

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação do aumento endógeno de adenosina decorrente da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato

Daniel Augusto Rodrigues Valério

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação do aumento endógeno de adenosina decorrente da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Toxicologia. Área de Concentração: Toxicologia

**Orientado:
Daniel Augusto Rodrigues Valério**

**Orientadora:
Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz**

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Valerio, Daniel Augusto Rodrigues

Investigação do aumento endógeno de adenosina decorrente da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato. Ribeirão Preto, 2009.
138 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa.

1. Frutose-1,6-Difosfato. 2. Adenosina. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Validação de metodologia analítica. 5. Dor. 6. Migração celular. 7. Citocinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Daniel Augusto Rodrigues Valério

Título do trabalho: Investigação do aumento endógeno de adenosina decorrente da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus e todas as formas de manifestação de sua existência, por ter(em) me guiado aos lugares certos e sempre colocado pessoas de bem em meu caminho, por ter(em) me escutado e atendido em diversas oportunidades, auxiliado nos momentos mais difíceis, e compartilhado comigo os sucessos e insucessos de minha jornada.

Aos meus pais, Antônio Carlos Valério e Maria Angélica Lui Rodrigues Valério, por permitirem ser o que sou, pela compreensão da distância, pelo amor e carinho e pela admiração que tenho por vocês.

À minha irmã Melina Andréa Rodrigues Valério, pelo afeto e por sempre ter estado ao meu lado durante minha vida.

A todos meus familiares, como meus avós maternos Dr. Matheus Beringhs Rodrigues e Waldes Lui Rodrigues, meus avós paternos Pedro Valério Toledo e Irma Stochi Valério, meu tio Marcelo Augusto Lui Rodrigues e minha tia Dra. Maria José Roncada.

À Srta. Flavia Isaura de Santi Ferreira, pelo amor, pela compreensão da distância e por ter estado ao meu lado não só nos momentos de alegria, mas também nos de cansaço e insegurança, e pela disponibilidade em me ajudar.

À todos amigos, pelo companheirismo ao longo de anos de convivência acompanhando esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, por confiar em mim e ter me acolhido em seu laboratório. Agradeço, também, à amizade, atenção, dedicação e compreensão dispensadas no âmbito pessoal, intelectual e profissional. Pela busca incessante de lapidar qualidades nas pessoas ao seu redor e por ser uma referência pessoal e profissional de vitórias e sabedorias.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr, pelo caráter e profissionalismo. Ainda, a esse professor que não é apenas dedicado, mas incansável, atribuo grande parte de minha formação científica por ter me guiado na busca e construção do saber.

À Dra. Sônia Aparecida Carvalho, por ser parte significativa de minha caminhada com as várias contribuições decisivas para este trabalho feitas com atenção, dedicação e valor. Pela instrução transmitida, amizade, companheirismo, paciência e por ser um exemplo de pessoa a ser seguido.

À Srta. Maria Aparecida Buzzeto pelo suporte laboratorial e por me ensinar técnicas cirúrgicas de remoção de cérebro de ratos. Pela amizade, sinceridade e repreensões também.

À Sra. Gilda Gatto pelo apoio técnico dispensado, pela amizade, sinceridade e agradáveis discussões sobre o nosso time de futebol.

À Srta. Marina Salviato Balbão, pela amizade, companheirismo e pelas ajudas dispensadas durante esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, por ter me aceitado em seu laboratório durante os quatro anos de iniciação científica.

Aos amigos do laboratório de farmacologia da FMRP: Thiago Mattar Cunha, Sérgio Roberto Rosa, Ieda Regina dos Santos Schivo, Giuliana Bertozzi Francisco, Diva Amábile Montanha de Souza, Ana Kátia dos Santos, Fabíola Leslie Antunes Cardoso Mestriner, Sílvio Manfredo Vieira, Fernando Spiller, Luis Fernando Ferrari, Henrique Lemos e Guilherme Rabelo de Souza.

Ao Bioterista Reinaldo por ter cuidado das centenas de camundongos que foram usadas nesse estudo.

Aos funcionários da FCFRP, em especial ao Seu Antônio da recepção e à Dona Evanira da copa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Por fim, à CAPES e à este laboratório de toxicologia por terem me financiado no âmbito pessoal e profissional, respectivamente.

EPÍGRAFE

Navegar é Preciso

Navegadores antigos tinham uma frase gloriosa:

"Navegar é preciso; viver não é preciso".

Quero para mim o espírito [d]esta frase,
transformada a forma para a casar como eu sou:
Viver não é necessário; o que é necessário é criar.
Não conto gozar a minha vida; nem em gozá-la penso.
Só quero torná-la grande,
ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a (minha alma) a lenha desse
fogo.

Só quero torná-la de toda a humanidade;
ainda que para isso tenha de a perder como minha.

Cada vez mais assim penso.

Cada vez mais ponho da essência anímica do meu sangue
o propósito impessoal de engrandecer a pátria e contribuir
para a evolução da humanidade.

É a forma que em mim tomou o misticismo da nossa Raça.

Fernando Pessoa

["Navigare necesse; vivere non est necesse" - latim, frase de Pompeu, general romano, 106-48 aC., dita aos marinheiros, amedrontados, que recusavam viajar durante a guerra].

O que Fernando Pessoa pretendia despertar no leitor com esse poema?

O termo “*preciso*” é passível de uma interpretação ambígua. “*Preciso*” pode equivaler a *exato* ou, em diferente análise, pode equivaler a *necessário*.

Em “*Navegar é preciso*”, uma primeira análise permite compreender a navegação como ciência, a qual exige, como todo método científico, um conhecimento calculado, medido, previsível, preciso, exato. Em contraste a isso, brilhantemente Pessoa afirma que “*viver não é preciso*”, pois a vida é incalculável no sentido de momentos, decisões e sentimentos. Nesse sentido, não devemos nunca nos deixar destruir, devemos sempre criar e recriar o impossível de nós para nós. Devemos, portanto, abandonar a mesquinhez, os falsos projetos, as falsas ilusões para apostarmos no que realmente há de melhor em nós.

Em uma segunda interpretação, ainda mais instigante, Pessoa leva-nos a refletir sobre o que é necessário criar para deixarmos ao mundo, pois enquanto a vida é fugaz e passageira, o conhecimento é permanente e imortal. Assim, viver é existir de todas as formas, e para isso não basta apenas ver, ouvir e falar, porque essas são manifestações da existência. Para viver, portanto, é preciso muito mais do que existir, é necessário sentir, pensar e criar. Em outras palavras, para viver é preciso navegar.

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xiii
Lista Tabelas	xv
Lista de abreviaturas e siglas	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 D-Frutose-1,6-difosfato.....	1
1.2 Adenosina.....	5
1.3 Relação entre F1,6BP e adenosina.....	12
1.4 Conceitos e modelos experimentais.....	15
1.4.1 Citocinas.....	15
1.4.2 Dor.....	17
1.4.3 Migração leucocitária.....	21
1.4.4 Cromatografia e CLAE.....	23
1.4.5 Validação de metodologia analítica.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Materiais.....	30
3.1.1 Animais.....	30
3.1.2 Vias de administração.....	30
3.1.3 Fármacos e regime de dosagem.....	31
3.2 Métodos.....	34
3.2.1 Modelos experimentais.....	34
3.2.1.1 Atividade anti-hipernociceptiva.....	34
3.2.1.2 Migração leucocitária.....	35
3.2.1.3 Quantificação de citocinas.....	36
3.2.1.4 Efeito sedativo e relaxante muscular.....	37
3.2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica.....	38
3.2.2.1 Soluções padrões e reagentes.....	38
3.2.2.2 Análise cromatográfica.....	38
3.2.2.3 Validação da metodologia analítica.....	39
3.2.2.3.1 Curva de calibração.....	40
3.2.2.3.2 Recuperação.....	41
3.2.2.3.3 Linearidade.....	42
3.2.2.3.4 Precisão e exatidão.....	42
3.2.2.3.5 Limites de detecção e quantificação.....	44
3.2.2.3.6 Especificidade.....	45
3.2.2.3.7 Estabilidade.....	46
3.2.3 Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Experimentos preliminares.....	47
4.2 F1,6BP inibe hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, TNF- α , IL-1 β e KC.....	48
4.3 F1,6BP não inibe produção de citocinas e a migração celular.....	50
4.4 F1,6BP inibe a hipernocicepção induzida pelos mediadores finais da cascata hipernociceptiva: PGE ₂ e dopamina.....	53

4.5 Adenosina inibe hipernocicepção induzida pela Cg, PGE ₂ e dopamina de maneira semelhante à F1,6BP.....	55
4.6 A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é revertida por antagonista seletivo para receptores A ₁ de adenosina....	58
4.7 A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é dependente da ativação de receptores A ₁ de adenosina.....	60
4.8 Validação da metodologia analítica.....	62
4.8.1 Procedimento para obtenção de amostras.....	62
4.8.2 Ajuste das condições cromatográficas.....	64
4.8.3 Linearidade e curva de calibração.....	66
4.8.4 Precisão e exatidão.....	68
4.8.5 Recuperação.....	69
4.8.6 Limite de quantificação.....	70
4.8.7 Limite de detecção.....	70
4.8.8 Especificidade.....	71
4.8.9 Estabilidade.....	71
4.9 F1,6BP eleva concentração plasmática de adenosina.....	72
5. DISCUSSÃO.....	76
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO 1: Certificado do comitê de ética.....	126
ANEXO 2: Artigo publicado: <i>British Journal of Pharmacology</i>	127

RESUMO

VALERIO, D. A. **Investigação do aumento endógeno de adenosina decorrente da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato.** 2009. 138p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

D-Frutose-1,6-difosfato (F1,6BP), um intermediário altamente energético da via glicolítica, é descrito na literatura como portador de diversas atividades farmacológicas, contudo seu mecanismo de ação ainda não fora esclarecido. Dessa forma, a possível atividade anti-inflamatória da F1,6BP sobre diferentes modelos de inflamação e sua via de ação em camundongos foram averiguadas com enfoque na inibição da produção de citocinas e na elevação dos níveis endógenos de adenosina. A hipernocicepção mecânica foi avaliada por método eletrônico de pressão crescente em patas de camundongos, o ensaio cinético-colorimétrico de mieloperoxidase (MPO) foi utilizado na avaliação da migração leucocitária para o tecido subcutâneo plantar, e a performance motora dos animais foi determinada pelo teste rota-rod. A quantificação de citocinas foi realizada por ELISA, enquanto a quantificação de adenosina foi obtida em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após validação laboratorial da metodologia segundo normas protocoladas pela ANVISA. O pré-tratamento de camundongos com F1,6BP reduziu a hipernocicepção induzida por injeção intraplantar de carragenina (45%), TNF- α (40%), IL-1 β (46%), KC (33%), prostaglandina E₂ (41%) e dopamina (55%). O tratamento com F1,6BP, no entanto, não alterou a produção de citocinas induzidas por carragenina (TNF α , IL-1 β e KC) e nem interferiu com a migração leucocitária para a região desafiada. Por outro lado, o efeito antinociceptivo da F1,6BP foi prevenido por tratamento sistêmico e local com antagonista de receptores A₁ de adenosina (DPCPX) e o tratamento com adenosina apresentou efeitos similares os do tratamento com F1,6BP, sugerindo que o efeito da F1,6BP é mediado pela ação periférica da adenosina sobre receptores A₁. Endossando isso, foi constatado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência um aumento na concentração plasmática de adenosina em camundongos após administração de F1,6BP. Por conseguinte, a via de ação da F1,6BP parece ser dependente da produção de adenosina, mas não da modulação na produção de citocinas

hipernociceptivas. A adenosina atua, então, periféricamente em receptores A_1 inibindo a hipernocicepção, e a evidência farmacológica de que ela medeia a atividade da F1,6BP através dessa ação sobre receptores A_1 foi corroborada por resultados *in vivo* que demonstram aumento dos níveis de adenosina decorrente da administração de F1,6BP. Em vista disso, esses resultados insinuam um possível potencial terapêutico da F1,6BP em reduzir a dor inflamatória.

Palavras-Chave: D-Frutose-1,6-difosfato, adenosina, citocinas, dor, cromatografia líquida de alta eficiência.

Abreviações: D-Frutose-1,6-Difosfato (F1,6BP), adenosina (Ado), carragenina (Cg), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interleucina-1-beta (IL-1 β), quimiocina derivada de queratinócito (KC), prostaglandina E_2 (PGE_2), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

ABSTRACT

VALERIO, D. A. **Investigation of adenosine endogenous increase decurrent of D-Fructose-1,6-difosfato administration, a glycolytic intermediate.** 2009. 138p. Master's Degree. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

D-Fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP), a high-energy glycolytic pathway intermediate, is reported to have a many pharmacologically effect, but its underlying mechanism of action in inflammation is incompletely understood. In this study, the aim was to examine the function of F1,6BP on cytokines and adenosine. Then, the possible F1,6BP anti-inflammatory activities in different models of inflammation and its mechanism of action in mice were addressed focusing inhibition of cytokine production or adenosine production enhancement.

Mechanical hypernociception (decrease in the nociceptive threshold of animals) was evaluated by the electronic pressure meter test in mice, the myeloperoxidase (MPO) kinetic–colorimetric assay was used to evaluate the leukocyte migration to the subcutaneous plantar tissue of mice hind paw, and mice motor performance were evaluated on the rota-rod test. The cytokines levels were measured by ELISA. Adenosine levels were determined by high performance liquid chromatography and this experimental procedure was validated according to ANVISA for this purpose.

The pretreatment of mice with F1,6BP reduced the hypernociception induced by intraplantar injection of carrageenan (45%), TNF α (40%), IL-1 β (46%), KC (33%), prostaglandin E₂ (41%) and dopamine (55%). However, FBP treatment did not alter carrageenin-induced cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) production or the leukocyte migration to the subcutaneous plantar tissue of mice hind paw. On the other hand, the antinociceptive effect of F1,6BP was prevented by systemic and local treatment with an adenosine A₁ receptor antagonist (DPCPX) and adenosine treatment presented similar effect of F1,6BP, suggesting that F1,6BP effect is mediated by peripheral adenosine acting on A₁ receptors. In agreement, the present work determined by high

performance liquid chromatography that D-Fructose-1,6-bisphosphate administration increased the adenosine endogenous levels in the mice plasma.

Therefore, F1,6BP mechanism of action seems dependent on adenosine production but not on modulation of hypernociceptive cytokine production. In turn, adenosine acts peripherally on A₁ receptor inhibiting hypernociception. The pharmacological evidence that adenosine through activation of adenosine A₁ receptor mediates the antinociceptive action of F1,6BP was supported by the finding that in vivo administration of F1,6BP increases the levels of adenosine in the blood samples. Thus, suggesting the treatment with F1,6BP as a possible therapeutic approach to reduce inflammatory pain.

Keywords: D-Fructose-1,6-bisphosphate, pain, cytokine, adenosine, DPCPX.

Abbreviations: D-Fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP), Adenosine (Ado), Tumor necrosis alpha (TNF- α), Interleukin-1beta (IL-1 β), Prostaflandin E₂ (PGE₂), Keratinocyte-derived chemokine (KC), High-performance liquid chromatography (HPLC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Configuração molecular da D-Frutose-1,6-difosfato na representação 'tubes' otimizada no programa HyperChem Professional.....	2
Figura 2: Configuração molecular da adenosina na representação "tubes" otimizada no programa HyperChem Professional.....	6
Figura 3: Principais vias envolvidas no metabolismo de adenosina.....	8
Figura 4: Metabolismo intracelular de adenosina.....	11
Figura 5: Esquema de um equipamento básico de CLAE.....	25
Figura 6: F1,6BP inibe hipernocicepção mecânica induzida por Cg, TNF- α , IL1- β e KC.....	49
Figura 7: F1,6BP não inibe a produção de citocinas e a migração celular.....	52
Figura 8: F1,6BP inibe a hipernocicepção mecânica induzida pelos mediadores finais: PGE ₂ e dopamina.....	54
Figura 9: Adenosina inibe hipernocicepção induzida pela Cg, PGE ₂ e dopamina de maneira semelhante à F1,6BP.....	57
Figura 10: A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é revertida por antagonista seletivo para receptores A ₁ de adenosina.....	59

Figura 11: A atividade anti-hipernociceptiva do da F1,6BP e da adenosina é dependente da ativação de receptores A_1 de adenosina.....	61
Figura 12: Fluxograma do procedimento para obtenção de amostras, da manipulação animal ao cromatograma.....	63
Figura 13: Cromatogramas após determinações das condições cromatográficas.....	65
Figura 14: Linearidade, curva seca e curva de calibração.....	67
Figura 15: F1,6BP eleva concentração plasmática de adenosina.....	74
Figura 16: Concentração plasmática de adenosina.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Precisão e exatidão para a validação da metodologia analítica.....68

Tabela 02: Recuperação determinada para validação da metodologia analítica.....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μg – Microgramas
μL - Microlitro
5'-NT – Enzima 5'-nucleotidase
A₁ – Receptor de adenosina tipo 1
A_{2A} - Receptor de adenosina tipo 2, subtipo B
A_{2B} - Receptor de adenosina tipo 2, subtipo B
A₃ - Receptor de adenosina tipo 3
AC - Enzima adenilato ciclase
ADA - Enzima adenosina deaminase
Ado - Adenosina
ADP – Adenosina 5'-difosfato
AK - Adenosina quinase
AMP – Adenosina 5'-monofosfato
AMPC - Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA - Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR - Receptores de adenosina
ATP – Adenosina 5'-trifosfato
ATPase - Adenosina trifosfatase
BSA – Bovine Serum Albumin
Cg – Carragenina
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
DPCPX - 1,3-di-propil-8-ciclopentilxantina
e5'-NT – Enzima ecto 5'-nucleotidase
ELISA – Ensaio imuno-enzimático
F1,6BP - D-Frutose-1,6-Difosfato
FDA – Food and Drug Administration
G – Proteína G
HPLC – High performance liquid chromatograph
HTAB - Brometo de hexadecil trimetil-amônio
i.p. - Intraperitoneal
i.pl. - Intraplantar

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 β – Interleucina 1 beta
KC - Quimiocina derivada de queratinócito
kDa – kilodaltons
LD – Limite de detecção
LPS - Lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas
LQ - Limite de quantificação
mL - mililitro
NDP - Nucleosídeo 5´-difosfato
ng – Nanogramas
nm - Nanometros
NT - Transportadores nucleosídeos
NTP - Nucleosídeo 5´-trifosfato
PBS – Phosphate buffered saline
PGE₂ - Prostaglandina E2
PGs - Prostaglandinas
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PNP - Purina nucleosídeo fosforilase
ROS – Espécies reativas de oxigênio
rpm – rotações por minuto
s.c. - Subcutânea
SAHH – Enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
t_r – Tempo de retenção
UV – Ultravioleta
UV-VIS - absorbância no ultravioleta visível
XO – Enzima xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

1.1 D-Frutose-1,6-difosfato

Há mais de duas décadas Dr. Angel K. Markov reportou que a administração exógena de Frutose-1,6-difosfato promove proteção a danos decorrentes de hipóxia isquêmica. A teoria proposta foi que a administração exógena de Frutose-1,6-difosfato levaria a uma manutenção do metabolismo: “Frutose-1,6-difosfato restaurará a atividade da glicólise, previamente inibida pela acidez, por intervir na via de Embden–Meyerhoff como um regulador metabólico e como um substrato de alta energia”. Ao invés do substrato, a entrada de uma molécula exógena de Frutose-1,6-difosfato na glicólise intracelular pouparia a despesa de dois ATP's (um pela hexoquinase e outro pela fosfofrutoquinase). Assim, a proposta original era que o metabolismo de Frutose-1,6-difosfato exógena forneceria duas vezes rendimento que o da energia glicolítica, quatro ATP's por a molécula de substrato (MARKOV, 1986).

D-Frutose-1,6-difosfato (F1,6BP; figura 1) é uma substância composta por um monossacarídeo frutose fosforilado nos carbonos C-1 e C-6, com atividade óptica dextrógira. Intermediário altamente energético da via glicolítica, F1,6BP é portador de diversos efeitos farmacológicos, incluindo: inibição da aderência leucocitária e disfunção microvascular no músculo esquelético em modelos de isquemia/reperfusão (AKIMITSU et al., 1995), redução do edema de patas induzido por carragenina (PLANAS et al., 1993), redução dos indicadores de pleuresia (ALVES-FILHO et al., 2004), diminuição da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de prostaglandina-E₂ (AHN et al., 2002), diminuição da produção intracelular de citocinas inflamatórias (ex:TNF- α , CUESTA et al., 2006; LOPES et al., 2006; YIN et al., 2008) e inibição da expressão da oxido nítrico sintase (iNOS, EDDE et al., 1998).

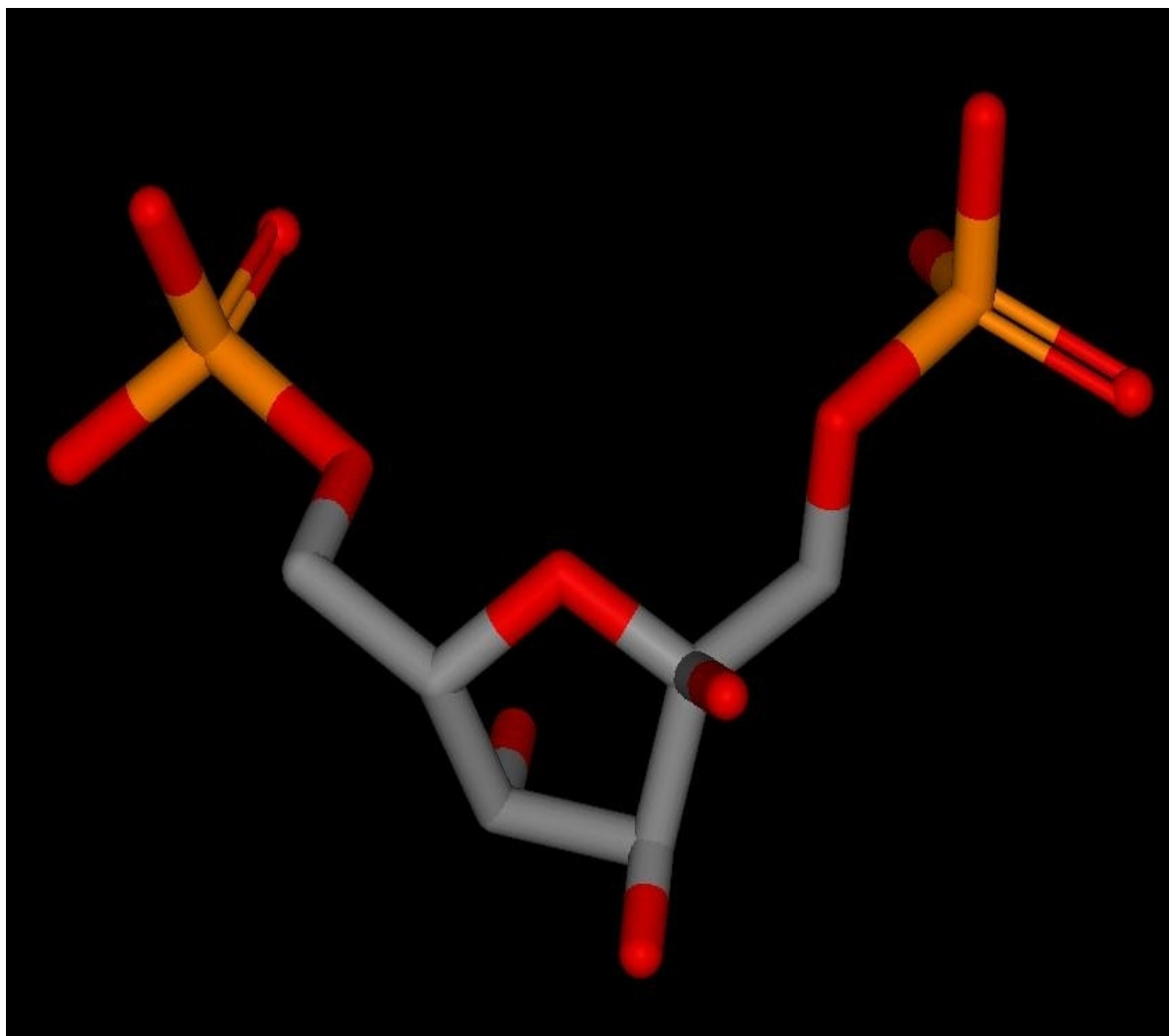


Figura 1: Configuração molecular de menor energia da D-Frutose-1,6-difosfato na representação stick otimizada no programa HyperChem Professional. Cinza: carbono, vermelho: oxigênio, laranja: fosfato. Hidrogênios não representados. A energia da molécula nessa configuração é de 60,952649 kcal/mol.

Apresenta, ainda, atividade imunomoduladora como redução da proliferação de células T *in vitro* (BORDIGNON-NUNES et al., 2003; LOPES et al., 2006), atividade anticonvulsivante (LIAN et al., 2007), prevenção de hepatite induzida por galactosamina (DE OLIVEIRA, ROSA, AMBROSIO, 1992), preservação de fígado em transplantes (MIHAS et al., 2003; MORESCO et al., 2004) e melhoria no quadro de sepse (NUNES et al., 2003). Além disso, F1,6BP têm sido constantemente reportada na literatura por trabalhos em que sua aplicação terapêutica aponta significativas atenuações de efeitos injuriantes em modelos experimentais de isquemias e reperfusões pós-isquemias em rins (DIDLAKE et al., 1989), fígado (NAKAI et al., 1991), intestino (SUN et al., 1990), cérebro (FARIAS, SMITH, MARKOV, 1990) e pulmões (CHU et al., 2002).

Hardin e colaboradores (2001) salientaram que embora a F1,6BP seja um promissor agente terapêutico em diversos modelos patológicos, pouco tem sido feito para elucidar seu mecanismo de ação. Esse composto é um intermediário glicolítico natural que se insere na glicólise após a etapa limitante da fosfofrutoquinase, e um significativo número de autores tem reportado sua eficiência em prevenir lesões e recuperar funções teciduais em circunstâncias oxigênio-deficientes por atuar na manutenção do estado energético celular (DIDLAKE et al., 1985; HARDIN, ROBERTS, 1994; LAZZARINO et al., 1991; MARKOV, 1986; MARKOV et al., 1980; PENNEY, CASCARANO, 1970; PLANAS et al., 1993; SULLIVAN, GRANTHAM, 1992; TAVAZZI et al., 1992).

Não obstante F1,6BP ser uma molécula muito polar e altamente carregada no pH fisiológico, já está bem sedimentado na literatura sua capacidade de atravessar membrana celular, inclusive de maneira dose-dependente (EHRINGER et al., 2000). Embora o mecanismo de seu transporte não esteja esclarecido e um transportador próprio de membrana não tenha sido identificado, Hardin e Roberts (1994) usando carbono-13 em ressonância magnética nuclear revelaram uma evidência direta que F1,6BP exógena marcada com carbono-13 é capaz de atravessar a membrana plasmática, demonstrando, de fato, que a F1,6BP possui essa capacidade. A literatura sugere quatro mecanismos para esclarecer essa passagem da F1,6BP para o interior celular: (i) F1,6BP usufrui de um carreador de membrana ainda não identificado; (ii) F1,6BP se ligaria a uma forma lipídica solúvel de aldolase que

promoveria seu acesso; (iii) endocitose de fluido extracelular contendo F1,6BP; (iv) passiva permeabilidade através da membrana plasmática (GALZIGNA et al., 1989; HARDIN & ROBERTS, 1994; RIGOBELLO et al., 1982).

