



Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina

Papel da adenosina na proliferação e diferenciação dos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo

Célia Cristina Moreira Soares¹

Orientador:

Professor Doutor Paulo Jorge da Silva Correia de Sá¹

Coorientadora:

Dra Ana Rita Vieira Pinheiro¹

¹Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS- UP), Portugal

2012

Abstract

Increased connective tissue stiffness due to fibrosis, as well as extracellular nucleotides/nucleosides, may play a role in the pathogenesis of intractable chronic pain. Fibroblasts, the predominant cell of the connective tissue, are able to release ATP in response to stressful conditions. Depending on its extracellular catabolism, fibrosis may be influenced the ATP and/or its metabolites through the activation of P2 and/or P1 receptors. Therefore, we aimed at characterizing the extracellular enzymatic pathways responsible for adenosine formation from the catabolism of ATP, as well as to evaluate the expression and function of adenosine receptors on the proliferation and synthesis of type I collagen by fibroblast cell cultures from the rat subcutaneous connective tissue.

Cells were isolated from the subcutaneous connective tissue of adult Wistar rats. The catabolism of ATP, ADP, AMP and adenosine in fibroblast cell cultures was evaluated through quantification of adenine nucleotides and nucleosides by high-performance liquid chromatography (with UV detection). The expression of E-NTPDases1, 2 and 3, as well as of ecto-5'-nucleotidase, was evaluated by immunocytochemistry. The role of subtype selective adenosine receptor agonists on the proliferation and type I collagen synthesis was assessed by MTT and Sirius Red assays, respectively.

ATP was hydrolyzed ($t_{1/2}$ =12.5 minutes) to ADP, adenosine and inosine. AMP was quickly dephosphorylated into adenosine ($t_{1/2}$ =3 minutes), whereas ADP ($t_{1/2}$ =68 minutes) and adenosine ($t_{1/2}$ =29 minutes) tend to accumulate in fibroblast cell cultures. Cells exhibited positive immunoreactivity for NTPDase2, NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase, but no labelling was found for NTPDase1. Incubation of cell cultures with selective A_1 and A_3 receptor agonists increased fibroblast cells proliferation. Activation of A_1 receptors also favored type I collagen synthesis, an effect that may be counteracted by co-localized inhibitory A_{2A} receptors.

Although preliminary, data suggest that ATP release by stressed fibroblasts may be sequentially dephosphorylated via an enzymatic cascade involving NTPDases2, -3 and ecto-5'-nucleotidase leading to adenosine accumulation. Activation of subtype selective adenosine receptors may influence connective tissue remodeling and fibrosis. In this regard, activation of high-affinity A_1 receptors has a pro-fibrotic effect, which may be partially counteracted by inhibition of collagen synthesis by A_{2A} receptors. Thus, targeting the purinergic pathways underlying fibrosis might be useful to design novel therapeutic approaches against musculo-skeletal chronic pain.

Resumo

A fibrose do tecido celular subcutâneo, associada à atividade parácrina ou autócrina dos nucleótidos e nucleósidos extracelulares, podem estar envolvidos na patogênese da dor crônica refractária. Os fibroblastos do tecido conjuntivo libertam ATP em resposta ao stresse. Dependendo do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina, a fibrose pode ser influenciada pelo ATP e/ou pelos seus metabolitos através da ativação de recetores purinérgicos P2 e/ou P1. Neste trabalho, estudaram-se as vias enzimáticas responsáveis pela formação de adenosina a partir do catabolismo extracelular do ATP. Também se avaliou a expressão e atividade dos recetores da adenosina na proliferação e na síntese de colagénio tipo I em culturas de fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana.

O catabolismo do ATP, ADP, AMP e adenosina e formação dos seus metabolitos nas culturas de fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (com deteção UV). A expressão das ectoNTPDases 1, 2 e 3 nos fibroblastos foi avaliada por imunocitoquímica. O papel dos agonistas seletivos dos recetores da adenosina na proliferação e síntese de colagénio do tipo I foi avaliado pelos ensaios de MTT e do corante Sirius Red, respetivamente.

O ATP foi metabolizado ($t_{1/2}=12,5$ minutos) em ADP, adenosina e inosina. O AMP foi rapidamente ($t_{1/2}= 3$ minutos) desfosforilado em adenosina, enquanto se observou uma tendência para a acumulação de ADP ($t_{1/2}= 68$ minutos) e de adenosina ($t_{1/2}=29$ minutos) nas culturas. Os fibroblastos apresentaram marcação positiva para as enzimas NTPDase2, NTPDase3 e ecto5'nucleotidase, mas foram negativos contra a NTPDase1. A incubação das células com os agonistas seletivos para os recetores A_1 e A_3 aumentou a sua proliferação de forma significativa. A ativação do recetor A_1 também promoveu a síntese de colagénio de tipo I nas culturas, um efeito que pode ser parcialmente contrariado pela ativação simultânea de recetores inibitórios do subtipo A_{2A} .

Apesar de preliminares. Estes resultados sugerem que o ATP libertado pelos fibroblastos do tecido subcutâneo pode rapidamente ser metabolizado por ação das NTPDases2, -3 e ecto-5'-nucleotidase, levando à acumulação de adenosina nas culturas. A ativação dos recetores da adenosina pode influenciar a remodelação do tecido conjuntivo e o aparecimento de fibrose. Esta situação parece depender da ativação preferencial dos recetores de elevada afinidade para a adenosina A_1 , mas pode ser parcialmente contrariada caso se favoreça a atividade dos recetores do subtipo A_{2A} capazes de inibir a síntese de colagénio do tipo I. Neste contexto, a compreensão das vias purinérgicas implicadas na fibrose pode ser útil para o desenvolvimento de novos fármacos utilizados na dor crônica de natureza músculo-esquelética.

Palavras Chave

Adenosina; Recetores da adenosina; Ecto-NPTDases; Fibroblastos; Tecido conjuntivo subcutâneo; Proliferação e diferenciação.

Índice

Abstract	2
Resumo	3
Palavras Chave	4
Lista de símbolos e abreviaturas	6
1. Introdução	7
2. Material e Métodos	10
2.1. Reagentes e material	10
2.2. Culturas celulares.....	10
2.3. Cinética do catabolismo dos nucleótidos de adenina e formação de adenosina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	11
2.4. Imunocitoquímica	12
2.5. Viabilidade / Proliferação celular	12
2.6. Apresentação dos resultados e análise estatística	13
3. Resultados.....	14
3.1. Caracterização das culturas de fibroblastos por imunocitoquímica	14
3.2. Padrão do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina e da formação de adenosina em fibroblastos em cultura.....	14
3.3. Marcação imunocitoquímica das ecto-NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase em fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana em cultura.....	16
3.4. Atividade dos recetores da adenosina na proliferação e na diferenciação (síntese de colagénio tipo I) dos fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana.....	16
4. Discussão e Conclusão	21
5. Referências	26
Agradecimentos	28

Lista de símbolos e abreviaturas

ADA – adenosina desaminase

ADO - adenosina

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

ATP – adenosina 5'- trifosfato

ARL 67156 – sal 6-N, N-Dietil-D- β , γ -dibromomethyleneATP trissódico

Ca²⁺ - ião de cálcio

CGS 21680C - 2-[4-(2-p-carboxietil) fenilamino]-5'-N-etilcarboxamido adenosina

Con-A – concanavalina A

CPA - N⁶-ciclopentiladenosina

DMEM – meio Eagle modificado Dulbecco

DMSO - dimetilsulfóxido

E-NPP - ecto-pirofosfatases / fosfodiesterases de nucleótidos

E-NTPDase - ecto-difosfohidrolases de nucleósidos trifosfato

FBS – soro bovino fetal

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HX - hipoxantina

INO - inosina

MTT – brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio

NECA - 5'-(N-etilcarboxamido)adenosina

PBS - tampão fosfato salino

PNP - fosforilases de nucleósidos de purinas

2-CI-IB-MECA - 2-cloro-N⁶-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metiluronamida

1. Introdução

Devido à sua relevância, a dor muscular crónica associada a disfunções do sistema músculo-esquelético tem merecido atenção crescente dos clínicos, razão pela qual se tem assistido a um aumento da sua incidência e prevalência. No entanto, em muitos estados de dor crónica a relação causal entre nocicepção e dor não está bem estabelecida, sendo que a dor nem sempre tem subjacente uma lesão tecidual evidente [revisto por (Schaible & Richter, 2004)]. Recentemente, um estudo de Langevin e colaboradores (2009) mostrou que indivíduos com lombalgia apresentavam uma desorganização do tecido conjuntivo da região toraco-lombar (Langevin *et al.*, 2009). O mesmo grupo sugeriu que o aumento da rigidez do tecido conjuntivo devido a fibrose pode estar na base do mecanismo patogénico conducente a dor crónica (Langevin & Sherman, 2007). De realçar que nos últimos anos o tecido conjuntivo tem sido alvo de diversos estudos que demonstram que este poderá desempenhar outras funções que não apenas a de suporte, papel que durante muitos anos lhe foi exclusivamente atribuído. Assim, vários estudos em cadáveres (Abu-Hijleh *et al.*, 2006; Hedley, 2007; Stecco *et al.*, 2009) mostram que o tecido conjuntivo se organiza de modo contínuo em todo corpo, havendo uma camada superficial e outra mais profunda (também denominadas de fáscia superficial e profunda, respetivamente), que lhe conferem algumas das propriedades observadas nos órgãos (Hedley, 2007), como por exemplo a pele.

