Produção de nitrito por cultura de células GRX tratadas com adenosina e/ou TNF- α

Com o objetivo de estudar a influência de TNF- α e adenosina na produção de nitrito pelas células GRX em cultura, os experimentos foram feitos conforme descrito em Materiais e Métodos. De acordo com a figura II5, o tratamento com TNF- α , durante 24 horas, aumentou a produção de nitrito. Esse efeito foi potencializado na presença de adenosina, resultando em uma maior produção de nitrito comparada com os demais grupos. No entanto, a produção de nitrito em resposta ao tratamento com adenosina não diferiu do controle.

Efeito da inibição de ecto-ADA na produção de nitrito

Nosso grupo já demonstrou que TNF- α modula os níveis extracelulares de adenosina, produzindo inosina. Vários trabalhos sugerem que esse metabólito pode mediar algumas funções, inclusive antiinflamatórias, em alguns modelos celulares através do seu transporte intracelular ou através da ligação a receptores de adenosina, tais como o receptor do tipo A₁ (Hasko et al., 2000; Liaudet et al., 2002; Schneider et al., 2006). Tendo em vista esses dados, a participação de inosina na produção de nitrito foi investigada, através do uso de inibidor de ecto-ADA, EHNA (Figura II6). Os resultados obtidos mostram que a inibição da hidrólise extracelular de adenosina, com conseqüente diminuição na formação de inosina, potencializam o aumento na produção de nitrito causado por TNF- α .

Envolvimento do receptor de adenosina do tipo A_{2B} na produção de nitrito

A presença do receptor A_{2B} nas células GRX foi observada recentemente pelo nosso grupo. Para estudar a participação do receptor A_{2B}, as células GRX foram pré-incubadas com MRS1706, antagonista seletivo desse receptor, seguida de incubação com adenosina na presença de TNF- α . Conforme observado na figura II7, o bloqueio

dos receptores de adenosina do tipo A_{2B} diminui a produção de nitrito resultante do tratamento com adenosina e $TNF-\alpha$. Esses resultados sugerem a participação desse receptor mediando os efeitos da adenosina no aumento da produção de nitrito em presença de $TNF-\alpha$.

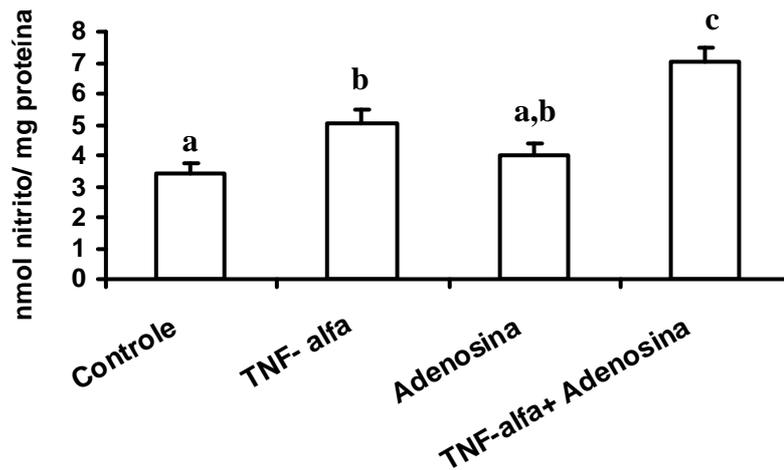


Figura II5: Efeitos do tratamento de adenosina e/ou TNF-alfa na produção de nitrito. As células GRX foram semeadas em placa de 24 wells, com uma densidade celular de 3×10^4 céls/ $1,88 \text{ cm}^2$, sendo mantidas até semi-confluência, quando foram tratadas com TNF-alfa 75U/mL e/ou adenosina 100 μ M por 24 h. O meio de incubação foi utilizado para a análise da produção de nitrito pelo método de Griess e as células foram utilizadas para dosagem de proteína. Resultados em média \pm ep. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, com $p < 0,05$.

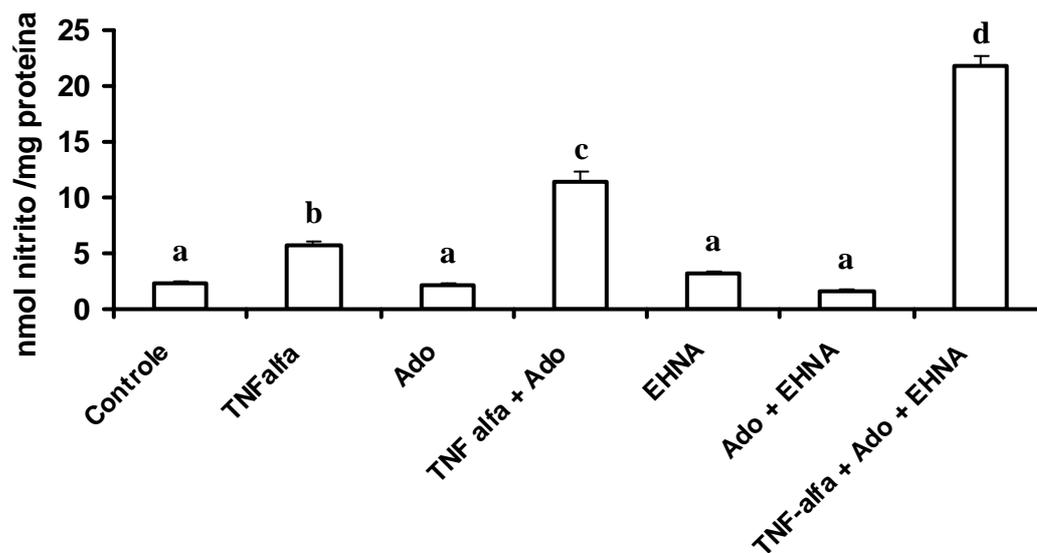


Figura II6: Efeitos da inibição da adenosina deaminase na produção de nitrito em células GRX tratadas com TNF-alfa e/ou adenosina. As células GRX foram semeadas em placa de 24 wells, sendo mantidas até semi-confluência, quando foram pré-incubadas com inibidor de ecto-adenosina deaminase, EHNA 10uM, durante 10 min, seguida por tratamento com TNF-alfa, adenosina e/ou EHNA por 24 horas adicionais. Dosagem de nitrito no meio de incubação pelo método de Griess e quantificação protéica com as células. Resultados em média \pm ep. Letras diferentes representam diferenças significativas, com $p < 0,05$. Ado: Adenosina.

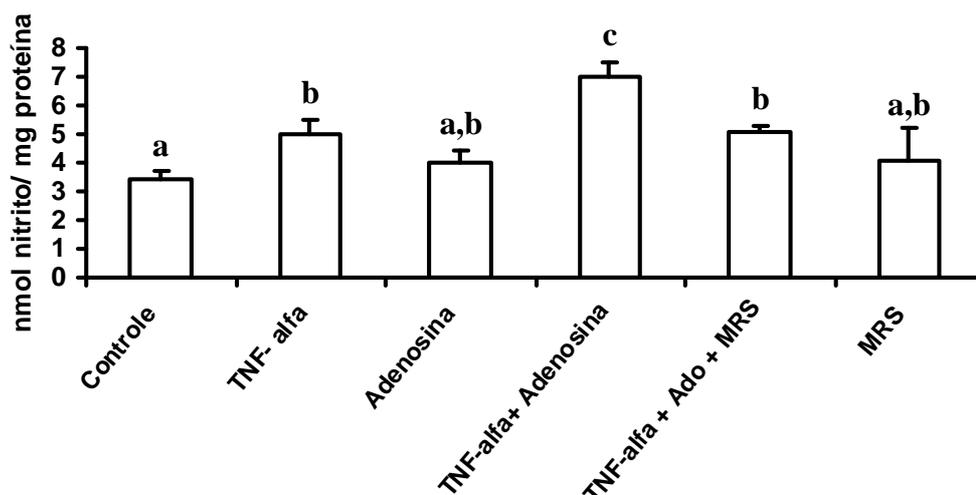


Figura II7: Efeito do antagonista seletivo de receptor para adenosina do tipo A_{2b} na produção de óxido nítrico nas células GRX tratadas com TNF-alfa e/ ou adenosina. As células GRX foram semeadas em placa de 24 wells, sendo mantidas até semi-confluência. Os experimentos foram conduzidos na presença do antagonista de A_{2B}, MRS1706 10 nM, durante 10 min, adicionado como pré-tratamento antes da adição de TNF-alfa 75U/mL e/ou adenosina 100 μM, por 24 horas. Dosagem de nitrito no meio de incubação pelo método de Griess e quantificação protéica com as células. Resultados em média ± ep. Letras diferentes representam diferenças significativas, com $p < 0,05$. Ado: Adenosina.

CAPÍTULO II

TRABALHO EM ANDAMENTO

**“ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE MMP-9 E MMP-2 EM RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM ADENOSINA E/OU TNF- α ”**

Efeito do tratamento com adenosina e TNF- α na atividade gelatinolítica das MMP

9 e 2

MMPs 9 e 2 desempenham papel importante na migração (Olaso et al., 2001) e até mesmo na apoptose de HSC (Zhou et al., 2004). Considerando a importância dessas enzimas, meio condicionado dos diferentes tratamentos foi concentrado e analisado por zimografia, conforme Materiais e Métodos. De acordo com a figura II8A, células GRX tratadas com adenosina, durante 24 horas, apresentaram uma atividade de MMP-9 menor, comparada ao grupo controle. Adicionalmente, o tratamento com TNF- α aumentou a atividade de MMP-9, sendo esse efeito diminuído a níveis de controle, em presença de adenosina. Com os resultados ainda mostramos a presença de MMP-2, cuja atividade diminui em presença de TNF- α e/ou adenosina (Fig.II8B). Na zimografia feita em gel de acrilamida 6%, o tratamento com adenosina resultou no aparecimento de um proteína com atividade de gelatinase na região de 300 Kda, cuja atividade diminui dramaticamente na presença de TNF- α (dado não mostrado).

Quantificação da expressão de mRNA de MMP-9 e -2 em culturas de GRX tratadas com adenosina e/ou TNF- α

A atividade de metaloproteinases pode ser regulada em diversos níveis, incluindo mecanismos pós-transcricionais, níveis de transcritos, entre outros (Chakraborti et al., 2003; Fu et al., 2008). No intuito de verificar a influência dos tratamentos no processo de transcrição das gelatinases, os níveis de transcritos foram quantificados por qRT-PCR. Segundo observado na figura II9A, o tratamento com TNF- α aumentou significativamente a expressão de mRNA de MMP-9 em cerca de 4 vezes com relação ao controle. As células tratadas com adenosina apresentaram níveis de expressão semelhantes aos níveis do grupo controle, entretanto, na presença de TNF- α , o tratamento com adenosina diminui significativamente a expressão de MMP-9, a

níveis maiores que o controle, diferentemente do resultado observado com a atividade da gelatinase.

Em relação à expressão de MMP-2, tanto os tratamentos com adenosina e TNF- α , quanto o tratamento com adenosina, em presença da citocina, aumentaram estatisticamente os níveis de transcritos de MMP-2 (figura II9B) sem existência de potencialização das ações do TNF- α com o tratamento com adenosina. Com o objetivo de comparar as expressões de MMP-9 e MMP-2 nas células controle, os cálculos para determinar a expressão relativa foram feitos utilizando-se MMP-9 como gene normalizador. Células controle apresentam níveis de mRNA de MMP-2 significativamente maiores em relação aos níveis de MMP-9; no entanto, esse resultado não se reflete na atividade gelatinolítica dessas enzimas (Figura II9C).