Nesse contexto, F1,6BP apresentou-se, em determinadas condições, capaz de aumentar o fluxo glicolítico e atuar como substrato para essa cascata reacional, evidenciando sua capacidade de atingir o citosol em quantidade suficiente para interferir com a via glicolítica (HASSINEN et al., 1991; LAZZARINO et al., 1984; NUUTINEN et al., 1991). Em decorrência disso, quando a F1,6BP entrar na célula a via glicolítica não poderá ser significativamente regulada porque a F1,6BP situa-se após as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase - pontos de regulação da via - e antes da piruvato quinase (terceiro ponto de regulação da via glicolítica) sobre a qual, todavia, a F1,6BP atua como ativador alostérico (BAILEY, STIRPE, TAYLOR, 1968; IRVING, WILLIAMS, 1973), logo a produção de ATP será estimulada pois a piruvato quinase não será um oponente à sua metabolização. Ainda, além de atuar como substrato para a via glicolítica e, conseqüentemente, elevar a produção de ATP, F1,6BP também pode elevar os níveis de ATP ao facilitar a re-síntese de ATP a partir de ADP (LOGUERCIO et al., 1996).

Embora também haja trabalhos como o publicado por Lorenzo A. Farias (1986) que apontam para uma elevação na quantidade de ATP em fluidos corporais em decorrência da administração de F1,6BP, a maioria dos investigadores têm reportado o aumento da produção de ATP pela administração de F1,6BP em tecidos de diferentes órgãos como fígado, rins e coração (ANTUNES et al., 2006; BAICU et al., 2004; BARTRONS; BERMÚDEZ, 1997; BICKLER, BUCK, 1996; COHEN et al., 2006; ESPANOL et al., 1998; FORTES-AIUB et al., 2003; GREGORY et al., 1990; HASSINEN et al., 1991; JUERGENS, HARDIN, 1996; LAZZARINO et al., 1992; LOGUERCIO et al., 1996; MARKOV, 1986; MARTIN, MCLEAN, 1996; OYANAGUI, 1998; ROIG, SANO et al., 1995; SHIROSHIMA et al., 1999; SOLA et al., 2001; TAVAZZI et al., 1992; TAYLOR et al., 2005; TRIMARCHI et al., 1997; ZHANG et al., 1988; WIDJAJA et al., 1999).

1.2 Adenosina

Adenosina (Ado, figura 2) é um nucleosídeo purínico que está amplamente distribuída pelo corpo classificada como neuromodulador endógeno e agonista purinérgico, produzida bioquimicamente através da união de uma base púrica adenina com uma D-ribose formando um dos maiores ribonucleotídeos do organismo (SAWINOK, 1999).

Sob condições normais ela é continuamente formada tanto intracelularmente quanto extracelularmente (FREDHOLM, 2001), todavia em locais de dano tecidual é produzida em altas concentrações, desempenhando importante papel na regulação da homeostase de muitos sistemas fisiológicos, incluindo cardiovascular, nervoso, renal e imune (BLACKBURN, 2003). É liberada por várias células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, plaquetas e células musculares, embora também possa ser derivada do metabolismo extracelular de nucleosídeos purínicos (LAPPAS, RIEGER, LINDEN, 2005).

Além disso, em condições metabolicamente desfavoráveis, tais como hipóxia, isquemia ou inflamação a adenosina atua como um potente mensageiro extracelular cuja formação está usualmente elevada devido a sua liberação por células pertencentes ou não ao sistema imune e pela rápida degradação de ATP e ADP em adenosina (CROSTEIN et al., 1985; OKUSA, 2002; THIEL, CALDWELL, SITKOVSKY, 2003). A via para produção de adenosina (figura 3) envolve uma cascata de defosforilação de ATP e ADP finalizada sob ação de enzimas do tipo 5' nucleotidases localizadas tanto na membrana celular quanto no interior celular (DUNWIDDIE et al., 1997; SCHUBERT et al., 1979; ZIMMERMANN et al., 1998; ZIMMERMANN, 2000). Assim, o metabólito adenosina é produzido principalmente pela quebra de nucleotídeos de adenina intra ou extracelular (ZIMMERMANN, 2000), embora também possa contribuir a hidrólise da S-adenosilhomocisteína (SAH) pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAHH), a qual catalisa uma reação de transmetilação que produz ao mesmo tempo adenosina e homocisteína (BOROWIEC et al., 2006; BROCH & UELAND, 1980; DEUSSEN, LLOYD, SCHRADER, 1989).

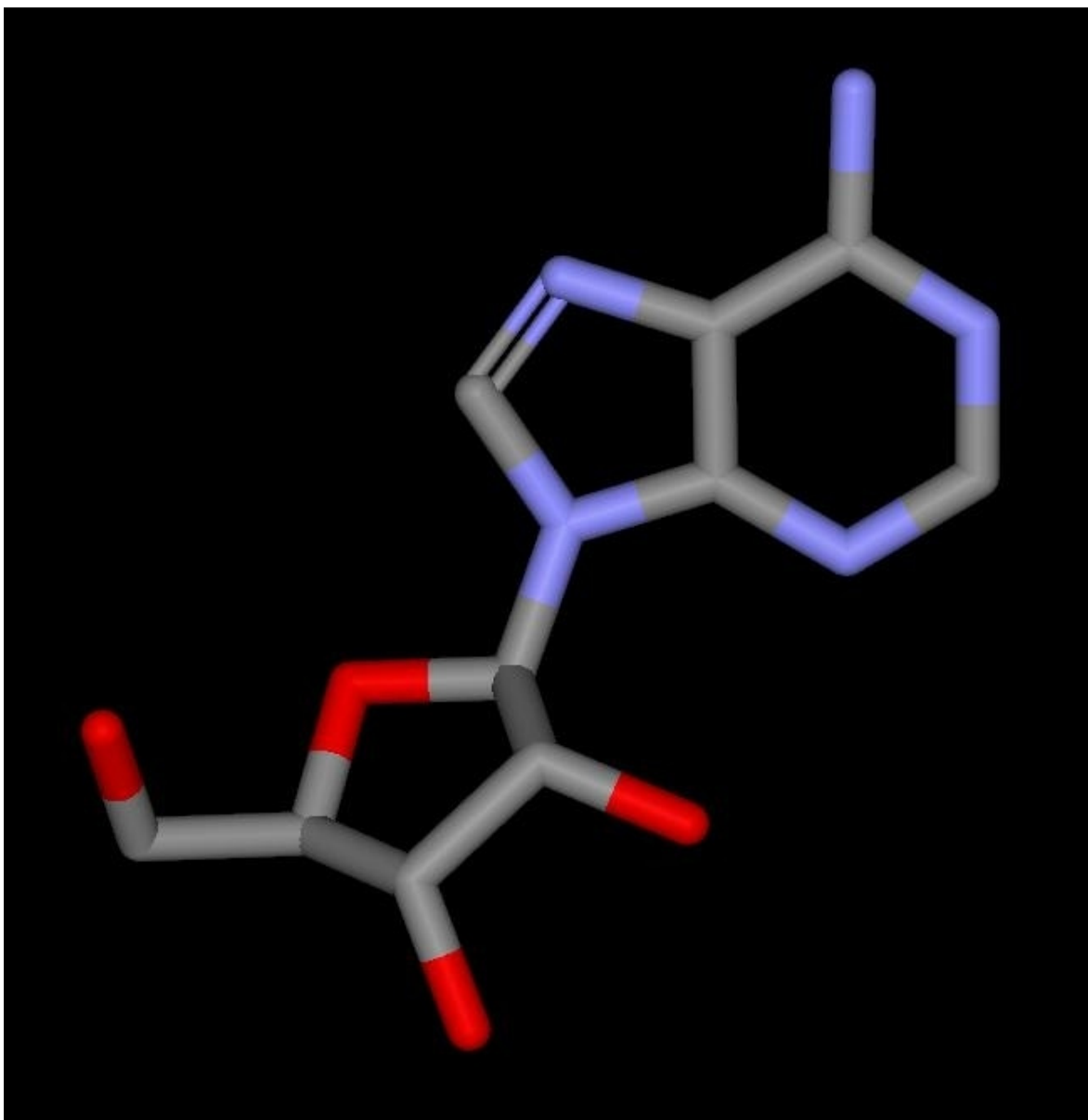


Figura 2: Configuração molecular de menor energia da adenosina na representação stick otimizada no programa HyperChem Professional. Cinza: carbono, vermelho: oxigênio, azul: nitrogênio. Hidrogênios não representados. A energia da molécula nessa configuração é de 31,888001 kcal/mol.

A adenosina intracelularmente formada, então, é derivada do ATP submetido a atividade de enzimas 5'-nucleotidases intracelulares (também citadas por 5'-endonucleotidase ou 5'-nucleotidase citoplasmática, BOROWIEC et al., 2006), dentre as quais duas isoformas, CN-I e CN-II, têm sido clonadas (FREDHOLM et al., 2001; HASKÓ & CRONSTEIN, 2004; SALA-NEWBY et al., 1999; SAWYNOK, DOAK, POON, 1998; SAWYNOK, 1999). Essas enzimas possuem papéis diferentes uma vez que a CN-II cataboliza IMP e GMP a inosina e guanosina enquanto a CN-I cataboliza AMP a adenosina (SALA-NEWBY et al., 2000), sendo o AMP intracelular derivado da clivagem da adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP) durante o ciclo de geração de energia (FREDHOLM et al., 2001). Em condições fisiológicas a maior parte da adenosina é derivada do AMP intracelular que se difunde a favor de um gradiente de concentração para o exterior celular e encontra a ecto-5'-nucleotidase ancorada na membrana celular, enzima responsável por converter AMP a adenosina, e então a defosforilação de AMP para adenosina é considerada o último passo dessa cadeia enzimática (FREDHOLM et al., 2001).

No meio extracelular, os nucleotídeos também podem originar adenosina por serem hidrolisados por um conjunto de 5'- nucleotidases que se localizam na superfície celular, no meio intersticial ou em fluidos corporais (e por essa razão denominadas ectonucleotidases, ZIMMERMANN, 2001). Membros de várias famílias de ectonucleotidases podem contribuir para a hidrólise extracelular de nucleotídeos, inclusive nucleosídeo 5'-trifosfato e Nucleosídeo 5'-difosfato (NTP e NDP) podem ser hidrolisados por determinados membros das famílias ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), família ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e por fosfatases alcalinas (ZIMMERMANN, 2001).

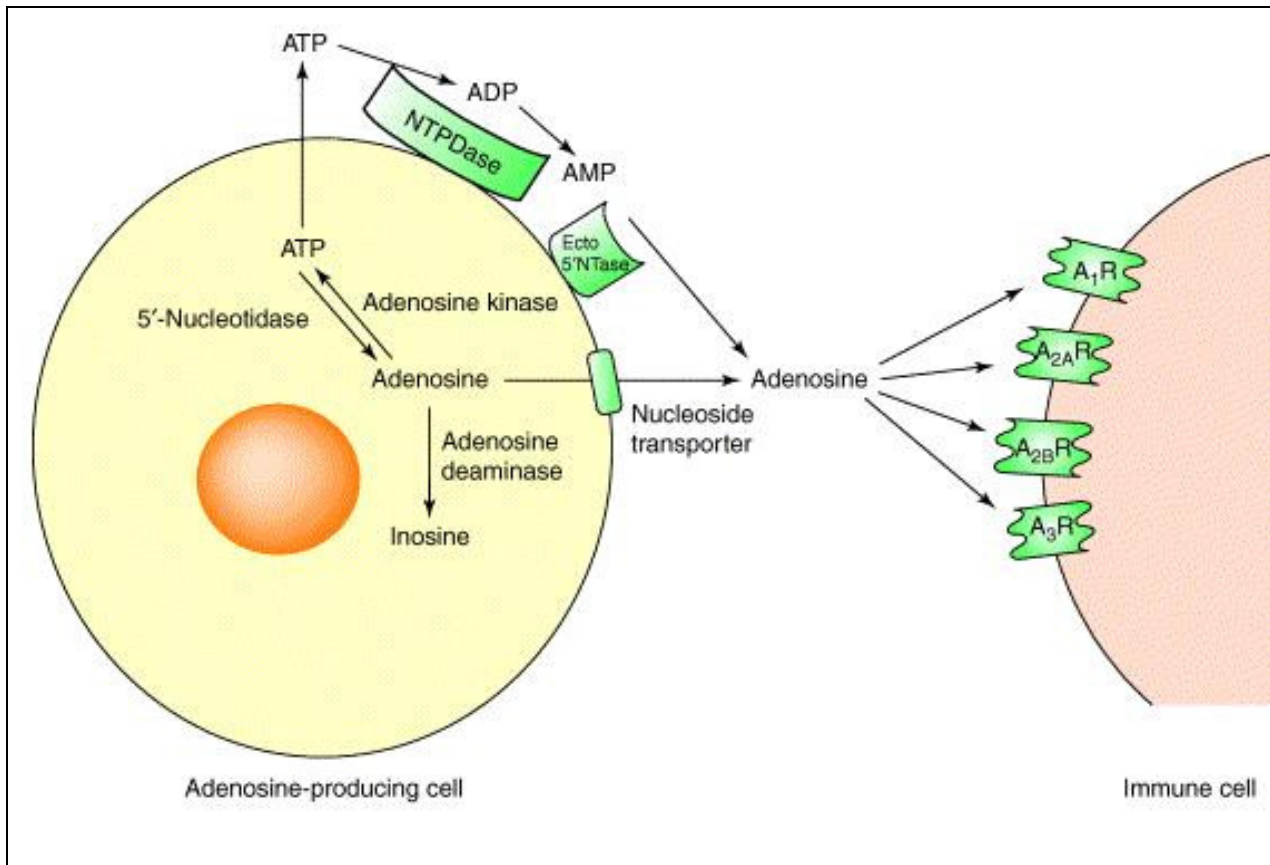


Figura 3: Principais vias envolvidas no metabolismo de adenosina. Adenosina pode ser formada a partir de ATP em ambos os espaços: intracelular e extracelular. A adenosina intracelular é formada por ação de enzimas 5'-nucleotidasas intracelulares, e é conduzida ao meio extracelular por meio de um transportador nucleosídeo de membrana. A enzima adenosina quinase refosforila adenosina a ATP, enquanto a enzima adenosina deaminase converte adenosina a inosina. A produção extracelular de adenosina é resultado de uma cascata enzimática constituída por NTPDases e ecto-5'-nucleotidasas (Ecto-5'-NTase). A adenosina extracelular se liga a receptores de adenosina (AR) 1, 2A, 2B e 3, expressos na superfície de células de diferentes tecidos (HASKÓ & CRONSTEIN, 2004).

Dentro do grupo das ectonucleotidasas deve-se destacar a família das NTPDases que são capazes de promover a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados até nucleotídeos monofosfatados e a ecto-5'-nucleotidase que promove a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados aos seus respectivos nucleosídeos (ZIGANSHIN, HOYLE, BURNSTOCK, 1994; ZIMMERMANN, BRAUN, 1999; ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN et al., 1996). Essa via metabólica dura poucas centenas de milisegundos e a defosforilação do AMP para adenosina parece ser a etapa limitante (DUNWIDDIE et al., 1997). Além disso, o ATP ainda pode ser hidrolisado extracelularmente até adenosina pela ação de certo grupo de ectonucleotidasas que inclui a direta conversão de ATP a AMP pela apirase (ROCHA et al., 1990; ZIGANSHIN, HOYLE, BURNSTOCK, 1994; BATTASTINI et al., 1991) ou a sucessiva formação de ADP e AMP pela ação da adenosina trifosfatase (ATPase) e da adenosina difosfatase (ADPase, JAMES; RICHARDSON, 1993; ZIGANSHIN, HOYLE, BURNSTOCK, 1994).

Desse modo, as ectonucleotidasas juntamente com as 5'-endonucleotidasas (5'-NT) controlam não só a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) para receptores de nucleotídeos e para receptores de nucleosídeos, como também a duração e extensão da ativação de receptores (CHEN, GUIDOTTI, 2001). Portanto, essa cascata formada pelas ectonucleotidasas e 5'-endonucleotidase é uma via enzimática com a dupla função de produzir ou remover o nucleotídeo liberado como molécula sinalizadora e gerar um outro sinalizador, o nucleosídeo adenosina. Ademais, é relevante o fato de essas enzimas terem uma função protetora ao manter os níveis extracelulares de ATP/ADP e adenosina dentro de condições fisiológicas (AGTERESCH et al., 1999).

Nesse cenário, o efeito modulatório sobre a formação, degradação e o transporte da adenosina é o que determina os níveis intra e extracelulares de adenosina. E a modulação de concentrações de adenosina extracelular, por exemplo por inibidores do metabolismo de adenosina, pode produzir atividades farmacológicas como antinociceptiva e antiinflamatória dentre outras (MILLAN, 2002; SAWYNOK, REID, LIU, 1999), uma vez que a adenosina modula diversos processos fisiológicos mediados por certos receptores de membrana pertencentes a uma classe específica de receptores denominada P₁

(receptores purinérgicos), os quais são acoplados a adenilato ciclase via proteína G. Assim, a ativação desses receptores pode desempenhar importantes funções por meio de mecanismos mediados por quatro receptores diferentes de adenosina: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (KLINGER, FREISSMUTH, NANOFF, 2002).

Esses receptores podem estimular ou inibir a atividade da enzima adenilato ciclase e aumentar ou diminuir, respectivamente, a produção de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) (FREDHOLM, 2007; LONDOS, COOPER, WOLFF, 1980), justificando os efeitos opostos descritos para a adenosina na literatura em virtude da ativação de diferentes receptores de adenosina (POLOSA, HORKE, HOLGATE, 2002; SITKOVSKY, 2003), já que enquanto os receptores A_1 e A_3 são acoplados a G_i ou G_o , os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados a G_s (KHASAR et al, 1995; FREISSMUTH, SCHUTZ, LINDER, 1991^a; FREISSMUTH; SELZER; SCHUTZ, 1991b; MUNSHI et al, 1991; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; TAIWO; LEVINE, 1991). Dessa maneira, tal inibição ou estímulo da AC proporciona diminuição ou aumento, respectivamente, das concentrações do segundo mensageiro AMPc, inibindo ou estimulando as vias dependentes desta molécula sinalizadora (LONDOS, COOPER, WOLFF, 1980; MILLAN, 2002; SAWINOK, REID, LIU, 1999).

A adenosina produzida a partir do AMP pela ação da 5'-endonucleotidase é convertida em 5'-AMP pela adenosina quinase (AK) quando em baixa concentração de adenosina ou em inosina por ação da enzima adenosina deaminase (ADA) quando em alta concentração de adenosina (BOROWIEC et al, 2006, Figura 4). Inosina é, então, convertida em catabólitos purínicos pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP, MORIWAKI, YAMAMOTO, HIGASHINO, 1999). Os metabólitos da adenosina por essa via são: inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico, o qual é excretado através da urina (figura 4; BOROWIEC et al, 2006; LOGUERCIO et al., 1996; TRAMS, LAUTER, 1974).

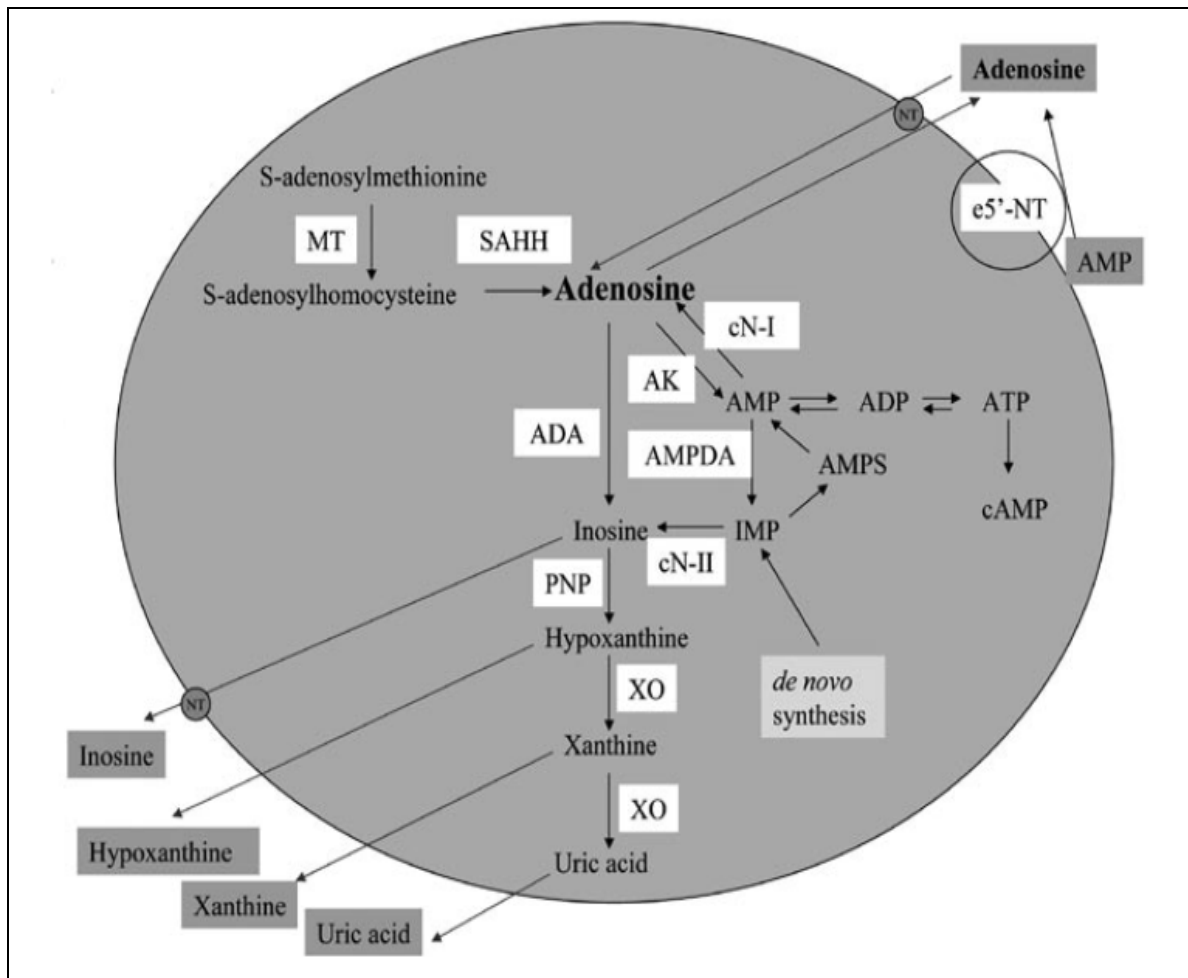


Figura 4: Metabolismo intracelular de adenosina: A adenosina citosólica pode ser oriunda da atividade da e5'-NT sobre o AMP extracelular e atingir do espaço intracelular através de transportadores nucleosídeos (NT), ser oriunda do metabolismo da S-adenosilhomocisteína pela SAHH, ou do catabolismo de ATP/ADP/AMP a adenosina pela enzima cN-I. A adenosina intracelular pode ser metabolizada novamente a AMP ou ser convertida a inosina pela enzima ADA. A inosina (que, também, pode ser proveniente da atividade da cN-II sobre o IMP), então, pode ser exportada para o espaço extracelular por transportadores nucleotídeos ou ser convertida a hipoxantina pela enzima PNP. A hipoxantina pode, por sua vez, atingir o espaço extracelular por atravessar passivamente a membrana plasmática ou ser convertida em xantina pela enzima XO. A xantina pode atingir o espaço extracelular por atravessar passivamente a membrana plasmática ou ser convertida a ácido úrico pela enzima XO. O ácido úrico pode atingir o espaço extracelular por atravessar passivamente a membrana plasmática e, assim, ser excretado (BOROEVIC et al., 2006).

A formação de adenosina intra e extracelular anteriormente citadas podem ser potencializadas através da prevenção de sua reutilização, ou seja, pela inibição da enzima adenosina quinase (a qual refosforila o nucleosídeo a AMP, SITKOVSKY, 2003), pela inibição da enzima adenosina deaminase (a qual converte adenosina em inosina, BOROWIEC et al, 2006) ou possivelmente pela liberação extracelular de precursores nucleotídicos de adenina (ATP, ADP e AMP) que por ação de ectonucleotidases são submetidos a catabolismo extracelular e culminam com a formação de adenosina (HASKO e CRONSTEIN, 2004).

Apesar de os tipos celulares envolvidos com a produção de adenosina extracelular não estarem totalmente esclarecido, são conhecidos muitos tecidos que produzem adenosina como subproduto da degradação do ATP. Por exemplo, em neurônios e células da glia a adenosina é liberada por meio de operação de sistemas de transporte da membrana quando a demanda se torna necessária (SAWINOK e SWEENEY, 1989; SAWINOK, 1998, 1999). Nesse sentido, a adenosina extracelular pode ser ambigualmente gerada tanto em decorrência do uso do ATP como fonte de energia, quanto como neurotransmissor, sendo que em repouso ocorre a produção e manutenção de níveis basais de adenosina.

1.3 Relação entre F1,6BP e Adenosina

É um fato relevante muitas atividades descritas para a F1,6BP serem atribuídas por outros estudos à adenosina. Embora o artigo publicado por T. Akimitsu et al. (1995) tenha sido o primeiro a comparar em um mesmo trabalho as atividades equivalentes de F1,6BP e adenosina, os autores não incluíram a produção de adenosina secundária ao tratamento com F1,6BP como uma possível justificativa para os resultados encontrados. Nesse trabalho, a ação da F1,6BP e da adenosina foi avaliada sobre a aderência leucocitária e disfunção microvascular no músculo esquelético em isquemia, sendo que ambas apresentaram a mesma ação inibitória em todos os modelos de experimentais descritos.

Além disso, essa atividade de prevenção a danos teciduais têm sido descrita em modelos de isquemia e reperfusão em vários órgãos para ambas,

F1,6BP e adenosina, por diversos autores separadamente (CHU et al., 2002; HARADA, OKAJIMA, KATSURAJI, 1999; LAZZARINO et al., 1992; LAZZARINO et al., 1991; LONG, ZHANG, LI, 2002; SANO et al.; 1995; SUN, FARIAS, MARKOV, 1990; TIAN et al., 2000; ZHENG et al, 2007). Outras atividades importantes como diminuição de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS, AHN et al., 2002; NARAYAN, MENTZER, LAZLEY, 2001), atividade anticonvulsivante (LIAN et al, 2007; WIESNER et al., 1999), prevenção de hepatite (BILZER, GERBES, 2002; DE OLIVEIRA, ROSA, AMBROSIO, 1992), preservação do fígado em modelos de transplantes (MIHAS et al., 2003; MORESCO et al., 2004; TIAN et al, 2000) também foram descritas separadamente para F1,6BP e para adenosina.