Uma das características do tecido conjuntivo é a sua plasticidade e remodelação em resposta ao stresse mecânico. No entanto, sob condições de stresse mecânico excessivo, inflamação ou imobilidade, pode originar uma deposição excessiva e desorganizada de colagénio e matriz, levando à fibrose e à formação de aderências. A remodelação e a fibrose do tecido conjuntivo subcutâneo poderão exercer, assim, um papel chave no mecanismo patogénico da dor crónica resistente à farmacoterapia, como a lombalgia e a fibromialgia (Langevin & Sherman, 2007).

A síntese e degradação da matriz extracelular é maioritariamente realizada pelos fibroblastos, as principais células do tecido conjuntivo (Ross *et al.*, 2010) Na medida em que os fibroblastos são capazes de libertar nucleótidos (como o ATP) em resposta a mediadores inflamatórios (Pinheiro *et al.*, 2012), e considerando que o ATP e/ou os seus metabolitos desempenham um papel importante na fisiopatologia da dor (Burnstock, 2007), será importante compreender as implicações da sinalização purinérgica nestas células.

Uma vez libertado, o ATP pode exercer efeitos diretos através da ativação de recetores purinérgicos do tipo P2 (P2X e P2Y). Por outro lado, a sua ação pode ser rapidamente interrompida através de cascatas enzimáticas localizadas na membrana celular, resultando na

formação de vários metabolitos biologicamente ativos no meio extracelular, como por exemplo o ADP e a adenosina, capazes de ativar recetores P2Y e P1, respetivamente. Resumidamente, a via hidrolítica dos nucleótidos de adenina compreende pelo menos três sistemas enzimáticos: as ecto-pirofosfatases / fosfodiesterases de nucleótidos (E-NPP), que catabolizam a hidrólise do ATP diretamente em AMP com libertação de pirofosfato; as ecto-difosfohidrolases de nucleósidos trifosfato (E-NTPDase), que catabolizam a hidrólise sequencial de ATP em ADP e ADP para AMP; e a ecto-5'-nucleotidase, que hidrolisa o AMP em adenosina. A adenosina resultante pode ser ainda desaminada em inosina através da desaminase da adenosina (ADA) e, posteriormente, em hipoxantina, por via da reação de fosforilases de nucleósidos de purinas (PNP) (Zimmermann, 1996; Yegutkin, 2008).

As E-NTPDases são consideradas ecto-nucleotidases dominantes porque apresentam maior afinidade para os nucleótidos disponíveis; existem 8 subtipos de E-NTPDases. Ao contrário das NTPDase4, NTPDase5, NTPDase6 e NTPDase7 que estão localizadas intracelularmente, as NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8 estão localizadas na superfície da membrana plasmática e hidrolisam nucleótidos no meio extracelular, apresentando valores de K_m na gama micromolar. As E-NTPDases diferem entre si relativamente às afinidades que apresentam para os seus substratos, sendo que a NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP com igual afinidade, a NTPDase2 é uma trifosfonucleotidase preferencial, enquanto as NTPDase3 e 8 são intermediárias funcionais entre as NTPDases1 e 2 (Kukulski *et al.*, 2005).

Dependendo do metabolismo extracelular do ATP libertado, as purinas podem influenciar a proliferação e produção de colagénio dos fibroblastos por intermédio dos seus metabolitos, cuja atividade biológica depende da estimulação de recetores P2, ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y, sensíveis aos nucleótidos de adenina e recetores P1, sensíveis à adenosina. Os recetores da adenosina são todos compostos metabotrópicos constituídos por 7 domínios transmembranares. Estes recetores subdividem-se em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃; os recetores A_{2A} e A_{2B} são classicamente acoplados a proteínas G_s e os recetores A₁ e A₃ estão predominantemente acoplados a proteínas G_i, embora possa existir alguma variação neste acoplamento [revisto por Burnstock (2006)].

Dependendo do tecido, a patogénese da fibrose parece envolver a ativação de recetores da adenosina [revisto por Cronstein (2011)]. No coração, demonstrou-se que a adenosina, por via da ativação de recetores do subtipo A_{2B}, inibe a produção de colagénio a partir de fibroblastos cardíacos (Dubey *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2004). Esta propriedade confere-lhe um efeito protetor no processo de remodelação cardíaca, na medida em que previne a fibrose (Dubey *et al.*, 1998). Além disso, a diminuição da expressão destes recetores parece contribuir para uma síntese e deposição anormal de colagénio e hipertrofia de fibroblastos cardíacos observadas em casos de

lesão por isquemia seguida de reperfusão (Dubey *et al.*, 2001). Pelo contrário, na pele, fígado e pulmão, tanto os recetores A_{2A} como os A_{2B} parecem induzir fibrose [revisão por Cronstein (2011)]. Apesar destes estudos indicarem um papel importante da adenosina na remodelação dos tecidos e no aparecimento de fibrose, não existem estudos sobre o papel das purinas na proliferação e síntese de colagénio em fibroblastos de tecido subcutâneo, nem tão pouco dados sobre a sua implicação na plasticidade e remodelação deste tecido. Em virtude da possibilidade de interconversão entre as várias purinas com significado biológico, interessa investigar a cinética do metabolismo dos nucleótidos de adenina e da formação de adenosina no sistema músculo-esquelético. Uma melhor compreensão dos mecanismos de sinalização relacionados com as purinas extracelulares por parte dos fibroblastos pode representar uma oportunidade para esclarecer o seu envolvimento na patogénese da dor crónica de origem músculo-esquelética, tendo em consideração que estas células estão intimamente relacionadas com os neurónios sensoriais.

Pelo exposto anteriormente, este trabalho procurou caracterizar as vias enzimáticas extracelulares responsáveis pela formação de adenosina a partir do catabolismo de ATP em culturas celulares de fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana, bem como avaliar a expressão e atividade dos subtipos de recetores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) envolvidos na proliferação e diferenciação (síntese de colagénio do tipo I) por estas células.

2. Material e Métodos

2.1. *Reagentes e material*

O brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT), a solução tripsina-EDTA, o tampão fosfato salino (PBS), o Sirius Red 80 (C₄₅H₂₆N₁₀Na₆O₂₁S₆), o ácido pícrico ((O₂N)₃C₆H₂OH), o soro bovino fetal (FBS), a anfotericina B, a penicilina / estreptomicina, a colagenase tipo I, a adenosina 5'-trifosfato (ATP), a adenosina 5'-difosfato (ADP), a adenosina 5'-monofosfato (AMP), a adenosina (ADO), a concanavalina A (Con-A, inibidor da ecto-5'-nucleotidase), o ARL 67156 (inibidor da NTPDase1), o 2-cloro-N⁶-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metiluronamide (2-Cl-IB-MECA, agonista seletivo dos recetores A₃), o 2-[4-(2-p-carboxietil)fenilamino]-5'-N-etilcarboxamido adenosina (CGS 21680C, agonista seletivo dos recetores A_{2A}), a N⁶-ciclopentiladenosina (CPA, agonista seletivo dos recetores A₁) e a 5'-(N-etilcarboxamido) adenosina (NECA, agonista não seletivo dos recetores A₂) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os fármacos foram preparados em meio DMEM (soluções de reserva e respetivas diluições) e foram armazenados como alíquotas congeladas a -20°C. O dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxio de sódio (NaOH) e o ácido acético glacial (CH₃COOH) foram obtidos pela Merck (Alemanha).

Os anticorpos primários: anti-NTPDase1 (coelho), anti-NTPDase2 (coelho), anti-NTPDase3 (coelho) e anti-ecto-5'-nucleotidase (coelho) foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Professor Jean Sévigny (Universidade de Laval, Quebec, Canada). Os anticorpos primários anti-vimentina (ratazana) e anti-colágeno tipo I (coelho) foram adquiridos à DAKO (Reino Unido) e à BD Serotec (UK), respetivamente. Os anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 (anticorpo anti-coelho) e Alexa Fluor 568 (anticorpo anti-ratazana) foram adquiridos à Molecular Probes (Invitrogen, EUA).