Participação do receptor A_{2B} nos efeitos de adenosina nas atividades das gelatinases

Considerando os efeitos de adenosina nas atividades de MMP-9 e -2, nos experimentos posteriores, estudamos o envolvimento do receptor do tipo A_{2B} nessas ações. Como pode ser observado na figura II10A, o bloqueio do receptor A_{2B}, através do tratamento com antagonista seletivo, MRS1706, aumenta a atividade de MMP-9, acima dos níveis do controle, indicando que os efeitos da adenosina sobre a atividade da metaloproteinase em questão são via receptor A_{2B}. O mesmo foi evidenciado durante a incubação das células GRX com MRS1706, em presença de TNF- α e adenosina, sugerindo claramente que os efeitos de adenosina sobre MMP-9 são mediados através do receptor A_{2B}.

Os receptores A_{2B} podem mediar seus efeitos através de mecanismos envolvendo cAMP, ativação de PKA, e uma série de cascatas de fosforilação sequenciais à ativação inicial de adenilato ciclase. Além disso, podem mediar ações

através do IP₃, via proteína Gq (Klotz, 2000) Os dados mostrados no inset indicam que a regulação da atividade proteolítica de MMP-9 pode ser mediada por cAMP, segundo mensageiro envolvido diretamente na ativação de receptores de adenosina do tipo A_{2B}. Com relação à atividade de MMP-2, podemos observar que o bloqueio dos receptores A_{2B} reverte o efeito de adenosina sobre a metaloproteinase, aumentando a atividade da mesma. Resultado semelhante pode ser visto com relação ao efeito do antagonista no tratamento com adenosina, em presença de TNF- α , sugerindo a participação do receptors A_{2B} mediando os efeitos de adenosina (Fig. II10B).

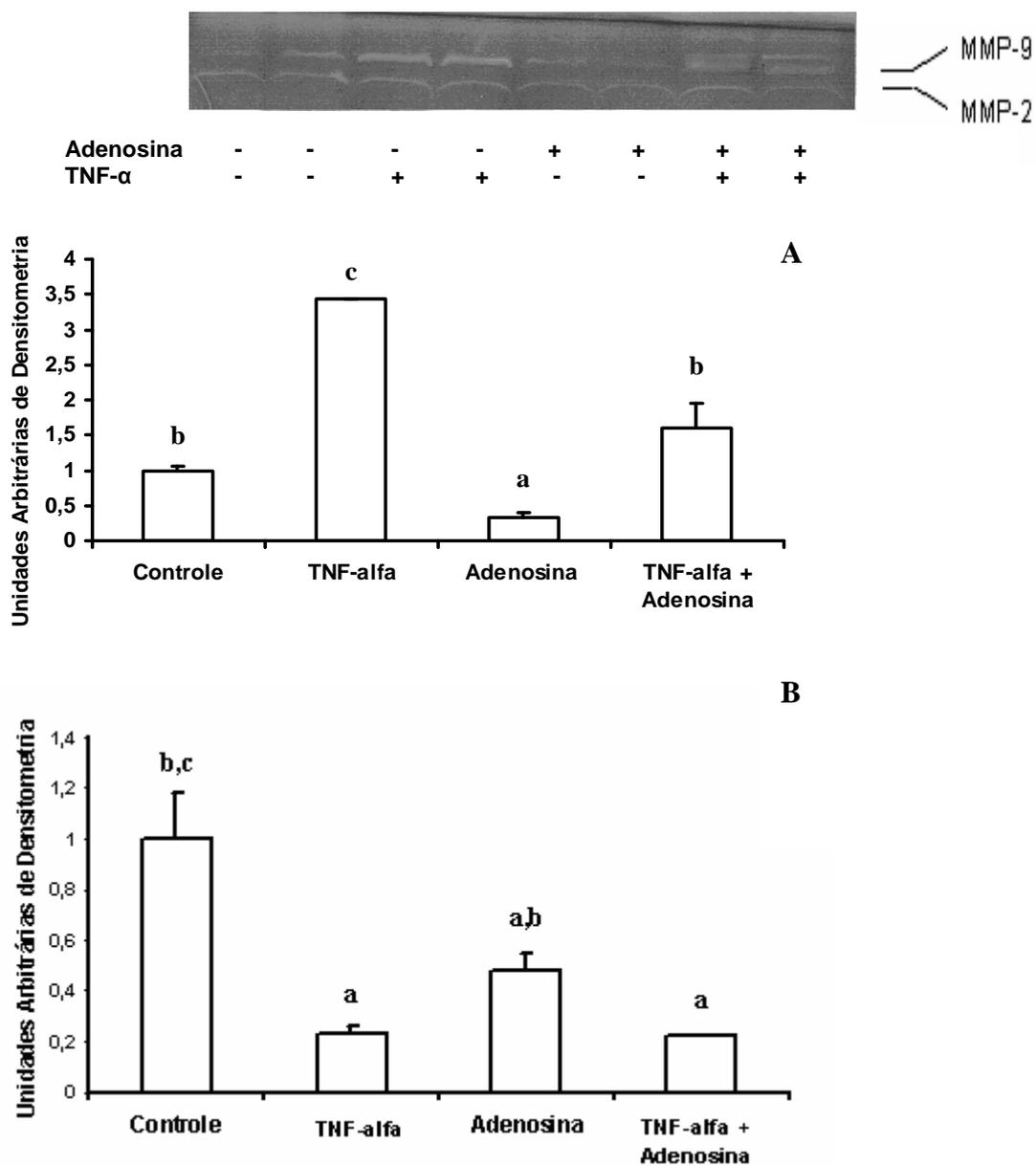
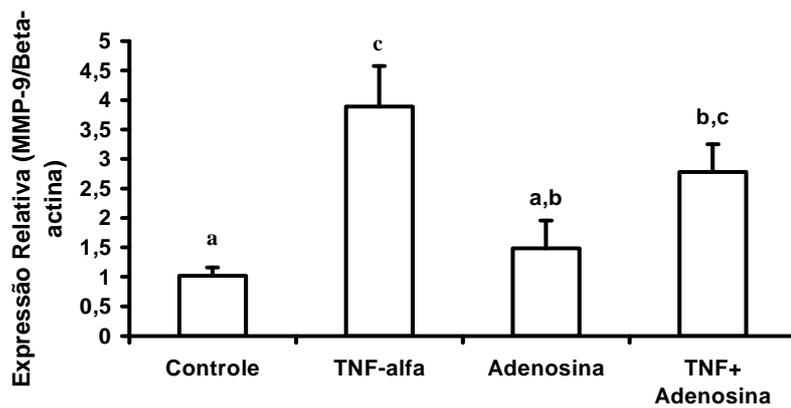
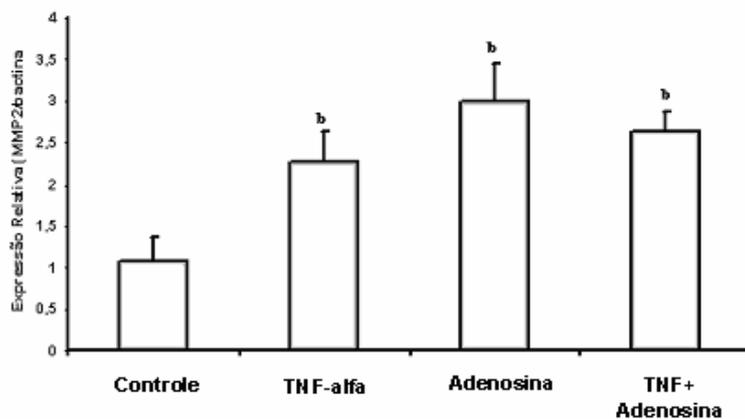


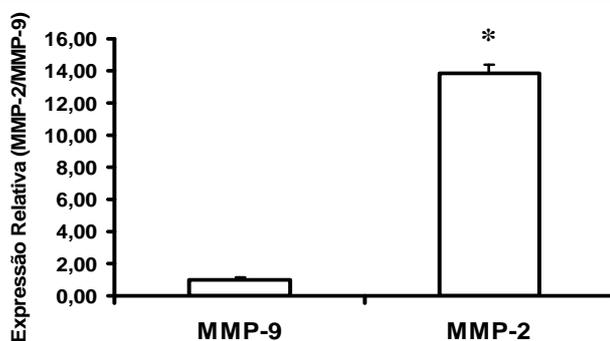
Figura II8: Atividade de MMP-9 e -2 em culturas de GRX tratadas com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α . Culturas semi-confluentes de GRX foram tratadas com adenosina e/ou TNF- α em DMEM 0,2% BSA, durante 24 horas. As atividades de MMP-9 (A) e MMP-2 (B) foram quantificadas no meio condicionado de incubação concentrado através de zimografia em gel de acrilamida 10%, conforme descrito em Materiais e Métodos. Resultados são expressos em média \pm ep, calculados em relação à média do grupo controle, considerada 1.



A



B



C

Figura II9: Regulação dos níveis de transcritos de MMP-9 e -2 em células tratadas com adenosina e/ou TNF- α . Culturas semi-confluentes de GRX foram tratadas com adenosina e/ou TNF- α em DMEM 0,2% BSA, durante 24 horas. O meio condicionado de incubação foi utilizado para zimografia e as células utilizadas para quantificação da expressão de MMP-9 (A) e -2 (B) através de real time RTPCR, conforme Materiais e Métodos, utilizando β -actina como gene normalizador. O gráfico C representa a comparação da expressão de MMP-2 em relação à MMP-9, nas células do grupo controle. Resultados são expressos em média \pm ep