Ademais, ambas possuem atividades em diferentes modelos e patologias que envolvem a participação de citocinas. Por exemplo, a inibição da liberação de citocinas (como TNF- α , CUESTA et al., 2006; LOPES et al., 2006; RAMAKERS et al., 2006; YIN et al., 2008), inibição da expressão da óxido nítrico sintase (iNOS, EDDE et al., 1998; LEE, 2005), atividade imunomoduladora como inibição da ativação e proliferação de células T (BORDIGNON-NUNES et al., 2003; HUANG et al., 1997; LOPES et al., 2006), redução dos indicadores de pleuresia (ALVES-FILHO et al., 2004; SCHRIER, 1990) e melhora do quadro de sepse (NUNES et al., 2003; SULLIVAN, et al., 2004). Ainda, muitas propriedades anti-inflamatórias têm sido descritas tanto para a F1,6BP quanto para a adenosina, por exemplo a redução do edema de patas induzido por carragenina foi descrito para primeira por PLANAS et al. (1993), e por POON & SAWYNOK (1999) para a segunda.

Recentemente, Sola et. al (2003) apresentaram evidências farmacológicas de que certas propriedades antiinflamatórias da F1,6BP poderiam estar relacionadas a alterações dos níveis endógenos de adenosina, uma vez que as atividades da F1,6BP descritas pelos autores foram inibidas pela administração de uma enzima metabolizadora de adenosina, a enzima adenosina deaminase (ADA), o que corroboraria com o fato apontado por Akimitsu et al. (1995) de ambas, F1,6BP e adenosina, possuírem atividades similares. Há trabalhos que sugerem rins e fígado como principais órgãos com atividade de hidrólise da Frutose-1,6-difosfato (RIGOBELLO, GALZIGNA, 1982; XU, STRINGER, 2008), o corrobora o fato de a maioria das atividades similares

entre F1,6BP e adenosina descritas na literatura envolverem esses tecidos (ANTUNES et al., 2006; CUESTA et al., 2006; DIDLAKE et al., 1989; LI, WANG, SHI, 1994; LOGUERCIO et al., 1996; MIHAS et al., 2003; MORESCO et al., 2004; NAKAI et al., 1991; SANO et al., 1995).

Tendo em vista que muitas atividades atribuídas a F1,6BP foram descritas com incertezas sobre o seu mecanismo de ação, é de grande valia para a literatura um trabalho que demonstre uma produção endógena de adenosina secundária ao tratamento com F1,6BP que resulte em uma elevação da concentração plasmática desse nucleosídeo, sugerindo uma possível via de ação para esse intermediário glicolítico. Assim, diferentes linhas de pesquisa poderão insinuar seus resultados através de mecanismos celulares esclarecidos que ocorram em resposta a ativação dos diferentes subtipos de receptores de adenosina.

Por exemplo, é sabido que a ativação de receptores de adenosina pode interferir com a abertura de canais de cálcio (HAYSLETT et al., 1995; MACALA, HAYSLETT, 2002), no entanto os diversos trabalhos que reportam a variação da concentração intracelular de Ca^{2+} em decorrência da administração de F1,6BP não consideram essa possibilidade (DAHLGREN, NOLKRANTZ, KENNEDY, 2005; DONOHOE et al., 2001; GALZIGNA, RIGOBELLO, 1986; KOCKSKÄMPER, ZIMA, BLATTER, 2005; RAMOS, DE MEIS, 1999; TAMAKI, NAKAI, YAMAUE, 2002; ZIMA, KOCKSKÄMPER, BLATTER, 2006).

1.4 Conceitos e Modelos Experimentais

1.4.1 Citocinas

Citocinas são definidas como polipeptídeos produzidos e liberados por células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, ou em respostas a outras citocinas. Em geral, elas são liberadas em uma controlada sequência a partir de vários tipos celulares e são responsáveis pela produção dos mediadores finais envolvidos na indução dos sinais e sintomas inflamatórios (VERRI et al., 2006). Elas são produzidas transitóriamente e geralmente têm um curto tempo de meia vida. Estruturalmente, citocinas possuem baixo peso molecular, entre 5kD e 140kD. Algumas delas são glicoproteínas, normalmente sintetizado na forma de grandes precursores que são clivados para produção da forma ativa.

Desde a descoberta da primeira citocina, os interferons (ISAACS & LINDENMANN, 1957), um considerável número de citocinas e de funções atribuídas a elas têm sido descritas. Atualmente é bem aceito que as citocinas constituem uma ligação entre a injúria celular ou reconhecimento imunológico e os sinais e sintomas da inflamação locais ou sistêmicos (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; CONTI et al., 2004; CUNHA & FERREIRA, 2003; DINARELLO, 2000; HOPKINS, 2003; VERRI et al., 2006). No entanto, a maioria das citocinas apresenta funções biológicas múltiplas incluindo diferenciação celular, sobrevivência, crescimento e metabolismo (AGGARWAL & PURI, 1995; VILCEK, 2003).

As citocinas podem agir em receptores da própria célula produtora (ação autócrina), em receptores de outras células adjacentes (ação parácrina) ou atuar em receptores de células distantes (ação hormonal) por meio da corrente sanguínea (VERRI et al., 2006). Concentrações de citocinas *in vivo* ocorrem em torno de nanogramas até poucos picogramas por mililitro. Em alguns casos somente poucas dúzias de receptores precisam ser ativados por células para desencadear numerosos efeitos em células do sistema imune e sobre a modulação de respostas inflamatórias (SOMMER, KRESS, 2004). A desregulação ou ativação de citocinas está implícita em vários quadros

patológicos como sepse, artrite reumatóide, doença de Crohn's ou esclerose múltipla (SOMMER, KRESS, 2004).

Embora as quimiocinas sejam consideradas citocinas (citocinas quimiotáticas), elas pertencem a um grupo particular de citocinas com propriedades químicas e funcionais diferentes. Elas são usualmente menores que as outras citocinas (8–10 kDa) e em contraste a elas agem em receptores de membrana acoplados a proteínas G. Uma das características mais importantes das quimiocinas é a redundância e a sobreposição funcional. Em outras palavras, existem diversos ligantes (quimiocinas) para cada receptor de quimiocina e múltiplos receptores para cada quimiocina (SOMMER, KRESS, 2004; VERRI et al., 2006).

As citocinas têm sua participação investigada em diversos modelos experimentais, como a dor inflamatória. Em seguida a uma injúria tecidual, uma resposta inflamatória é gerada por macrófagos residentes e amplificada por células sanguíneas migrantes (POOLE, CUNHA, FERREIRA, 1999; SOMMER, KRESS, 2004). Nesse contexto, os vários mediadores inflamatórios atuam sinergicamente para a indução da dor e hipernocicepção. Um substancial corpo de informações sobre o papel das citocinas nesse processo tem sido acumulado através dos últimos anos. A primeira indicação do efeito hipernociceptivo das citocinas vêm de estudos com o uso de injeções de citocinas em ratos. É sabido que as citocinas IL-1 β , TNF- α e a quimiocina KC induzem deflagração de estímulos dolorosos em um processo onde os mediadores finais são prostaglandinas e aminas simpáticas, cuja hierarquia de produção e/ou liberação desses mediadores está descrita a seguir (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005; EASTGATE et al., 1988).

1.4.2 Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou não a uma lesão tecidual (FLÓREZ, 1993). Ela apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial e o componente emocional. O primeiro equivale ao mecanismo neurofisiológico que permite a transmissão e interpretação de um estímulo nocivo (geralmente forte o suficiente para produzir lesão tecidual) através da ativação de receptores, enquanto o segundo corresponde à percepção do estímulo doloroso seguido pela tomada de consciência e reação à dor, e, em decorrência disso, uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso é desencadeada (RAMADABRAN e BANSINATH, 1996).

A parte emocional e psicológica desta definição apresenta grande dificuldade de avaliação em animais, por conseguinte o termo nocicepção é utilizado para definir a produção de estímulo nocivo através de injúria, na qual os receptores aferentes que detectam e sinalizam esse estímulo nocivo são classificados como nociceptores. E como as alterações nos limiares nociceptivos são detectadas comportamentalmente foram criados os termos alodinia (dor decorrente de um estímulo que normalmente não provoca dor) e hiperalgesia (resposta exacerbada a um estímulo doloroso) para a prática experimental. Contudo, em metodologias como o de pressão crescente na pata de camundongos (CUNHA et al., 2004), uma versão eletrônica do método de Von Frey (1896), detecta-se comportamento nociceptivo antes da administração de um estímulo inflamatório. Além disso, diferentes grupos de pesquisa relatam a detecção de limiares nociceptivos previamente à administração do estímulo utilizando o método de von Frey (1896) (RIRIE & EISENACH, 2006; VIVANCOS et al., 2004; ZHUANG et al., 2006).

Em vista disso, pela aplicação do método de von Frey (1896) poderíamos estudar hiperalgesia ou alodinia. Todavia, esse conceito não é compartilhado por todos os pesquisadores da área, e para evitar essas controvérsias o Prof. Sérgio H. Ferreira sugere o uso do termo hipernocicepção em modelos animais para designar as alterações comportamentais induzidas pela sensibilização dos neurônios sensitivos responsáveis pelo reconhecimento

de estímulos dolorosos (nociceptores) (PARADA et al., 2003). Além disso, o uso do termo hipernocicepção evita extrapolações diretas de resultados obtidos com experimentação em animais para a clínica.

Apesar de o termo sugerir uma estrutura especializada, os nociceptores são terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias finas não mielinizadas, denominadas fibras C, com baixa capacidade de condução (0,5 – 2 m/s) ou mielinizadas, as fibras A δ , que conduzem o impulso nervoso com maior velocidade (10 – 30 m/s), havendo ainda as fibras A β que também são mielinizadas e de grande diâmetro, capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso em resposta a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes dorsais, faz sinapses com neurônios secundários do corno medular dorsal, onde os neurotransmissores são sintetizados e liberados (BESSON et al., 1999; MILLAN, 2002). Por sua vez, esses últimos dão origem às vias ascendentes da dor responsáveis pela transmissão do impulso às estruturas centrais supra-espinhais (MILLAN, 1999).

Desse modo a dor pode originar-se de fibras aferentes mielinizadas e/ou não mielinizadas que apresentam terminações sensoriais finas que se ramificam nos tecidos periféricos e são ativados por vários estímulos (mecânico, térmico e químico). As fibras aferentes primárias C de pequeno calibre e não mielinizadas e as fibras A δ de médio calibre e mielinizadas são responsáveis por enviar esses estímulos nocivos a partir dos tecidos injuriados, transportando informações nociceptivas, principalmente pelas lâminas superficiais (I e II), profundas (V e VI) e também pela lâmina X do corno dorsal da medula. As fibras A β de grande calibre, mielinizadas e de condução rápida transmitem informações relacionadas a estímulos mecânicos inócuos para lâminas mais profundas (III - VI) (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002).

Classicamente, a transmissão da dor se faz por uma via bem estudada e conhecida. Os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II da medula espinha. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde

existe o componente emocional da dor (RUSSO & BROSE, 1998). A transmissão da dor descrita acima representa a sua via clássica, mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (BESSION, 1999; JABBUR & SAADÉ, 1999).

Precede a transmissão de um impulso doloroso à detecção de estímulos nocivos, e a habilidade de detectar estímulos potencialmente destrutivos ou nocivos (nociceptivos) pelo sistema somatosensorial é um mecanismo de proteção muito importante que envolve a interação de vários mecanismos periféricos e centrais. A detecção de estímulos nocivos culmina com a ativação dos nociceptores e com a transmissão da informação nociceptiva ao sistema nervoso central, sendo que os aferentes nociceptivos são amplamente distribuídos pelo corpo, presentes em pele, músculos, articulações, vísceras e meninges (COUSINS & COHEN, 2005). Dessa forma, a nocicepção corresponde a um processo neural que envolve vários mediadores e neurotransmissores, em que a qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinados por muitos fatores na região periférica injuriada, na medula espinal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (DICKENSON, 1995; SANTOS, 2000; RUSSO & BROSE, 1998).

Há várias fontes importantes em que são produzidos mediadores químicos participantes da perpetuação da resposta dolorosa, dentre as quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, células imunes, sistema vascular, nervos simpáticos e sensoriais. Ademais, existem mecanismos complexos nos quais um transmissor pode agir, via múltiplos receptores amplamente distribuídos nos tecidos periféricos e centrais (DICKENSON, 1995; SANTOS, 2000). Diferentes estímulos inflamatórios (produtos bacterianos, fúngicos, reações antígenoanticorpo entre outros) induzem a liberação de mediadores pró-inflamatórios por células residentes resultando na sensibilização dos nociceptores ou sua ativação direta dependendo da intensidade do estímulo (FLÓREZ, 1993). Dentre os mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório, talvez os que tenham sido mais extensivamente estudados na nocicepção inflamatória são os metabólitos da ciclooxigenase (principalmente prostaglandina E₂ e prostaciclina; PGE₂ e PGI₂, respectivamente) e as aminas

simpáticas, que interagem com os seus respectivos receptores acoplados a proteínas G.

A liberação desses mediadores durante a resposta inflamatória foi demonstrada após estímulos como a carragenina (Cg) e o LPS. Essas substâncias induzem a liberação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela liberação/produção dos mediadores finais prostaglandinas e aminas simpáticas. Assim, quando administradas por via intraplantar, a Cg induz produção de bradicinina, que estimula a liberação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). O TNF- α induz a produção de interleucina-1 β (IL-1 β), os quais estimulam a formação de produtos da ciclooxigenase através da indução enzimática da ciclooxigenase-2 (COX-2) resultando principalmente na produção de PGE₂ (TNF- α \rightarrow IL-1 β \rightarrow PGE₂). O TNF- α também é capaz de induzir a liberação de quimiocinas (ex: KC), as quais estimulam a liberação/produção de aminas simpáticas (TNF- α \rightarrow quimiocinas \rightarrow aminas simpáticas) (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1988; FERREIRA et al., 1993a; FERREIRA et al., 1993b; LORENZETTI et al., 2002).

Reforçando os dados apresentados acima obtidos utilizando-se experimentação em ratos, foi demonstrado que em camundongos existe uma diferença importante na hierarquia de liberação entre as citocinas. Porém, o conceito de uma cascata de citocinas permanece. Dessa maneira, demonstrou-se que em camundongos, não só o TNF- α , mas também o KC (quimiocina derivada de queratinócitos) são as primeiras citocinas a serem liberadas pela Cg e são então sucedidas pela IL-1 β , que estimula a produção de PGE₂. Porém, diferentemente do TNF- α , o KC também age via liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al., 2005). Nesse contexto, a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum da dor inflamatória.

Em suma, existem dois grupos de mediadores hipernociceptivos que agem diretamente sobre os nociceptores: eicosanóides e aminas simpáticas, os quais podem ser induzidos por três vias dependentes da liberação de citocinas. As três vias são: (i) carragenina \rightarrow TNF- α \rightarrow IL-1 β \rightarrow prostaglandinas (que sensibilizam o nociceptor), (ii) carragenina \rightarrow TNF- α \rightarrow KC \rightarrow IL-1 β \rightarrow prostaglandinas (que sensibilizam o nociceptor) e (iii) carragenina \rightarrow TNF- α \rightarrow

KC → aminas simpáticas que também sensibilizam o nociceptor (CUNHA et al., 2004).

1.4.3 Migração Leucocitária

Os sinais cardeais descritos no início da era cristã por Cornélius Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) – calor, rubor, tumor e dor - integram uma resposta tecidual às agressões de diversas naturezas (por exemplo: infecções microbianas, queimaduras, radiações, traumatismos mecânicos, toxinas, isquemia, interações antígeno-anticorpo, substâncias cáusticas, e presença de tecido necrótico), visando a destruir, diluir ou imobilizar o agente injuriante e a limitar sua disseminação. Assim, lesões teciduais ou substâncias potencialmente injuriantes fazem com que sejam liberados mediadores químicos que provocam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos, o que permite um maior afluxo de sangue para a área agredida, bem como a exsudação de líquido, proteínas e células de defesa para o espaço intersticial. Com a exsudação líquida, que resulta no edema inflamatório, o sangue torna-se gradativamente mais viscoso, pelo aumento da concentração de hemáceas, e a corrente circulatória dos pequenos vasos torna-se cada vez mais vagarosa, culminado com a estase sangüínea (pequenos vasos dilatados e repletos de hemáceas). Ao mesmo tempo, ocorre a migração dos leucócitos através da parede vascular para o espaço intersticial (diapedese, transmigração ou emigração leucocitária). Esses fenômenos, denominados fenômenos vasculares-exsudativos, são eventos inespecíficos e constituem a fase inicial (aguda) de qualquer resposta inflamatória (ROCHA & SILVA, 1978; SEDGWICK et al., 1985).

Os mediadores envolvidos na gênese da dor inflamatória podem, também, ter papel essencial em outros eventos inflamatórios, incluindo edema e migração leucocitária. Por exemplo, prostaglandinas podem ser crucial para a formação de edema, e citocinas podem ser relevantes para o recrutamento leucocitário em diversos modelos de inflamação (CUNHA et al., 1992; FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1988; GRANSTEIN et al., 1986; MONCADA, et al., 1973; WANKOWICZ et al., 1988; WHITE et al., 2005), enquanto também tem sido demonstrado que a migração leucocitária pode ser

essencial para a formação de exudato e indução de dor através de certos estímulos inflamatórios (ISSEKUTZ, 1984; LEVINE et al., 1984; WEDMORE & WILLIAMS, 1981).

No entanto existem evidências de que esses eventos possam ocorrer de maneira independente, por exemplo anti-inflamatórios não-esteroidais não interferem com a migração leucocitária, embora possam inibir a formação de edema e dor (BOMBINI et al., 2004; CANETTI et al., 2001; FERREIRA, 1972; FORD-HUTCHINSON et al., 1984; LUKKARINEN et al., 2006; MONCADA, et al., 1973). Analgésicos periféricos, como dipirona, reduzem a dor inflamatória sem afetar a formação de edema e a migração leucocitária (LORENZETTI & FERREIRA, 1985).

O recrutamento leucocitário para o local de injúria celular é uma das etapas essenciais da defesa do organismo contra um agente agressor. Não obstante haver diferenças no tipo e cinéticas de leucócitos conforme o agente injuriante, nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios como em respostas contra bactérias, o leucócito predominante é o neutrófilo, permanecendo em geral 12-24 horas no local da injúria. Após esse período, o neutrófilo inicia um processo de morte programada (apoptose), sendo em seguida fagocitado por macrófagos. A partir da décima hora surgem progressivamente os eosinófilos, macrófagos e linfócitos, permanecendo por cerca de uma semana no local, isto se o agente agressor for removido, caso contrário, ocorre a cronificação do processo (GALLIN & SNYDERMAN, 1999; INSEL, 1996).

1.4.4 Cromatografia e CLAE

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor. Apesar deste estudo e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos por comparação com padrões, para a purificação de compostos ao separar as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1993).

A Cromatografia, então, é uma técnica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura, na qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido, ou um líquido distribuído sobre um suporte sólido com grande área superficial. Enquanto a fase móvel, que pode ser gasosa ou líquida, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. Dessa maneira, a separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária.

Há três tipos de cromatografia que merecem ênfase: cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Focando em CLAE, tal tipo de cromatografia recebeu esse nome justamente pelo fato de a fase móvel usada em sua aplicação ser um líquido (ANDRADE et al., 1995; COLLINS, BRAGA, BONATO, 1993)

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade. As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado. As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna.

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação. O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros. A figura 5 mostra um equipamento típico de CLAE.

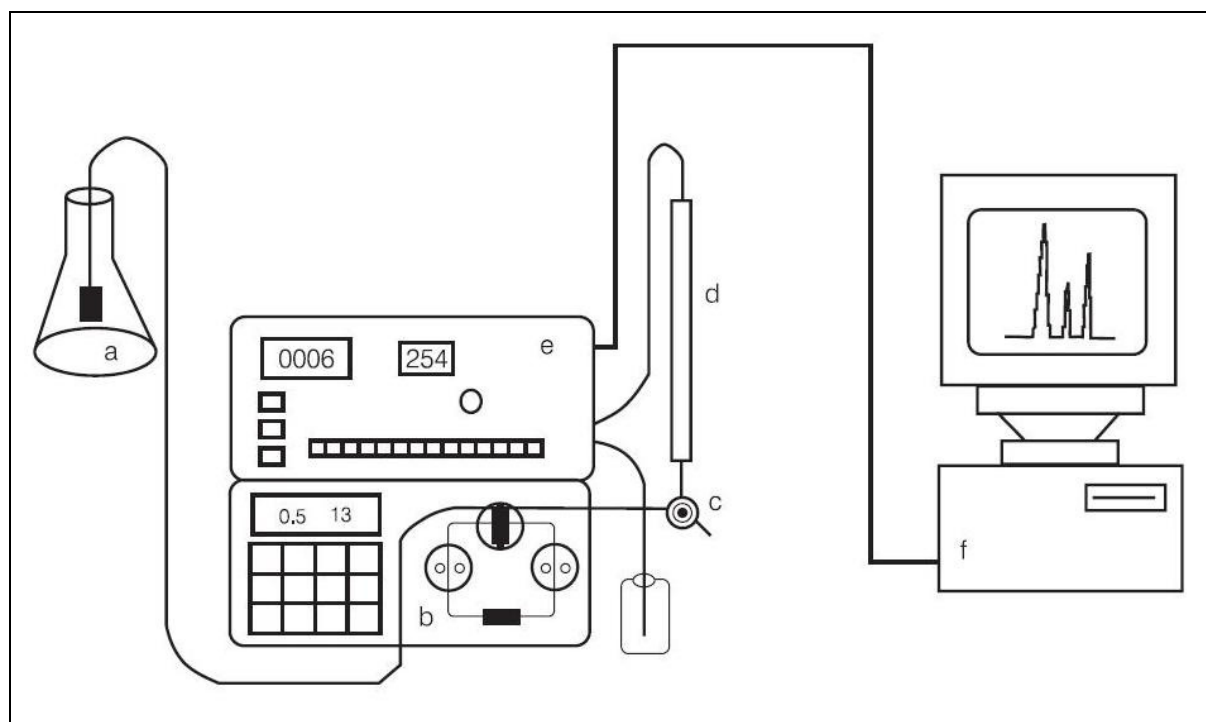


Figura 5: Esquema de um equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna de separação cromatográfica; e) detector UV e f) registrador.

A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações. As separações em CLAE podem se dar por adsorção, partição ou ambos. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. O uso de fases estacionárias líquidas adsorvidas a um suporte não tem grande aplicação devido à perda de fase estacionária, mas o uso de suportes modificados, os quais foram desenvolvidos como consequência do problema acima, possibilita a produção de uma imensa variedade de colunas com diferentes propriedades e tipos de seletividade. As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases que atuam no modo normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1993).

Propriedades como massa molecular, solubilidade, estrutura e pKa devem ser consideradas no processo de pesquisa e escolha da melhor condição cromatográfica, com o objetivo de separar componentes de uma determinada amostra. Em relação à fase móvel, é fundamental que seja de alto grau de pureza ou, ao menos, de fácil purificação, porque impurezas podem interferir com a detecção dos componentes da amostra. Além disso, ela deve dissolver a amostra sem decompor seus componentes, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade, ser compatível com o tipo de detector utilizado, ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (GUIMARÃES, 1997).

Assim, a quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido adotada para diversas análises por ser uma metodologia bastante versátil e prática, uma vez que pode ser totalmente automatizada. Ela

tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES et al., 1997). Um exemplo de aplicação constantemente reportado na literatura para a cromatografia líquida de alta eficiência é a separação e quantificação de analitos presentes em amostras de plasma (BOMPADRE et al., 2008; PARONI et al., 2009; POZHARITSKAYA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008; QUEIROZ et al., 2003; QUEIROZ et al., 1995; SOYINKA, ONYEJI, OMORUYI, 2008).

1.4.5 Validação de Metodologia Analítica

Vários autores definem validação de métodos, e pode-se dizer que os conceitos estão constantemente evoluindo sob a supervisão das agências reguladoras. Por exemplo, para o Eurachem Working Group a validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho condizente com o que a aplicação requer (EURACHEM, 1998), enquanto para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) a validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros.

A validação deve garantir, então, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade (ou limite de detecção), limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003). Nesse sentido, é preciso utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, é admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003).

Em todos os tipos de métodos analíticos validados, há requerimentos de pré-validação que precisam estar em conformidade antes de se iniciar a validação do método. Assim, para assegurar uma boa validação e,

conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados, são de suma importância a qualificação analítica do equipamento, a estabilidade das soluções e amostras, e a conformidade do sistema (LEITE, 2002; RIBANI et al., 2004).

A qualificação analítica do equipamento envolve a adequação do equipamento frente aos resultados esperados, e para isso o equipamento deve estar não só em boa manutenção, mas, principalmente, calibrado. Para gerar resultados reprodutíveis e seguros as estabilidades das amostras, dos padrões, dos reagentes e das fases móveis precisam ser avaliadas antes do início da validação do método. Para o bom desenvolvimento de um procedimento de validação de um determinado método analítico é preciso assegurar que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Esta é a etapa inicial a ser estabelecida, e é obtida para os métodos cromatográficos a partir de testes experimentais de conformidade do sistema (system suitability) que inclui avaliação de parâmetros como fator de retenção ou capacidade (k), fator de separação ou seletividade (α), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator de cauda ou assimetria (A_s) (HEARN, 1992).

Além disso, a análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica, como a detecção e quantificação de adenosina em plasma de camundongos, deve ser concluída dentro do período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada. Ainda, no uso rotineiro do método analítico validado a precisão e exatidão devem ser monitoradas regularmente para assegurar a continuidade do desempenho satisfatório (ANVISA, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar se a administração em camundongos de D-Frutose-1,6-difosfato promove produção endógena de adenosina aferindo-a no plasma. Ainda, avaliar se tal fato estaria relacionado a prováveis efeitos antiinflamatórios da F1,6BP.

2.2 Objetivos Específicos

Um objetivo desse estudo foi avaliar possíveis atividades farmacológicas da F1,6BP sobre alguns eventos da resposta inflamatória, averiguando sua via de ação. Para isso, investigou-se a participação das citocinas inflamatórias TNF- α , IL1- β e KC no efeito da F1,6BP, aferindo não só a ação da F1,6BP sobre a atividade hipernociceptiva desses mediadores e dos respectivos mediadores finais da cascata hipernociceptiva prostaglandina E₂ e dopamina, como também através da quantificação dessas citocinas realizadas pelo método de ELISA.