As placas de cultura de 96 poços foram adquiridos à Corning (EUA) e as lâminas multipoço foram obtidas pela Nunc (Nova Iorque, EUA).

2.2. *Culturas celulares*

Os fibroblastos foram isolados a partir de fragmentos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratas Wistar com 2-3 meses de idade (Charles River, Barcelona, Espanha) pela técnica de explante, com a aprovação da comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino

fetal (FBS), 2,5 µg/mL de anfotericina B e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, a 37°C numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% CO₂. O meio foi substituído duas vezes por semana.

As culturas celulares primárias foram mantidas durante 2-3 semanas, até próximo da confluência, altura em as células aderentes foram tripsinizadas com 0,04% de solução de tripsina-EDTA e 0,025% colagenase tipo I em tampão fosfato salino (PBS), a pH 7,4 durante 15-20 minutos. A suspensão de células resultante foi cultivada (primeira subcultura, 10⁴ células/cm²) (dia 0) e mantida nas condições acima mencionadas. As culturas de fibroblastos foram mantidas durante 28 dias, na ausência (controlo) ou na presença de agonistas dos recetores da adenosina, os quais foram adicionados ao meio de cultura no dia 1 e em todas as mudanças de meio subsequentes. As culturas de células foram sistematicamente monitorizadas por microscopia de contraste de fase e caracterizadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 quanto à viabilidade/proliferação celular (ensaios de MTT) (Costa *et al.*, 2011) e produção de colagénio do tipo I (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999).

2.3. Cinética do catabolismo dos nucleótidos de adenina e formação de adenosina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Após um período de equilíbrio de 30 min, as células, com 11 dias, foram incubadas com 3 µM de ATP, ADP, AMP ou ADO adicionado ao meio de cultura nas condições referidas acima (tempo zero). As amostras (75 µl) foram recolhidas de cada poço em diferentes momentos durante 30 min para a análise da variação de desaparecimento do substrato e da formação dos produtos do seu catabolismo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, LaChrome Elite, Merck, Alemanha) (Magalhaes-Cardoso *et al.*, 2003). As concentrações de ATP, ADP, AMP, ADO, inosina (INO) e hipoxantina (HX) no meio de incubação foram expressas em micromolar por comparação com um padrão externo de elevado grau de pureza. As concentrações do substrato e dos produtos do seu metabolismo foram representadas em função do tempo (curvas de progresso). Foram analisados os seguintes parâmetros para cada curva: tempo de semivida ($t_{1/2}$) do substrato inicial, o tempo de aparecimento das diferentes concentrações dos produtos, a concentração do substrato ou de qualquer produto remanescente no final da experiência.

Para avaliar o envolvimento da NTPDase1 e da ecto-5'-nucleotidase, as células foram previamente incubadas com os seus inibidores, ARL 67156 (100 µM) e a concanavalina A (Con-A, 0,2 mg/ml), respetivamente.

Na ausência das células, a degradação espontânea dos nucleótidos e nucleósidos de adenina a 37°C foi negligenciável (0-3%) durante 30 min.

2.4. Imunocitoquímica

Os fibroblastos foram cultivados em lâminas de vidro multipoço com uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/ml e mantidos em cultura durante 11 dias. Subsequentemente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) em PBS 1X durante 10 minutos, lavadas 3 vezes em PBS 1X (10 minutos cada) e, posteriormente, incubadas com tampão de bloqueio I (10% de FBS, 1% de albumina de soro bovino (BSA), 0,1% de Triton X, 0,05% de NaN_3) durante 1 h. Os anticorpos primários em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0,1% de Triton X, 0,05% de NaN_3) foram aplicados na diluição escolhida [anti-vimentina 1:75 (ratazana); anti-colagénio tipo I 1:50 (coelho); anti-NTPDase1 1:300 (coelho); anti-NTPDase2 1:75 (coelho); anti-NTPDase3 1:75 (coelho); anti-ecto-5'-nucleotidase 1:1000 (coelho)]; as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X (10 minutos cada). Os anticorpos secundários [Alexa Fluor 488 1:1500 (anticorpo anti-coelho); Alexa Fluor 568 1:1500 (anticorpo anti-ratazana)] foram diluídos em tampão de bloqueio II e colocados durante 1 h no escuro. Após uma última lavagem com PBS 1X, as lâminas de vidro foram montadas com meio VectaShield e armazenadas a 4°C. A observação e análise das lâminas foi realizada num microscópio confocal de varrimento a laser (Olympus FV1000, Japão) (Costa et al., 2011).

2.5. Viabilidade / Proliferação celular

Os estudos de proliferação incluíram o ensaio de MTT e a quantificação do colagénio tipo I.

Ensaio MTT: Consiste na redução do brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a um produto de reação púrpura de formazan pelas células viáveis. As células foram incubadas durante 4 horas com 0,5 mg/mL de MTT nas condições referidas acima. O meio foi cuidadosamente removido e o produto corado foi dissolvido com DMSO antes da leitura da absorvância (A) a 600 nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em A por poço (Costa et al., 2011).

Determinação do colagénio tipo I: O corante Sirius Red F3BA foi dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado a uma concentração de 100 mg/100 mL. A solução de Bouin (para a fixação de células) foi preparada no laboratório misturando 15 mL de ácido pícrico aquoso saturado com 5 mL de formaldeído a 35% e 1 mL de ácido acético glacial. As células foram lavadas duas vezes em PBS 1X antes de serem fixadas com solução de Bouin por 1 h. O líquido de fixação foi removido por aspiração e as placas de cultura foram lavadas por imersão em água corrente da

torneira durante 15 min. As placas de cultura foram deixadas secar ao ar antes da incubação com o corante Sirius Red. As células foram coradas durante 1 h sob agitação suave num agitador orbital de microplacas e o corante foi então removido por sucção. Os poços foram lavados duas vezes com 0,01 N de ácido clorídrico, de modo a que todo o corante não-ligado pudesse ser removido. Em seguida, a coloração foi dissolvida em hidróxido de sódio 0,1 N durante 30 min à temperatura ambiente usando um agitador de microplacas. A densidade ótica foi medida a 550 nm e os resultados foram expressos em A por poço (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999).

2.6. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) de um número n de animais de experiência; foram realizadas 4 a 6 réplicas para cada animal testado. Os dados foram analisados usando a análise de variância one-way (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni para avaliar o significado estatístico das diferenças encontradas entre o controlo e as culturas tratadas com fármacos (agonistas). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Caracterização das culturas de fibroblastos por imunocitoquímica

As células cultivadas exibem imunorreatividade contra a vimentina, o filamento intermédio mais frequente dos fibroblastos que tem sido considerado como um marcador fiável destas células (Fig. 1A, vermelho) (Agocha & Eghbali-Webb, 1997). As células também exibem marcação positiva contra o colagénio tipo I (Fig. 1B, verde), uma proteína abundantemente sintetizada por fibroblastos (Agocha & Eghbali-Webb, 1997). Nota-se que a marcação do colagénio tipo I é concentrada em torno do núcleo, o que parece ser um indicador que este estará a ser intensivamente sintetizado no retículo endoplasmático rugoso e armazenado no aparelho de Golgi destas células (Gartner & Hiatt, 2007)

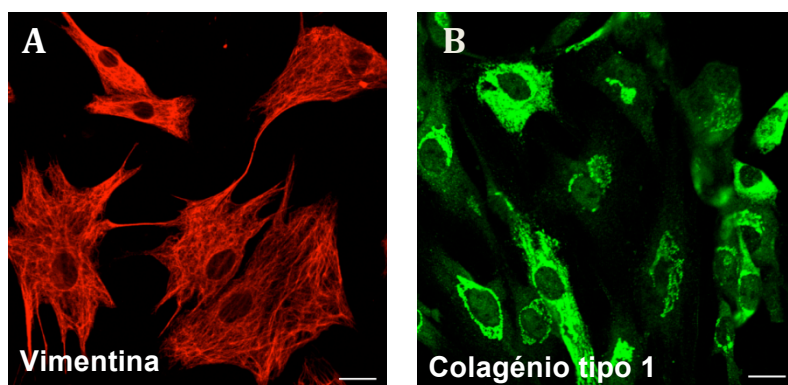


Figura 1. Marcação imunocitoquímica de fibroblastos isolados de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana em cultura para a vimentina (vermelho) (A) e para o colagénio tipo I (verde) (B). Imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento a laser. Barra de escala: 20 μ m.