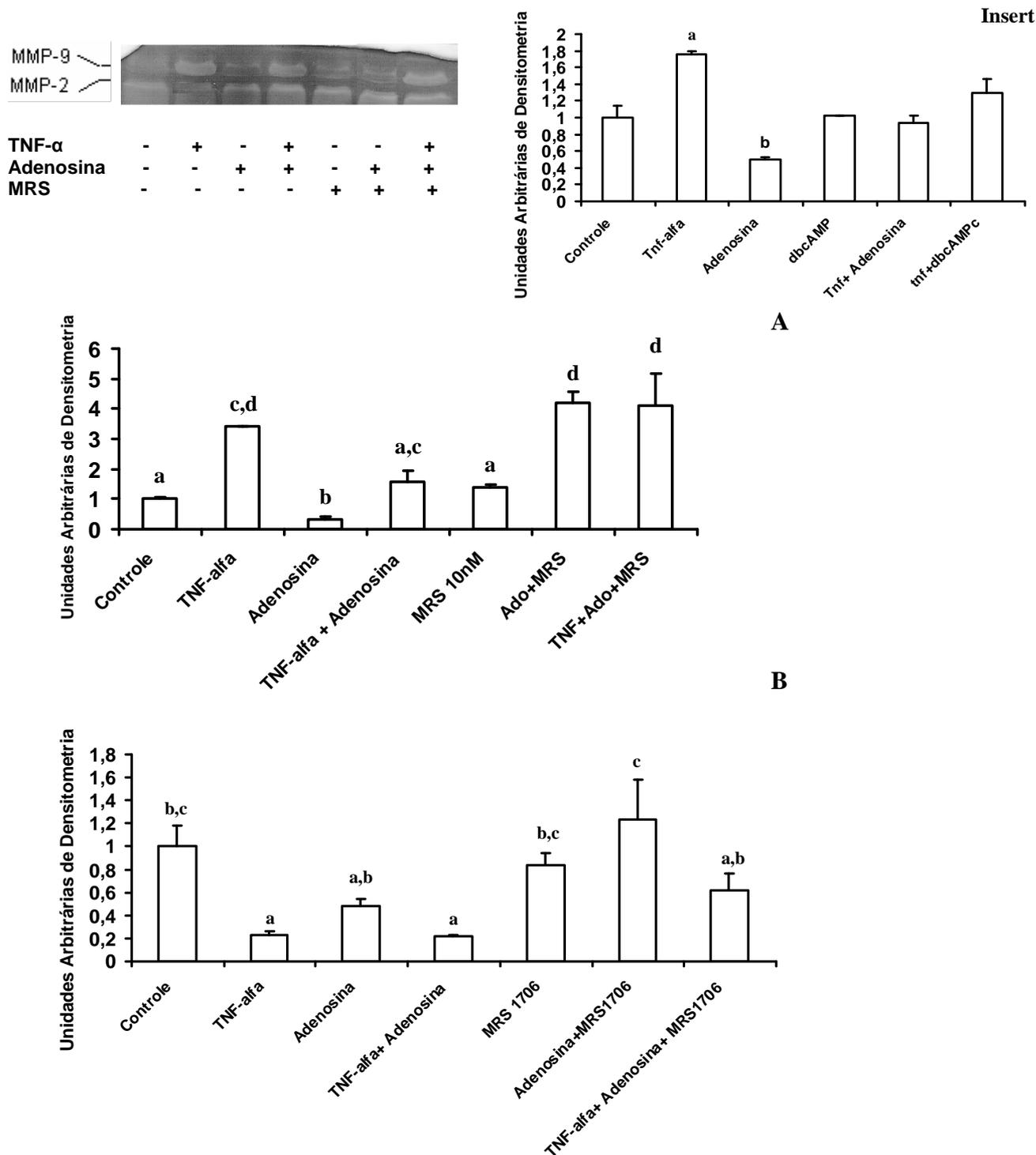


Figura II10: Participação do receptor A_{2B} na regulação das atividades de MMP-9 e -2 em culturas de GRX tratadas com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α . Culturas semi-confluentes de GRX foram pré-incubadas durante 15 min com antagonista de receptor A_{2B} , MRS1706 10nM, seguidas de tratamento com adenosina e/ou TNF- α e MRS1706 em DMEM 0,2% BSA, durante 24 horas. Para verificar o

envolvimento de cAMP nestas ações, as células foram tratadas durante 24 horas, conforme Insert, para a atividade de MMP-9 (dbcAMP 500 μ M). As atividades de MMP-9 (A) e MMP-2 (B) foram quantificadas no meio condicionado de incubação concentrado através de zimografia em gel de acrilamida 10%, conforme descrito em Materiais e Métodos. Resultados são expressos em média \pm ep, calculados em relação à média do controle igual a 1.

PARTE III

3. DISCUSSÃO

Fibrose hepática é uma condição patológica marcadamente inflamatória. A distorção da arquitetura do fígado, bem como a obliteração do espaço de Disse, perda de fenestras entre células sinusoidais e a mudança da natureza das sinalizações intercelulares (Bataller and Brenner, 2005; Guo and Friedman, 2007; Iredale, 2007; Poli, 2000; Saile and Ramadori, 2007; Tsukada et al., 2006) que acompanham o processo fibrogênico são os responsáveis, entre outros fatores, pela participação dessa doença no ranking dos dez principais responsáveis pela morte de brasileiros, em 2004. Conseqüências como hipertensão portal (Schuppan and Afdhal, 2008), perda de áreas funcionais do fígado – através da presença de fibras de colágeno do tipo I – e a evolução para cirrose (Schuppan and Afdhal, 2008), na persistência do dano, fazem da fibrose um importante assunto de saúde pública e foco de estudos científicos.

3.1. Receptor A_{2B} e a regulação dos níveis extracelulares de adenosina

Inúmeros grupos de pesquisa já descreveram o papel antiinflamatório da adenosina. O aumento da atividade colagenolítica em fígado de modelos animais com cirrose induzida por CCl_4 , o estímulo à proliferação celular, auxiliando na regeneração hepática (Hernandez-Munoz et al., 2001), e outros efeitos são prova de seus benefícios nas situações de dano hepático (Hernandez-Munoz et al., 1994; Hernandez-Munoz et al., 1997) (Chagoya de Sanchez et al., 1995; Odashima et al., 2005).

É conhecido que, em vários tipos celulares, a adenosina inibe a síntese de citocinas como $TNF-\alpha$, e que, no fígado, esta citocina participa da ativação das HSC, aumentando a expressão de α -SMA nessas células. Além disso, estimula a produção de determinadas proteínas de matriz extracelular (Knittel et al., 1997), entre outros efeitos marcadamente pró-inflamatórios. Entretanto, pouco se sabe a respeito da regulação dos

níveis extracelulares desse nucleosídeo, dos mecanismos de ação que medeiam seus efeitos e dos seus receptores nas diversas HSCs de diferentes origens.

No presente estudo, demonstramos que TNF- α regula os níveis de adenosina extracelular em culturas de células GRX, através da regulação da atividade de ecto-ADA, hidrolisando adenosina e, conseqüentemente, aumentando a produção de inosina. O efeito de citocinas sobre a atividade de ecto-ADA foi descrito em linfócitos, onde esta enzima tem um envolvimento direto na ativação de células T e na coordenação da quantidade de adenosina extracelular. Nestas células, esta enzima é regulada por algumas citocinas como a IL-2 e IL-12, mas não por TNF- α , através de mecanismos que não envolvem mRNA tradução, transcrição genética ou os níveis de ecto-ADA (Cordero et al., 2001).

A adenosina extracelular, no fígado, está associada a ações benéficas (Chagoya de Sanchez et al., 1995; Odashima et al., 2005) e, portanto, a regulação dos seus níveis extracelulares pode resultar na modulação dos seus efeitos. Nas células GRX, demonstramos que o TNF- α diminui a quantidade de adenosina extracelular. Esse efeito pode ser importante para o mecanismo de ação desta citocina, uma vez que a adenosina se oporia aos efeitos primordialmente pró-inflamatórios do TNF- α , cujo aumento está relacionado ao estabelecimento do dano hepático. Por outro lado, a produção de inosina pode ser importante em resposta ao tratamento com TNF- α . Inosina possui papel antiinflamatório em condições patológicas, tais como pancreatite aguda experimental em ratos, melhorando a microcirculação (Schneider et al., 2006). Adicionalmente, inosina diminui a inflamação pulmonar induzida por LPS *in vivo* e reduz a toxicidade de citocinas nas células de pulmão, *in vitro*. Estes efeitos antiinflamatórios foram atribuídos à ligação da inosina aos receptores de adenosina do tipo A₃, devido à abundância dos mesmos no homogeneizado de pulmão de roedores (Liaudet et al.,

2002). A sobrevivência de ratos expostos à dose letal de LPS, após o tratamento com inosina, também já foi descrita, e a redução da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais tratados com inosina foi significativamente revertida através da utilização de antagonistas de receptores da adenosina do tipo A₁ e A₂ (Hasko et al., 2000). Entretanto, de acordo com nossos dados, não observamos a existência de receptores A₁ e A₃ para adenosina, nas células GRX.

Através dos resultados, sugerimos que estas células não secretam purinas em quantidades detectáveis no meio extracelular, independentemente do tratamento com TNF- α , sugerindo que as células GRX utilizariam purinas secretadas pelas células adjacentes a elas. Em células humanas de hepatoma HepG2, foi descrito que estímulos fibrogênicos como etanol ou metotrexato estimulam a liberação de adenosina (Chan et al., 2006), sugerindo que, nesse caso, os hepatócitos poderiam ser uma possível fonte de adenosina útil para células adjacentes, como HSC.

Nucleotídeos de adenina são secretados e executam papel importante na sinalização parácrina e autócrina (Brake and Julius, 1996; Dranoff et al., 2007; Kruglov et al., 2007). Além disso, considerando que GRX expressa enzimas que permitem hidrolisar tais nucleotídeos e produzir adenosina (Andrade et al., 2008), a partir dos mesmos, a hidrólise extracelular de ATP também foi estudada.. Os resultados com o metabolismo de ATP mostram que, apesar da baixa taxa de hidrólise, não podemos descartar essa fonte de adenosina extracelular. O ATP pode ser hidrolisado extracelularmente através da ação de enzimas como NTPDases, produzindo AMP, cuja degradação, pela ecto-5'-nucleotidase / CD73, resulta na formação de adenosina (Dubyak and el-Moatassim, 1993). Na insuficiência hepática, alguns grupos têm dado a atenção para o papel da hidrólise da AMP na produção de adenosina (Peng et al., 2008). Em células GRX, foi demonstrado que a hidrólise de AMP leva à produção de

adenosina e inosina (Andrade et al., 2008), sugerindo que este nucleotídeo poderia colaborar com a produção de adenosina extracelular.

Ao investigar as possíveis ações da adenosina nas células GRX, nosso estudo demonstrou a presença de mRNA apenas para o receptor A_{2B}. A identidade desse receptor foi confirmada posteriormente através de seqüenciamento do produto de PCR do receptor A_{2B} de adenosina. Vários modelos experimentais foram desenvolvidos ao longo dos anos, com o objetivo de compreender a fisiologia da HSC. Porém, esses modelos celulares não foram estabelecidos a partir do mesmo protocolo para isolamento (no caso de culturas primárias) e estabelecimento de linhagens celulares, utilizando-se diferentes mecanismos que incluem a transformação através de transfecção com SV40T, isolamento experimental a partir de doenças, imortalização espontânea através de culturas e outros (Gutierrez-Ruiz and Gomez-Quiroz, 2007). A exemplo disso, GRX é oriunda de um granuloma produzido por uma lesão hepática induzida por *Schistosoma mansoni*. Esta célula encontra-se em estado intermediário e apresenta a capacidade de ser induzida a expressar tanto o fenótipo quiescente, quanto o fenótipo mais ativado, em resposta aos tratamentos com retinol/indometacina ou TNF- α , respectivamente. Os resultados obtidos estudando a expressão de receptores de adenosina neste tipo celular são diferentes daqueles observados em células estreladas hepáticas imortalizadas de ratos (HSC-T6), em linhagens de células estreladas hepáticas humanas (LX-2) ou em homogeneizado de fígado de camundongos tratados com tioacetamida, que apresentaram diferentes tipos de receptores de adenosina (Chan et al., 2006). Além disso, Hashmi *et al* mostraram também discrepâncias entre cultura primária de HSC de camundongo, que exibem mRNA para A₃, mas não para receptor A₁, e a linhagem humana, LX-2, que exibem mRNA para a A₁ mas não para o receptor A₃ (Hashmi et al., 2007). Receptores A_{2A}, nas HSCs, estão envolvidos na progressão da fibrose hepática,

pois o tratamento com agonista seletivo deste receptor aumenta a produção de colágeno tipo I (Chan et al., 2006; Che et al., 2007). Os mesmos autores ainda mostraram que ratos com deficiência do receptor A_{2A} de adenosina são resistentes a fibrose hepática induzida por tioacetamida, atribuindo um papel claramente pró-fibrogênico para a adenosina (Chan et al., 2006). Entretanto, a existência de mais receptores de adenosina nas HSCs e a dependência destes em relação à origem das células em estudo, sugerem que outras funções, mesmo benéficas, possam ser atribuídas aos outros receptores desse nucleosídeo. Em outros tipos de células envolvidos com fibrose, tais como fibroblastos cardíacos, a superexpressão de receptores A_{2B} diminui os níveis basais de colágeno e de síntese protéica, enquanto a sua expressão diminuída tem efeitos contrários (Chen et al., 2004). Além disso, a estimulação a longo prazo dos receptores A_{2B} melhora a função cardíaca após infarto miocárdico (Wakeno et al., 2006). Apesar disso, na fibrose pulmonar este receptor tem ações deletérias (Sun et al., 2006).