Outro parâmetro inflamatório mensurado foi a migração leucocitária para o tecido subcutâneo plantar, realizado com aplicação do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Além disso, almejou-se associar um possível envolvimento do nucleosídeo purínico adenosina no mecanismo de ação da F1,6BP. E para isso um adequado antagonista de receptor de adenosina foi administrado com o intuito de reverter a atividade da F1,6BP para indicar farmacologicamente esse envolvimento. Para corroborar tais resultados aferiu-se a concentração plasmática de adenosina em animais tratados com F1,6BP ou adenosina, bem como a dos animais que receberam tratamento com veículo. E em virtude disso foi preciso validar metodologia analítica com o uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo as normas vigentes protocoladas pela ANVISA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Animais

Os experimentos foram realizados com o uso de camundongos Swiss SPF (espécie livre de patógenos) machos adultos pesando aproximadamente 25g, adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade de São Paulo – campus Ribeirão Preto.

Os animais foram alojados em caixa (n=20) de polipropileno medindo 50 x 35 x 15 cm no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) em salas com ciclo de 12 horas de claro - escuro, temperatura ambiente constante (22^o C a 24^o C) mantida por meio de aparelho de ar condicionado e com água e comida ofertadas “ad libitum” durante todo procedimento experimental. Todos os procedimentos descritos para o manejo, uso e acondicionamento dos animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, tendo sido avalizado em reunião na CEUA de 10.08.07.

3.1.2 Vias de Administração

Para a realização dos experimentos foram usadas três vias de administração: intraperitoneal (i.p.), subcutânea (s.c.) e intraplantar (i.pl.). Com relação a via intraperitoneal , após adequada imobilização com o animal contido pelo dorso e a cabeça sutilmente mais baixa em relação ao abdome voltado para cima, a agulha é disposta na região da metade caudal do abdome paralelamente à linha da pata, e introduzida na parede abdominal para atingir a cavidade peritoneal, na qual o fármaco pode ser administrado em 0,2 mL. A agulha, quando introduzida perpendicularmente à linha da pata, proporciona injeção segura em área que evita a bexiga urinária no abdômen posterior e o

fígado no anterior. Não obstante existir perigo de injeção dentro do trato gastrointestinal, isto é uma complicação rara.

Para a via subcutânea, os animais são contidos pelo dorso com o abdome voltado para baixo, e a agulha é introduzida sob a pele da região posterior, geralmente na região dorsal do pescoço. Sugere-se que a região de injeção seja massageada após o procedimento e que toda a agulha seja introduzida para evitar vazamento do volume de injeção, o qual também foi 0,2 mL.

A administração intraplantar é realizada após o acondicionamento adequado do animal em um suporte específico em forma de V, onde o animal acomoda-se com o ventre para baixo e com uma pata traseira estendida para injeção intraplantar de um volume de 25µL. Assim como as outras injeções, a injeção intraplantar também requer assepsia local com álcool 70 °GL para evitar contaminações que eventualmente possam interferir com a resposta experimental.

3.1.3 Fármacos e Regime de Dosagem

Fármacos

Os seguintes fármacos foram obtidos a partir das fontes indicadas:

- Adenosina - Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- Carragenina (Cg) - FMC Corporation (Philadelphia, PA, USA).
- Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina Agener) - União Química Farmacêutica Nacional S/A (Embu-Guaçu, SP, Brasil)
- Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser) – Laboratórios Calier (Barcelona, Espanha)
- D-Frutose-1,6-Difosfato (F1,6BP) - Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- Dopamina - Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- DPCPX (1,3-di-propil-8-ciclopentilxantina) - Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- IL-1β murino recombinante - Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológico (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK).
- KC murino recombinante - PeproTech INC. (Rocky Hill, NJ, USA).

- Prostaglandina E₂ (PGE₂) – Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- TNF- α murino recombinante - Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológico (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK).

Regime de Dosagem

As substâncias foram administradas nos animais sob regime de dosagem única (em alguns casos com associação de fármacos) com dose e tempo de pré-tratamento determinados experimentalmente. Para cada grupo experimental houve o respectivo controle, no qual o veículo do fármaco é administrado junto aos demais tratamentos para eliminar a hipótese de o veículo estar desempenhando ou interferindo atividade farmacológica.

As substâncias testadas ou fármacos utilizados foram preparados e administrados da seguinte forma:

- *F1,6BP* – diluída em salina e administrada por injeção intraperitoneal na dose de 300 mg/Kg. O volume de injeção foi de 200 μ L e o tempo de pré-tratamento de 15 minutos com relação ao desafio.
- *Adenosina* - diluída em salina e administrada por injeção intraperitoneal na dose de 100 mg/Kg. O volume de injeção foi de 200 μ L e o tempo de pré-tratamento de 15 minutos com relação ao desafio.
- *DPCPX* – solubilizado a 0,5% de tween 80 em salina, esse antagonista foi aplicado com um pré tratamento de 30 minutos com relação ao estímulo, isto é, 15 minutos antes da administração de F1,6BP ou adenosina. Para esse composto houve duas vias de administração: sistêmica e local. A administração sistêmica foi realizada pela via subcutânea nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg com volume de injeção de 200 μ L. Enquanto a administração local fora feita por injeção intraplantar nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 μ g/pata com volume de injeção de 25 μ L.

Estímulos para indução de hipernocicepção foram preparados e administrados da seguinte forma:

- *Carragenina* – estímulo inflamatório diluído em salina e administrado por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 100 μ g/pata.
- *TNF- α* – citocina pró-inflamatória diluída em salina e administrado por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 100pg/pata.
- *IL1- β* - citocina pró-inflamatória diluída em salina e administrado por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 1ng/pata.
- *KC* – quimiocina diluída em salina e administrado por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 40ng/pata.
- *Prostaglandina E₂* – estímulo nociceptivo diluído em salina e administrado por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 30ng/pata.
- *Dopamina* – amina simpática diluída em salina e administrada por injeção intraplantar com volume de injeção de 25 μ L na dose de 10 μ g/pata.

3.2 Métodos

3.2.1 Modelos Experimentais

3.2.1.1 Atividade anti-hipernociceptiva

O termo nocicepção é utilizado para definir a produção de estímulo nocivo através de injúria, na qual os receptores aferentes que detectam e sinalizam esse estímulo nocivo são classificados como nociceptores. Assim o termo antinociceptivo refere-se à capacidade que certas substâncias possuem de impedir que os nociceptores sejam ativados e/ou impedir que esse estímulo seja conduzido na fibra nervosa.

A atividade anti-hipernociceptiva foi avaliada no teste de pressão crescente em pata de camundongos com o uso do filamento de Von Frey conforme descrito por Cunha et al. (2004). O termo hipernocicepção é usado para notificar a diminuição do ponto inicial de retirada aferido por um transdutor de força aplicada na pata do animal (electronic anesthesiometer; IITC Life Science, Woodland Hills, CA) registrando o momento do reflexo de retirada característico (PARADA et al., 2003; VERRI et al., 2006a). O valor adotado como resultado é a média de três aferições, sendo os animais desafiados antes e após o tratamento. Os resultados são expressos por delta (Δ) de ponto inicial de retirada (em gramas) calculado pela subtração do tempo zero das medidas aferidas 3h após a administração de estímulos.

Desse modo, foi possível avaliar a atividade da F1,6BP sobre a hipernocicepção induzida por outros estímulos nociceptivos como a Cg, as citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β , a quimiocina KC, e os mediadores finais da cascata hipernociceptiva prostaglandina E₂ e dopamina. Além disso, avaliar a atividade anti-hipernociceptiva da adenosina sobre os estímulos Cg, prostaglandina E₂ e dopamina. Ainda, através desse modelo foi possível reverter a atividade anti-hipernociceptiva da adenosina e da F1,6BP com a aplicação do antagonista de receptores A1 de adenosina DPCPX.

3.2.1.2 Migração leucocitária

Substâncias potencialmente injuriantes ou lesões teciduais ou fazem com que sejam liberados mediadores químicos que provocam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que permite um maior afluxo de sangue para a área agredida, bem como a exsudação de líquido, proteínas e células de defesa para o espaço intersticial. Assim, outro parâmetro inflamatório avaliado foi a migração celular.

A avaliação do recrutamento leucocitário foi realizado por meio da quantificação colorimétrica-cinética de mieloperoxidase (MPO), a qual permite calcular a quantidade de leucócitos que migraram para o tecido subcutâneo plantar nas patas traseiras de camundongos (COLLIER et al., 1968). Nesse experimento as amostras do tecido subcutâneo plantar são removidas 3h após a administração intraplantar do estímulo inflamatório, acondicionadas em tampão fosfato de potássio 50 mM com HTAB (Brometo de hexadecil trimetilamônio, 13,72 mM, pH 6.0) na concentração de 50 mg de tecido/mL, e homogeneizadas com auxílio do Polytron (PT3100) seguida de centrifugação (2 min, 16100 g, 4°C). O sobrenadante é, então, separado e pode ser congelado para que a leitura possa ser feita em outra ocasião.

Nessa amostra a dosagem é realizada através de uma reação colorimétrica cinética, na qual em uma placa de 96 poços é adicionada uma alíquota do sobrenadante e posteriormente é adicionado 200 µL da solução de reação (52,64 mM de dihidroclorato de O-dianisidina, 0,05% de H₂O₂ 30%, 90mL de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6.0 e 10 mL de H₂O destilada). Nessa placa também é feita uma curva padrão por meio de diluições de uma solução de neutrófilos de concentração conhecida, através da qual se infere a quantidade de células nos poços das amostras. Para esse fim o aparelho é programado para realizar 3 leituras em intervalos de 30 segundos em 450 nm (Aparelho Spectra MAX 250), (BRADLEY et al., 1982).

3.2.1.3 Quantificação de Citocinas

As citocinas são liberadas em uma controlada seqüência a partir de vários tipos celulares e são responsáveis pela produção dos mediadores finais envolvidos na indução dos sinais e sintomas inflamatórios (VERRI et al., 2006). Então, outro parâmetro inflamatório também avaliado foi a realização da quantificação das citocinas participantes da cascata hipernociceptiva em camundongos, por ensaio imuno-enzimático (ELISA, CUNHA et al., 2005).

Para isso, 3h após a injeção intraplantar de carragenina (Cg, 100 µg) os animais foram terminantemente anestesiados e em seguida o tecido plantar foi removido e homogeneizado em 500 µL de tampão apropriado contendo inibidores de proteases. As citocinas TNF- α , IL-1 β e KC foram quantificadas por ELISA conforme descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). Resumidamente, placas de microtitulação foram recobertas e incubadas com os respectivos anticorpos diluídos em PBS durante 15 - 18h a 4°C. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS + 0,1% de Tween 20 e bloqueadas durante 1h à temperatura ambiente com BSA 1%. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por um período de 12h à 4°C com as amostras e suas respectivas curvas padrão.

Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e incubadas com o respectivo anticorpo por 1h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de avidina-HRP foi adicionado a cada poço, e novamente incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas, e adicionados 50 µL do substrato dihidroclorato de 1,2 fenilenodiamina diluído em tampão fosfato contendo 0,4 µg/mL de H₂O₂ 30%. Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490nm.

3.2.1.4 Efeitos Sedativo e Relaxante Muscular

Para avaliação de possíveis efeitos sedativo e relaxante muscular após administração de F1,6BP foi realizada a monitoração da performance motora dos animais por meio do Teste Rota Rod da forma descrita por ROSLAND; HUNSKAAR e HOLE (1990).

Além de fornecer mais informações sobre os efeitos da administração sistêmica de F1,6BP e adenosina, esse teste é de grande importância para confirmar que qualquer atividade de restauração do limiar nociceptivo seja resultado da ação da substância administrada, e não decorrente de uma suposta alteração comportamental derivada de efeito sedativo ou relaxante muscular que levariam a um registro errôneo no processo de obtenção de resultados com o filamento de Von Frey.

Nesse teste, o aparelho consiste em uma barra de 2.5 cm de diâmetro, subdividida em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro (Ugo Basile, Model 7600) a qual gira a uma constante rotação de 22 voltas por minuto, sendo que os animais devem permanecer nela durante 180 segundos. Nesse experimento os animais utilizados foram submetidos a treinamento no aparelho 24h antes do teste, sendo eliminados aqueles que não conseguiram permanecer por dois períodos consecutivos de 180s. Assim, os animais receberam administração de F1,6BP ou adenosina e, então, foram submetidos ao teste 15 minutos, 1 hora e 3 horas após o tratamento.

O resultado será apresentado em forma gráfica de maneira a evidenciar os possíveis efeitos relaxante muscular e/ou sedativo analisados. A conclusão experimental será obtida através da constatação de uma redução estatística ou de nenhum efeito observado no tempo de queda dos animais tratados com fármaco com relação ao respectivo grupo controle, o qual recebeu administração intraperitoneal de veículo (salina) apenas.

3.2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica

3.2.2.1 Soluções Padrões e Reagentes

As soluções de adenosina foram preparadas em metanol grau cromatografia (J.T. Baker[®] HPLC, Mallinckrodt Baker, Inc., EUA). As soluções-estoque de adenosina foram preparadas na concentração de 0,4 mg/mL, diluídas em metanol para obter as concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 2 e 4 µg/mL em plasma e estocadas a -20 °C. O procedimento requisitou a preparação de solução-estoque do padrão interno teofilina (Sigma) na concentração de 40 µg/mL em metanol.

As soluções da curva e amostras foram tratadas com acetonitrila grau cromatografia (J.T. Baker[®] HPLC, Mallinckrodt Baker, Inc., EUA) para precipitação protéica. O tampão acetato 0,25 mol L⁻¹ foi preparado diluindo uma mistura prévia de acetato de sódio 0,75 M e ácido acético 0,75 M grau p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os solventes usados na preparação da amostra e da fase móvel foram de grau cromatografia (Merck, Darmstadt, Alemanha), enquanto a água usada para preparação do tampão foi obtida por meio do sistema de purificação Milli-Q. A fase móvel foi filtrada em membranas de 0,45 µm (Millipore[®]) degaseificada em ultra-som T 50 (Thornton-Inpec Eletrônica LTDA., Brasil) e bomba a vácuo (Marconi, Art. Lab., Brasil) acoplado em sistema de filtração Ultra-Ware (Millipore[®]). O pH da fase móvel foi ajustado para 6,5 no pHmetro VWR Scientific modelo 8005 (ATI Orion Research, EUA).

3.2.2.2 Análise Cromatográfica

Para quantificação de adenosina plasmática foi utilizado um equipamento para cromatografia a líquido Shimadzu - modelo LC-10AS equipado com injetor "Rheodyne" modelo 7125, amostrador de 20µL, detector de absorvância no ultravioleta visível (UV-VIS) (Shimadzu modelo SPD-10A) operando em 313nm utilizando uma coluna de fase reversa (RP-18,

Supersher® - Merck - 125 x 4 mm, partículas de 3 µm) com pré-coluna recheada com o mesmo material. Os cromatogramas da técnica serão obtidos com a aplicação do integrador *Shimadzu-C-R6A chromatopac*.

3.2.2.3 Validação da Metodologia Analítica

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Uma questão de suma importância no delineamento das etapas a comporem o procedimento de validação de um método analítico está justamente no estabelecimento dessas etapas. A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico.

Precisamente, a técnica desenvolvida inicia com a correta anestesia dos animais através da combinação anestésica Cetamina – xilazina (50% Cloridrato de cetamina a 10% + 50% Cloridrato de xilazina a 2%, v/v) administrada na dose de 10µL de solução para cada 10g de animal, para a colheita de material. Devido à necessidade de uma quantidade relativamente grande de sangue, a colheita por meio de punção cardíaca revelou-se pertinente por ser uma técnica eficaz e confiável para essa finalidade.

Nesse processo, o sangue recolhido em seringas de 1 mL previamente heparinizadas é transferido para tubos de vidro acondicionados em gelo. Cada tubo recebe sangue colhido de 3 animais e é rapidamente levado à centrífuga para separação do plasma com centrifugação das amostras a 3000 rpm durante 15 minutos. As amostras de plasma são, então, separadas dos elementos figurados, transferidas individualmente a outros tubos e conservadas em gelo até próxima etapa da metodologia analítica em questão. Nessa etapa podem ser adicionados (quando necessários) os padrões de adenosina e teofilina (padrão interno). Assim, o plasma separado passa por um processo de precipitação protéica no qual se adiciona 1mL de acetonitrila para cada 0,5 mL de plasma com agitação de 2 minutos em agitador de tubos. Em seguida os tubos são centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos e os sobrenadantes são

transferidos individualmente a outros tubos. Após essa etapa, o sobrenadante é levado à secagem, podendo, nesse estágio, ser acondicionado em freezer - 20 °C para posterior análise.

Em seguida o solvente é evaporado sob fluxo de ar, e a amostra seca é re-suspendida em 100µL de fase móvel. A essa solução é adicionado 100 µL de hexano e, então, a amostra é submetida a agitação (30s) e centrifugação (5 minutos, 3000 rpm). O hexano adicionado atua na remoção de proteínas que não se precipitaram no estágio anterior, tornando o cromatograma mais “limpo”, isto é, com menos picos desprazíveis. Assim, o tubo apresentará duas fases: uma hidrofóbica (hexano + proteínas) localizada acima da porção hidrofílica (fase móvel + analíto) apta à injeção no aparelho de CLAE.

A validação de métodos analíticos constitui um procedimento fundamental para verificar se o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido e para garantir a confiabilidade dos resultados produzidos. A validação desenvolvida para esse trabalho foi realizada em concordância com as normas protocoladas pela ANVISA em seu Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos segundo a Resolução RE número 889 de 29 de maio de 2003. Por conseguinte, parâmetros analíticos específicos foram determinados com relação à curva de calibração, recuperação, linearidade, precisão e exatidão, limites de quantificação e detecção, especificidade e estabilidade.

3.2.2.3.1 Curva de calibração

A curva de calibração define, adequadamente, a relação que existe entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo 5 pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI et al., 2004). Assim, a construção dessa curva será feita mediante a análise cromatográfica de 5 a 8 amostras submetidas ao método de extração avaliado. As concentrações dos padrões devem ser escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo a ser realizado.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando-se o método matemático conhecido por regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Esse parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, logo o coeficiente de correlação igual a 1.0 indica perfeita correlação entre x e y . Por conseguinte, após a obtenção daquele conjunto de pontos experimentais foram calculadas as equações de regressão linear ($y = ax + b$) e os coeficientes de determinação (r^2).

3.2.2.3.2 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores para a extensão da recuperação de um analito, inclusive na ordem de 50 – 60%, desde que a recuperação seja precisa, exata e reprodutível (CHASIN et al., 1998; SWARTZ, KRULL, 1998; LANÇAS, 2004).

A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações altas, médias e baixas, com outras não extraídas representando 100% de recuperação (CAUSON, 1997). Para os cálculos da recuperação absoluta será necessário corrigir o volume de solvente recuperado para o volume de solvente adicionado. Na recuperação absoluta, o padrão interno, quando usado, é adicionado à fase orgânica após o procedimento de extração.

As amostras de plasma contendo concentrações adequadas de adenosina foram analisadas em duplicatas após a realização da precipitação protéica nas mesmas. A porcentagem de recuperação será calculada dividindo-

se a resposta da curva extraída pela resposta da curva não extraída (curva seca) e multiplicando este valor por 100.

3.2.2.3.3 Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa (SWARTZ; KRULL, 1998; SWARTZ, KRULL, 1998; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996). Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação de primeira ordem, ou seja, linear, é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) da substância nas amostras, podendo ser descrita pela equação de regressão linear: $y = a x + b$, onde a é a inclinação da reta e b é a intersecção da curva no eixo y (PENG; CHIOU, 1990).

Segundo as normas do Center for Drug Evaluation and Research (FDA, 1998) aceita-se valores de r^2 maiores que 0,95, contudo em nossos ensaios foram consideradas lineares, curvas com r^2 maior que 0,98 (CHASIN et al., 1998).

3.2.2.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996). A precisão pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade (LANÇAS, 2004). Condições de repetibilidade são aquelas em que resultados independentes são obtidos usando-se: o mesmo equipamento, com mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, em curto intervalo de tempo. Condições de reprodutibilidade são aquelas em que os resultados são obtidos usando-se: o mesmo

equipamento, com o mesmo método, para a mesma amostra, em diferentes laboratórios, por diferentes operadores. Assim, a precisão de um método analítico é a medida do erro randômico e pode ser definida como a concordância entre o resultado das replicatas de uma mesma amostra, sendo expressa em porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas (CAUSON, 1997).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como verdadeiro ou referência (SWARTZ; KRULL, 1998), sendo melhor expressa como porcentagem de erro sistemático. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e esse valor é indeterminado por natureza (LANÇAS, 2004). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Esses limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição-padrão.

Desse modo, as concentrações de adenosina plasmática nas amostras analisadas serão determinadas empregando-se curvas de calibração preparadas diariamente, nas quais amostras de plasma de animais não tratados serão adicionadas de quantidades previamente determinadas de adenosina e padrão interno (teofilina). O valor numérico usado para quantificar a precisão é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo:

$$CV = [S / K] \times 100$$

Onde, S = desvio padrão e K = valor médio da relação [altura padrão/ altura padrão interno/ concentração do padrão].

3.2.2.3.5 Limites de quantificação e detecção

O limite inferior de quantificação ou simplesmente limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando-se um determinado procedimento

experimental (SWARTZ; KRULL, 1998; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL. REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996). Para o LQ ser aceito, ele deve apresentar precisão e exatidão de até 20%, e deve ser pelo menos cinco vezes maior que algum interferente com mesmo tempo de retenção presente na amostra branca. Segundo POMMIER, SIOUFI, GODBILLON (1997), o limite de quantificação é considerado como a menor concentração que forneceu precisão e exatidão com erro menor que 20%.

O limite superior de quantificação (LSQ) é a concentração máxima de um analito presente em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Geralmente, o limite superior de quantificação é o maior ponto da curva de calibração (PETERS, MAURER, 2002; SHAH et al., 2000).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se de um determinado método analítico. O LD pode ser calculado de três maneiras: pelo método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL. REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996).

O método visual é útil para determinar o LD utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Esse procedimento também pode ser feito por meio do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

O método da relação sinal-ruído é aplicado apenas em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. E para determinar essa relação é feita comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) dessas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada. As relações sinal-ruído de 3:1 ou 2:1 são geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

Ainda, o LD pode ser determinado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. Nesse processo o LD é expresso como:

$$LD = 3,3s / S$$

Onde, s = a estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação; S = a inclinação (slope) ou coeficiente angular da curva analítica.

Para calcular esses dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz que contém o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

3.2.2.3.6 Especificidade

A especificidade pode ser definida como a habilidade de o método distinguir o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra. Isto pode ser estabelecido pela comparação do tempo de retenção cromatográfico do analito com outras substâncias. Se houver algum interferente na amostra, ele deve ser 1/5 do limite de quantificação (CAUSON, 1997). Havendo coincidência nos tempos de retenção, o interferente é submetido ao procedimento de extração e então re-analisado.

3.2.2.3.7 Estabilidade

A avaliação da estabilidade das soluções utilizadas no método analítico é de suma importância, já que uma degradação do analito ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados. A estabilidade de fármacos e outras substâncias em fluidos biológicos dependem de suas propriedades químicas, da matriz biológica e das condições de acondicionamento utilizadas.

As determinações de estabilidade devem utilizar amostras preparadas a partir de uma solução estoque recente da substância em análise, adicionada a

uma matriz biológica isenta de interferência. Nesse caso, para os estudos de estabilidade, brancos de plasma serão adicionados de soluções padrão para obtenção de amostras com concentrações de 0,2 a 6,0 µg/mL de adenosina e 4µg/mL de teofilina. Essas amostras serão armazenadas a -20 °C até a análise, na qual as alíquotas serão analisadas durante sete dias consecutivos, a cada quinzena, durante duas quinzenas consecutivas e a cada mês, durante três meses consecutivos.

3.2.3 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados será feita com o auxílio do Programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows e apresentados sob forma de média e desvio padrão da média para grupos de cinco animais (para experimentos *in vivo*) e grupos de quatro animais (para experimentos *in vitro*). As diferenças entre grupos experimentais também serão comparadas por One-Way ANOVA e, para casos de significância estatística, subseqüentes comparações individuais serão realizadas pelo teste t de Bonferroni, permitindo um intervalo de confiança maior que 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Experimentos preliminares

A maioria dos trabalhos publicados na literatura que atribuem atividades farmacológicas a Frutose-1,6-difosfato (F1,6BP) revelam experimentos em que sua administração foi realizada em doses únicas pertencentes ao intervalo de 300-500mg/Kg por meio de injeção intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c.). Por exemplo, Nunes e colaboradores (2002) e Alves-Filho et al. (2004) por meio de administração intraperitoneal de 500mg/Kg de F1,6BP, respectivamente, obtiveram significantes resultados em modelos de sepse e pleurisia, enquanto Antunes et al. (2006) caracterizou a F1,6BP como um agente protetor para falência renal decorrente de isquemia aguda pela administração de 300mg/Kg.

Além disso, Bordignon Nunes e colaboradores (2003) determinaram em um recente trabalho com ratos que a dose de F1,6BP que possui mais de 95% de chance de matar 50% dos indivíduos de certo grupo experimental (LD_{50}) é de 1068 mg/Kg, logo esses fatos foram levados em consideração para a pesquisa da dose adequada para proceder os experimentos dessa tese.

Triagens experimentais de dose e tempo apontaram pré-tratamentos adequados com 300mg/Kg de F1,6BP e 100mg/Kg de adenosina dissolvidas em salina, administradas por injeção intraperitoneal 15 minutos antes do estímulo nociceptivo. Quanto ao antagonista seletivo para receptores A_1 de adenosina DPCPX, a dose adequada encontrada foi de 30mg/Kg de DPCPX dissolvido em 0,5% de Tween 80 em salina, administrado por injeção subcutânea 30 minutos antes do estímulo nociceptivo e 3 μ g/pata de DPCPX dissolvido em 0,5% de Tween 80 em salina.

4.2 F1,6BP inibe hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, TNF- α , IL-1 β e KC.

Citocinas são produzidas por vários tipos de células em resposta a vários estímulos e constituem uma relação entre injúria celular e o desenvolvimento dos sintomas locais e sistêmicos da inflamação (BLACKWELL, 1996; DINARELLO, 2000; HOPKINS, 2003; CUNHA & FERREIRA, 2003). Têm sido demonstrado que os estímulos inflamatórios não promovem diretamente a liberação de mediadores hipernociceptivos primários, mas que a liberação desses é precedida por uma cascata de citocinas (POOLE et al., 1999). Nesse contexto, a carragenina (Cg) induz hipernocicepção mecânica através de uma cascata de citocinas liberada por células residentes ou migrantes, estimulada pela indução prévia da formação de bradicinina. A primeira citocina liberada é o TNF- α , o qual promove a liberação de IL-1 β e KC, responsáveis pela estimulação da síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas, respectivamente (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; LORENZETTI et al., 2002).