3.2. Padrão do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina e da formação de adenosina em fibroblastos em cultura

O ATP (3 μ M, n=2) é rapidamente metabolizado ($t_{1/2}$ ~12,5 min) nas culturas de fibroblastos do tecido celular subcutâneo de ratazana; ao fim de 30 minutos de incubação observa-se a acumulação de ADP (0,77 μ M), ADO (0,58 μ M) e INO (0,72 μ M) (Fig. 2A.1). Curiosamente, ao longo dos 30 minutos de incubação com ATP (3 μ M) a formação de AMP foi praticamente inexistente. Observa-se, no entanto, a acumulação de AMP (1,07 μ M) e a ausência de formação dos nucleósidos da adenina (ADP e INO) quando as células foram incubadas na presença do inibidor da ecto-5'-nucleotidase, concanavalina A (Con-A, 0,1 mg/ml, n=2); nestas circunstâncias, o padrão de formação do ADP manteve-se similar ao observado na ausência da Con-A (Fig. 2A.2). A presença do inibidor da NTPDase1, ARL 67156 (100 μ M, n=2), não alterou

significativamente o padrão da cinética do catabolismo do ATP (30 μM) (Fig. 2A.3). Os fibroblastos de ratazana têm uma capacidade limitada para metabolizar o ADP (3 μM , $n=2$, $t_{1/2}\sim 68$ min) (Fig. 2B). Nestas condições experimentais, o ADP foi metabolizado essencialmente em ADO e INO, com pequena acumulação de AMP. De todos os substratos utilizados, o AMP (3 μM , $n=2$) foi aquele cuja metabolização foi mais rápida ($t_{1/2}\sim 3$ min) nas culturas de fibroblastos de ratazana; nestas circunstâncias observou-se uma formação significativa de ADO e, subsequentemente, de INO nas culturas (Fig. 2C). A ADO (3 μM , $n=2$) foi desaminada em INO com uma semivida de 29 min (Fig. 2D). A formação de hipoxantina (HX) nestas condições experimentais foi pouco significativa.

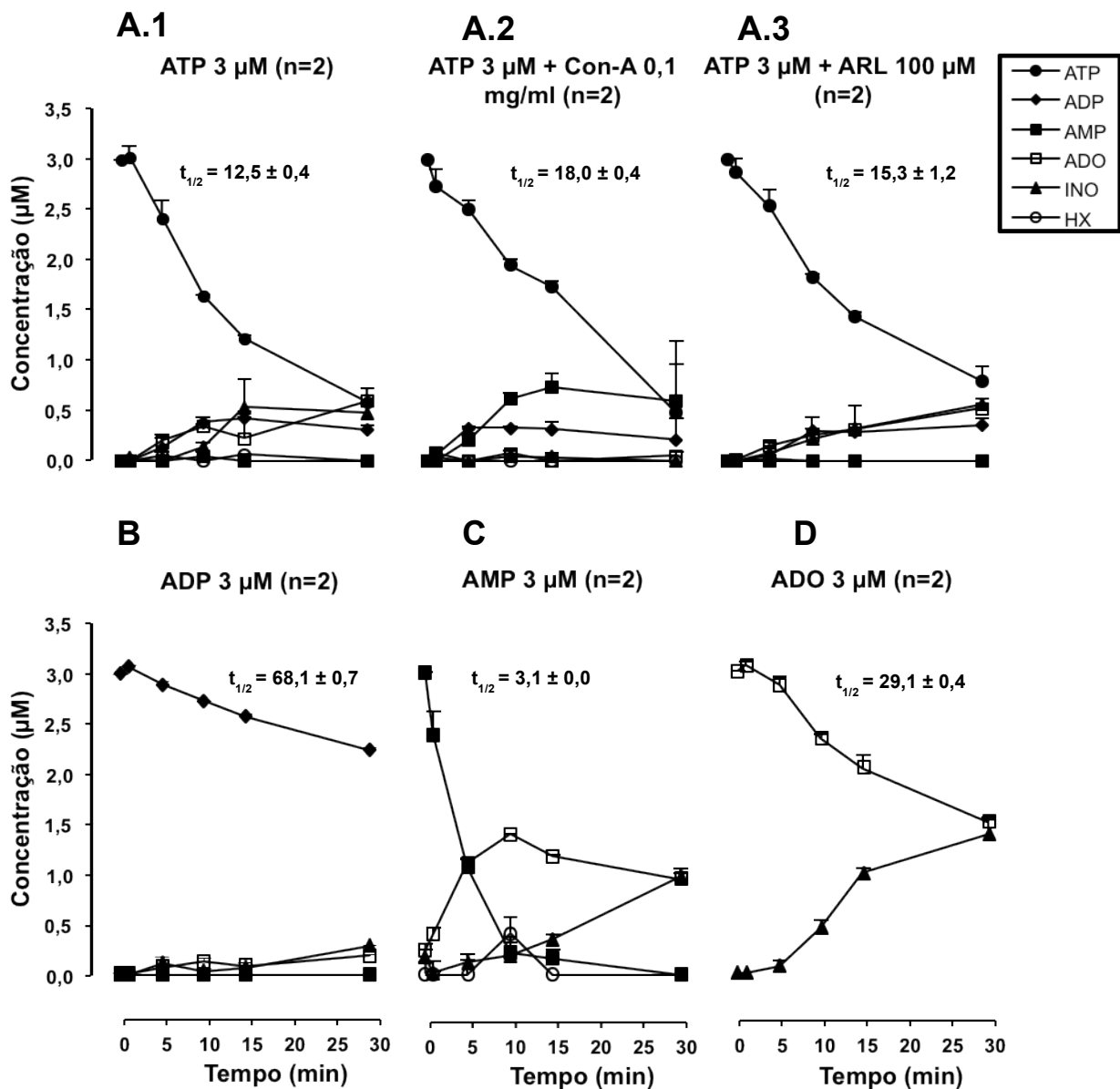


Figura 2. Cinética do catabolismo do ATP (A), ADP (B) AMP (C) e ADO (D) nas culturas de fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana. Os nucleótidos e nucleósidos de adenina (3 μM) foram adicionados ao meio de cultura no tempo zero. Cada ponto representa a média \pm S.E.M.. $t_{1/2}$ representa o tempo de semivida calculado para cada substrato.

3.3. Marcação imunocitoquímica das ecto-NTPDases e da ecto-5'-nucleotidase em fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana em cultura

Os fibroblastos isolados do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana exibem uma marcação positiva para as ectoenzimas NTPDase2 (Fig. 3B), NTPDase3 (Fig. 3C) e ecto-5'-nucleotidase (Fig. 3D); a marcação contra a ecto-5'-nucleotidase foi a marcação mais exuberante obtida, seguida da imunoreatividade contra a E-NTPDase3. Não se obteve qualquer marcação com o anticorpo contra a E-NTPDase1 (Fig. 3A).

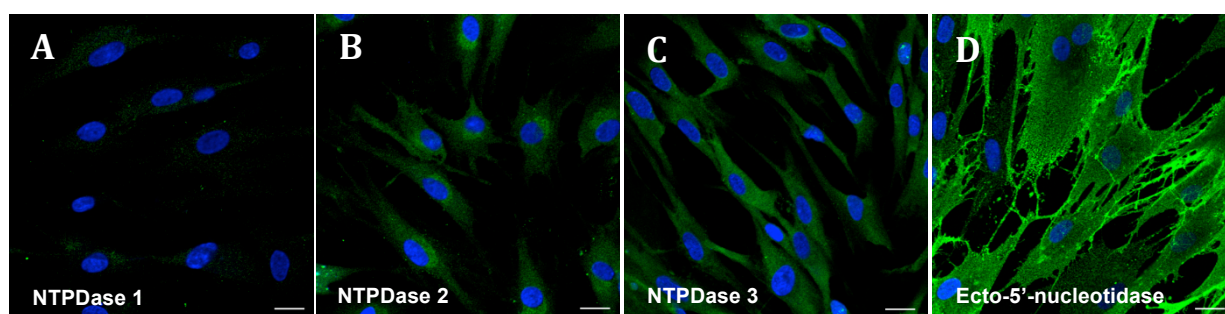


Figura 3. Marcação imunocitoquímica da E-NTPDase1 (A), E-NTPDase2 (B), E-NTPDase3 (C) e ecto-5'-nucleotidase (D) em fibroblastos isolados do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana. Imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento a laser (Olympus FV1000, Japão). Verde: ecto-NTPDase1 (1:300), ecto-NTPDase2 (1:75), ecto-NTPDase3 (1:75) e ecto-5'-nucleotidase (1:1000); azul: DAPI. Barra de escala: 20 μ m.

3.4. Atividade dos recetores da adenosina na proliferação e na diferenciação (síntese de colagénio tipo I) dos fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana

O padrão de crescimento dos fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo em cultura, avaliado pelo ensaio de MTT está representado na Figura 4A. As células proliferam até atingirem um máximo de células viáveis aos 14 dias, a partir do qual os valores de MTT começam a diminuir (n=4) (Fig. 4A). Relativamente à síntese de colagénio do tipo I, um indicador da diferenciação fibroblástica das culturas, observa-se um aumento progressivo dessa síntese ao longo da cultura atingindo o pico máximo aos 21 dias que se manteve estável até aos 28 dias (n=2) (Fig. 4B).