Paralelamente, mostramos que a atividade de ecto-ADA é surpreendentemente baixa em células de controle, ao contrário do que a observada em outras células (Casali et al., 2003), onde a hidrólise de adenosina extracelular é caracterizada pela alta velocidade do aparecimento de seus metabólitos. Este é um fato interessante, tendo em vista a conhecida propriedade dos receptores A_{2B} de adenosina, denominados receptores de baixa afinidade (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Nos linfócitos, ecto-ADA aumenta a afinidade do agonista NECA para o receptor A_{2B} , funcionando como proteína de ancoramento desta enzima de membrana (Herrera et al., 2001; Pacheco et al., 2005). Em conclusão, os dados obtidos mostraram que as células GRX são responsivas para ambos adenosina extracelular e $TNF-\alpha$, com a regulação dos níveis extracelulares do nucleosídeo por esta citocina.

3.2. Apoptose e quiescência de células GRX

Em virtude das conseqüências debilitantes da fibrose hepática, estudos que investigam as possibilidades de reversão do processo fibrótico são importantes. Experimentos com ratos tratados com CCl₄ mostraram que a regressão de uma cirrose avançada é possível (Jin et al., 2005). Entre os mecanismos propostos na literatura, estão a reversão fenotípica e a apoptose das células estreladas hepáticas. Talvez, a regressão da fibrose ou de uma cirrose já instalada seja mediada por uma mescla entre os dois processos, uma vez que a apoptose das HSCs ativadas traz uma questão relevante: quem substituirá as HSCs no papel da produção de matriz extracelular na nova condição? Sendo assim, a reversão fenotípica poderia ser uma resposta a essa questão. Alguns autores exploram o potencial de reversão fenotípica das HSC. No modelo GRX, essa propriedade tem sido extensivamente estudada, e tratamentos com retinóides e indometacina levam à reversão ao fenótipo lipocítico da célula GRX já ativada (Borojevic et al., 1990). Um indicativo de reversão fenotípicas dessas células é a síntese de lipídios, devido às características da HSCs em acumular gotas lipídicas em seu citoplasma. Considerando a importância de determinar o possível papel da adenosina neste processo, as células GRX foram tratadas com adenosina, durante 3 e 6 horas e por períodos mais prolongados (7 dias), para estudar a síntese de lipídios, entretanto, nossos resultados demonstram que esse nucleosídeo não atua nesse mecanismo de reversão fenotípica da GRX, pelo menos, por meio desse mecanismo. A apoptose, em resposta ao tratamento com adenosina e também ao tratamento com TNF- α , também foi estudado. Nossos dados indicam que nem TNF- α , nem adenosina induzem apoptose das células GRX. Os resultados obtidos com adenosina diferem dos dados encontrados na literatura, para outros tipos celulares. Em células de carcinoma gástrico, adenosina extracelular induz apoptose que envolve o processo de transporte de

nucleosídeo (Wang and Ren, 2006). Em linhagem de hepatoma humano, Li-7A, o tratamento com adenosina resulta em apoptose através da ativação da via da caspase-3 (Wen and Knowles, 2003). Além disso, esse nucleosídeo induz apoptose em músculo liso de artérias humanas, através do receptor A_{2B} (Peyot et al., 2000). Por outro lado, os dados mostrados com o tratamento com TNF- α , estão de acordo com a grande maioria dos trabalhos com culturas de HSC, que mostram ações anti-apoptóticas para esta citocina (Saile et al., 2001; Saile et al., 1999). Apesar de alguns trabalhos com HSCs sugerirem papel contrário para o TNF- α nestas células (Malhi et al., 2006; Novo et al., 2006; Saxena et al., 2004), as ações anti-apoptóticas são mais coerentes, uma vez que a apoptose colabora para a regressão da fibrose, opondo-se aos efeitos primordialmente pró-inflamatórios do TNF- α .

3.3. Regulação da produção de NO

A dinâmica dos efeitos do óxido nítrico (NO) é muito variada e, por vezes, obscura (Guzik et al., 2003). Na fibrose hepática, a presença de NO tanto pode ser relacionada com efeitos benéficos, quanto deletérios e até mesmo inexistentes. No fígado, o óxido nítrico é produzido intracelularmente em resposta à administração de TNF- α e LPS aos ratos, sugerindo que essa pequena molécula lipofílica é um importante mediador da hepatotoxicidade nesse modelo de injúria (Chamulitrat et al., 1995; Leung et al., 2008) . No entanto, o óxido nítrico também pode ter efeitos protetores, devido às funções fisiológicas de vasodilatador, sendo benéfico na manutenção da hemodinâmica tecidual (Gonzalez-Abraldes et al., 2002). O presente estudo mostrou que o tratamento com TNF- α aumenta a produção de NO, em células GRX. Nos estudos com outros modelos de HSCs, os resultados obtidos evidenciam que a participação de TNF- α na produção de NO seria limitada à potencialização dos efeitos produzidos com LPS e IFN- γ (Rockey et al., 1998). Existem poucos estudos mostrando a modulação da

produção de NO em resposta ao tratamento com TNF- α . Rockey *et al* demonstraram que em HSC, com fenótipo lipocítico, o tratamento com TNF- α ., durante 24 horas, não modifica a produção de NO (Rockey and Chung, 1995). No entanto, a interpretação dos resultados deve considerar o estado de ativação da HSC. Células estreladas, em fenótipo quiescente, não são responsivas aos efeitos de TNF- α mediados por NF- κ B, em virtude da falha na fosforilação do inibidor desse fator de transcrição por I κ K (Hellerbrand et al., 1998). Esse evento prejudicaria a síntese de iNOS, em resposta a citocinas, processo controlado através da expressão de seu mRNA, que contém uma região promotora para NF- κ B (Aktan, 2004). Tal fato poderia explicar a falha na produção de NO nessas culturas primárias quiescentes de HSC estimuladas com TNF- α . Células GRX apresentam um fenótipo intermediário, previamente ativado, sendo responsivas aos efeitos desta citocina em relação à produção de NO.

A participação da adenosina na produção de NO tem sido reportada na literatura, em inúmeros modelos experimentais. A adenosina extracelular modula positivamente o transporte de L-arginina, podendo influenciar na produção de NO, em células endoteliais de veia umbilical humana (Wyatt et al., 2002). Em aorta torácica de ratos, o tratamento com adenosina, durante 12 horas, aumentou a atividade da eNOS e, conseqüentemente, a produção de NO, com implicações benéficas para esse efeito (Lu et al., 2007). Com relação ao receptor A_{2B}, estudos mostram que este receptor medeia os efeitos da adenosina na produção de óxido nítrico e na modulação de NOS (Kemp and Cocks, 1999; Olanrewaju and Mustafa, 2000) em outros tipos celulares, entretanto, nosso estudo não encontrou modulação da produção de óxido nítrico em células tratadas com adenosina. A inexistência dessa modulação poderia ser explicada pela ocorrência de dessensibilização dos receptores A_{2B}. A dessensibilização é um fenômeno comum para muitos receptores, incluindo os receptores acoplados à proteína G, como os receptores

de adenosina, por exemplo. Esse evento pode ser o responsável pelas perdas de eficácia terapêutica de muitas drogas e pode ocorrer em resposta à longa duração do estímulo no receptor em questão, ou em razão da presença de altas concentrações de seu agonista, através do desacoplamento da proteína G destes receptores, ou em virtude da própria internalização destes receptores (Klaasse et al., 2008). No caso do receptor A_{2B} , esse fato é bastante descrito (Breschi et al., 2007; Matharu et al., 2001; Wang et al., 2004) e não parece ser relacionado com mudanças na expressão deste receptor. Apesar de não regular a produção de NO por si só, a presença de adenosina potencializou a ação de TNF- α na produção de óxido nítrico, sendo esse efeito diminuído com o bloqueio dos receptores A_{2B} através do uso de antagonista seletivo, MRS1706, sugerindo a participação desse receptor na mediação dos efeitos da adenosina extracelular sobre a produção de nitrito pelas células GRX. A modulação do receptor de adenosina do tipo A_{2B} em presença de citocinas já foi descrita na literatura. Em células da astroglia humana, o tratamento com TNF- α , durante 24 horas, aumentou a ligação do receptor A_{2B} à proteína G, aumentando a resposta funcional deste receptor, claramente atenuando sua desensibilização, sem modificação nos níveis de proteína e expressão de mRNA (Trincavelli et al., 2004). Por outro lado, em células epiteliais intestinais, a regulação do receptor A_{2B} foi mediada pela super-expressão do mesmo, estimulada por TNF- α , que potencializou o recrutamento de $A_{2B}R$ para a membrana plasmática das células em questão (Kolachala et al., 2005). Considerando que pouco se sabe a respeito da regulação do receptor A_{2B} , esses dois mecanismos podem ser considerados na explicação dos resultados encontrados. Além disso, a produção de NO pode ser regulada através da participação de cAMP, produzido pela ativação dos receptores A_{2B} . Tal ação já foi demonstrada em culturas de neuroeptelioma (Boissel et al., 2004), através da regulação da óxido nítrico sintase neuronal por cAMP. Em células endoteliais de aorta

de boi, a descoberta de elementos responsivos ao cAMP na região promotora da enzima eNOS representa um novo mecanismo de regulação da expressão dessa enzima (Niwano et al., 2003). Esses e outros trabalhos (Ray and Marshall, 2006) sugerem que a regulação da expressão de NOS por cAMP pode refletir-se na produção de óxido nítrico.

A regulação dos níveis extracelulares de adenosina pode controlar as ações desse nucleosídeo. Além disso, metabólitos da adenosina, como inosina, produzida através da hidrólise extracelular mediada através de ecto-adenosina deaminase, também podem ter efeitos. Em células de Sertoli, inosina aumenta a produção de NO, e pode ser um fator intermediário dos efeitos de TNF- α na produção de nitrito, uma vez que seus níveis são regulados por esta citocina (de Souza et al., 2006). Levando em consideração os resultados que demonstram uma modulação da atividade de ecto-ADA em resposta ao tratamento com TNF- α , analisamos o resultado da inibição dessa enzima sobre a produção de nitrito em células estimuladas com TNF- α , em presença de adenosina. Os dados sugerem que o bloqueio de ecto-ADA, com conseqüente aumento da concentração extracelular de adenosina, estimula ainda mais a produção de nitrito, em presença de TNF- α , sugerindo que a ação da adenosina sobre os efeitos desta citocina na produção de nitrito provavelmente não está relacionada a sua hidrólise, e conseqüente produção de inosina.