Desse modo, a hipernocicepção pode ser induzida não só por um estímulo hipernociceptivo (por exemplo LPS ou Cg), como também pela injeção local de TNF- α IL-1 β e KC. Estabelecidos tempo e dose de tratamento, foi observado que a F1,6BP é capaz de inibir a hipernocicepção mecânica 3 h após a administração dessas substâncias.

Para o estímulo carragenina, os camundongos foram tratados com F1,6BP (100, 300 e 1000mg/Kg, i.p.) ou veículo 15 minutos antes da injeção intraplantar de Cg (100 μ g) ou veículo (salina, 25 μ L). A hipernocicepção mecânica induzida pela Cg foi inibida (37% e 42%) pelas doses de 300 e 1000mg/Kg de maneira dose-dependente (Figura 6, painel A).

F1,6BP (300mg/Kg) também revelou-se capaz de inibir hipernocicepção mecânica induzida por TNF- α (100pg) em 30%, IL-1 β (1ng) em 42% e KC (40ng) em 25% (Figura 6, painéis B, C e D; respectivamente).

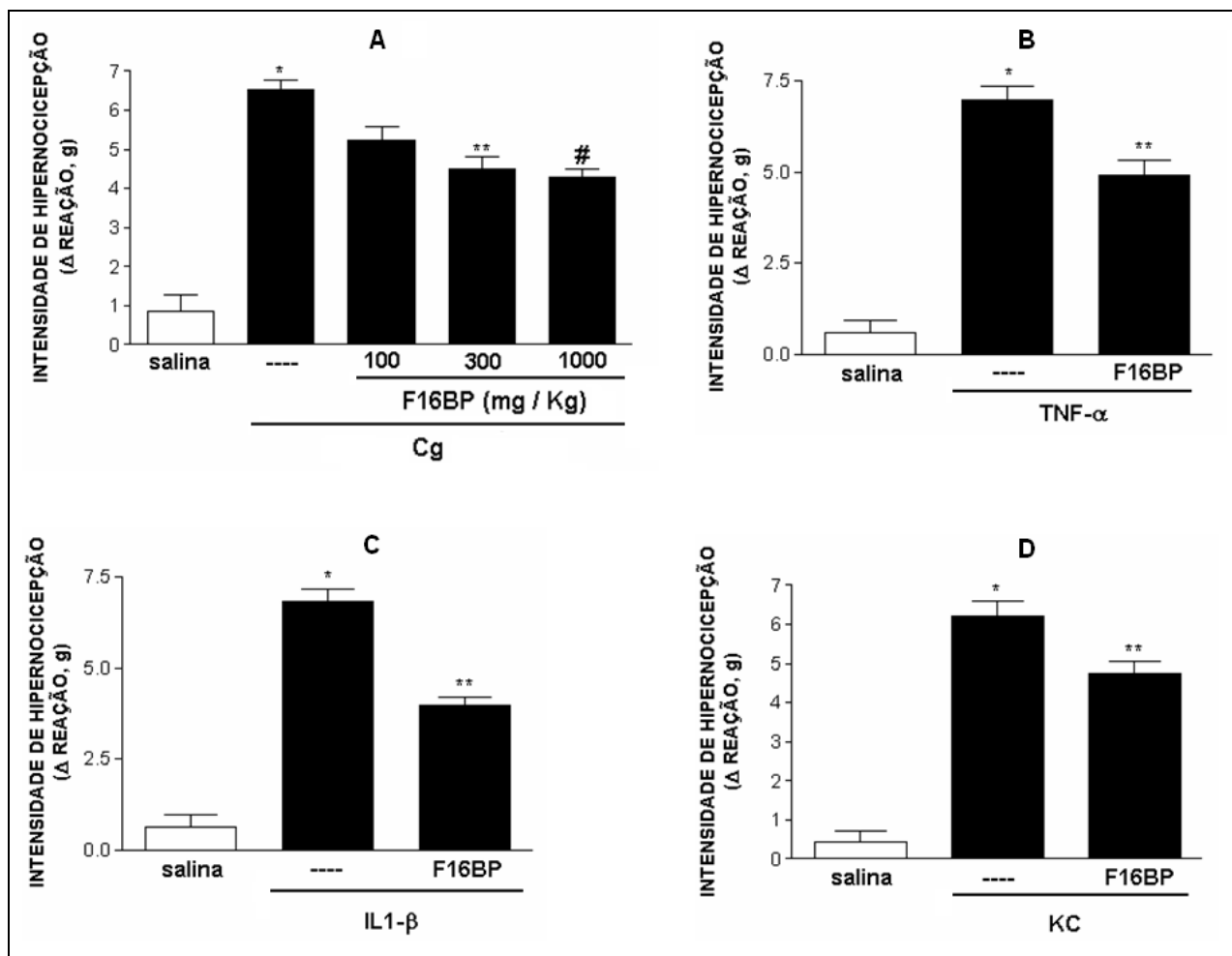


Figura 6: F1,6BP inibe hipernociceção mecânica induzida por Cg, TNF- α , IL1- β e KC. **Painel A:** Camundongos Swiss machos (25g) foram tratados com F1,6BP (doses de 100, 300 ou 1000 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200 μ L) antes do estímulo i.pl. com Cg (100 μ g/25 μ L/pata) ou salina (25 μ L). **Painel B:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (doses de 300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo antes do estímulo i.pl. com TNF- α (100 pg/25 μ L/pata) ou salina (25 μ L). **Painel C:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (doses de 300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo antes do estímulo i.pl. com IL1- β (1 ng/25 μ L/pata) ou salina (25 μ L). **Painel D:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (doses de 300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo antes do estímulo i.pl. com KC (40 ng/25 μ L/pata) ou salina (25 μ L). O comportamento nociceptivo foi avaliado 3 h após o estímulo hipernociceptivo. * $P < 0.05$ comparado ao grupo salina, ** $P < 0.05$ comparado ao grupo controle veículo/estímulo e # $P < 0.05$ comparado ao de 300 mg F1,6BP. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.3 F1,6BP não inibe produção de citocinas e a migração celular

Uma propriedade de diversas citocinas é a capacidade de induzir sua própria produção ou a produção de outras citocinas, por exemplo TNF- α estimula a produção de IL-1, e IL-1 induz a produção de IL-1 (CUNHA et al., 1992; DINARELLO et al., 1986; DINARELLO et al., 1987). Além disso, certas citocinas, como TNF- α e IL-1 β , participam do processo de migração leucocitária (FACCIOLI et al., 1990), e, em decorrência disso, a inibição de produção ou liberação desses mediadores pode culminar com uma redução da migração celular (CUNHA et al., 2008). Considerando que neutrófilos ativados podem produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , KC e mediadores finais como prostaglandinas (CONTI et al., 1988; KASAMA et al., 2005; TOLONE et al., 1977), que são essenciais para o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória, é pertinente que a hipernocicepção possa, em vários casos, estar relacionada com a migração celular, logo a inibição da migração celular pode ser etapa importante da atividade anti-hipernociceptiva de uma determinada substância (VALÉRIO et al., 2007).

Nesse sentido muitos trabalhos demonstram atividades pró-inflamatória da migração leucocitária e, inclusive, sua relação com a indução processo hipernociceptivo por alguns mediadores (LEVINE et al., 1984; BISGAARD & KRISTENSEN, 1985; BENNETT et al., 1998). Em contraste a isso, existe alguns trabalhos atribuindo aos neutrófilos a capacidade de limitar a hipernocicepção decorrente do processo inflamatório via produção de opióides (BRACK et al., 2004), sugerindo que os neutrófilos sejam essenciais para uma auto-limitação da hipernocicepção inflamatória. Além disso, existem evidências de que esses eventos possam ocorrer de maneira independente, por exemplo anti-inflamatórios não-esteroidais não interferem com a migração leucocitária, embora possam inibir a formação de edema e dor (FERREIRA, 1972; MONCADA, et al., 1973; LUKKARINEN et al., 2006; CANETTI et al., 2001; BOMBINI et al., 2004; FORD-HUTCHINSON et al., 1984), enquanto analgésicos periféricos, como dipirona, reduzem a dor inflamatória sem afetar a formação de edema e a migração leucocitária (LORENZETTI & FERREIRA, 1985). Por conseguinte, é relevante a importância da quantificação de migração leucocitária para estudos relacionados a processos nociceptivos.

Soma-se a isso o fato de a F1,6BP apresentar em outros modelos experimentais a capacidade de inibir a produção de citocinas (LOPES et al., 2006; CUESTA et al., 2006; YIN et al., 2008). Então, se a hipernocicepção induzida por Cg e citocinas (TNF- α , KC) dependem da produção de citocinas (CUNHA et al., 2005), foi avaliado se a F1,6BP poderia inibir a hipernocicepção por ocasionar uma suposta redução na produção de citocinas e na migração celular, a qual geralmente esta associada aos níveis de citocinas (FACCIOLI et al., 1990).

As amostras de tecido plantar de animais tratados ou não com F1,6BP foram coletadas 3 h após a administração do estímulo Cg para a quantificação das citocinas por ELISA e da migração celular pelo ensaio de mieloperoxidase (MPO). No entanto, F1,6BP não alterou a produção de TNF- α , KC e IL-1 β no tecido plantar (Figura 7, painéis A, B e C), tampouco a migração leucocitária para a região desafiada (Figura 7, painel D).

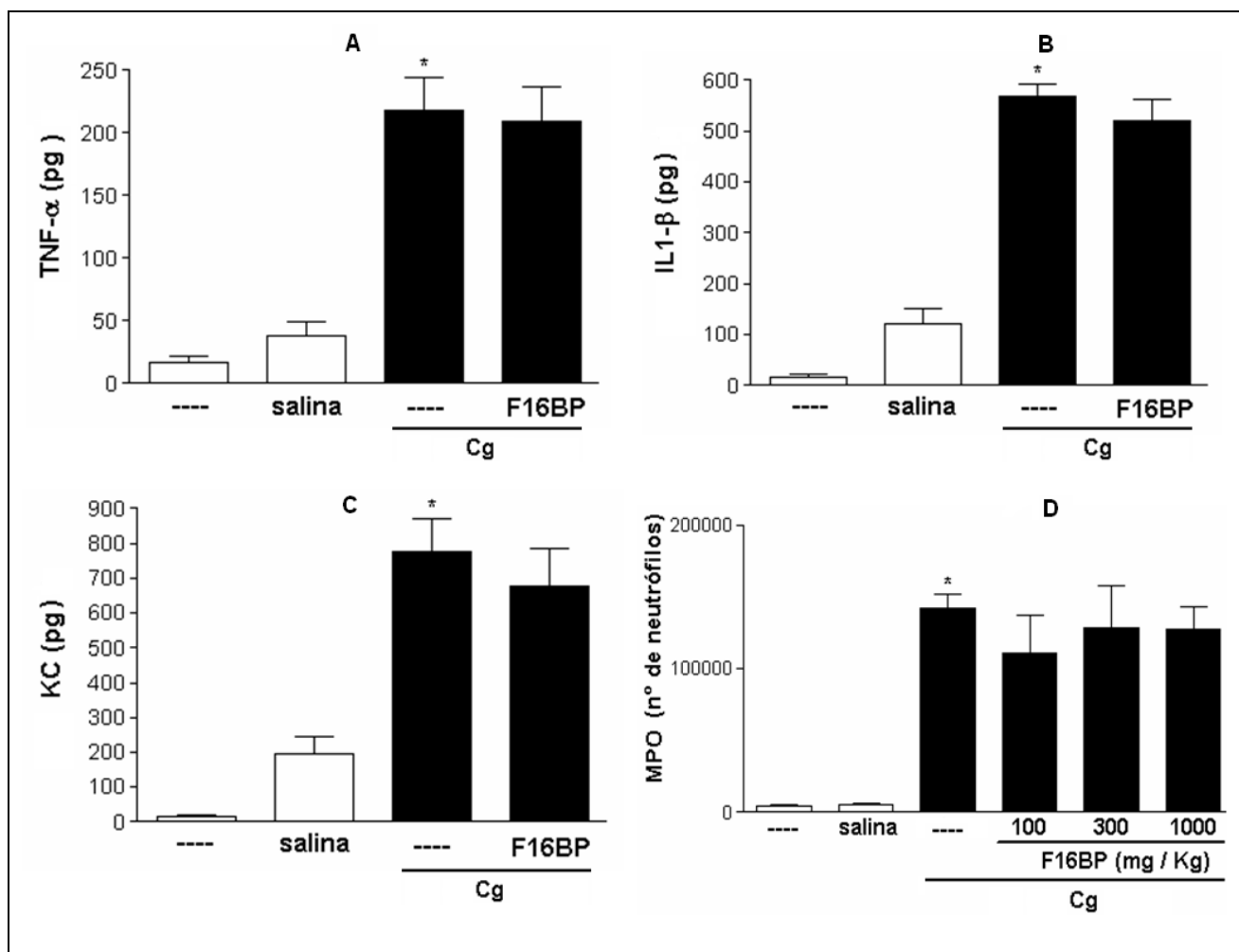


Figura 7: F1,6BP não inibe a produção de citocinas e a migração celular. Camundongos Swiss machos (25g) foram tratados com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200μL) antes da injeção i.pl. de salina, estímulo com Cg (100 μg/25μL/pata) ou nenhum. As amostras de tecido plantar foram coletadas 3h após estímulo ou veículo para a quantificação de citocinas – TNF-α (**Painel A**), KC (**Painel B**) e IL-1 β (**Painel C**) - por ELISA. **Painel D:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (doses de 100, 300 ou 1000 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo antes do estímulo i.pl. com Cg (100μg/25μL/pata), salina (25μL) ou nenhum estímulo. As amostras de tecido plantar foram coletadas 3h após estímulo ou veículo para a quantificação da migração celular por MPO. * $P < 0.05$ comparado ao grupo salina. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.4 F1,6BP inibe a hipernocicepção mecânica induzida pelos mediadores finais da cascata hipernociceptiva: PGE₂ e dopamina

A sensibilização dos receptores de dor é o denominador comum da dor inflamatória. Especificamente, a dor inflamatória aguda é caracterizada por hipernocicepção devido a sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários. Após injúria tecidual, são liberados mediadores primários específicos primários que atuam sobre receptores metabotrópicos localizados na membrana neuronal para provocar a ativação de segundos mensageiros. Eicosanóides e aminas simpáticas são os mais importantes mediadores primários finais responsáveis pela hipernocicepção através da ativação de vias de segundos mensageiros (AMP cíclico - AMPc, proteína quinase A - PKA e proteína quinase C - PKC) responsáveis por reduzir o limiar nociceptivo e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal. Nesse estado, a ativação do nociceptor e a transmissão do impulso pelo neurônio nociceptivo primário são facilitadas (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; NAKAMURA & FERREIRA, 1987; KHASAR et al., 1999; TAIWO et al., 1989; CODERRE, 1992; HINGTGEN et al., 1995; GOLD et al., 1996; MALMBERG, 1997; LYNN & O'SHEA, 1998; CUNHA et al., 1999; SOUZA et al., 2002).

Nesse contexto, a frutose-1,6-difosfato inibe a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina (100 µg/25µL/pata), induzida pelas citocinas intermediárias da cascata hipernociceptiva TNF-α (100 pg/25µL/pata) e IL1-β (1 ng/25µL/pata) e pela quimiocina KC (40 ng/25µL/pata) sem, contudo, inibir a produção das citocinas integrantes dessa via. Diante disso, investigou-se a atividade da F1,6BP sobre os mediadores finais da cascata hipernociceptiva, isto é, se a F1,6BP tem atividade anti-hipernociceptiva sobre os mediadores primários finais da cascata hipernociceptiva PGE₂ e dopamina que ativam diretamente o nociceptor.

F1,6BP demonstrou-se capaz de inibir, também, a hipernocicepção mecânica induzida pelos mediadores finais PGE₂ e dopamina, uma amina simpática. O tratamento prévio de 15 minutos com F1,6BP (300mg/Kg, i.p.) inibiu a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ (30µg) e pela dopamina (10µg) na 3 h em 30% e 44%, respectivamente (Figura 8, painéis A e B).

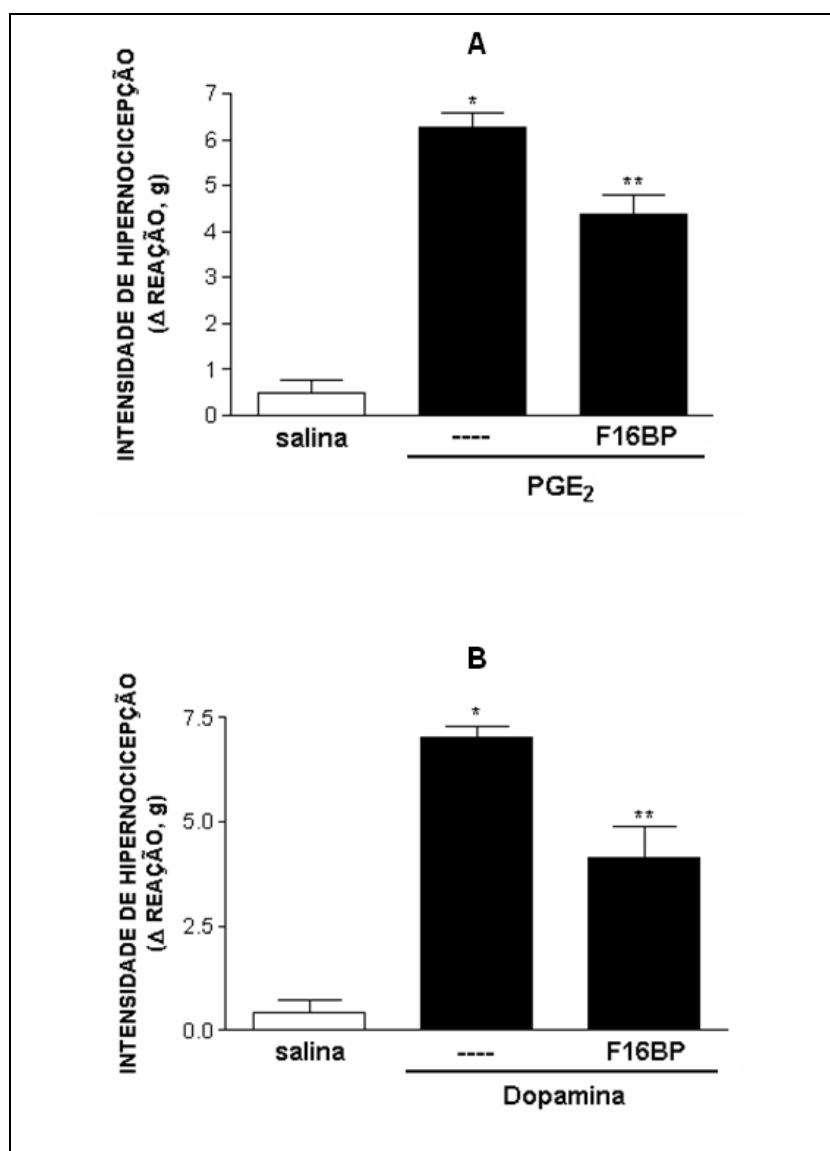


Figura 8: F1,6BP inibe a hipernocicepção mecânica induzida pelos mediadores finais: PGE₂ e dopamina. Painel A: Camundongos Swiss machos (25g) foram tratados com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200μL) antes do estímulo i.pl. com PGE₂ (30 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **Painel B:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo antes do estímulo i.pl. com dopamina (10 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). O comportamento nociceptivo foi avaliado 3 h após o estímulo hipernociceptivo. **P* < 0.05 comparado ao grupo salina e ***P* < 0.05 comparado ao grupo controle veículo/estímulo. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.5 Adenosina inibe hipernocicepção induzida pela Cg, PGE₂ e dopamina de maneira semelhante à F1,6BP

A carragenina (Cg) induz hipernocicepção ao estimular células residentes ou migrantes a produzirem uma cascata citocinas que culmina com a síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; LORENZETTI et al., 2002), as quais são responsáveis pela hipernocicepção através da ativação de vias de segundos mensageiros (AMPc, proteína quinase A, e PKC) responsáveis por reduzir o limiar nociceptivo e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal (KHASAR et al., 1999; TAIWO et al., 1989; CODERRE, 1992; HINGTGEN et al., 1995; MALMBERG, 1997; LYNN & O'SHEA, 1998; CUNHA et al., 1999; SOUZA et al., 2002).

Diversos estudos revelam um efeito antinociceptivo decorrente da ativação de receptores A₁ de adenosina em virtude da inibição da atividade da enzima adenilato-ciclase. Essa inibição da adenilato-ciclase diminui a produção de adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico (AMPc), a qual encontra-se elevada perante a hipernocicepção devido ao fato de o AMPc ser um segundo mensageiro que atua na redução do limiar nociceptivo e no aumento da excitabilidade da membrana neuronal (SOSNOWSKI et al., 1989; KARLSTEN et al., 1991; TAIWO & LEVINE, 1991; KARLSTEN & GORDH, 1995; KHASAR et al., 1995; SAWYNOK et al., 1998). Em um estudo interessante Malhotra e colaboradores (2000) aplicando o teste de retirada da cauda (Tail Flick test) relacionaram a ativação de receptores A₁ de adenosina pela adenosina e por agonistas seletivos a uma atividade anti-hipernociceptiva decorrente da interação entre o sistema adenosinérgico e o sistema dopaminérgico.

Por conseguinte, investigou-se a capacidade de a adenosina inibir a hipernocicepção mecânica induzida pelo estímulo com carragenina e pelos mediadores finais da cascata hipernociceptica PGE₂ e dopamina no modelo de pressão crescente na pata com o uso do filamento de Von Frey. E assim como a F1,6BP, a adenosina também é capaz de inibir a hipernocicepção mecânica no modelo de pressão crescente na pata de camundongos aferida com o uso do filamento de Von Frey.

Os presentes experimentos investigaram se a adenosina (Ado) poderia apresentar atividade anti-hipernociceptiva semelhante às encontradas para a frutose-1,6-difosfato (F1,6BP) no presente modelo. De fato, o pré-tratamento com Ado (100 mg/Kg, i.p., 15 minutos) revelou resposta similar a obtida com a F1,6BP, na qual a hipernocicepção induzida pela Cg foi inibida de maneira dose-dependente (100 µg/pata, Figura 9, painel A, 35% e 41%). Além disso, a adenosina também demonstrou-se capaz de inibir parcialmente a hipernocicepção induzida pelos mediadores finais PGE₂ (30 µg/pata, Figura 9, painel B, 43%) e dopamina (10 µg/pata, Figura 9, painel C, 39%) na 3 h.

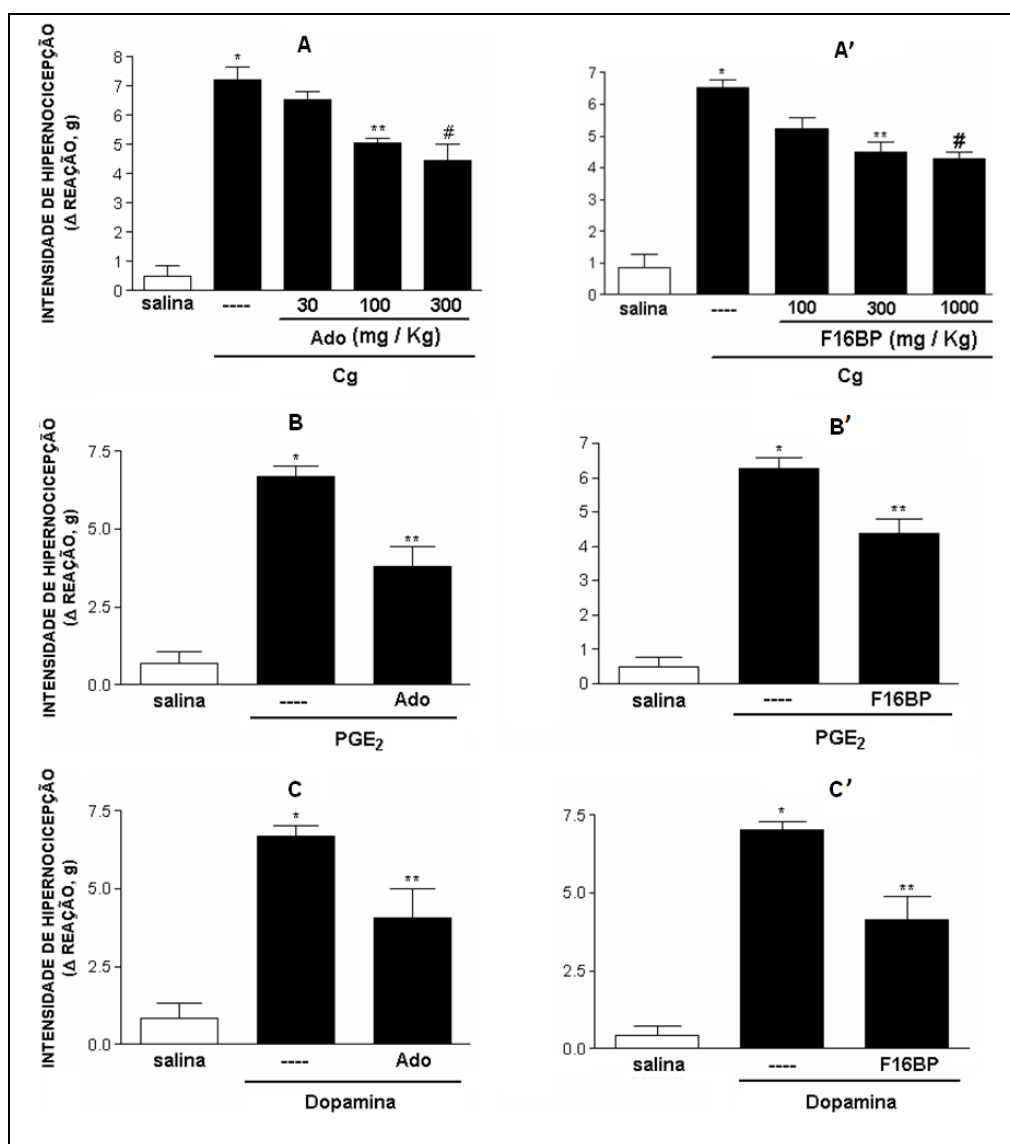


Figura 9: Adenosina inibe hipernocicepção induzida pela Cg, PGE₂ e dopamina de maneira semelhante à F1,6BP. Painel A: Camundongos Swiss machos (25g) foram tratados com Ado (doses de 30, 100 ou 300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200μL) antes do estímulo i.pl. com Cg (100 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **Painel B:** Camundongos tratados com Ado (100 mg/Kg/i.p., 15min) ou veículo antes do estímulo i.pl. com PGE₂ (30 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **Painel C:** Camundongos tratados com Ado (100 mg/Kg/i.p.,15min) ou veículo antes do estímulo i.pl. com dopamina (10 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **Painéis A', B' e C':** Atividade da F,16BP equivalente à Ado (descritos anteriormente). O comportamento nociceptivo foi avaliado 3 h após o estímulo hipernociceptivo. **P* < 0.05 comparado ao grupo salina e ***P* < 0.05 comparado ao grupo controle veículo/estímulo. #*P* < 0.05 comparado ao de 300 mg/kg F1,6BP ou 100mg/Kg Ado. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.6 A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é revertida por antagonista seletivo para receptores A₁ de adenosina.