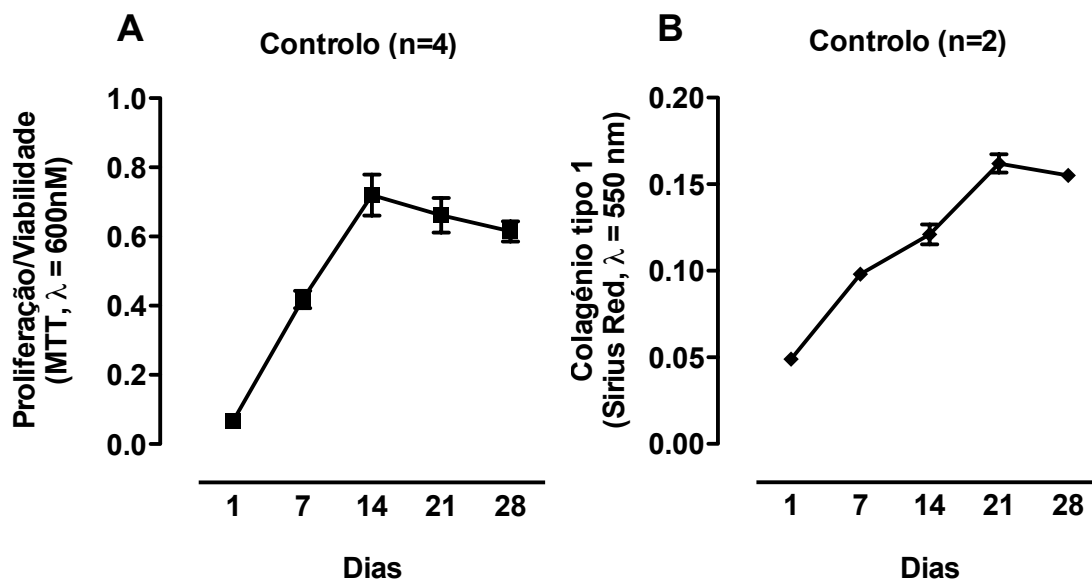


Figura 4. Caracterização da proliferação (A) e síntese de colagénio tipo I (B) por fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana (situação controlo), durante 28 dias. Cada ponto representa a média dos dados obtidos a partir de um número n de animais; foram realizadas 4-6 réplicas para cada experiência individual. As barras verticais representam o S.E.M..

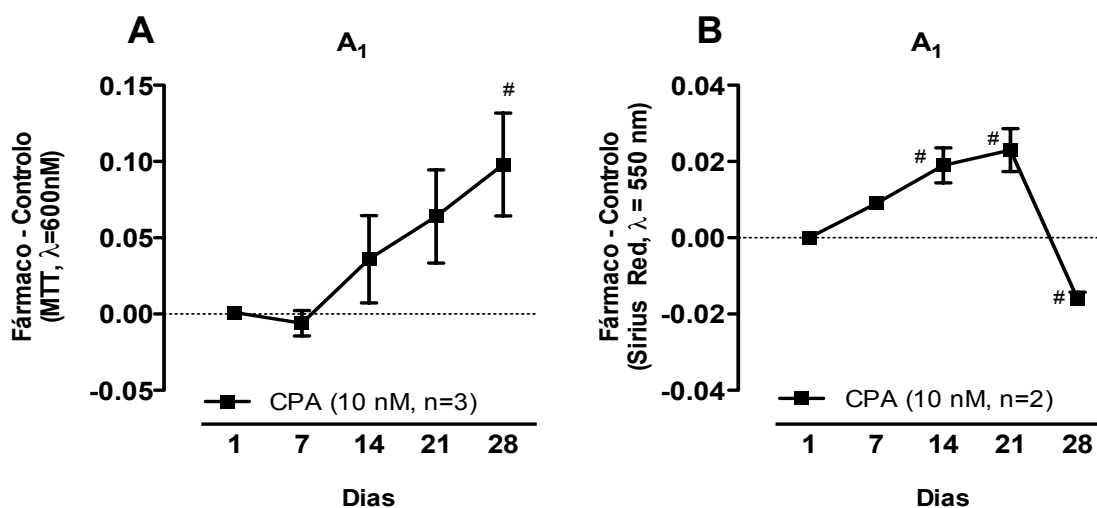


Figura 5. Proliferação (A) e síntese de colagénio tipo I (B) (fármaco - controlo) por fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana incubados com o agonista seletivo dos recetores A₁, CPA (10 nM), durante 28 dias. Cada ponto representa a média das diferenças das células tratadas com fármaco em relação ao controlo de um número n de animais; foram realizadas 4-6 réplicas para cada experiência individual. As barras verticais representam S.E.M.. # corresponde a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado o efeito do fármaco em relação ao controlo.

A incubação dos fibroblastos em cultura com o agonista seletivo do recetor A_1 , CPA (10 nM), induziu um aumento da proliferação celular que foi mais evidente a partir do dia 14 (n=3-4), sendo mesmo significativo no dia 28 ($p < 0,05$) (Fig. 5A). A CPA (10 nM, n=2) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a síntese de colagénio do tipo I nos dias 14 e 21; no período subsequente, correspondente à estabilização da produção de colagénio tipo I pelas culturas de fibroblastos, a CPA (10 nM) não alterou ou até reduziu ligeiramente a síntese desta proteína (Fig. 5B). Estes resultados sugerem que a ativação dos recetores A_1 nos fibroblastos de ratazana em cultura tem um efeito proliferativo e antecipa a sua maturação no que respeita à capacidade destas células produzirem colagénio de tipo I.

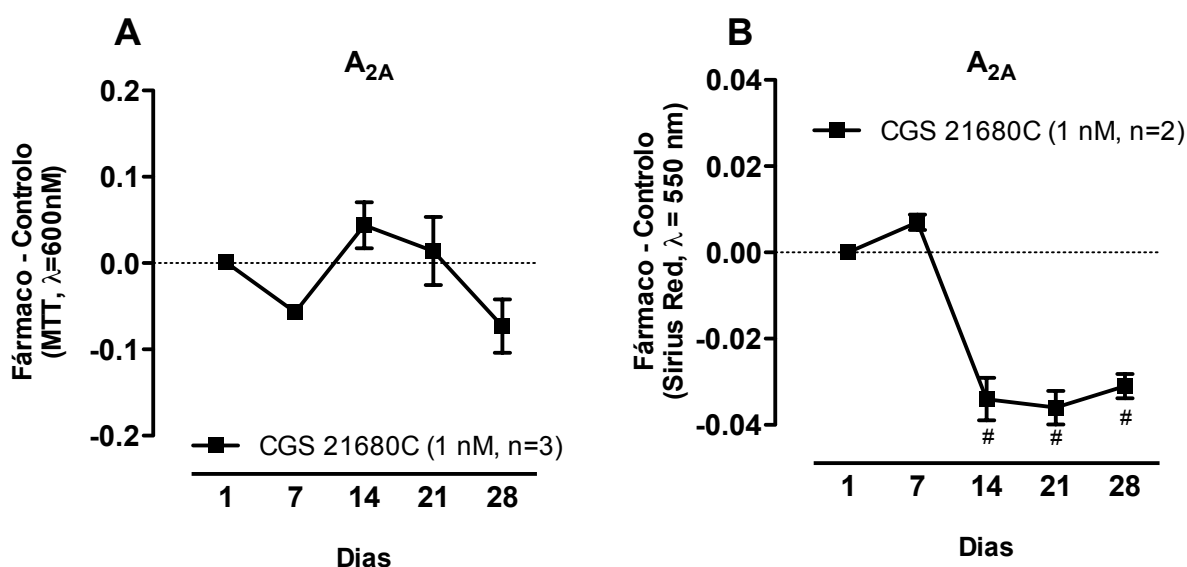


Figura 6. Proliferação (A) e síntese de colagénio tipo I (B) (fármaco - controlo) por fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana incubados com o agonista seletivo dos recetores purinérgicos A_{2A} , o CGS 21680C (1 nM), durante 28 dias. Cada ponto representa a média das diferenças das células tratadas com fármaco em relação ao controlo a partir de um número n de animais; foram realizadas 4-6 réplicas para cada experiência individual. As barras verticais representam S.E.M.. # corresponde a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado o efeito do fármaco em relação ao controlo.