Os efeitos de NO são dependentes da concentração encontrada no local de ação, com níveis < 1 μ M (baixos níveis) relacionados a efeitos diretos, como a via PKG-cGMP. Por outro lado, concentrações maiores que 1 μ M, medeiam os efeitos indiretos do NO, como nitrosilação protéica e outros (Davis et al., 2001). Os efeitos bifásicos do óxido nítrico já foram demonstrados em linhagens de macrófagos, apresentando ações diferenciais com relação à atividade de MMP-9 (Ridnour et al., 2007). Na HSC,

conforme descrito anteriormente, a migração de linhagens LX-2, estimuladas com PDGF e Rac-1 (GTPase pequena, envolvida em processos migratórios) é inibida através de doadores de NO (Lee et al., 2005). O óxido nítrico também pode funcionar como *scavenger* de espécies reativas de oxigênio, produzindo peroxinitrito, diminuindo a produção de mRNA de α (I) pró-colágeno em co-culturas de HSC e neutrófilos, previamente estimulados com FMLP (f-Met-Leu-Phe) (Casini et al., 1997). É necessário aprofundar os estudos em torno dos efeitos do óxido nítrico, devido aos diversos fatores que estão envolvidos na regulação de suas ações.

3.4. Modulação de MMP-2 e MMP-9

O resultado final da fibrose hepática é a formação da cicatriz fibrótica. No processo fibrogênico, há a substituição da matriz extracelular previamente existente por outra, densa e fibrosa. Sendo assim, é razoável pensar na importância das enzimas que iniciam esse processo. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas zinco-dependentes, subdivididas em vários grupos, incluindo as gelatinases, MMP-2 e MMP-9 (Clark et al., 2008). Essas últimas têm como substrato fibras de colágeno do tipo IV, presentes em grande quantidade na matriz normal do fígado. Logo, seu papel no início da fibrose é fundamental, uma vez que facilita a migração de células como HSC, além de criar a possibilidade de substituição por matriz fibrótica, rica em colágeno do tipo I. A elevação de MMP-9 e -2 ocorre após uma única dose de CCl₄ em ratos, com picos de expressão coincidindo com a expressão de citocinas inflamatórias (Knittel et al., 2000). Na HSC, MMP-9 pode estar envolvida na cascata de transdiferenciação dessas células, estando, inclusive, co-localizada com α -SMA em algumas subpopulações de HSC, conforme descrito recentemente (Han et al., 2004). Além disso, seu papel na apoptose das HSC vem sendo estudado. MMP-2 está envolvida em migração e proliferação em alguns modelos de HSC (Olaso et al., 2001). Conforme o próprio nome, as gelatinases

também degradam gelatina, que são fibras de colágenos, desnaturadas e pequenas, resultantes da degradação prévia por outras metaloproteinases, sugerindo a participação das MMP-9 e -2 na remoção da matriz fibrótica já instalada. O presente trabalho mostrou que tanto adenosina, quanto TNF- α regulam a atividade de ambas gelatinases. Nas células GRX em cultura, o tratamento com TNF- α , durante 24 horas aumentou a atividade e expressão de MMP-9. A regulação de MMP-9, em resposta ao tratamento com TNF- α , tem sido estudado e descrito extensivamente na literatura, em diversos tipos celulares. Em linhagens de HSCs humanas, LI90, o tratamento com TNF- α induziu a degradação de I κ B, ativando o fator de transcrição NF- κ B, levando ao aumento da atividade de MMP-9, e, em monócitos humanos, TNF- α induz a transcrição gênica de MMP-9 através da ativação de NF- κ B (Nguyen et al., 2006). Recentemente, em linhagens de colangiocarcinoma, foi demonstrado que TNF- α , via receptor TNFR1 ativa tanto ERK 1/2 e p38, quanto NF- κ B, que estão intimamente relacionados à produção e ativação de MMP-9 (Itatsu et al., 2008). MMPs, sintetizadas como zimogênios, são secretadas ou permanecem ligadas à membrana plasmáticas, e, subsequentemente, são processadas e ativadas, seguindo para o local de degradação de seus substratos. A regulação das gelatinases pode ser atingida através de múltiplos níveis, incluindo a regulação por seus inibidores (TIMPs), expressão gênica, regulação pós-transcricional, entre outros. MMP-9 possui sítios regulatórios para fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 em sua região promotora (Yan and Boyd, 2007), o que explicaria o efeito encontrado em resposta ao estímulo com TNF- α , cujas ações podem ser mediadas via translocação de NF- κ B para o núcleo, aumentando a expressão e, conseqüente, a atividade de MMP-9, nas células GRX. O presente trabalho mostra que o tratamento com adenosina diminui a atividade de MMP-9, seja em células controle ou em células estimuladas com TNF- α . Os resultados obtidos com MRS1706 sugerem que

esse efeito é mediado pelo receptor A_{2B}. A ativação dos receptores A_{2B} pode resultar na ativação tanto da proteína Gs, quanto da proteína Gq, produzindo cAMP e IP₃, respectivamente (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Com o objetivo de testar o envolvimento de cAMP na atividade das gelatinases, as células foram tratadas em presença de um análogo não-degradável de cAMP, dbcAMP. O resultado observado sobre a atividade de MMP-9 em resposta à presença de cAMP corrobora os dados obtidos com o uso de antagonista de A_{2B}R. O efeito do tratamento com adenosina sobre a atividade de MMP-9 está de acordo com o efeito descrito por Chan *et al* que evidenciaram, em culturas da linhagem LX-2, que o tratamento com agonista de receptor A_{2A} suprimiu a atividade da MMP-9 (Chan et al., 2006). Em culturas de células dendríticas, expostas a condições de hipóxia, a superexpressão do receptor A_{2B}, acompanhada do aumento de sua funcionalidade, desencadeia a inibição da atividade de MMP-9, via mecanismo dependente de cAMP e proteína quinase A (PKA) (Zhao et al., 2008). A elevação dos níveis de cAMP também regula MMP-9 em modelos experimentais de neutrófilos (Ernens et al., 2006) e de queratinócitos. Nesse último estudo, o aumento de cAMP, através da ativação de adenilato ciclase por forskolin, inibe o efeito de EGF na indução de MMP-9. O estudo ainda sugere que essa ação seria suportada pela cascata de MAP-quinases (McCawley et al., 2000). Nas células GRX, a diminuição da atividade de MMP-9, em resposta ao tratamento somente com adenosina, não foi acompanhada da diminuição nos níveis de transcritos de MMP-9, comprovando o amplo nível de regulação da MMP-9 e sugerindo um mecanismo pós-transcricional para tal efeito. Apesar disso, o tratamento com adenosina, em células estimuladas com TNF- α , diminui também a expressão de mRNA de MMP-9, acompanhando a diminuição da atividade detectada no sobrenadante. Curiosamente, o tratamento com adenosina resultou no aparecimento de uma banda de \pm 300Kda, com atividade de

MMP, observada em gel de poliacrilamida 6%. A formação de multímeros, hetero ou homogêneos de MMP é bastante comum (Kjeldsen et al., 1993; Triebel et al., 1992). Recentemente foi descrita a existência de um multímero de aproximadamente 300 Kda, formado por pró-MMP9 e proteoglicano, entretanto, suas características bioquímicas são alteradas em relação ao monômero de MMP-9 (Malla et al., 2008). A composição do multímero observado nas células GRX tratadas com adenosina, cuja atividade diminui em presença de TNF- α , não foi esclarecida, sendo necessário o uso de anticorpos específicos para MMP-9 e MMP-2.

Ao contrário de MMP-9, MMP-2 não possui região reguladora para AP-1, e possui uma região TATA box. Segundo Chakraborti *et al*, a expressão dessa gelatinase é “constitutiva”, respondendo modestamente a fatores de crescimento e citocinas ampla (Chakraborti et al., 2003; Fu et al., 2008). Além disso, diferentemente das outras MMPs, cuja atividade é regulada através de uma cascata de ativação, envolvendo outras MMPs, a atividade de MMP-2 é coordenada por uma MMP ancorada à membrana (MMP-14) e por um inibidor de MMP, TIMP-2 (Hernandez-Barrantes et al., 2000). Apesar dessa peculiaridade na regulação, evidenciamos que tanto o tratamento com TNF- α , quanto o tratamento com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α , diminuem a atividade de MMP-2, sendo as ações da adenosina extracelular também mediadas pelo receptor A_{2B} .

Conforme comentado previamente, a ativação de receptores do tipo A_{2B} pode induzir à formação de cAMP. A coordenação das ações de MMP-2 em resposta ao cAMP é bem reportada pela literatura. Em culturas celulares de fibrosarcoma, o uso de agentes que elevam o nível de cAMP diminui o efeito da fosfolipase A_2 na ativação de pro-MMP-2, com o envolvimento de ERK $\frac{1}{2}$ (Lee et al., 2006). Nossos resultados de expressão gênica, obtidos em resposta ao tratamento com adenosina, entretanto, não

coincidem com os dados de atividade de MMP-2, sugerindo a existência de mecanismo pós-transcricional, que pode estar relacionado com a produção de cAMP. Essa afirmação é suportada pelo estudo anterior que também mostra, em culturas células de uma linhagem de fibrosarcoma, o aumento nos níveis de TIMP-2 em decorrência do estímulo da produção de cAMP através do aumento da atividade de adenilato ciclase, por forskolin (Lee et al., 2006). Além disso, a evidência de uma expressão de TIMP-2, responsiva à cAMP, com a cooperação de fatores de transcrição como NF-Y e Sp1, como mostrado em culturas de células epiteliais de câncer de mama, colabora com a hipótese de regulação pós-transcricional da atividade de MMP-2 (Han et al., 2001). Para tanto, deve-se considerar que a atividade de MMP-2 é coordenada, entre outros fatores, por TIMP-2, que possui papel complexo na modulação da atividade da gelatinase em questão. TIMP-2 é necessária para a ativação de pró-MMP-2, através da ligação com MMP-14 - metaloproteinase de membrana -. Concentrações equimolares de TIMP-2 e MMP-14 são essenciais para esse processo (Ward et al., 1991). Logo, o aumento dos níveis de TIMP-2, induzido por cAMP, desloca o equilíbrio desse processo em favor da inativação de pró-MMP2.

Nossos resultados claramente demonstram que tanto adenosina, quanto TNF- α modulam aspectos importantes da fisiologia da linhagem GRX. Os dados mostrados contribuem para elucidar os efeitos da adenosina extracelular, sobre a resposta inflamatória gerada por TNF- α , e ainda sugerem que os fatores modulados, NO e MMPs, podem estar relacionados. Em modelos de HSC, NO diminui a migração estimulada por VEGF. Nas células GRX, adenosina potencializa os efeitos de TNF- α na produção de NO, via receptor A_{2B} e diminui a atividade de MMP-9, cujas funções estão intimamente relacionadas à migração. Além disso, a modulação da atividade de MMP-9 em resposta ao NO já foi extensivamente descrita na literatura, existindo, inclusive,

modulações bifásicas dessa atividade, ou seja, concentrações baixas de NO aumentam a atividade de MMP-9, ao passo que concentrações mais altas resultam em efeito contrário, levantando a hipótese de que o NO produzido pelas células tratadas com TNF- α poderia regular positivamente a atividade de MMP-9, e que a potencialização dessa produção, resultando em níveis maiores de NO, diminuiria a atividade da gelatinase em questão, trazendo um mecanismo integrado de regulação.