Diversos análogos de adenosina apresentam atividade anti-hipernociceptiva sobre vários modelos animais de dor (SAWYNOK et al., 1998). Essa atividade muitas vezes é associada à ativação de receptores A₁ de adenosina (TAIWO & LEVINE, 1991; KHASAR et al., 1995; MALHOTRA et al., 2000) e pode ser revertida pela administração de antagonistas seletivos para esse receptor (BOREA et al., 1996; BASTIA et al., 2002). Especificamente, o antagonista seletivo para receptores A₁ de adenosina DPCPX tem sido reportado na literatura por diversos autores como uma droga eficiente para reverter a atividade anti-hipernociceptiva decorrente da ativação de receptores A₁ de adenosina por agonistas seletivos ou mesmo pela adenosina (DA SILVA TORRES et al., 2003; KHANDWALA et al., 1998; MAIONE et al., 2007; PAN et al., 2001).

Pelo exposto, o estudo voltou-se então para o possível envolvimento de adenosina na atividade farmacológica desempenhada pela F1,6BP. Então, foi averiguado se o DPCPX, um antagonista seletivo de receptores A₁ de adenosina, seria capaz de reverter o efeito da F1,6BP e da própria adenosina sobre a hipernocicepção mecânica no modelo de pressão crescente na pata de camundongos com o uso do filamento de Von Frey. Para esse fim, os camundongos sistemicamente foram tratados com injeção intraperitoneal de DPCPX nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg 15 minutos antes da administração de F1,6BP na dose de 300mg/Kg ou Ado na dose 100mg/Kg. Após 15 minutos os animais receberam injeção intraplantar de Cg (100µg).

A hipernocicepção mecânica avaliada na 3h após a injeção do estímulo apontou novamente atividade da F1,6BP e adenosina sobre a hipernocicepção induzida pela Cg, sendo que o DPCPX (doses de 10 e 30 mg/kg) preveniram tal efeito (Figura 10, painel A e B).

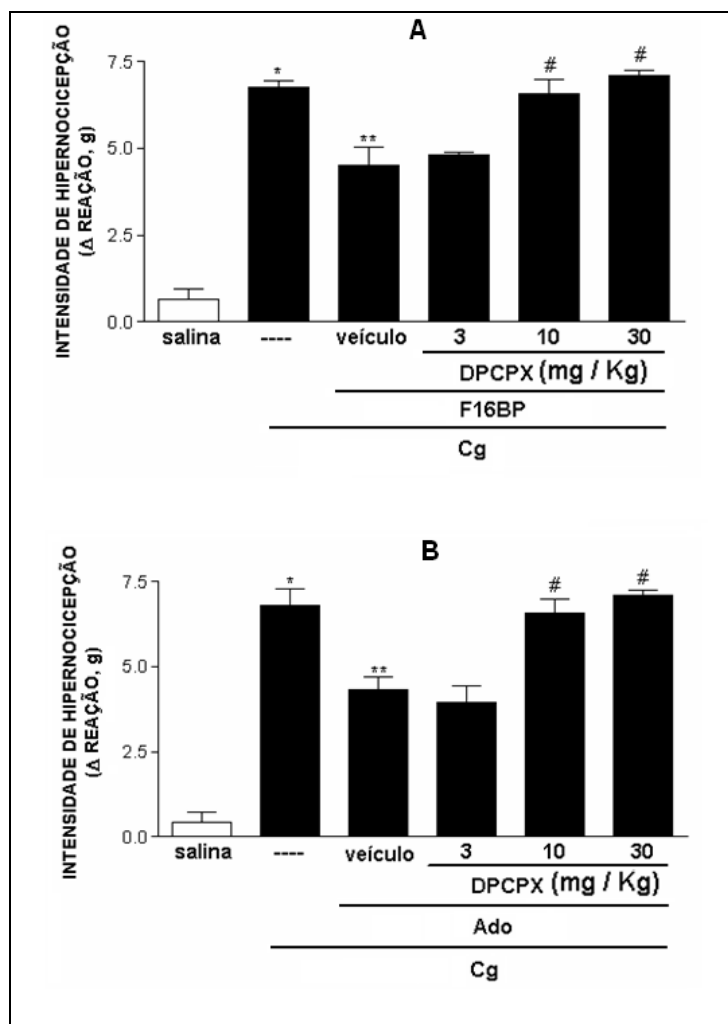


Figura 10: A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é revertida por antagonista seletivo para receptores A_1 de adenosina. Painel A: Camundongos Swiss machos (25g) receberam tratamento sistêmico (i.p.) com o respectivo veículo (0,5% tween80 em salina) ou DPCPX (doses de 3 – 30 mg/Kg/30min), e com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200 μ L) antes do estímulo i.pl. com Cg (100 μ g/25 μ L/pata) ou salina (25 μ L). **Painel B:** Camundongos Swiss machos (25g) receberam tratamento sistêmico (i.p.) com o respectivo veículo (0,5% tween80 em salina) ou DPCPX (doses de 3 – 30 mg/Kg/30min), e com Ado (100 mg/Kg/i.p., 15min) ou com o respectivo veículo (salina, 200 μ L) antes do estímulo i.pl. com Cg (100 μ g/25 μ L/pata) ou salina. * $P < 0.05$ comparado ao grupo salina e ** $P < 0.05$ comparado ao grupo controle veículo/estímulo. # $P < 0.05$ comparado ao de 300 mg/kg F1,6BP ou 100mg/Kg Ado. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.7 A atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina é dependente da ativação de receptores A₁ de adenosina.

Após determinar que a atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP e da adenosina envolve a ativação de receptores A₁ de adenosina, devido à reversão de seus efeitos pela administração prévia do antagonista seletivo para receptores A₁ de adenosina DPCPX, outros grupos experimentais também receberam pré-tratamento com DPCPX, no entanto esses animais foram submetidos à injeção local (i.pl.) desse antagonista de receptores A₁ de adenosina nas doses de 0,3; 1 e 3 µg/pata 15 minutos antes da administração de F1,6BP (300mg/Kg, i.p.) ou Ado (100mg/Kg, i.p.). Quinze minutos depois, os animais receberam injeção i.pl. com os mediadores finais hipernociceptivos PGE₂ (30ng) ou dopamina (10µg) e, novamente, F1,6BP e adenosina inibiram a hipernocicepção e o DPCPX reverteu-a parcialmente na dose de 1 µg e totalmente na dose de 3 µg (Figura 11, painéis A, B, C e D, respectivamente).

Os grupos tratados apenas com o veículo e os estímulos nociceptivos não exibiram qualquer atividade inibitória, excluindo a possibilidade de o veículo possuir efeito farmacológico. Além disso, o grupo tratado apenas com DPCPX e PGE₂ ou dopamina apresentou intensidade de hipernocicepção equivalente à do grupo tratado apenas com os veículos e PGE₂ ou dopamina, o que demonstra que o DPCPX é responsável por qualquer redução na indução da atividade hipernociceptiva.

Para comprovar que o DPCPX não influenciaria os resultados por uma suposta atividade pró-nociceptiva própria, houve grupos de animais (resultado não exibido) que receberam injeção intraplantar com esse composto para aferição da linha de base 3h e 30min após sua administração. E a não constatação de alterações da linha de base exclui possíveis dúvidas com relação aos resultados que apontam a reversão da atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP via adenosina.

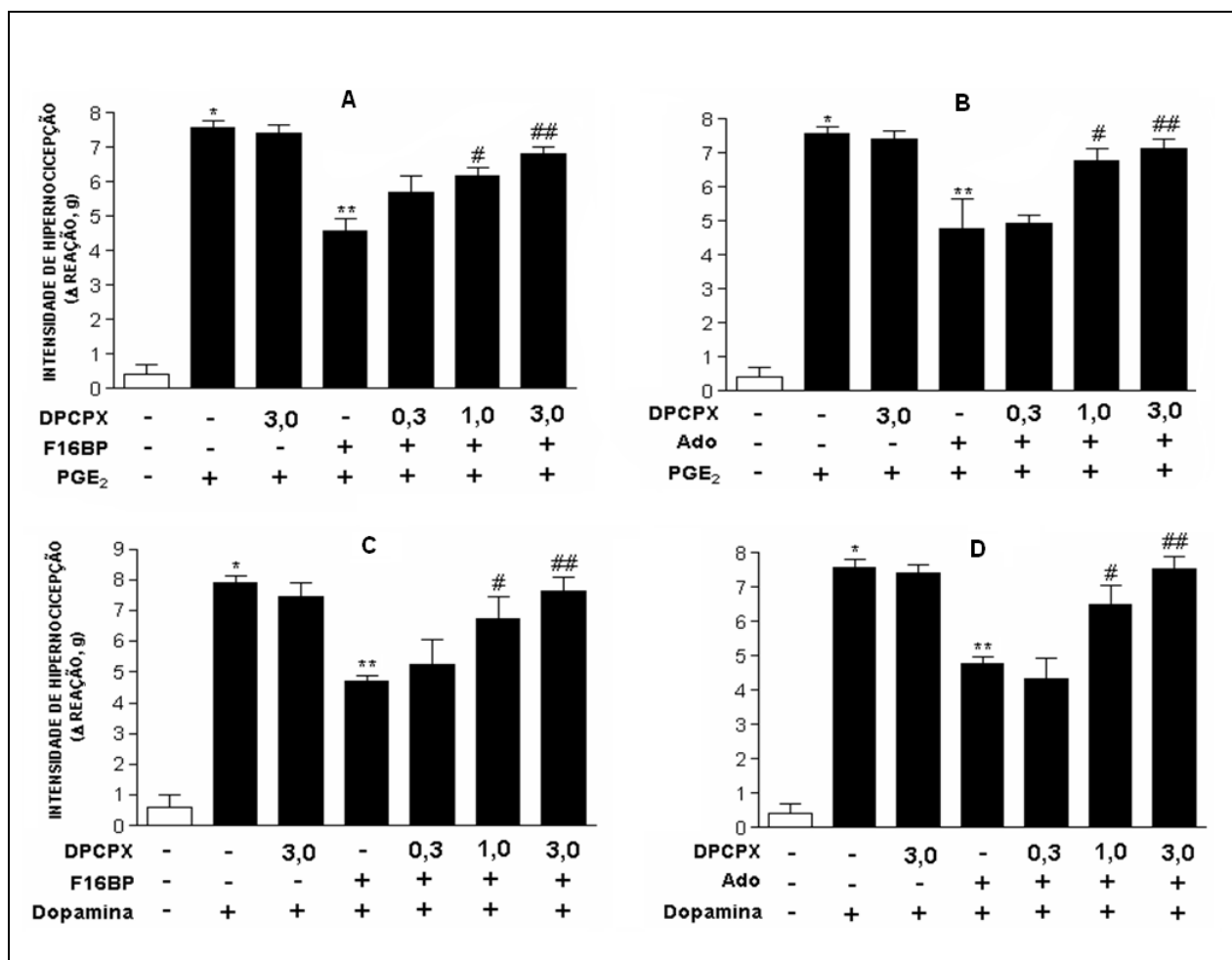


Figura 11: A atividade anti-hipernociceptiva do da F1,6BP e da adenosina é dependente da ativação de receptores A₁ de adenosina. Painéis A e B: Camundongos receberam tratamento local (i.pl.) com o respectivo veículo (0,5% tween80 em salina) ou DPCPX (doses de 0.3 – 3 mg/Kg/30min), e com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min, Painei A), Ado (100 mg/Kg/i.p., 15min, Painei B) ou com o respectivo veículo (salina, 200μL) antes do estímulo i.pl. com PGE₂ (30 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **Painéis C e D:** Camundongos receberam tratamento local (i.pl.) com o respectivo veículo (0,5% tween80 em salina) ou DPCPX (doses de 0.3 – 3 mg/Kg/30min), e com F1,6BP (300 mg/Kg/i.p., 15min, Painei C), Ado (100 mg/Kg/i.p., 15min, Painei D) ou com o respectivo veículo (salina, 200μL) antes do estímulo i.pl. com dopamina (10 μg/25μL/pata) ou salina (25μL). **P* < 0.05 comparado ao grupo salina e ***P* < 0.05 comparado ao grupo controle veículo/estímulo. #*P* < 0.05 comparado ao grupo (**). ##*P* < 0.05 comparado ao grupo (#). ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

4.8 Validação da metodologia analítica

4.8.1 Procedimento para obtenção de amostras

A técnica desenvolvida inicia com a correta anestesia dos animais (em jejum de 12h) através da combinação anestésica quetamina - xilasina para a colheita de material. Devido à necessidade de uma quantidade relativamente grande de sangue, a colheita por meio de punção cardíaca revelou-se pertinente por ser uma técnica eficaz e confiável para essa finalidade. Nesse processo, o sangue recolhido em seringas de 1 mL previamente heparinizadas é transferido para tubos de vidro acondicionados em gelo.

Cada tubo recebe sangue colhido de 3 animais e é rapidamente levado à centrífuga para separação do plasma com centrifugação das amostras a 3000 rpm durante 15 minutos. As amostras de plasma são, então, separadas dos elementos figurados, transferidas individualmente a outros tubos e conservadas em gelo até próxima etapa da metodologia analítica em questão. Nessa etapa podem ser adicionados (quando necessários) os padrões de adenosina e teofilina (padrão interno). Assim, o plasma separado passa por um processo de precipitação protéica no qual se adiciona 1 mL de acetonitrila para cada 0,5 mL de plasma com agitação de 2 minutos em agitador de tubos. Em seguida os tubos são centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos e os sobrenadantes são transferidos individualmente a outros tubos.

Após essa etapa, o sobrenadante é levado à secagem, podendo, nesse estágio, ser acondicionado em freezer -20°C para posterior análise. Em seguida o solvente é evaporado sob fluxo de ar, e a amostra seca é re-suspendida em 100 µL de fase móvel. A essa solução é adicionado 100 µL de hexano e, então, a amostra é submetida a agitação (30s) e centrifugação (5 minutos, 3000 rpm). O hexano adicionado atua na remoção de proteínas que não se precipitaram no estágio anterior, tornando o cromatograma mais “limpo”, isto é, com menos picos desprazíveis. Assim, o tubo apresentará duas fases: uma hidrofóbica (hexano + proteínas) localizada acima da porção hidrofílica (fase móvel + analíto) apta à injeção no aparelho de CLAE (Figura 12).

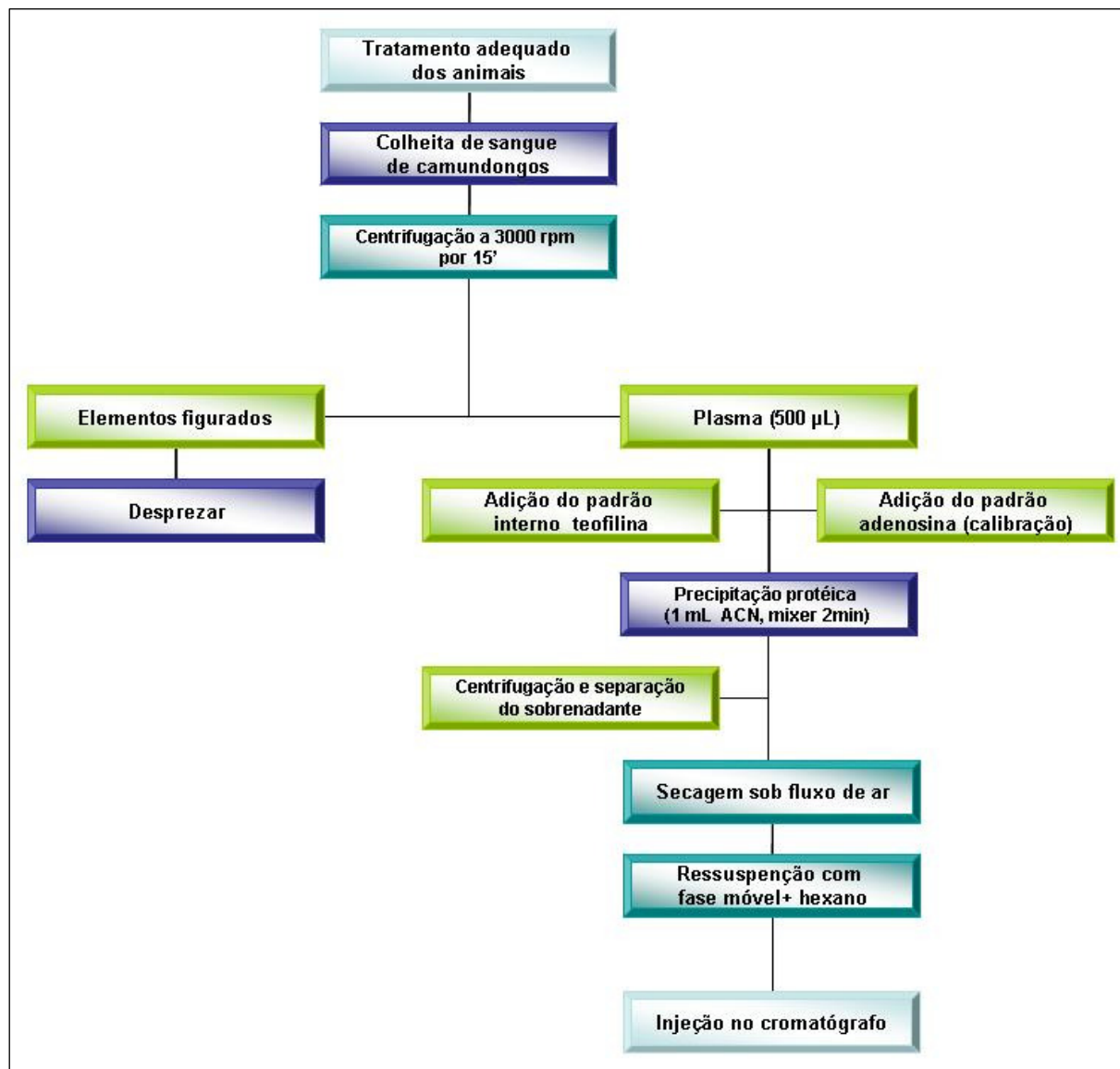


Figura 12: Fluxograma do procedimento para obtenção de amostras, da manipulação animal ao cromatógrafo.

4.8.2 Ajuste das condições cromatográficas

Precede o processo de validação de uma metodologia analítica a busca por adequadas condições experimentais. Testes preliminares foram realizados para a escolha de coluna, fase móvel, solventes e padrão interno ideais para a referida metodologia. Nesse processo foram os parâmetros mais pertinentes encontrados:

- Coluna: C-18.
- Fase móvel: 0,5% de acetonitrila, 5% de metanol e 94,5% de tampão fosfato de sódio 0,25M pH 6,5.
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- $\lambda = 254\text{nm}$.
- Auxiliar range = 1.
- Atenuação: 4.
- Padrão interno: teofilina.

Com essa combinação foi possível separar o pico referente à adenosina do pico referente ao padrão interno teofilina (Figura 13, painel A). Especificamente encontrou-se que o pico referente a adenosina possui um tempo de retenção em torno de 12 minutos e o referente à teofilina em torno de 22 minutos, sendo a distância entre eles de 10 minutos. Além disso, também foi possível separar o pico referente à adenosina e o pico referente ao padrão interno teofilina (ambas adicionadas a plasma de animais não tratados) dos demais picos de substâncias presentes no plasma (Figura 13, painel B).

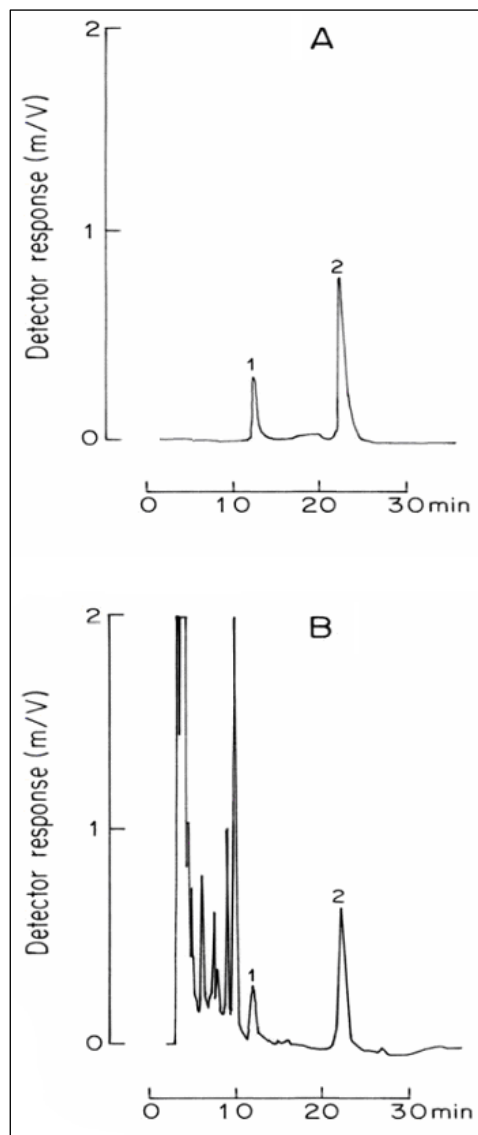


Figura 13: Cromatogramas após determinações das condições cromatográficas. Painel A: Cromatograma pertencente à curva seca exibindo os picos referentes à adenosina (1) e teofilina (2). **Painel B:** Cromatograma pertencente à curva extraída, apresentando os picos plasmáticos (< 11 min), o pico referente à adenosina (1) e o referente à teofilina (2).

4.8.3 Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade corresponde a capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996; SWARTZ; KRULL, 1998). Segundo as normas do Center for Drug Evaluation and Research (FDA, 1998) aceita-se valores de r^2 maiores que 0,95, contudo em nossos ensaios foram consideradas lineares, curvas com r^2 maior que 0,98 (CHASIN et al., 1998).

A equação de regressão linear e o coeficiente de determinação r^2 (Figura 14, painel A) obtidos para a linearidade foram:

$$y = 1,02 x - 0,0222; r^2 = 0,9999.$$

A curva de calibração define, adequadamente, a relação que existe entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo 5 pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI et al., 2004).

As concentrações dos padrões foram escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo a ser realizado. Em seguida foi realizada a curva de calibração para o cálculo das equações de regressão linear ($y = ax + b$) e os coeficientes de determinação (r^2) para as curvas seca e extraída.

A equação de regressão linear e o coeficiente de determinação r^2 (Figura 14, painel B) obtidos para a curva seca foram:

$$y = 1,1172 x - 0,0047; r^2 = 0,999.$$

Para a curva de calibração a equação de regressão linear e o coeficiente de determinação r^2 (Figura 14, painel C) encontrados foram:

$$y = 1,029 x - 0,0068; r^2 = 0,9917.$$

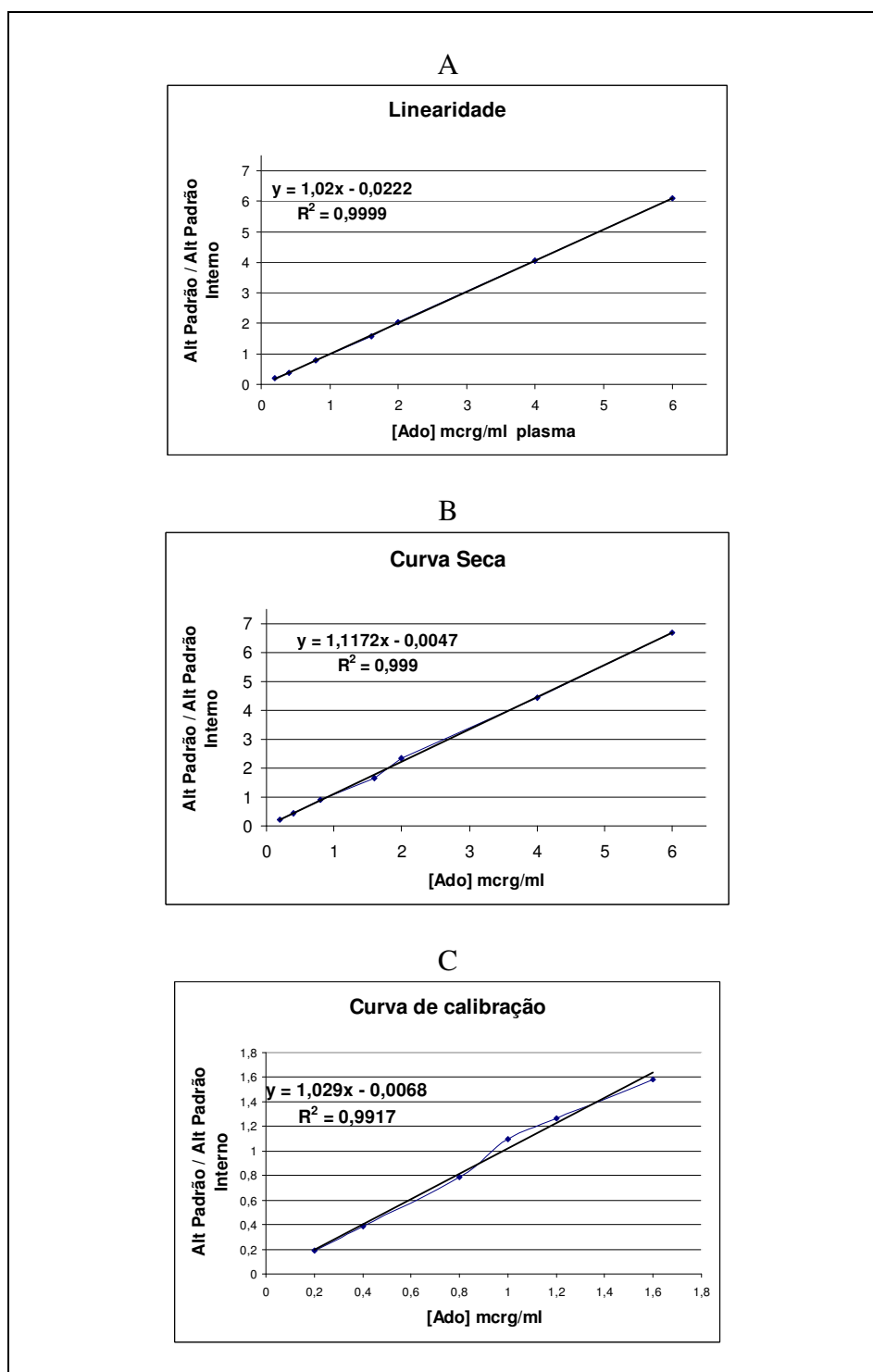


Figura 14: **Painel A:** Linearidade, exibindo equação de regressão linear ($y = ax + b$) e seu respectivo coeficientes de determinação (r^2). **Painel B:** Curva Seca, exibindo equação de regressão linear ($y = ax + b$) e seu respectivo coeficientes de determinação (r^2). **Painel C:** Curva de Calibração, exibindo equação de regressão linear ($y = ax + b$) e seu respectivo coeficientes de determinação (r^2).