A ativação seletiva dos recetores A_{2A} , CGS680C (1 nM), não modificou significativamente ($p > 0,05$) a proliferação/viabilidade dos fibroblastos de ratazana em cultura (n=3) (Fig. 6A). Contrariamente ao observado com o agonista seletivo dos recetores A_1 , observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e sustentada da produção de colagénio tipo I a partir do dia 14 nas culturas incubadas com CGS 21680C (1 nM, n=2) (Fig. 6B). O efeito do agonista não seletivo dos recetores A_2 NECA (10 e 100 μM), não diferiu significativamente dos resultados apresentados para o agonista seletivo A_{2A} , CGS 21680C (1 nM). A NECA (10 e 100 μM) não

alterou a proliferação/viabilidade celular (n=3-4) (Fig. 7A), mas reduziu de forma marcada e sustentada a produção de colagénio do tipo I (Fig. 7B).

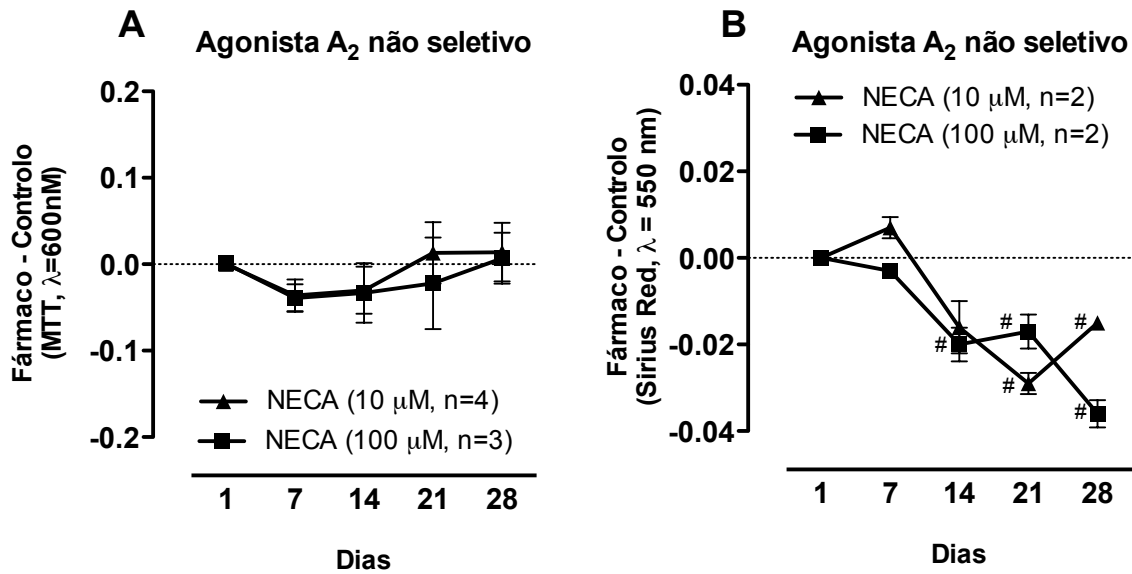


Figura 7: Proliferação e síntese de colagénio tipo I (fármaco - controlo) por fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana incubados com concentrações crescentes do agonista não seletivo dos recetores A₂, NECA (10 e 100 μM) (A, B) durante 28 dias em cultura. Cada ponto representa a média das diferenças entre fármaco em relação ao controlo das células tratadas a partir de um número n de animais; foram realizadas 4-6 réplicas para cada experiência individual. As barras verticais representam S.E.M.. # corresponde a diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) quando comparado o efeito do fármaco em relação ao controlo.

Já quando os fibroblastos do tecido subcutâneo de ratazana foram incubados com o agonista seletivo do recetor A₃, o 2-Cl-IB-MECA (10 nM), a proliferação/viabilidade das células aumentou progressivamente atingindo significado estatístico (p<0,05) no 28º dia em cultura (n=3) (Fig. 8A). Contrariamente aos outros agonistas testados, a 2-Cl-IB-MECA (10 nM) foi desprovida de efeito sobre a maturação destas células avaliada pela produção de colagénio tipo I (n=2) (Fig. 8B). Estes resultados sugerem que a ativação de recetores A₃ pode ter uma influência positiva sobre a proliferação/ viabilidade dos fibroblastos do tecido celular subcutâneo em cultura.

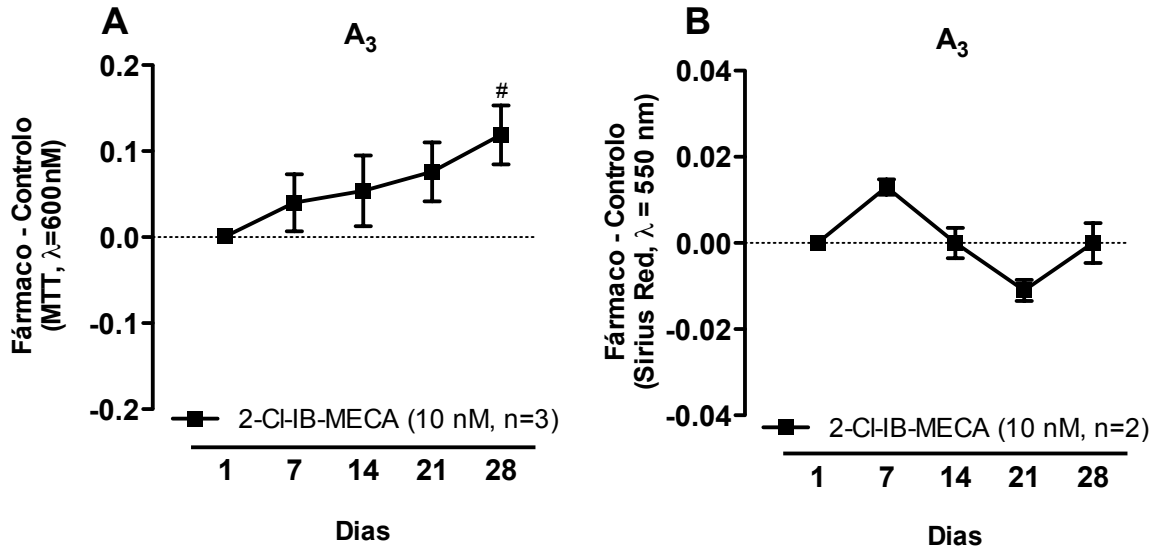


Figura 8. Proliferação (A) e síntese de colagénio tipo I (B) (fármaco - controlo) por fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana incubados com o agonista seletivo dos receptores A₃ da adenosina, 2-Cl-IB-MECA (10 nM), durante 28 dias. Cada ponto representa a média das diferenças entre o fármaco em relação ao controlo das células tratadas a partir de um número n de animais; foram realizadas 4-6 réplicas para cada experiência individual. As barras verticais representam S.E.M.. # corresponde a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparado o efeito do fármaco em relação ao controlo.

4. Discussão e Conclusão

No meio extracelular, os nucleótidos e nucleósidos da adenina, como o ATP e a ADO, exercem papéis importantes como moléculas sinalizadoras capazes de mediar uma vasta gama de funções, nomeadamente a proliferação e a remodelação da matriz extracelular (Burnstock, 2002). Estudos anteriores com fibroblastos de origem cardíaca mostraram que estas células estão envolvidas na origem da fibrose do miocárdio devido a um aumento da síntese de colagénio induzida por purinas (Dubey *et al.*, 1998; Epperson *et al.*, 2009; Braun *et al.*, 2010). Por analogia e considerando que o tecido conjuntivo subcutâneo é ricamente innervado, é possível que alterações da plasticidade e da remodelação dos fibroblastos (e.g. fibrose) possam estar na base de situações de dor crónica resistente a múltiplos fármacos, como a fibromialgia (Langevin & Sherman, 2007). Perante esta situação, urge a investigação de novos mecanismos fisiopatológicos associados à dor crónica músculo-esquelética que conduza ao aparecimento de alvos terapêuticos inovadores para o combate a esta(s) doença(s). Os fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo estão habitualmente sujeitos a situações de stresse químico e mecânico, das quais pode resultar a libertação de ATP e outras purinas. Uma vez libertados para o meio extracelular, a ação dos nucleótidos de adenina sobre os seus recetores específicos (P1 e P2) é balanceada por ectonucleotidases responsáveis pela interconversão de várias purinas com atividade biológica (e.g. ATP, ADP, adenosina). Acontece que a via de metabolização das purinas nas células que compõem o tecido conjuntivo ainda não foi esclarecida. Este trabalho foi desenhado para caracterizar a via de metabolização extracelular dos nucleótidos de adenina (ATP, ADP e AMP) e formação de adenosina em fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana, bem como avaliar a atividade dos vários subtipos de recetores da adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) sobre a proliferação/viabilidade e maturação (síntese de colagénio do tipo I) destas células em cultura.