4. CONCLUSÕES

Em resumo, com o presente trabalho, demonstramos que, em células GRX, os níveis extracelulares de purinas são bastante baixos e não são alterados na presença de TNF- α , sugerindo que essas células fazem uso das purinas produzidas pelas células adjacentes. Também evidenciamos que as taxas de hidrólise tanto de ATP, quanto de adenosina são baixas, comparando-se com outros tipos celulares. No entanto, em presença de TNF- α , a hidrólise de adenosina foi aumentada, em consequência do aumento da atividade da enzima ecto-adenosina deaminase.

Os efeitos da adenosina sobre a produção de óxido nítrico (NO), e atividade e expressão das gelatinases, MMP-9 e MMP-2, também foram investigadas, em presença e ausência de TNF- α e, conforme observado nos dados obtidos, o tratamento com adenosina pode regular as ações do TNF- α . Adenosina potencializou a ação do TNF- α sobre a produção de NO, provavelmente sem o envolvimento de inosina, uma vez que a inibição de ecto-adenosina deaminase não reverteu essa potencialização. Adenosina diminuiu a atividade de MMP-9, em ausência e presença de TNF- α , revertendo o efeito dessa citocina, inclusive ao nível de expressão, embora a adenosina sozinha não tenha tido a mesma ação, observada sobre a atividade de MMP-9. Além disso, o tratamento com adenosina diminuiu a atividade de MMP-2, entretanto não potencializou a ação do TNF- α , que também diminuiu a atividade de MMP-2, em presença e ausência de

adenosina. Os dados obtidos com a técnica de PCR em tempo real, mostrando um aumento na expressão do mRNA de MMP-2 em resposta ao tratamento com adenosina, com ou sem a presença de TNF- α , sugerem a existência de mecanismo pós-transcricional no controle dessa enzima.

A adenosina extracelular pode desencadear suas ações ligando-se a quatro diferentes subtipos de receptores de adenosina: A₁, A₃, A_{2A} e A_{2B}. Após a identificação do receptor A_{2B} nas células GRX, investigamos a sua participação nos efeitos encontrados com adenosina. Conforme observado nos resultados utilizando-se antagonista seletivo do receptor A_{2B}, o receptor A_{2B} tem papel importante, tanto na produção de NO, quanto na regulação das atividades de MMP-2 e MMP-9.

Estudos futuros são necessários para entender a consequência funcional dessa modulação, na GRX. Além disso, são importantes, uma vez que pouco se sabe a respeito das ações da adenosina extracelular na HSC, em geral. Logo, a atribuição de um papel benéfico ou deletério a esse nucleosídeo ainda necessita muita pesquisa.

5. PERSPECTIVAS

- Analisar a expressão de iNOS nas células GRX tratadas com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α , bem como investigar a influência do receptor de adenosina do tipo A_{2B} na modulação dos níveis de transcritos desse gene;
- Confirmar o perfil de expressão de MMP-9 e -2, em presença de antagonista de receptor A_{2B};
- Analisar a expressão do gene do receptor A_{2B} em células tratadas com TNF- α ;
- Investigar, com o auxílio de anticorpos para MMP-9 e MMP-2, a constituição da banda de 300 kDa, observada em gel de acrilamida 6%.

6. REFERÊNCIAS

- Akazawa, Y. and Gores, G. J. (2007). *Semin Liver Dis* 27, 327-38.
- Aktan, F. (2004). *Life Sci* 75, 639-53.
- Andrade, C. M., Roesch, G. C., Wink, M. R., Guimaraes, E. L., Souza, L. F., Jardim, F. R., Guaragna, R. M., Bernard, E. A., Margis, R., Borojevic, R., Battastini, A. M. and Guma, F. C. (2008). *Life Sci* 82, 21-9.
- Aram, G., Potter, J. J., Liu, X., Torbenson, M. S. and Mezey, E. (2008). *Hepatology* 47, 2051-8.
- Armendariz-Borunda, J., Katayama, K. and Seyer, J. M. (1992). *J Biol Chem* 267, 14316-21.
- Bartley, P. B., Ramm, G. A., Jones, M. K., Ruddell, R. G., Li, Y. and McManus, D. P. (2006). *Int J Parasitol* 36, 993-1001.
- Bataller, R. and Brenner, D. A. (2005). *J Clin Invest* 115, 209-18.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-4.
- Benyon, R. C. and Arthur, M. J. (2001). *Semin Liver Dis* 21, 373-84.
- Blomhoff, R., Green, M. H., Berg, T. and Norum, K. R. (1990). *Science* 250, 399-404.
- Boissel, J. P., Bros, M., Schrock, A., Godtel-Armbrust, U. and Forstermann, U. (2004). *Biochemistry* 43, 7197-206.
- Borojevic, R., Guaragna, R. M., Margis, R. and Dutra, H. S. (1990). *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 361-8.
- Borojevic, R., Monteiro, A. N., Vinhas, S. A., Domont, G. B., Mourao, P. A., Emonard, H., Grimaldi, G., Jr. and Grimaud, J. A. (1985). *In Vitro Cell Dev Biol* 21, 382-90.
- Brake, A. J. and Julius, D. (1996). *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 519-41.

- Breschi, M. C., Blandizzi, C., Fogli, S., Martinelli, C., Adinolfi, B., Calderone, V., Camici, M., Martinotti, E. and Nieri, P. (2007). *Eur J Pharmacol* 575, 149-57.
- Casali, E. A., de Souza, L. F., Gelain, D. P., Kaiser, G. R., Battastini, A. M. and Sarkis, J. J. (2003). *Mol Cell Biochem* 247, 111-9.
- Casini, A., Ceni, E., Salzano, R., Biondi, P., Parola, M., Galli, A., Foschi, M., Caligiuri, A., Pinzani, M. and Surrenti, C. (1997). *Hepatology* 25, 361-7.
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Yanez, L., Vidrio, S. and Diaz-Munoz, M. (1995). *J Biochem Toxicol* 10, 41-50.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T. (2003). *Mol Cell Biochem* 253, 269-85.
- Chamulitrat, W., Blazka, M. E., Jordan, S. J., Luster, M. I. and Mason, R. P. (1995). *Life Sci* 57, 2273-80.
- Chan, E. S., Montesinos, M. C., Fernandez, P., Desai, A., Delano, D. L., Yee, H., Reiss, A. B., Pillinger, M. H., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Friedman, S. L. and Cronstein, B. N. (2006). *Br J Pharmacol* 148, 1144-55.
- Chang, Y. Z., Yang, L. and Yang, C. Q. (2008). *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7, 401-5.
- Che, J., Chan, E. S. and Cronstein, B. N. (2007). *Mol Pharmacol* 72, 1626-36.
- Chen, Y., Epperson, S., Makhsudova, L., Ito, B., Suarez, J., Dillmann, W. and Villarreal, F. (2004). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2478-86.
- Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L. and Edwards, D. R. (2008). *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1362-78.
- Cordero, O. J., Salgado, F. J., Fernandez-Alonso, C. M., Herrera, C., Lluís, C., Franco, R. and Nogueira, M. (2001). *J Leukoc Biol* 70, 920-30.
- da Silva, F. M., Guimaraes, E. L., Grivicich, I., Trindade, V. M., Guaragna, R. M., Borojevic, R. and Guma, F. C. (2003). *J Cell Biochem* 90, 387-96.

- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V. and Murad, F. (2001). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 203-36.
- de Souza, L. F., Gelain, D. P., Jardim, F. R., Ribeiro, G. R., Zim, M. and Bernard, E. A. (2006). *Mol Cell Biochem* 281, 123-8.
- DeLeve, L. D. (2007). *Semin Liver Dis* 27, 390-400.
- Deleve, L. D., Wang, X. and Guo, Y. (2008). *Hepatology*.
- dos Santos, A. Q., Nardin, P., Funchal, C., de Almeida, L. M., Jacques-Silva, M. C., Wofchuk, S. T., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2006). *Arch Biochem Biophys* 453, 161-7.
- Dranoff, J. A., Kruglov, E. A., Abreu-Lanfranco, O., Nguyen, T., Arora, G. and Jain, D. (2007). *In Vivo* 21, 957-65.
- Dranoff, J. A., Ogawa, M., Kruglov, E. A., Gaca, M. D., Sevigny, J., Robson, S. C. and Wells, R. G. (2004). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G417-24.
- Dubyak, G. R. and el-Moatassim, C. (1993). *Am J Physiol* 265, C577-606.
- El-Darahali, A., Fawcett, H., Mader, J. S., Conrad, D. M. and Hoskin, D. W. (2005). *Exp Mol Pathol* 79, 249-58.
- Elsharkawy, A. M., Oakley, F. and Mann, D. A. (2005). *Apoptosis* 10, 927-39.
- Eng, F. J. and Friedman, S. L. (2000). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G7-G11.
- Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y. and Wagner, D. R. (2006). *Circ Res* 99, 590-7.
- Feoktistov, I. and Biaggioni, I. (1997). *Pharmacol Rev* 49, 381-402.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957). *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G. and Wasserman, W. (2000). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 364-74.

- Friedman, S. L. (2000). *J Biol Chem* 275, 2247-50.
- Friedman, S. L. (2008). *Physiol Rev* 88, 125-72.
- Fu, X., Parks, W. C. and Heinecke, J. W. (2008). *Semin Cell Dev Biol* 19, 2-13.
- Galli, A., Svegliati-Baroni, G., Ceni, E., Milani, S., Ridolfi, F., Salzano, R., Tarocchi, M., Grappone, C., Pellegrini, G., Benedetti, A., Surrenti, C. and Casini, A. (2005). *Hepatology* 41, 1074-84.
- Gasull, X., Bataller, R., Gines, P., Sancho-Bru, P., Nicolas, J. M., Gorbig, M. N., Ferrer, E., Badia, E., Gual, A., Arroyo, V. and Rodes, J. (2001). *J Hepatol* 35, 739-48.
- Gonzalez-Abraldes, J., Bosch, J. and Garcia-Pagan, J. C. (2001). *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1407-13.
- Gonzalez-Abraldes, J., Garcia-Pagan, J. C. and Bosch, J. (2002). *Metab Brain Dis* 17, 311-24.
- Guimaraes, E. L., Franceschi, M. F., Grivicich, I., Dal-Pizzol, F., Moreira, J. C., Guaragna, R. M., Borojevic, R., Margis, R. and Guma, F. C. (2006). *Liver Int* 26, 477-85.
- Guo, J. and Friedman, S. L. (2007). *Semin Liver Dis* 27, 413-26.
- Gutierrez-Ruiz, M. C. and Gomez-Quiroz, L. E. (2007). *Liver Int* 27, 434-9.
- Guzik, T. J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. (2003). *J Physiol Pharmacol* 54, 469-87.
- Han, Y. P., Tuan, T. L., Wu, H., Hughes, M. and Garner, W. L. (2001). *J Cell Sci* 114, 131-139.
- Han, Y. P., Yan, C., Zhou, L., Qin, L. and Tsukamoto, H. (2007). *J Biol Chem* 282, 12928-39.
- Han, Y. P., Zhou, L., Wang, J., Xiong, S., Garner, W. L., French, S. W. and Tsukamoto, H. (2004). *J Biol Chem* 279, 4820-8.