4.8.4 Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (LANÇAS, 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como verdadeiro ou referência (SWARTZ; KRULL, 1998), sendo melhor expresso como porcentagem de erro sistemático.

Concentração real	Concentração obtida (µg/mL)	Precisão (CV, %)	Exatidão (% de erro)
Intra dia (n=10)			
0,2 µg/mL plasma	0,192	5,91	4
0,8 µg/mL plasma	0,758	6,11	5,25
1,6 µg/mL plasma	1,579	2,45	1,31
Inter dia (n=5)			
0,2 µg/mL plasma	0,19	10,52	5
0,8 µg/mL plasma	0,738	7,98	7,75
1,6 µg/mL plasma	1,568	2,93	2

Tabela 01: Precisão e exatidão para a validação da metodologia analítica.

4.8.5 Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação (LANÇAS, 2004).

Concentração plasmática	Recuperação Absoluta
($\mu\text{g/mL}$)	(%)
0,2	84,4
0,4	88,5
0,8	85,8
1,6	96,0
2,0	87,2
Recuperação média: 88,4 %	

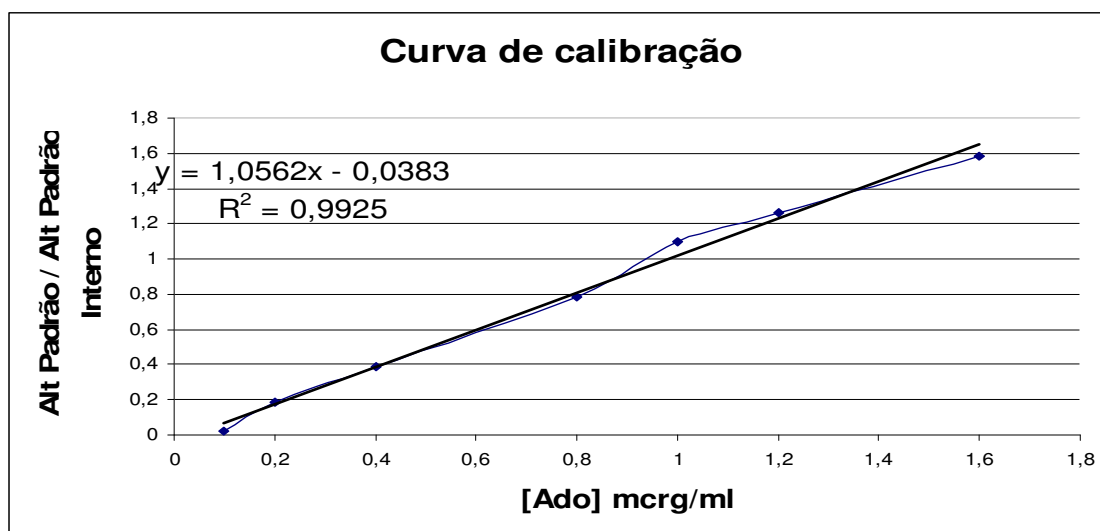
Tabela 02: Recuperação determinada para validação da metodologia analítica.

4.8.6 Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação ou simplesmente limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando-se um determinado procedimento experimental (SWARTZ; KRULL, 1998).

$$\text{LQ} = 0,1 \text{ mcrg/ml}$$

$$y = 1,0562 x - 0,0383; r^2 = 0,9925$$



Curva de calibração (Figura 14, painel C) acrescentada do ponto referente ao limite de quantificação (0,1 mcrg/ml), e a influência deste sobre o coeficiente de correlação linear (r^2).

4.8.7 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando-se de um determinado método analítico. O LD para a metodologia em questão obtido pelo método visual foi de 0,05 mcrg/ml, já que a amostra injetada nesta concentração revelou um pico referente à adenosina, cujo sinal, embora reconhecido pelo detector, não fora quantificado pelo integrador.

$$\text{LD} = 0,05 \text{ mcrg/ml}$$

4.8.8 Especificidade

A especificidade pode ser definida como a habilidade de o método distinguir o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra. Isto pode ser estabelecido pela comparação do tempo de retenção cromatográfico do analito com outras substâncias.

O tempo de retenção obtido para a adenosina foi suficientemente diferente dos tempos de retenção de outros constituintes do plasma, permitindo uma especificidade adequada para a quantificação do analito.

4.8.9 Estabilidade

As determinações de estabilidade devem utilizar amostras preparadas a partir de uma solução estoque recente da substância em análise, adicionada a uma matriz biológica isenta de interferência. Nesse caso, para os estudos de estabilidade, brancos de plasma foram adicionados de soluções padrão para obtenção de amostras com concentrações de 0,2 a 6,0 µg/mL de adenosina e 4 µg/mL de teofilina.

Essas amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise, na qual as alíquotas foram analisadas durante sete dias consecutivos, a cada quinzena, durante duas quinzenas consecutivas e a cada mês, durante três meses consecutivos.

Durante esse período não foi observada qualquer variação significativa na concentração das substâncias analisadas que sugerisse uma possível degradação de analito.

4.9 F1,6BP eleva concentração plasmática de adenosina

A quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) têm sido adotada para diversas análises por ser uma metodologia bastante versátil e prática, uma vez que pode ser totalmente automatizada. Ela possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES et al., 1997). Um exemplo de aplicação constantemente reportado na literatura para a cromatografia líquida de alta eficiência é a separação e detecção de analitos presentes em amostras de plasma (BOMPADRE et al., 2008; SOYINKA, ONYEJI, OMORUYI, 2008; POZHARITSKAYA et al., 2008; PARONI et al. 2009).

Análises quantitativas em cromatografia líquida de alta eficiência permitiram concluir que a F1,6BP é capaz de interferir com a concentração plasmática de adenosina, aumentando-a. Suportam essa teoria os cromatogramas apresentados na Figura 15 e os gráficos apresentados na Figura 16. No painel A (Figura 15) um cromatograma de amostra de plasma de animais não tratados com F1,6BP ou Ado, mas adicionado de padrão interno teofilina, revela o tempo de retenção da teofilina (2) e a presença endógena normal de adenosina plasmática (1).

Adjacente a isso, o painel B (Figura 15) revela os picos de uma amostra de plasma oriunda de animais que não foram submetidos a qualquer forma de tratamento, mas cujo plasma foi adicionado dos padrões internos de adenosina (1) e teofilina (2). O painel C (Figura 15) apresenta cromatograma de plasma de animais tratados com Ado (100 mg/Kg, i.p) e adicionado de padrão interno teofilina, revelando uma elevação significativa da quantidade de adenosina no sangue. O painel D (Figura 15) apresenta cromatograma de plasma de animais tratados com F1,6BP (300 mg/Kg, i.p) e adicionado de padrão interno teofilina, e a presença do pico referente a adenosina significativamente maior em relação àquele em plasmas de animais que não receberam tratamentos com esse composto, sugere que a F1,6BP é capaz de elevar a concentração plasmática do nucleosídeo adenosina.

Para confirmar essa hipótese, então, a análise dos cromatogramas permitiu aferir esse possível aumento da concentração plasmática de adenosina 2 e 3 h após tanto a administração de adenosina (100 mg/Kg, i.p.; Figura 16, painel A), quanto a administração de F1,6BP (300 mg/Kg, i.p.; Figura 16, painel B). A administração de adenosina elevou sua concentração plasmática em aproximadamente 155% e 124% na 2 h e 3 h, respectivamente, após a injeção. Enquanto a administração de F1,6BP promoveu um acréscimo na concentração plasmática de adenosina respectivamente de aproximadamente 54% e 48%, na 2 h e 3 h.

Por conseguinte, as concentrações encontradas foram de $0,98 \pm 0,04 \mu\text{M}$ para animais tratados com o veículo (salina), $1,37 \pm 0,21 \mu\text{M}$ para animais tratados com F1,6BP e $1,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$ para animais tratados com adenosina 2 h antes do procedimento experimental. Para os grupos experimentais cujo material foi colhido 3 h após a administração de F1,6BP ou adenosina, a concentração plasmática de adenosina obtida foi, respectivamente de $2,25 \pm 0,75 \mu\text{M}$ e $2,11 \pm 0,47 \mu\text{M}$.

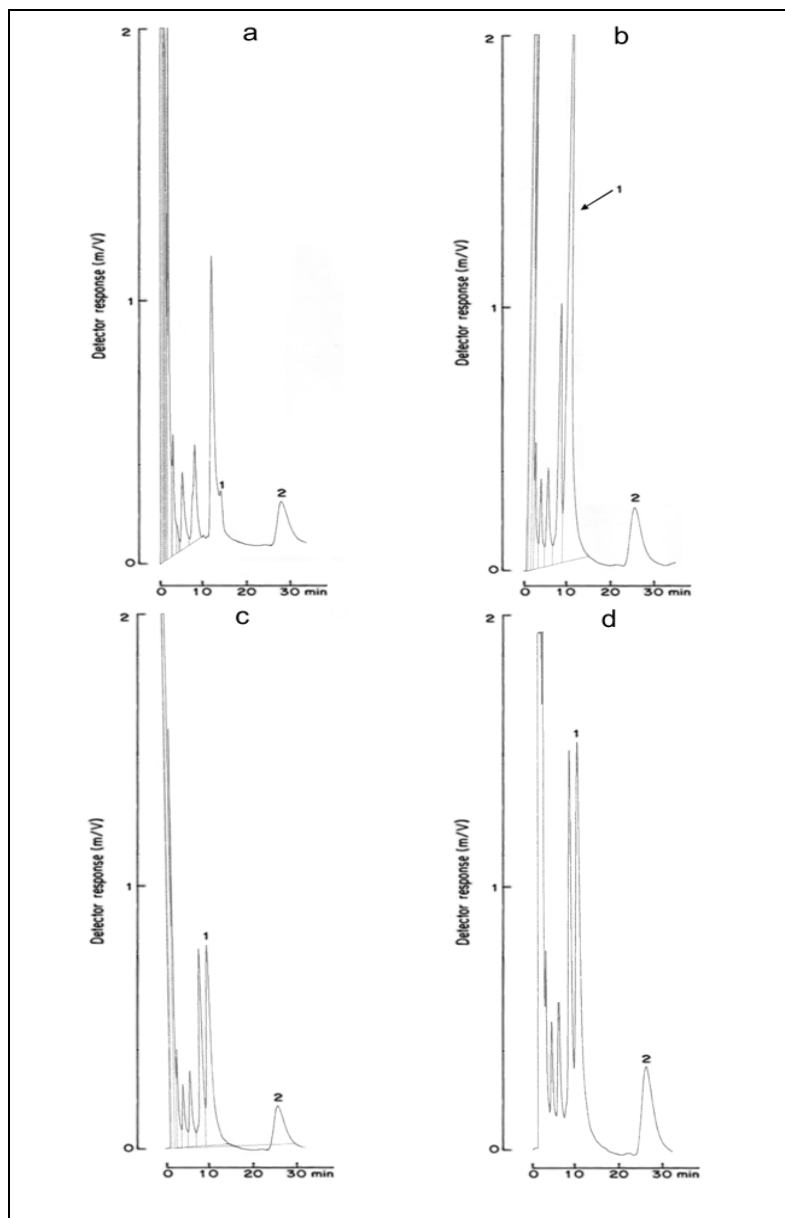


Figura 15: F1,6BP eleva concentração plasmática de adenosina. Painel A: Cromatograma de plasma de animais não tratados com F1,6BP ou Ado. **Painel B:** Cromatograma de plasma de animais não tratados com F1,6BP ou Ado, mas contaminado com Ado. **Painel C:** Cromatograma de plasma de animais tratados com Ado. **Painel D:** Cromatograma de plasma de animais tratados com F1,6BP. Amostras de todos os grupos receberam adição do padrão interno teofilina. Pico 1 referente à adenosina (endógena ou adicionada ao plasma como padrão) e pico 2 referente à teofilina (adicionada à amostra de plasma como padrão interno).

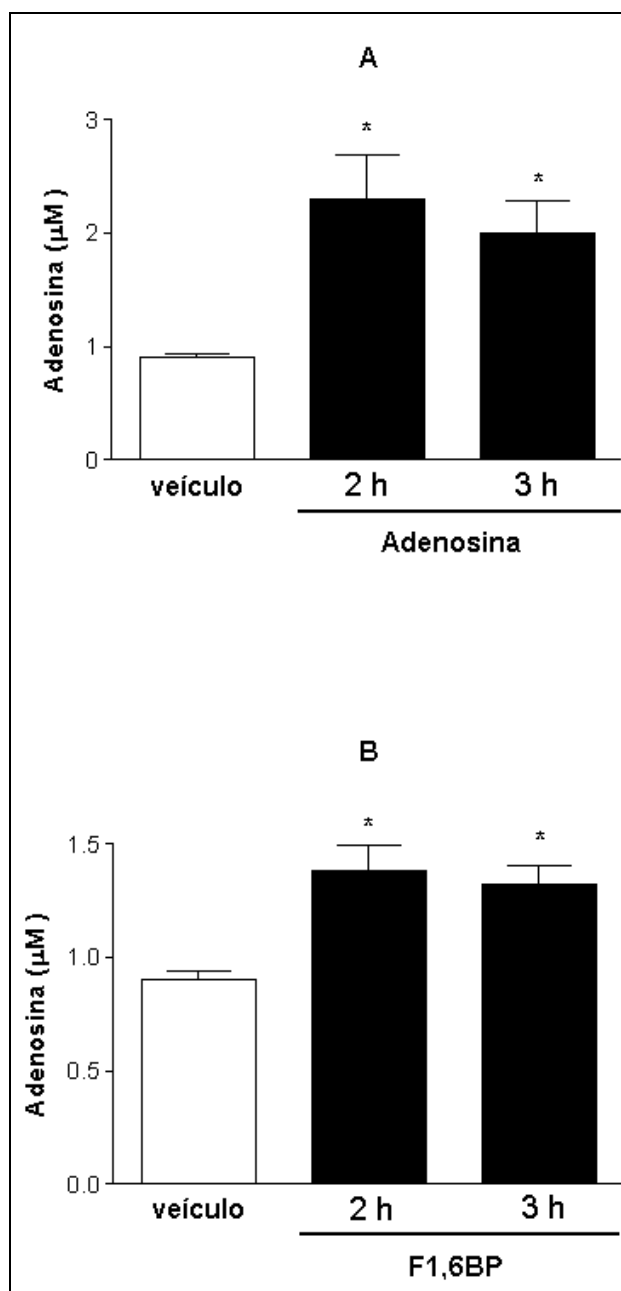


Figura 16: Concentração plasmática de adenosina. Painel A: Camundongos foram tratados com Ado (100 mg/Kg, i.p) ou com o respectivo veículo (salina, 200µL) e submetidos a procedimento experimental para a obtenção de plasma 2 ou 3 h após o tratamento. **Painel B:** Camundongos foram tratados com F1,6BP (300 mg/Kg, i.p) ou com o respectivo veículo (salina, 200µL) e submetidos a procedimento experimental para a obtenção de plasma 2 ou 3 h após o tratamento. * $P < 0.05$ comparado ao grupo salina. ANOVA de uma via seguido do teste t de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

D-Frutose-1,6-Difosfato é um intermediário da glicólise altamente energético que possui vários efeitos farmacológicos. Hardin et al. (2001) salientaram que embora a F1,6BP seja permanentemente reportada em trabalhos científicos como um promissor agente terapêutico em diversas patologias, pouco tem sido feito para elucidar seu mecanismo de ação. Para justificar as atividades da F1,6BP reportadas em diferentes áreas, várias propostas envolvendo alterações no trânsito de íons têm sido descritas.

Por exemplo, em um dos primeiros estudos realizados com a F1,6BP Galzigna & Rigobello (1986) propuseram que a F1,6BP agiria como uma “estabilizadora de membrana” capaz de interferir com a entrada de Ca^{2+} , enquanto em outra linha de pesquisa CATTANI et al. (1984) sugeriram que a F1,6BP favoreceria a captação de K^+ em músculo cardíaco e liberação de H^+ nos eritrócitos. Desde então, têm sido descrito que a F1,6BP ao interagir diretamente com a membrana celular modifica a sua permeabilidade a íons, ocasionando um fluxo iônico direto que culminaria com diferentes efeitos celulares (CATTANI et al., 1980; CHLOUVERAKIS, 1968; HASSINEN et al., 1991). Não obstante essas propostas serem suficientes para endossar tais trabalhos, é pertinente questioná-las no sentido de sugerir que tais alterações na permeabilidade celular a íons como Ca^{2+} e K^+ , por exemplo, possa ocorrer via ativação mecanismos celulares já existentes, como via abertura de canais iônicos em decorrência da ativação direta ou indireta de receptores, ao invés de uma suposta interação estabilizadora pouco fundamentada da F1,6BP com a membrana celular.

Por não haver qualquer relato na literatura de que a F1,6BP possa atuar diretamente sobre algum receptor próprio na superfície celular ou mesmo sobre receptores de alguma molécula sinalizadora, durante vários anos muitas publicações justificaram as atividades da F1,6BP debatendo a capacidade de certos açúcares fosfatados serem capazes de cruzar a membrana celular, na quais alguns autores desafiaram essa teoria (CATTANI et al., 1980; EDDY et al., 1981). Recentemente, EHRINGER et. al, (2000) demonstraram que apesar da presença de dois grupos fosfato em sua estrutura, a F1,6BP possui capacidade de atravessar membranas celulares inclusive de maneira dose-

dependente, corroborando vários autores e finalizando uma polêmica de décadas atrás (HARDIN, ROBERTS, 1994; LAZZARINO et al., 1984).

Dentre os estudos, foi demonstrado, também, que a F1,6BP é capaz de aumentar a produção de ATP (ANTUNES et al., 2006), evidenciando sua capacidade de atingir o citosol em quantidade suficiente para interferir com a via glicolítica (ANTUNES et al., 2006; GREGORY et al., 1990; HASSINEN et al., 1991; LAZZARINO et al., 1984; NUUTINEN et al., 1991). Em vista disso, quando a F1,6BP entrar na célula a via glicolítica não poderá ser eficazmente regulada porque a F1,6BP situa-se nesta cadeia reacional após as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase - pontos de regulação da via - e antes da piruvato quinase sobre a qual a F1,6BP atua como ativador alostérico (BAILEY; STIRPE; TAYLOR, 1968; IRVING; WILLIAMS, 1973; TAYLOR, BAILEY, 1967). Sustentam essa teoria, ainda, os diversos experimentos que demonstram não só em condições de privação de oxigênio, mas também em normóxia que a F1,6BP é significativamente mais metabolizada frente a outros substratos como frutose ou glicose (HARDIN, ROBERTS, 1994 ; TAVAZZI et al., 1992).

Em condições nas quais há déficit de ATP (p.ex. isquemia, hipóxia ou inflamação) o ATP é defosforilado a ADP e então a AMP, sendo o AMP degradado a adenosina para a partir desta gerar os produtos de degradação de nucleotídeos (BOROWIEC et al., 2006; HASKÓ & CRONSTEIN, 2004). Especificamente, o excesso de adenosina é eliminado pela via: adenosina → inosina → hipoxantina → xantina → ácido úrico, o qual é excretado na urina (BOROWIEC et al., 2006). Assim, todos esses produtos do catabolismo de AMP, inclusive a adenosina, são encontrados em concentrações acima do normal em condições nas quais há uma produção menor de ATP do que a necessária. E nessas condições o tratamento de animais com F1,6BP demonstrou-se capaz de prevenir a redução dos níveis ATP (deslocamento do equilíbrio ATP/ADP/AMP é deslocado no sentido anabólico) e, conseqüentemente, manter todos os produtos do catabolismo de AMP em níveis normais, exceção feita à adenosina cuja quantidade encontrada para os animais tratados com F1,6BP é muito acima da concentração encontrada em animais não submetidos a qualquer tratamento ou daquela quantidade elevada encontrada para os animais que foram submetidos às mesmas condições isquêmicas porém receberam placebo (SOLA et al., 2004).

Adjacente a isso, Domanski et al. (2006) demonstraram que é possível elevar a concentração dos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) em animais em condições de normóxia submetidos a tratamento com trimetazidina, uma droga que sabidamente é capaz de elevar a produção de ATP (CATROUX et al., 1990; HAUET et al., 1998). Além disso, um fato relevante é que Domanski et al. (2006) com o uso da trimetazidina apresentaram resultados extremamente semelhantes aos resultados apresentados por Sola et al. (2004) com o uso da F1,6BP (outra droga que sabidamente têm a capacidade de elevar a produção de ATP) no qual esse aumento da produção de ATP é acompanhado por uma redução da concentração dos produtos de degradação de nucleotídeos como inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico, exceção feita, novamente, à adenosina cuja concentração encontrou-se extremamente elevada. Por conseguinte é pertinente sugerir que a F1,6BP possui um efeito equivalente ao proposto por Domanski et al (2006) em que o aumento da concentração de adenosina pode ser resultado do aumento da síntese dos nucleotídeos de adenina ou pela inibição da degradação de adenosina em inosina, justificando tanto o aumento na quantidade de adenosina, quanto a redução da quantidade dos produtos de degradação de nucleotídeos.

Kaiping Xu e Janet L. Stringer (2008) publicaram resultados endossando Rigobello e Galzigna (1982) em que rins e fígado são apontados como os principais órgãos metabolizadores de F1,6BP, logo não é surpreendente que a maioria das atividades descritas na literatura para a F1,6BP envolvam esses tecidos (ANTUNES et al., 2006; CUESTA et al., 2006; DIDLAKE et al., 1989; LI, WANG, SHI, 1994; LOGUERCIO et al., 1996; MIHAS et al., 2003; MORESCO et al., 2004; NAKAI et al., 1991; SANO et al., 1995). Corroborando isso, esses são os órgãos em que há maior expressão da enzima Frutose-1,6-Difosfatase (FBPase), responsável pela conversão da Frutose-1,6-difosfato em Frutose-6-fosfato (F6P) para a gliconeogênese. A gliconeogênese emprega a maior parte das mesmas enzimas que agem na glicólise, mas ela não é simplesmente o reverso desta via. Sete das reações glicolíticas são livremente reversíveis e as enzimas que catalisam cada uma destas reações também funcionam na gliconeogênese. Três reações da glicólise são tão exergônicas que são essencialmente irreversíveis: são aquelas catalisadas pela hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 e piruvato quinase. A gliconeogênese emprega desvios ao

redor de cada um desses passos irreversíveis. Então, é coerente supor que além de ser metabolizada pela piruvato quinase para a produção de ATP como descrito anteriormente, a F1,6BP injetada no animal possa, principalmente em fígado e rins, ser também metabolizada pela FBPase (desvio da gliconeogênese ao redor da piruvato quinase) para a produção de glicose e subsequente armazenamento sob a forma de glicogênio. Nessa via a F6P é convertida a glicose-6-fosfato (G6P) que é defosforilada a glicose.

Além disso, uma outra via importante para a F1,6BP envolve o fato de a G6P ser substrato para a via das pentoses fosfato. A primeira reação da via das pentoses fosfato é a desidrogenação da G6P pela glicose-6-fosfato-desidrogenase, para formar 6-fosfogliconolactona, a qual é hidrolizada para a forma ácida livre 6-fosfogliconato por uma lactonase específica. No passo seguinte, o 6-fosfogliconato sofre desidrogenação e descarboxilação pela 6-fosfogliconato-desidrogenase para formar a cetopentose D-ribulose-5-fosfato. A D-Ribose-5-fosfato reage com ATP formando AMP e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) em uma reação catalisada pela enzima PRPP-sintetase. Sob a atividade enzima adenina fosforibosil transferase (APRT) o PRPP e a adenina são substratos de uma reação que gera outro AMP. Por conseguinte, o excesso de AMP formado pode ser convertido por enzimas do tipo 5'-nucleotidase citoplasmática (CN-I) a adenosina, a qual atinge o meio extracelular por transportadores bidirecionais de adenosina (Boroewic et al., 2006). Perante isso, o aumento da concentração de adenosina realmente pode ser resultado do aumento da síntese dos nucleotídeos de adenina como proposto por Domanski et al. (2006).

Adenosina, então, é o produto da completa defosforilação dos nucleotídeos de adenina, um importante nucleosídeo que atua como molécula sinalizadora engajada na regulação da fisiologia e modulação de numerosos tipos celulares (por exemplo neurônios, plaquetas, neutrófilos, células de músculo liso, miócitos, etc.). Além disso, como parte do sistema purinérgico de sinalização a adenosina medeia neurotransmissão, condução, secreção, vasodilatação, proliferação e morte celular (BOROWIEC et al., 2006). Focando no processo inflamatório, a presença de um agente injuriante tecidual leva a uma indução de um processo inflamatório local que provoca um aumento de atividades celulares na região afetada, e dessa forma haverá um descompasso

entre oferta de oxigênio para o processo de respiração aeróbia e as necessidades metabólicas do tecido inflamado, assim o equilíbrio ATP/ADP/AMP é deslocado no sentido catabólico levando a um aumento na produção de adenosina. Essa adenosina atinge o espaço intersticial por meio de transportadores bidirecionais de adenosina e atua sobre o músculo liso arteriolar para ocasionar um relaxamento que leve a uma vasodilatação arteriolar para promover um maior fluxo sanguíneo local condizente com a necessidade metabólica do foco inflamatório. Todo esse mecanismo metabólico de controle do fluxo sanguíneo regional é chamado de mecanismo de auto-regulação do fluxo sanguíneo.

Nesse cenário, os resultados encontrados por Sola et al. (2004) e Domanski et al. (2006) são imprescindíveis para esclarecer os resultados desta tese, uma vez que revelam que a produção de adenosina pode ser potencializada (a despeito do anabolismo $\text{Ado} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$) e atingir uma quantidade intersticial muito maior do que aquela atingida pelo mecanismo de auto-regulação do fluxo sanguíneo, supostamente como resultado do aumento da síntese dos nucleotídeos de adenina ou pela inibição da degradação de adenosina em inosina. E esta quantidade extra de adenosina que atinge o interstício é peça-chave para elucidar o mecanismo de ação da F1,6BP uma vez que poderá atuar não apenas no músculo liso localizado na túnica média arteriolar, mas também em outros receptores de adenosina que estejam expressos na membrana de células localizadas na região do foco inflamatório. Por exemplo nos receptores A1 de adenosina localizados em fibras nociceptivas e, por conseguinte, influenciar com o processo de indução de dor sem, contudo, interferir com a migração celular ou com a produção de citocinas.