Considerando que na maioria das células a concentração citoplasmática de ATP é superior a 5 mM e que uma proporção significativa deste pode ser libertado sem perda de viabilidade celular, as concentrações de ATP junto do local de libertação podem facilmente atingir unidades na ordem do micromolar (Costa *et al.*, 2011). Neste trabalho avaliou-se a cinética do catabolismo extracelular do ATP (3 µM) em culturas de fibroblastos do tecido celular subcutâneo de ratazana. Os resultados mostram que o ATP é metabolizado sequencialmente em ADP, AMP, ADO e INO apresentando um tempo de semivida de cerca de 12 min em cultura, sendo que os metabolitos que tendem a acumular-se nestas condições experimentais são o ADP e a ADO. O facto de a ADO aparecer no meio extracelular nos primeiros 5 minutos de incubação associado a baixos níveis de AMP nas culturas, sugere, por um lado, que o ATP parece ser rapidamente desfosforilado em AMP e, por outro, que a ecto-5'-nucleotidase responsável pela hidrólise do AMP em ADO

apresenta uma atividade elevada. Esta hipótese foi confirmada nos estudos em que se avaliou a cinética da inativação do AMP (3 μ M) no meio extracelular; nestas circunstâncias o tempo de semivida do AMP foi muito inferior (\sim 3 min) ao do ATP. Curiosamente, o ADP (3 μ M) apresentou uma cinética de inativação muito lenta (\sim 68 min) nos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana em cultura.

Das várias nucleotidasas existentes extracelularmente, as E-NTPDases são as dominantes tendo em consideração o facto de apresentarem uma elevada afinidade para baixas concentrações de nucleótidos de adenina. Desta família de 8 nucleotidasas, apenas 4 exibem atividade extracelular, nomeadamente a 1, 2, 3 e 8 (Zimmermann, 2000). A E-NTPDase1 apresenta igual afinidade para o ATP e para o ADP (Zimmermann, 2000), pelo que no caso da hidrólise do ATP se dar preferencialmente por esta via o tempo de semivida do ATP e do ADP deveriam ser semelhantes. Tal não se verificou nas condições experimentais deste estudo, já que o tempo de semivida do ADP foi mais de 5 vezes superior ao do ATP. Por outro lado, a presença do inibidor da E-NTPDase1, o ARL 67156 (100 μ M), não alterou significativamente ($p > 0,05$) o catabolismo extracelular do ATP (3 μ M) (ver Fig. 2). Os resultados dos ensaios de imunocitoquímica mostraram que os fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo em cultura são negativos para a marcação contra a E-NTPDase1. A E-NTPDase2 tem uma afinidade preferencial para o ATP que é 20 a 40 vezes superior do que para o ADP (Kukulski *et al.*, 2005). A hidrólise preferencial do ATP por esta enzima pode levar à acumulação de ADP nas culturas, traduzindo-se num tempo de semivida do ATP muito inferior ao do ADP. Os resultados dos ensaios para avaliar a cinética do catabolismo do ATP e do ADP confirmam que o ADP se acumula extensivamente nas culturas de fibroblastos do tecido subcutâneo (ver Fig. 2). Por outro lado, estas células possuem imunorreatividade contra a E-NTPDase2. Relativamente à NTPDase3, outra enzima para a qual também se obteve imunorreatividade positiva nos fibroblastos em cultura, catalisa lentamente a hidrólise do ATP e ADP com um rácio de 3-4:1, respetivamente. Assim, a par da E-NTPDase2, a E-NTPDase3 existente nos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo poderá também estar envolvida na hidrólise dos nucleótidos de adenina, particularmente do ADP. Por falta de ferramentas farmacológicas seletivas e/ou de anticorpos específicos, a atividade da E-NTPDase8 não foi avaliada neste estudo. Uma vez que a família das NPPs tem menor afinidade para os nucleótidos de adenina (valores de K_m para o ATP entre 20 e 50 μ M) comparativamente com as E-NTPDases, espera-se que as NPPs não exerçam um papel relevante no catabolismo dos nucleótidos de adenina na concentração estudada (3 μ M) (Zimmermann, 2000).

A ecto-5'-nucleotidase é a enzima que catalisa o passo final da hidrólise dos nucleótidos de adenina no meio extracelular e é a principal responsável pela formação de ADO a partir do catabolismo dos nucleótidos libertados após a sua desfosforilação em AMP. Ao contrário da

maioria dos tecidos avaliados (e.g. junção neuromuscular, plexo mioentérico, bexiga, hipocampo), os fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo metabolizam o AMP em ADO com grande velocidade e eficiência ($t_{1/2} \sim 3\text{min}$) comparativamente ao ATP ($t_{1/2} \sim 12.5\text{min}$). Este facto justifica a deteção de níveis reduzidos de AMP originados a partir do catabolismo do ATP (e ADP) e sugere que a ecto-5'-nucleotidase possui uma atividade elevada nos fibroblastos do tecido celular subcutâneo de ratazana em cultura, que é compatível com os elevados níveis de expressão desta enzima detetados por imunocitoquímica (Fig. 3). A acumulação de AMP no meio extracelular só se tornou evidente quando se adicionou ao meio de incubação o inibidor da ecto-5'-nucleotidase, a concanavalina A (Fig. 2A). Curiosamente, o padrão do catabolismo dos nucleótidos de adenina nos fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana parece ser semelhante aos encontrados em células do estroma da medula óssea humana, cuja origem é também mesenquimatosa (Costa *et al.*, 2010).

A elevada velocidade de formação de ADO a partir do AMP catalisada pela ecto-5'-nucleotidase contrasta com a reduzida ação da enzima responsável pela desaminação da ADO em INO no meio extracelular, ADA, nos fibroblastos do tecido subcutâneo de ratazana em cultura. Esta situação justifica a acumulação de ADO no meio de cultura quando as células foram incubadas com nucleótidos de adenina e permite admitir que a acumulação do nucleósido possa ter um papel relevante na proliferação e na maturação (avaliada pela produção de colagénio do tipo I) dos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo por intermédio da ativação de recetores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3). Os resultados obtidos sugerem que a ADO exerce um efeito promotor da proliferação/viabilidade dos fibroblastos em cultura por via da ativação de recetores A_1 (elevada afinidade) e A_3 (baixa afinidade). No entanto, a ausência de efeito do recetor A_3 sobre a maturação celular contrasta com o papel promotor da síntese de colagénio do tipo I observada com o agonista seletivo do recetor A_1 , CPA (10 nM), cuja atividade foi mais marcada na fase proliferativa das culturas (e.g. 14 e 21 dias, ver Fig. 5). À semelhança do que acontece nas células osteoprogenitoras da medula óssea humana (ver Costa et al., 2011), o efeito promotor dos recetores A_1 sobre a maturação dos fibroblastos do tecido subcutâneo da ratazana pode ser contrariado pela ativação concomitante de recetores do subtipo A_{2A} . Neste trabalho mostrou-se que o agonista dos recetores A_{2A} , CGS 21680C (1 nM), reduziu significativamente a síntese de colagénio do tipo I sem, contudo, afectar a proliferação/viabilidade destas células (Fig. 6).

Para avaliar o envolvimento dos recetores A_{2B} na proliferação e na maturação dos fibroblastos em cultura, testou-se o agonista não seletivo A_2 , NECA (10 e 100 μM), comparando o seu efeito com os resultados obtidos com o agonista seletivo A_{2A} , CGS 21680C (1 nM). Não excluindo, nesta fase, o envolvimento dos recetores de baixa afinidade para a ADO, A_{2B} , na maturação dos fibroblastos do tecido celular subcutâneo de ratazana em cultura, é provável que o

efeito inibitório da NECA (10 e 100 μM) sobre a produção de colagénio do tipo I se deva à ativação de recetores A_{2A} . Esta assunção é suportada já a NECA (10 e 100 μM) mimetizou de forma fiel o efeito inibitório do agonista seletivo, CGS 21680C (1 nM), na síntese de colagénio do tipo I pelos fibroblastos do tecido celular subcutâneo em cultura. Outros autores mostraram que a produção de colagénio do tipo I por fibroblastos cardíacos pode ser exacerbada na presença de NECA por via da ativação de recetores A_{2B} (Dubey *et al.*, 1998). Contudo, estes autores não observaram diferenças na produção de colagénio do tipo I na presença do agonista A_{2A} , CGS21680, ao inverso do que foi observado neste trabalho. São, por isso, necessárias mais experiências para avaliar inequivocamente o papel dos recetores A_{2B} na maturação dos fibroblastos do tecido subcutâneo.

A utilização de cremes contendo cafeína, um antagonista não seletivo dos recetores da ADO, tem sido utilizada para evitar a fibrose cicatricial (queloides) na cirurgia plástica e reconstrutiva [revisto por Cronstein (2011)]. Neste contexto, será ainda precoce com os dados apresentados neste estudo concluir de forma segura acerca do recetor da ADO predominantemente envolvido no efeito da cafeína na fibrose cicatricial ou se, eventualmente, esta substância ou seus derivados poderão vir a constituir um novo medicamento para o tratamento da dor crónica de origem músculo-esquelética. Pode, contudo, especular-se sobre a preponderância do recetor A_1 relativamente aos restantes, já que a ativação deste recetor de elevada afinidade para a ADO possui um efeito proliferativo moderado e favorece a produção de colagénio pelos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo (de ratazana), que são condições necessárias à ocorrência de fibrose tecidular.