- Hashemi, M., Karami-Tehrani, F., Ghavami, S., Maddika, S. and Los, M. (2005). *Cell Prolif* 38, 269-85.
- Hashmi, A. Z., Hakim, W., Kruglov, E. A., Watanabe, A., Watkins, W., Dranoff, J. A. and Mehal, W. Z. (2007). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G395-401.
- Hasko, G., Kuhel, D. G., Nemeth, Z. H., Mabley, J. G., Stachlewitz, R. F., Virag, L., Lohinai, Z., Southan, G. J., Salzman, A. L. and Szabo, C. (2000). *J Immunol* 164, 1013-9.
- Hasko, G., Xu, D. Z., Lu, Q., Nemeth, Z. H., Jabush, J., Berezina, T. L., Zaets, S. B., Csoka, B. and Deitch, E. A. (2006). *Crit Care Med* 34, 1119-25.
- Hautekeete, M. L., Dodeman, I., Azais-Braesco, V., Van den Berg, K., Seynaeve, C. and Geerts, A. (1998). *Alcohol Clin Exp Res* 22, 494-500.
- Hellemans, K., Rombouts, K., Quartier, E., Dittie, A. S., Knorr, A., Michalik, L., Rogiers, V., Schuit, F., Wahli, W. and Geerts, A. (2003). *J Lipid Res* 44, 280-95.
- Hellerbrand, C., Jobin, C., Licato, L. L., Sartor, R. B. and Brenner, D. A. (1998). *Am J Physiol* 275, G269-78.
- Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M. M., Yurkova, M., Gervasi, D. C., Raz, Y., Sang, Q. A. and Fridman, R. (2000). *J Biol Chem* 275, 12080-9.
- Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M. and Chagoya de Sanchez, V. (1994). *Biochim Biophys Acta* 1200, 93-9.
- Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Lopez, V., Lopez-Barrera, F., Yanez, L., Vidrio, S., Aranda-Fraustro, A. and Chagoya de Sanchez, V. (1997). *Hepatology* 26, 1100-10.

- Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Suarez-Cuenca, J. A., Trejo-Solis, C., Lopez, V., Sanchez-Sevilla, L., Yanez, L. and De Sanchez, V. C. (2001). *Hepatology* 34, 677-87.
- Herrera, C., Casado, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (2001). *Mol Pharmacol* 59, 127-34.
- Herrmann, J., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2007). *J Cell Mol Med* 11, 704-22.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Nudelman, R. and Stamler, J. S. (2001). *Nat Cell Biol* 3, E46-9.
- Higashi, N., Sato, M., Kojima, N., Irie, T., Kawamura, K., Mabuchi, A. and Senoo, H. (2005). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 286, 899-907.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. and Byrns, R. E. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8103-7.
- Iimuro, Y. and Brenner, D. A. (2008). *Pharm Res* 25, 249-58.
- Iimuro, Y., Gallucci, R. M., Luster, M. I., Kono, H. and Thurman, R. G. (1997). *Hepatology* 26, 1530-7.
- Iredale, J. P. (2001). *Semin Liver Dis* 21, 427-36.
- Iredale, J. P. (2007). *J Clin Invest* 117, 539-48.
- Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C. and Arthur, M. J. (1998). *J Clin Invest* 102, 538-49.
- Itatsu, K., Sasaki, M., Harada, K., Yamaguchi, J., Ikeda, H., Sato, Y., Ohta, T., Sato, H., Nagino, M., Nimura, Y. and Nakanuma, Y. (2008). *Liver Int.*
- Jin, B., Alter, H. J., Zhang, Z. C., Shih, J. W., Esteban, J. M., Sun, T., Yang, Y. S., Qiu, Q., Liu, X. L., Yao, L., Wang, H. D. and Cheng, L. F. (2005). *Lab Invest* 85, 992-1002.
- Jing, Y., Shishkov, A. and Ponnappa, B. C. (2008). *Biochim Biophys Acta* 1780, 34-40.

- Kawada, N., Tran-Thi, T. A., Klein, H. and Decker, K. (1993). *Eur J Biochem* 213, 815-23.
- Kemp, B. K. and Cocks, T. M. (1999). *Br J Pharmacol* 126, 1796-800.
- Kisseleva, T. and Brenner, D. A. (2006). *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3, S84-7.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H. and Borregaard, N. (1993). *J Biol Chem* 268, 10425-32.
- Klaasse, E. C., Ijzerman, A. P., de Grip, W. J. and Beukers, M. W. (2008). *Purinergic Signal* 4, 21-37.
- Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002). *Cell Signal* 14, 99-108.
- Klotz, K. N. (2000). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 382-91.
- Kmiec, Z. (2001). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161, III-XIII, 1-151.
- Knittel, T., Mehde, M., Grundmann, A., Saile, B., Scharf, J. G. and Ramadori, G. (2000). *Histochem Cell Biol* 113, 443-53.
- Knittel, T., Mehde, M., Kobold, D., Saile, B., Dinter, C. and Ramadori, G. (1999). *J Hepatol* 30, 48-60.
- Knittel, T., Muller, L., Saile, B. and Ramadori, G. (1997). *J Hepatol* 27, 1067-80.
- Koesling, D., Russwurm, M., Mergia, E., Mullershausen, F. and Friebe, A. (2004). *Neurochem Int* 45, 813-9.
- Kolachala, V., Asamoah, V., Wang, L., Obertone, T. S., Ziegler, T. R., Merlin, D. and Sitaraman, S. V. (2005). *Cell Mol Life Sci* 62, 2647-57.
- Kreckler, L. M., Wan, T. C., Ge, Z. D. and Auchampach, J. A. (2006). *J Pharmacol Exp Ther* 317, 172-80.
- Kroncke, K. D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997). *Nitric Oxide* 1, 107-20.
- Kruglov, E. A., Correa, P. R., Arora, G., Yu, J., Nathanson, M. H. and Dranoff, J. A. (2007). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G975-82.

- Langer, D. A., Das, A., Semela, D., Kang-Decker, N., Hendrickson, H., Bronk, S. F., Katusic, Z. S., Gores, G. J. and Shah, V. H. (2008). *Hepatology* 47, 1983-93.
- Lee, C., Lee, J., Choi, Y. A., Kang, S. S. and Baek, S. H. (2006). *Biochem Biophys Res Commun* 340, 1278-83.
- Lee, J. S., Kang Decker, N., Chatterjee, S., Yao, J., Friedman, S. and Shah, V. (2005). *Am J Pathol* 166, 1861-70.
- Leung, T. M., Tipoe, G. L., Liong, E. C., Lau, T. Y., Fung, M. L. and Nanji, A. A. (2008). *Int J Exp Pathol* 89, 241-50.
- Li, J. T., Liao, Z. X., Ping, J., Xu, D. and Wang, H. (2008). *J Gastroenterol* 43, 419-28.
- Li, Y. L., Sato, M., Kojima, N., Miura, M. and Senoo, H. (1999). *Cell Struct Funct* 24, 255-61.
- Liaudet, L., Mabley, J. G., Pacher, P., Virag, L., Soriano, F. G., Marton, A., Hasko, G., Deitch, E. A. and Szabo, C. (2002). *Ann Surg* 235, 568-78.
- Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X. and Robeva, A. S. (1999). *Mol Pharmacol* 56, 705-13.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). *Methods* 25, 402-8.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). *J Biol Chem* 193, 265-75.
- Lu, J., Zhu, S. M., Zang, W. J., Xu, X. L., Luo, H. L., Yu, X. J., Wang, S. P., Kong, S. S., Wu, J., Horie, M. and Sun, L. (2007). *Biol Pharm Bull* 30, 1206-11.
- Lukivskaya, O., Patsenker, E., Lis, R. and Buko, V. U. (2008). *Eur J Clin Invest* 38, 317-25.
- Ma, T. T., Ischiropoulos, H. and Brass, C. A. (1995). *Gastroenterology* 108, 463-9.
- Malhi, H., Gores, G. J. and Lemasters, J. J. (2006). *Hepatology* 43, S31-44.

- Malla, N., Berg, E., Uhlin-Hansen, L. and Winberg, J. O. (2008). *J Biol Chem* 283, 13652-65.
- Margis, R. and Borojevic, R. (1989). *Biochim Biophys Acta* 1011, 1-5.
- Matharu, A. L., Mundell, S. J., Benovic, J. L. and Kelly, E. (2001). *J Biol Chem* 276, 30199-207.
- Mazzanti, R., Gramantieri, L. and Bolondi, L. (2008). *Mol Aspects Med* 29, 130-43.
- McCawley, L. J., Li, S., Benavidez, M., Halbleib, J., Wattenberg, E. V. and Hudson, L. G. (2000). *Mol Pharmacol* 58, 145-51.
- McClain, C. J., Barve, S., Barve, S., Deaciuc, I. and Hill, D. B. (1998). *Alcohol Clin Exp Res* 22, 248S-252S.
- Mermelstein, C. S., Andrade, L. R., Portilho, D. M. and Costa, M. L. (2006). *Cell Tissue Res* 323, 351-7.
- Michel, T. and Feron, O. (1997). *J Clin Invest* 100, 2146-52.
- Moreno, M. G. and Muriel, P. (2006). *J Appl Toxicol* 26, 326-32.
- Murad, F. (1999). *Biosci Rep* 19, 133-54.
- Nanji, A. A., Greenberg, S. S., Tahan, S. R., Fogt, F., Loscalzo, J., Sadrzadeh, S. M., Xie, J. and Stamler, J. S. (1995). *Gastroenterology* 109, 899-907.
- Nemeth, Z. H., Bleich, D., Csoka, B., Pacher, P., Mabley, J. G., Himer, L., Vizi, E. S., Deitch, E. A., Szabo, C., Cronstein, B. N. and Hasko, G. (2007). *Faseb J* 21, 2379-88.
- Nguyen, J., Gogusev, J., Knapnougel, P. and Bauvois, B. (2006). *Immunol Lett* 106, 34-41.
- Niwano, K., Arai, M., Tomaru, K., Uchiyama, T., Ohyama, Y. and Kurabayashi, M. (2003). *Circ Res* 93, 523-30.

- Noguchi, N., Teramoto, K., Ochiai, T., Irie, T., Kudou, A., Kurokawa, T., Nakamura, N., Tanaka, S., Kawamura, T. and Arii, S. (2006). *Hepatology* 36, 86-93.
- Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Valfre di Bonzo, L., Monitillo, L., Cannito, S., Petrai, I., Mazzocca, A., Bonacchi, A., De Franco, R. S., Colombatto, S., Autelli, R., Pinzani, M. and Parola, M. (2006). *Gut* 55, 1174-82.
- Oakley, F., Meso, M., Iredale, J. P., Green, K., Marek, C. J., Zhou, X., May, M. J., Millward-Sadler, H., Wright, M. C. and Mann, D. A. (2005). *Gastroenterology* 128, 108-20.
- Odashima, M., Otaka, M., Jin, M., Komatsu, K., Wada, I., Matsushashi, T., Horikawa, Y., Hatakeyama, N., Oyake, J., Ohba, R., Linden, J. and Watanabe, S. (2005). *J Gastroenterol* 40, 526-9.
- Olanrewaju, H. A. and Mustafa, S. J. (2000). *Gen Pharmacol* 35, 171-7.
- Olaso, E., Ikeda, K., Eng, F. J., Xu, L., Wang, L. H., Lin, H. C. and Friedman, S. L. (2001). *J Clin Invest* 108, 1369-78.
- Ookawauchi, K., Saibara, T., Yoshikawa, T., Chun-Lin, L., Hayashi, Y., Hiroi, M., Enzan, H., Fukata, J. and Onishi, S. (1998). *J Hepatol* 29, 923-32.
- Pacheco, R., Martinez-Navio, J. M., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9583-8.
- Parks, W. C., Wilson, C. L. and Lopez-Boado, Y. S. (2004). *Nat Rev Immunol* 4, 617-29.
- Peng, Z., Fernandez, P., Wilder, T., Yee, H., Chiriboga, L., Chan, E. S. and Cronstein, B. N. (2008). *Faseb J* 22, 2263-72.
- Peyot, M. L., Gadeau, A. P., Dandre, F., Belloc, I., Dupuch, F. and Desgranges, C. (2000). *Circ Res* 86, 76-85.

- Poli, G. (2000). *Mol Aspects Med* 21, 49-98.
- Qu, Z., Lou, D. and Pan, Y. (2007). *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27, 407-10.
- Ram, M., Sherer, Y. and Shoenfeld, Y. (2006). *J Clin Immunol* 26, 299-307.
- Ray, C. J. and Marshall, J. M. (2006). *J Physiol* 570, 85-96.
- Reynaert, H., Thompson, M. G., Thomas, T. and Geerts, A. (2002). *Gut* 50, 571-81.
- Ridnour, L. A., Windhausen, A. N., Isenberg, J. S., Yeung, N., Thomas, D. D., Vitek, M. P., Roberts, D. D. and Wink, D. A. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16898-903.
- Rockey, D. (1997). *Hepatology* 25, 2-5.
- Rockey, D. C. (2001). *Semin Liver Dis* 21, 337-49.
- Rockey, D. C., Boyles, J. K., Gabbiani, G. and Friedman, S. L. (1992). *J Submicrosc Cytol Pathol* 24, 193-203.
- Rockey, D. C. and Chung, J. J. (1995). *J Clin Invest* 95, 1199-206.
- Rockey, D. C., Chung, J. J., McKee, C. M. and Noble, P. W. (1998). *Hepatology* 27, 86-92.
- Rockey, D. C., Housset, C. N. and Friedman, S. L. (1993). *J Clin Invest* 92, 1795-804.
- Roderfeld, M., Hemmann, S. and Roeb, E. (2007). *Z Gastroenterol* 45, 25-33.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M. and Freeman, B. A. (1994). *J Biol Chem* 269, 26066-75.
- Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Novitskiy, S. V., Blackburn, M. R., Biaggioni, I. and Feoktistov, I. (2008). *J Pharmacol Exp Ther* 324, 694-700.
- Saile, B., Matthes, N., El Armouche, H., Neubauer, K. and Ramadori, G. (2001). *Eur J Cell Biol* 80, 554-61.
- Saile, B., Matthes, N., Knittel, T. and Ramadori, G. (1999). *Hepatology* 30, 196-202.

- Saile, B. and Ramadori, G. (2007). *Z Gastroenterol* 45, 77-86.
- Sakaida, I., Hironaka, K., Kimura, T., Terai, S., Yamasaki, T. and Okita, K. (2004). *Life Sci* 74, 2251-63.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. and Seiki, M. (1996). *FEBS Lett* 393, 101-4.
- Saxena, N. K., Titus, M. A., Ding, X., Floyd, J., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V. and Anania, F. A. (2004). *Faseb J* 18, 1612-4.
- Schneider, L., Pietschmann, M., Hartwig, W., Marcos, S. S., Hackert, T., Gebhard, M. M., Uhl, W., Buchler, M. W. and Werner, J. (2006). *Am J Surg* 191, 510-4.
- Schramm, C. and Lohse, A. W. (2005). *Clin Rev Allergy Immunol* 28, 105-14.
- Schuppan, D. and Afdhal, N. H. (2008). *Lancet* 371, 838-51.
- Schuppan, D., Ruehl, M., Somasundaram, R. and Hahn, E. G. (2001). *Semin Liver Dis* 21, 351-72.
- Senoo, H. (2004). *Med Electron Microsc* 37, 3-15.
- Sims, D. E. (1991). *Can J Cardiol* 7, 431-43.
- Stamler, J. S., Lamas, S. and Fang, F. C. (2001). *Cell* 106, 675-83.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). *Sci Signal* 1, re6.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. and Goldberg, G. I. (1995). *J Biol Chem* 270, 5331-8.
- Sun, C. X., Zhong, H., Mohsenin, A., Morschl, E., Chunn, J. L., Molina, J. G., Belardinelli, L., Zeng, D. and Blackburn, M. R. (2006). *J Clin Invest* 116, 2173-2182.
- Svegliati-Baroni, G., Saccomanno, S., van Goor, H., Jansen, P., Benedetti, A. and Moshage, H. (2001). *Liver* 21, 1-12.

- Taimr, P., Higuchi, H., Kocova, E., Rippe, R. A., Friedman, S. and Gores, G. J. (2003). *Hepatology* 37, 87-95.
- Takemura, S., Kawada, N., Hirohashi, K., Kinoshita, H. and Inoue, M. (1994). *FEBS Lett* 354, 53-6.
- Tanaka, Y., Nouchi, T., Yamane, M., Irie, T., Miyakawa, H., Sato, C. and Marumo, F. (1991). *J Pathol* 164, 273-8.
- Thirunavukkarasu, C., Watkins, S. C. and Gandhi, C. R. (2006). *Hepatology* 44, 389-98.
- Tomita, K., Tamiya, G., Ando, S., Ohsumi, K., Chiyo, T., Mizutani, A., Kitamura, N., Toda, K., Kaneko, T., Horie, Y., Han, J. Y., Kato, S., Shimoda, M., Oike, Y., Tomizawa, M., Makino, S., Ohkura, T., Saito, H., Kumagai, N., Nagata, H., Ishii, H. and Hibi, T. (2006). *Gut* 55, 415-24.
- Triebel, S., Blaser, J., Reinke, H. and Tschesche, H. (1992). *FEBS Lett* 314, 386-8.
- Trincavelli, M. L., Marroni, M., Tuscano, D., Ceruti, S., Mazzola, A., Mitro, N., Abbracchio, M. P. and Martini, C. (2004). *J Neurochem* 91, 1180-90.
- Tsukada, S., Parsons, C. J. and Rippe, R. A. (2006). *Clin Chim Acta* 364, 33-60.
- Varela-Rey, M., Montiel-Duarte, C., Oses-Prieto, J. A., Lopez-Zabalza, M. J., Jaffrezou, J. P., Rojkind, M. and Iraburu, M. J. (2002). *FEBS Lett* 528, 133-8.
- Vera, M. and Nieto, N. (2006). *Rev Esp Enferm Dig* 98, 674-84.
- Wakeno, M., Minamino, T., Seguchi, O., Okazaki, H., Tsukamoto, O., Okada, K., Hirata, A., Fujita, M., Asanuma, H., Kim, J., Komamura, K., Takashima, S., Mochizuki, N. and Kitakaze, M. (2006). *Circulation* 114, 1923-32.
- Wang, D. R., Sato, M., Li, L. N., Miura, M., Kojima, N. and Senoo, H. (2003). *Cell Struct Funct* 28, 505-13.
- Wang, L., Kolachala, V., Walia, B., Balasubramanian, S., Hall, R. A., Merlin, D. and Sitaraman, S. V. (2004). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G1100-7.

- Wang, M. X. and Ren, L. M. (2006). *Acta Pharmacol Sin* 27, 1085-92.
- Ward, R. V., Atkinson, S. J., Slocombe, P. M., Docherty, A. J., Reynolds, J. J. and Murphy, G. (1991). *Biochim Biophys Acta* 1079, 242-6.
- Weisberg, I. S., Brown, R. S., Jr. and Sigal, S. H. (2007). *Clin Liver Dis* 11, 893-916, ix.
- Wen, L. T. and Knowles, A. F. (2003). *Br J Pharmacol* 140, 1009-18.
- Wyatt, A. W., Steinert, J. R., Wheeler-Jones, C. P., Morgan, A. J., Sugden, D., Pearson, J. D., Sobrevia, L. and Mann, G. E. (2002). *Faseb J* 16, 1584-94.
- Yan, C. and Boyd, D. D. (2007). *J Cell Physiol* 211, 19-26.
- Yan, C., Zhou, L. and Han, Y. P. (2008). *Liver Int.*
- Yegutkin, G. G. (2008). *Biochim Biophys Acta* 1783, 673-94.
- Zhao, P., Li, X. G., Yang, M., Shao, Q., Wang, D., Liu, S., Song, H., Song, B., Zhang, Y. and Qu, X. (2008). *Mol Immunol* 45, 2187-95.
- Zhong, H., Belardinelli, L., Maa, T. and Zeng, D. (2005). *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 2-8.
- Zhou, X., Murphy, F. R., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, J. P. and Benyon, R. C. (2004). *J Biol Chem* 279, 23996-4006.

7. LISTA DE FIGURAS

Figura I1: Desenho esquemático de fígado em condição fisiológica e seus principais tipos celulares e componentes.....	6
Figura I2: Desenho esquemático do processo de transdiferenciação da célula estrelada hepática: suas causas e conseqüências.....	8
Figure 1: ATP and adenosine metabolism in cultured GRX cells.....	45
Figure 2: Effect of ecto-ADA and nucleoside transport inhibitors on TNF-alpha stimulated adenosine hidrolysis in cultures of GRX.....	46
Figure 3: Adenosine receptors on the surface of cultured GRX cells.....	47
Figura II1: Efeito do tratamento com adenosina na incorporação de [¹⁴ C] acetato em lipídios totais.....	58
Figura II2: Efeito do tratamento com adenosina de 6 horas na incorporação de [¹⁴ C] acetato em lipídios totais.....	59
Figura II3: Efeito do tratamento de TNF- α , em presença ou ausência de adenosina, sobre a apoptose de culturas de GRX tratadas por 24 horas.....	61
Figura II4: Efeito do tratamento de adenosina 1mM na apoptose de culturas de GRX tratadas por 24 e 48 horas.....	62
Figura II5: Efeito do tratamento de adenosina e/ou TNF-alfa na produção de nitrito.....	66
Figura II6: Efeito da inibição de adenosina deaminase na produção de nitrito em células GRX tratadas com TNF-alfa e/ou adenosina.....	67
Figura II7: Efeito do antagonista seletivo de receptor para adenosina do tipo A2b na produção de óxido nítrico nas células GRX tratadas com TNF-alfa e/ ou adenosina.....	68

Figura II8: Atividade de MMP-9 e -2 em culturas de GRX tratadas com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α	73
Figura II9: Regulação dos níveis de transcritos de MMP-9 e -2 em células tratadas com adenosina e/ou TNF- α	74
Figura II10: Participação do receptor A _{2B} na regulação das atividades de MMP-9 e -2 em culturas de GRX tratadas com adenosina, em presença ou ausência de TNF- α	75

8. LISTA DE TABELAS

Tabela I1: Incorporação de [¹⁴ C]acetato em lipídios totais nas células GRX.....	60
--	----