Perspetiva-se, assim, para o futuro próximo o aumento do número das experiências que permitam tirar conclusões com maior segurança, eventualmente através do teste de antagonistas seletivos de todos os recetores estudados. Complementarmente, será útil avaliar a expressão dos subtipos de recetores P1 expressos nos fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo em cultura por imunocitoquímica e *Western Blot* ao longo do tempo em cultura.

Em conclusão, os fibroblastos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratazana mantidos em cultura metabolizam extracelularmente o ATP com acumulação de quantidades significativas de ADP e adenosina preferencialmente através de reações catalisadas pelas E-NTPDases 2 e 3 e pela ecto-5'-nucleotidase. Esta última enzima metaboliza rapidamente o AMP em ADO, impedindo a acumulação do monofosfato no meio extracelular. Por sua vez, verificou-se que estas células têm pouca capacidade desaminativa permitindo a acumulação extracelular de ADO. Os resultados mostram, ainda, que os recetores P1 sensíveis à ADO formada a partir do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina libertados podem controlar a proliferação e a maturação dos fibroblastos e, com isso, a remodelação/plasticidade do tecido conjuntivo subcutâneo, A

estimulação dos recetores A_1 e A_3 parece ter um efeito pró-fibrótico na medida em que favorecem a proliferação dos fibroblastos e, no caso do recetor A_1 , também promove a síntese de colagénio do tipo I. Já a ativação do recetor A_{2A} parece ter um efeito protetor da fibrose tecidual, inibindo a produção de colagénio tipo I. O efeito pró-fibrótico dos recetores A_1 pode ser contrariado por antagonistas dos recetores da ADO, como por exemplo a cafeína e os seus derivados; o efeito anti-fibrótico destes compostos pode justificar-se através do bloqueio dos recetores da ADO. Mais estudos são entretanto necessários para confirmar o seu envolvimento no processo cicatricial e na sinalização mediada pelo Ca^{2+} . É ainda de realçar que um melhor conhecimento dos mecanismos de sinalização purinérgica nos fibroblastos de tecido conjuntivo subcutâneo poderá representar uma oportunidade para clarificar o seu envolvimento na patogénese da dor crónica de origem músculo-esquelética, uma vez que estas células estão muito próximas de terminações nervosas.

5. Referências

- Abu-Hijleh, M., Roshier, A., Al-Shboul, Q., Dharap, A. & Harris, P. (2006). "The membranous layer of superficial fascia: evidence for its widespread distribution in the body." Surgical and Radiologic Anatomy **28**(6): 606-619.
- Agocha, A. E. & Eghbali-Webb, M. (1997). "A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue." Molecular and Cellular Biochemistry **172**(1): 195-198.
- Braun, O. O., Lu, D., Aroonsakool, N. & Insel, P. A. (2010). "Uridine triphosphate (UTP) induces profibrotic responses in cardiac fibroblasts by activation of P2Y2 receptors." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **49**(3): 362-369.
- Burnstock, G. (2002). "Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **22**(3): 364-373.
- Burnstock, G. (2006). "Purinergic signalling." British Journal of Pharmacology **147**: S172-S181.
- Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." Cellular and Molecular Life Sciences **64**(12): 1471-1483.
- Chen, Y., Epperson, S., Makhsudova, L., Ito, B., Suarez, J., Dillmann, W. & Villarreal, F. (2004). "Functional effects of enhancing or silencing adenosine A2b receptors in cardiac fibroblasts." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **287**(6): H2478-H2486.
- Costa, M. A., Barbosa, A., Neto, E., Sa-e-Sousa, A., Freitas, R., Neves, J. M., Magalhaes-Cardoso, T., Ferreirinha, F. & Correia-de-Sa, P. (2011). "On the Role of Subtype Selective Adenosine Receptor Agonists During Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Primary Bone Marrow Stromal Cells." Journal of Cellular Physiology **226**(5): 1353-1366.
- Cronstein, B. N. (2011). "Adenosine receptors and fibrosis: a translational review." F1000 Biol Rep **3**: 21.
- Dubey, R. K., Gillespie, D. G. & Jackson, E. K. (1998). "Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts - Role of A(2B) receptors." Hypertension **31**(4): 943-948.
- Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Zacharia, L. C., Mi, Z. & Jackson, E. K. (2001). "A2B Receptors Mediate the Antimitogenic Effects of Adenosine in Cardiac Fibroblasts." Hypertension **37**(2): 716-721.
- Epperson, S. A., Brunton, L. L., Ramirez-Sanchez, I. & Villarreal, F. (2009). "Adenosine receptors and second messenger signaling pathways in rat cardiac fibroblasts." American Journal of Physiology - Cell Physiology **296**(5): C1171-C1177.
- Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2007). Color textbook of Histology, Saunders Elsevier.
- Hedley, G. (2007). "Demonstration of the integrity of human superficial fascia as an autonomous organ." J Bodywork Mov Ther **12**(3): 258.

- Kukulski, F., Lévesque, S. A., Lavoie, É. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F., Robson, S. C., Kirley, T. L. & Sévigny, J. (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." Purinergic Signalling **1**(2): 193-204.
- Langevin, H., Stevens-Tuttle, D., Fox, J., Badger, G., Bouffard, N., Krag, M., Wu, J. & Henry, S. (2009). "Ultrasound evidence of altered lumbar connective tissue structure in human subjects with chronic low back pain." BMC Musculoskeletal Disorders **10**(1): 151.
- Langevin, H. M. & Sherman, K. J. (2007). "Pathophysiological model for chronic low back pain integrating connective tissue and nervous system mechanisms." Medical Hypotheses **68**(1): 74-80.
- Magalhaes-Cardoso, M. T., Pereira, M. F., Oliveira, L., Ribeiro, J. A., Cunha, R. A. & Correia-de-Sa, P. (2003). "Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A(2A) receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve endings." Journal of Physiology-London **549**(2): 399-408.
- Pinheiro, A. R., Certal, M., Paramos, D., Costa, M. A. & Correia-de-Sá, P. (2012). "Bradykinin activation of fibroblasts of the rat subcutaneous tissue triggers the release of ATP and P2 purinoceptors activation." Journal of bodywork and movement therapies **16**(2): 155-156.
- Ross, M. H., Pawlina, W. & Kluwer, W. (2010). Histology: a text and atlas., Lippincott William & Wilkins: Philadelphia.
- Schaible, H.-G. & Richter, F. (2004). "Pathophysiology of pain." Langenbeck's Archives of Surgery **389**(4): 237-243.
- Stecco, A., Macchi, V., Stecco, C., Porzionato, A., Ann Day, J., Delmas, V. & De Caro, R. (2009). "Anatomical study of myofascial continuity in the anterior region of the upper limb." Journal of bodywork and movement therapies **13**(1): 53-62.
- Tullberg-Reinert, H. & Jundt, G. (1999). "In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta 2 and ascorbic acid 2-phosphate." Histochemistry and Cell Biology **112**(4): 271-276.
- Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research **1783**(5): 673-694.
- Zimmermann, H. (1996). "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system." Progress in Neurobiology **49**(6): 589-618.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **362**(4): 299-309.

Agradecimentos

Esta tese resulta de um trabalho levado a cabo ao longo de vários anos e que não teria sido possível sem a ajuda e o apoio de várias pessoas a quem eu quero expressar o meu mais sincero obrigado.

Ao meu tutor, Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá pela oportunidade que me deu de desenvolver esta tese de mestrado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS, por toda a ajuda, orientação e incentivo.

À minha coorientadora Ana Rita Pinheiro, pela orientação científica, organização do trabalho e ensinamento das técnicas laboratoriais. Queria ainda agradecer pela paciência, disponibilidade e amizade que sempre demonstrou durante este tempo.

Não queria deixar de agradecer a todos os investigadores e técnicos do laboratório pelos ensinamentos científicos, por me terem recebido tão bem e pela disponibilidade sempre demonstrada.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, projetos PTDC/SAU-FCF/108263/2008 e UMIB-215/94) com a comparticipação de fundos do FEDER.

Aos meus pais, Alberto Tomás Soares e Rosa Célia Moreira por tudo o que me ensinaram na vida e por tudo o que abdicaram para que eu pudesse ser ensinada também por outras pessoas. A realização desta tese é o culminar de tudo isso.

Agradeço ao meu namorado, Daniel Vasconcelos, pelo amor, paciência, compreensão e apoio. Agradeço ainda toda o apoio técnico informático facultado.

Ainda, a todos os meus colegas de curso e amigos pela força e motivação que me deram.