É um fato relevante que muitas atividades descritas para a F1,6BP em diversos tecidos também são encontradas na literatura atribuídas à ativação dos diferentes receptores de adenosina pela própria adenosina ou por agonistas específicos (AHN et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2004; EDDE et al., 1998; LEE, 2005; LIAN et al., 2007; LOPES et al., 2006; NARAYAN; MENTZER; LAZLEY, 2001; NUNES et al., 2003; PLANAS et al., 1993; POON; SAWYNOK, 1999; RAMAKERS et al., 2006; SCHRIER, 1990; SULLIVAN, et al., 2004; WIESNER et al., 1999;). Para corroborar esses indícios, foi um

objetivo desta tese averiguar se a adenosina e a F1,6BP poderiam apresentar atividades similares no modelo experimental utilizado. De fato, o pré-tratamento com adenosina (100 mg/Kg, i.p., 15 minutos) revelou resposta similar a obtida com a F1,6BP (300 mg/Kg, i.p., 15 minutos) sobre os diferentes estímulos hipernociceptivos aplicados no modelo experimental utilizado, o que está em concordância com os resultados em outros modelos experimentais obtidos por T. Akimitsu et al. (1995) de ambas, F1,6BP e adenosina, possuírem atividades similares. Recentemente, Sola et al. (2003) apresentaram evidências farmacológicas de que certas propriedades antiinflamatórias da F1,6BP poderiam estar relacionadas a alterações dos níveis endógenos de adenosina, uma vez que as atividades da F1,6BP descritas pelos autores foram inibidas pela administração da enzima adenosina deaminase (ADA). A adenosina e diversos análogos de adenosina alteram o comportamento atribuído à dor em um amplo espectro de modelos experimentais de dor (SAWYNOK, 1998). Essa ação da adenosina e seus análogos dependem muito do subtipo de receptor de adenosina ativado, sendo que a ativação de receptores A_1 leva a uma redução no comportamento de dor, enquanto a ativação dos demais receptores está associada a um efeito contrário. Assim, a exógena administração de um agonista de receptores A_1 de adenosina produz anti-hipernocicepção (TAIWO & LEVINE, 1990), enquanto a ativação local de receptores A_2 provoca efeito pró-nociceptivo ou aumento do efeito nociceptivo (KARLSTEN et al., 1992; TAIWO & LEVINE, 1990), sendo esta ação mais relacionada a ativação de receptores A_{2A} como elucidada por Doak e Sawynok (1995). Ainda, a ativação de receptores A_3 de adenosina produz comportamento de dor em decorrência da liberação por mastócitos de histamina e 5-hidroxitriptamina (5-HT) que agem no terminal sensitivo nervoso (SAWINOK et al., 1997).

Nesse contexto, a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum da dor inflamatória. Existem dois grupos de mediadores hipernociceptivos que agem diretamente sobre os nocieptores: eicosanóides e aminas simpáticas, os quais podem ser induzidos por três vias dependentes da liberação de citocinas. As três vias são: (i) carragenina \rightarrow TNF- α \rightarrow IL-1 β \rightarrow prostaglandinas (que sensibilizam o nociceptor), (ii) carragenina \rightarrow TNF- α \rightarrow KC \rightarrow IL-1 β \rightarrow prostaglandinas (que sensibilizam o nociceptor) e (iii)

carragenina → TNF- α → KC → aminas simpáticas que também sensibilizam o nociceptor (CUNHA et. al., 2004). Então, os mecanismos de que as drogas dispõem para intervir com a sensibilização dos nociceptores envolve inibição da ação ou da liberação de certa citocina pertencente a alguma das vias descritas; ou uma ação direta da substância sobre o nociceptor, bloqueando a formação ou condução do sinal como é o caso da ativação dos receptores A₁ de adenosina (SAWINOK, 1998).

Nesse sentido, o presente trabalho revelou que a F1,6BP (Figura 1) possui atividade anti-hipernociceptiva tanto sobre a hipernocicepção induzida pela Cg quanto pelas citocinas integrantes da cascata hipernociceptiva (Figura 6, painéis A, B, C e D). A atividade da F1,6BP sobre a Cg revelou-se de maneira dose-dependente, pois a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg foi inibida em 37% pela dose de 300 mg/Kg e 42% pela dose de 1000 mg/Kg, enquanto a dose de 100 mg/Kg revelou uma tendência de inibição não confirmada estatisticamente. Já atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP sobre as citocinas foi de 30% para oTNF- α , 42% para a IL-1 β e de 25% para o KC. Contudo, apesar de revelar essas atividades a F1,6BP não foi capaz de interferir com a migração leucocitária (Figura 7, painel D), e nem com a produção de citocinas (Figura 7, painéis A, B, C) no modelo desafiado. Assim, esses dados insinuam que a ação analgésica da F1,6BP deva ocorrer por ação direta sobre os nociceptores, bloqueando a formação ou condução do sinal uma vez que a mesma não interfere com a cascata responsável pela indução de nocicepção. Dessa forma é coerente propor que a forma pela qual a F1,6BP desempenha essa atividade seja por meio de um mecanismo mediado por receptor, cuja ativação reduza a excitabilidade do nociceptor impedindo a formação do sinal e/ou a transdução do mesmo. Reforça essa teoria, ainda, os resultados obtidos com o uso dos mediadores finais Prostaglandina E₂ e dopamina, os quais demonstram a F1,6BP inibindo hipernocicepção induzida por mediadores nociceptivos diretos PGE₂ (30%) e dopamina (44%) (Figura 9), fundamentando tal hipótese.

Dessa forma, por não ser conhecido que F1,6BP possua um receptor próprio ou ao menos seja capaz de ativar ou inibir receptores de membrana alheios, é pertinente procurar dentre seus metabólitos algum ao qual se possa atribuir tal atividade. Não é recente na literatura que a adenosina (Figura 2)

participa de diversos processos fisiológicos mediados por diferentes receptores de membrana acoplados à adenilato ciclase via proteína G, sendo que esse metabólito desempenha atividade biológica através de quatro receptores: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Figura 3), os quais podem estimular ou inibir a atividade da enzima adenilato ciclase (KHASAR et.al, 1995; TAIWO; LEVINE, 1991). Focando em dor, é sabido que o receptor A_1 está acoplado negativamente à adenilato ciclase (SAWYNOK, 1998) e que sua ativação desempenha inibição hipernociceptiva por impedir aumento da formação citoplasmática do segundo mensageiro AMPc, o qual ao se elevar estimularia a transdução do potencial de ação.

Assim, investigou-se a capacidade de a adenosina inibir a hipernocicepção mecânica induzida tanto pelo estímulo carragenina, quanto pelos mediadores finais da cascata hipernociceptica PGE_2 e dopamina. De fato, o pré-tratamento com Ado (100 mg/Kg, i.p., 15 minutos) revelou resposta similar a obtida com a F1,6BP, pois a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg foi inibida em 35% pela dose de 100 mg/Kg e 41% pela dose de 300 mg/Kg, enquanto a dose de 30 mg/Kg revelou uma tendência de inibição não confirmada estatisticamente (Figura 9, painel A). Além disso, a adenosina também se demonstrou capaz de inibir parcialmente a hipernocicepção induzida pelos mediadores nociceptivos diretos PGE_2 (43%) e dopamina (39%) (Figura 9, painéis B e C, respectivamente).

Além disso, o presente trabalho têm elucidado que é possível reverter a atividade anti-hipernociceptiva da F1,6BP sobre a Cg, Prostaglandina E_2 e dopamina com o uso do antagonista seletivo para o receptor A_1 de adenosina DPCPX administrado tanto sistemicamente, quanto localmente (Figuras 10 e 11), comprovando farmacologicamente a participação desse nucleosídeo purínico no mecanismo de ação da F1,6BP. É coerente supor, portanto, a incapacidade celular de regulação da via glicolítica devido a penetração da F1,6BP, ocasione uma série de reações que ocasione uma elevação dos níveis de adenosina citoplasmática, ou ainda de adenosina extracelular através da ação de ecto-5'-nucleotidases ancoradas na membrana celular sobre o AMP intracelular que se difunde a favor de um gradiente de concentração para o exterior celular (Figura 4; BOROEVIC et al., 2006; FREDHOLM et al., 2001). Além disso, há evidências de que a F1,6BP também possa provocar um

aumento do ATP extracelular, o qual pode ser hidrolisado por um conjunto de ectonucleotidasas que se localizam na superfície celular, no meio intersticial ou em fluidos corporais (CUNHA, 2001; FARIAS, SMITH, MARKOV, 1990; ZIGANSHIN, HOYLE, BURNSTOCK, 1994; ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

O aumento da concentração citoplasmática de adenosina faz com que ela seja distribuída para as células circunvizinhas por transportadores bidirecionais de adenosina (Figura 3) até equilibrar os níveis intra e extracelulares (DUNWIDDIE, DIAO, PROCTOR, 1997; FREDHOLM et al., 2001), tornando-se disponível para se ligar a receptores de adenosina disponíveis na superfície das células ou para elevar sua concentração plasmática, como também comprovado pelo presente trabalho (Figura 15), e por meio da corrente sangüínea atingir outros tecidos e desempenhar atividade farmacológica.

Por conseguinte, a constatação do aumento da concentração plasmática de adenosina a partir da administração do intermediário glicolítico D-Frutose-1,6-difosfato (F1,6BP) é importante não apenas para de fato comprovar que a via analgésica da F1,6BP é dependente da produção de adenosina, como também para sugerir uma possível forma de ação para F1,6BP em outras linhas de pesquisa, as quais poderão insinuar seus resultados através de mecanismos celulares esclarecidos que ocorram em resposta a ativação dos diferentes subtipos de receptores de adenosina, alavancando a descrição da F1,6BP como um fármaco potencial nas diversas linhas de pesquisa em que vêm sendo estudada.

6. CONCLUSÕES

Em sintonia com a literatura, os resultados do presente trabalho apóiam-se na teoria de que F1,6BP é capaz de aumentar a quantidade extracelular de adenosina (foco central dessa tese) supostamente como resultado do aumento da síntese dos nucleotídeos de adenina ou por hidrólise enzimática de ATP.

É pertinente supor que a F1,6BP possa submeter-se no interior celular às vias enzimáticas: (i) via glicolítica, (ii) neoglicogênese e (iii) via das pentoses fosfato. Quando a F1,6BP entrar na célula a via glicolítica não poderá ser regulada, tornando excessiva a produção de ATP, que pode ser hidrolisado até adenosina por enzimas do tipo 5'-nucleotidase. Por outro lado, em órgãos como rins e fígado a grande expressão da frutose-1,6-difosfatase poderia conduzir a F1,6BP à neoglicogênese. Em uma das etapas dessa via ocorre produção de glicose-6-fosfato que é também substrato da via das pentoses fosfato, a qual promove por meio de uma série de reações o aumento da síntese de AMP (nucleotídeo de adenina) com o consumo de ATP. Esse AMP excedente, então, poderia ser convertido por enzimas do tipo 5'-nucleotidase citoplasmática a adenosina.

Após alcançar o interstício por meio de um transporte extracelular via transportadores bidirecionais, essa adenosina seria capaz de atuar localmente exercendo ação farmacológica como a redução da atividade nociceptiva demonstrada por esse trabalho; ou atingir a circulação e elevar sua concentração plasmática normal, como também demonstrado aqui com a aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência, e tornar-se disponível para atuar nos diversos tecidos responsivos à adenosina da mesma forma como a adenosina administrada exogenamente. E isso justificaria o fato de adenosina e F1,6BP possuírem as diversas atividades similares reportadas por vários pesquisadores.

Nesse sentido, essa tese almejou, também, comparar as atividades equivalentes de F1,6BP e adenosina em experimentos ainda não descritos na literatura. Com esse objetivo, foi demonstrado que ambas são capazes de reduzir a nocicepção de maneira similar e que esse efeito em ambos os casos não é dependente da migração celular ou da produção de citocinas no sítio inflamatório, mas da ação da adenosina sobre receptores A_1 de adenosina da

fibra nociceptiva. Esse fato foi constatado em virtude de um antagonista seletivo para receptores A_1 de adenosina ter sido capaz de reverter a atividade de ambas, F1,6BP e adenosina, comprovando também de maneira indireta a presença e participação da adenosina na atividade desempenhada pela F1,6BP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAH, A.; BENGHUZZI, H.; TUCCI, M.; HUANG, D.; FRANKLIN, L.; ADAH, F. Metabolic effects of fructose 1,6-bisphosphate in normoxic and hypoxic states of MG63 osteosarcoma cells. **Biomed Sci Instrum.**, New York, v.42, p.120-125, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos. Anvisa, Brasília, Resolução n.899, 29/05/2003.

AGTERESCH, H.J.; DAGNELIE, P.C.; VAN DEN BERG, J.W.; WILSON, J.L. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs.**, New York, v.58, n.2, p.211 –232, 1999.

AGGARWAL, B.B.; PURI, R.K. Common and uncommon features of cytokines and cytokines receptors: an overview. In AGGARWAL, B.B.; PURI, R.K. Human cytokines their role in disease and therapy. **Ann Arbour: Blackwell Science.**, v.1, p.3–24. 1995.

AHN, S.M.; YOON, H.Y.; LEE, B.G.; PARK, K.C.; CHUNG, J.H.; MOON, C.H.; LEE, S.H. Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E2 production and cyclo-oxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. **Br J Pharmacol.**, London, v.137, p.497-503, 2002.

AKIMITSU, T.; WHITE, J.A.; CARDEN, D.L.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Fructose-1,6-diphosphate or adenosine attenuate leukocyte adherence in postischemic skeletal muscle. **Am J Physiol.**, Washington, v.269, p.H1743-1751, 1995.

ALVES-FILHO, J.C.F.; VIANNA-SANTOS, R.C.; CASTAMAN, T.A.; DE OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. **Pharmacol Res.**, London, v.49, p.245-248, 2004.

ANDERSON, C.M.; XIONG, W.; YOUNG, J.D.; CASS, C.E.; PARKINSON, F.E. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. **Brain Res Mol Brain Res.**, Amsterdam, v.42, n.2, p.358–361, 1996.

ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H.L.; LOPES, W.A.; MARTINS, S.; AMORIM, A.M.; BRANDÃO, A.M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, v.18, n. 4, p. 379-381, 1995.

ANTUNES, N.; MARTINUSSO, C.A.; TAKIYA, C.M.; DA SILVA, A.J.; DE ORNELLAS, J.F.; ELIAS, P.R.; LEITE, M.J.R.; CARDOSO, L.R. Fructose-1,6 diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, New York, v.69, n.1, p.68-72, 2006.

BAICU, S.C.; SIMMONS, P.M.; CAMPBELL, L.H.; TAYLOR, M.J.; BROCKBANK, K.G. Interstitial fluid analysis for assessment of organ function. **Clin Transplant.**, Copenhagen, v.18, n.12, p.16-21, 2004.

BAILEY, E.; STIRPE, F.; TAYLOR, C.B. Regulation of rat liver pyruvate kinase. The effect of preincubation, pH, copper ions, fructose 1,6-diphosphate and dietary changes on enzyme activity. **Biochem. J.**, London, v.108, n.3, p.427-436, 1968.

BALDWIN, S.A.; MACKEY, J.R.; CASS, C.E.; YOUNG, J.D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. **Mol Med Today**, Cambridge, v.5, n.5, p.216–224, 1999.

BASTIA, E., VARANI, K., MONOPOLI, A., BERTORELLI, R. Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. **Neurosci Lett.**, Amsterdam, v.328, n.3, p.241-244, 2002.

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemical Research**, New York, v.16, n.12, p.1303-1310, 1991.

BELLONI, F.L.; WANG, J.; HINTZE, T.H. Adenosine causes bradycardia in pacing-induced cardiac failure. **Circulation**, Dallas, v.85, n.3, p.1118-1124, 1992.

BENNETT, G., AL-RASHED, S., HOULT JR, BRAIN, S.D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, Amsterdam, v.77, n.3, p.315-322, 1998.

BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet.**, London, n.9164, v.353, p.1610-1615, 1999.

BICKLER, P.E.; BUCK, L.T. Effects of fructose-1,6-bisphosphate on glutamate release and ATP loss from rat brain slices during hypoxia. **J Neurochem.**, Oxford, v.67, n.4, p.1463-1468, 1996.

BILZER, M.; GERBES, A.L. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Z Gastroenterol.**, München, v.40, n.7, p.543-544, 2002.

BISGAARD, H., KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, New York, v.30, n.5, p.791-797, 1985.

BLACKBURN, M.R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.24, n.2, p.66-70, 2003.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **Br J Anaesth.**, London, v.77, n.1, p.110-117, 1996.

BOMBINI, G., CANETTI, C., ROCHA, F. A., CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.496, n.1-3, p.197-204, 2004.

BOMPADRE, S.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; GIORGETTI, R.; BATTINO, M. Improved HPLC column-switching determination of Coenzyme Q and Vitamin E in plasma. **Biofactors.**, Oxford, v.32, n.1-4, p.257-262, 2008.

BORDIGNON-NUNES, F.; MEIER, C.; GRAZIOTTIN, C.; ALVES-FILHO, J.C.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; PERES, A. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. **J Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.3, n.2, p.267-272, 2003.

BOREA, P.A., DALPIAZ, A. VARANI, K., GESSI, S., GILLI, G. Binding thermodynamics at A1 and A2A adenosine receptors. **Life Sci.**, Oxford, v.59, n.17, p.1373–1388, 1996.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKŁADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.53, n.2, p.269–278, 2006.

BRACK, A., RITTNER, H.L., MACHELSKA, H., LEDER, K., MOUSA, S.A., SCHAFER, M., STEIN, C. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, Amsterdam, v.112, n.3, p.229-238, 2004.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, **J Invest Dermatol.**, Baltimore, v.78, n.3, p.206–209, 1982.

BROCH, O.J.; UELAND, P.M. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. **J Neurochem.**, Oxford, v.35, n.2, p.484–488, 1980.

CANETTI, C., SILVA, J. S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor- α and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.134, n.8, p.1619-1628, 2001.

CASS, C.E.; YOUNG, J.D.; BALDWIN, S.A. Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. **Biochem Cell Biol.**, Ottawa, v.76, n.5, p.761– 770, 1998.

CATTANI, L.; COSTRINI, R.; CERILLI, C. Fructose-1,6-diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. **Agressologie.**, Paris, v.21, n.5, p.263, 1980.

CATTANI, L.; COSTRINI, R.; LAZZARINO, G.; DIANA, M.; GALZIGNA, L. Fructose-1,6-diphosphate counteracts potassium effects on cardiac muscle. **Pharmacol Res Commun.**, New York, v.16, n.8, p. 785–793, 1984.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: Viewpoint and discussion. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.**, Amsterdam, v.689, n.1, p.175 – 180, 1997.

CATROUX, P.; BENCHEKROUN, N.; ROBERT, J.; CAMBAR, J. Influence of trimetazidine on deleterious effect of oxygen radical species in post-ischemic acute renal failure in the rat. *Cardiovasc Drugs Ther.*, Norwell, v.4 n.4, p.816-817, 1990.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev Bras Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CHEN, W., GUIDOTTI, G. Soluble apyrase releases ADP during ATP hydrolysis. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v.282, n.1, p.90–95, 2001.

CHLOUVERAKIS, C. The lipolytic action of fructose-1,6-diphosphate. **Metabolism.**, New York, v.17, n.8, p. 708-716, 1968.

CHU, S.J.; CHANG, D.M.; WANG, D.; CHEN, Y.H.; HSU, C.W.; HSU, K. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Crit Care Med.**, New York, v.30, n.7, p.1605–1609, 2002.

CODERRE TJ. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. **Neurosci Lett.**, Amsterdam, v.140, n.2, p.181-184, 1992.

CODERRE, T.J., ABBOT, F.V. & MELZACK, R. Effects of peripheral antisympathetic treatments in tail-flick, formalin and autotomy tests. **Pain.**, Amsterdam, v.18, n.1, p.13-23, 1984.

COHEN, J.E.; ATLURI, P.; TAYLOR, M.D.; GRAND, T.J.; LIAO, G.P.; PANLILIO, C.M.; SUAREZ, E.E.; ZENTKO, S.E.; HSU, V.M.; BERRY, M.F.; SMITH, M.J.; GARDNER, T.J.; SWEENEY, H.L.; WOO, Y.J. Fructose 1,6-diphosphate administration attenuates post-ischemic ventricular dysfunction. **Heart Lung Circ.**, Carlton, v.15, n.2, p.119-23, 2006.

COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother.**, London, v.32, n.2, p.295–310, 1968.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 5ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CONTI, P.; REALE, M.; FIORE, S.; CANCELLI, A.; ANGELETTI, P.U.; DINARELLO, C. A. Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor acting in synergy to release thromboxane, 6-KETO-PGF₁ and PGE₂ by human neutrophils. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v.75, p.318-324, 1988.

CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. **Front Biosci.**, Tampa, v.9, p.1433–1449, 2004.

COUSINS, M.J.; COHEN, M.L. Physiology and Psychology of Acute Pain, in *Acute Pain Management: Scientific Evidence* (Cousins MJ and Cohen ML eds), Australian and New Zealand College of Anaesthetists, Melbourne, p. 1-19, 2005.

CROSTEIN, B.N.; ROSENSTEIN, E.D.; KRAMER, S.B.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A₂ receptor on human neutrophils. **J Immunol.**, Baltimore, v.135, n.2, p.1366-1371, 1985.

CUESTA, E.; BOADA, J.; CALAFELL, R.; PERALES, J.C.; ROIG, T.; BERMUDEZ, J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. **Crit Care Med.**, New York, v.34, n.3, p.807-814, 2006.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv Exp Med Biol.**, New York, v.521, p.22-39, 2003.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int.**, Oxford, v.38, n.2, p.107– 125, 2001.

CUNHA, T.M.; VERRI W.A. JR; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.**, São Paulo, v.37, n.3, p.401-407, 2004.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice, **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.102, n.5, p.1755–1760, 2005.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol.**, New York, v.83, n.4, p.824-832, 2008.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol.**, London, v.104, n.3, p.765-767, 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, London, v.107, n.3, p.660-664, 1992.

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, London, v.127, n.3, p.671-678, 1999.

DA SILVA TORRES, I.L.; BONAN, C.D.; CREMA, L.; DE LEON NUNES, M.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; DALMAZ, C.; FERREIRA, M.B. Effect of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.481, n.2-3, p.197-201, 2003.

DAHLGREN, G.M.; NOLKRANTZ, K.; KENNEDY, R.T. Effect of intracellular delivery of energy metabolites on intracellular Ca²⁺ in mouse islets of Langerhans. **Life Sci.**, Oxford, v.77, n.23, p.2986-2997, 2005.

DAVAL, J.L.; NICOLAS, F.; DORIAT, J.F. Adenosine physiology and pharmacology: how about A₂ receptors? **Pharmacol Ther.**, Oxford, v.71, n.3, p.325-335, 1996.

DE OLIVEIRA, J.R.; ROSA, J.L.; AMBROSIO, S. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism; protective role of fructose-1,6-bisphosphate. **Hepatology**, Baltimore, v.15, n.6, p.1147-1153, 1992.

DEUSSEN, A.; LLOYD, H.G.; SCHRADER, J. Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. **J Mol Cell Cardiol.**, London, v.21, n.8, p.773-782, 1989.

DIDLAKE, R.; KIRCHNER, K.A.; LEWIN, J.; BOWER, J.D.; MARKOV, A.K. Attenuation of ischemic renal injury with fructose-1,6-diphosphate. **J Surg Res.**, Philadelphia, v.47, n.3, p.220–226, 1989.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest.**, Chicago, v.118, n.2, p.503-508, 2000.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A. Jr; O'CONNOR, J.V. Tumour necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J. Exp. Med.**, New York, v.163, n.6, p.1443-1450, 1986.

DINARELLO, C.A.; IKEJIMA, T.; WARNER, S.J.C.; ORENCOLE, S.F.; LONNEMANN, G.; CANNON, J.G.; LIBBY, P. Interleukin 1 induces Interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin I in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, v.139, n.6, p.1902-1910, 1987.

DONOHUE, P.H.; FAHLMAN, C.S.; BICKLER, P.E.; VEXLER, Z.S.; GREGORY, G.A. Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. **Brain Res.**, Amsterdam, v.917, n.2, p.158-166, 2001.

DOMANSKI, L.; SULIKOWSKI, T.; SAFRANOW, K.; PAWLIK, A.; OLSZEWSKA, M.; CHLUBEK, D.; URASINSKA, E.; CIECHANOWSKI, K. Effect of trimetazidine on the nucleotide profile in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. **Eur J Pharm Sci.**, Amsterdam, v.27, n.4, p.320-327, 2006.

DUNWIDDIE, T.V.; DIAO, L.; PROCTOR, W.R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. **J Neurosci.**, Baltimore, v.17, n.20, p.7673-7682, 1997.

EASTGATE, J.A.; SYMONS, J.A.; WOOD, N.C.; GRINLINTON, F.M.; DI GIOVINE, F.S.; DUFF, G.W. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. **Lancet.**, London, v.2, n.8613, p.706–709, 1988.

EDDE, L.; ZHOU, X.; EATON, J.W.; SHERMAN, M.P. Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by fructose-1,6-diphosphate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.243, n.3, p.683-687, 1998.

EDDY, L.J.; CHAMBERS, D.; HONIG, S; DOWNEY, J.M. Lack of a direct metabolic effect of fructose-1,6-diphosphate in ischemic myocardium. **Am. J. Physiol.**, Washington, v.241, n.4, p.H576–H582, 1981.

EHRINGER, W.D.; NIU, W.; CHIANG, B.; WANG, O.L.; GORDON, L.; CHIEN, S. Membrane permeability of fructose-1,6-diphosphate in lipid vesicles and endothelial cells. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v.210, n.1-2, p.35-45, 2000.

EHRINGER, W.D.; CHIANG, B.; CHIEN, S. The uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate in rat cardiomyocytes. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v.221, n.1-2, p.33-40, 2001.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; MENARD, J.F.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J.M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **Br J Pharmacol.**, London, v.129, n.7, p.1465-1473, 2000.

ESPANOL, M.T.; LITT, L.; HASEGAWA, K.; CHANG, L.H.; MACDONALD, J.M.; GREGORY, G.; JAMES, T.L.; CHAN, P.H. Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. **Anesthesiology.**, Philadelphia, v.88, n.2, p.461-472, 1998.

EURACHEM WORKING GROUP (EURACHEM). Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom, 1998.

FARIAS, L.A.; SMITH, E.E.; MARKOV, A.K. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. **Stroke.**, New York, v.21, n.4, p.606–613, 1990.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol.**, London, v.240, n.102, p.200-203, 1972.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature.**, London, v.334, n.6184, p.698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions.**, Basel, v.38, p.C7-C9, 1993a.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, London, v.110, n.3, p.1227-1231, 1993b.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I-Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins.**, New York, v.18, n.2, p.179-190, 1979.

FLÓREZ, J. Terapéutica Farmacológica del dolor, in Dolor: mecanismos de transmission y control. (Flórez J ed), Madrid, p. 19-39, 1993.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRUNET, G.; SAVARD, P.; CHARLESON, S. Leukotriene B₄, polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. **Prostaglandins**., New York, v.28, n.1, p.13-27, 1984.

FORTES-AIUB, C.A.; BORTOLINI, R.; ARRIEIRA-AZAMBUJA, A.; ALVES-FILHO, J.C.; BORDIGNON-NUNES, F.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, J. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. **Hepatol Res.**, Amsterdam, v.25, n.1, p.83-91, 2003.

FREDDUZZI, S.; MORATALLA, R.; MONOPOLI, A.; CUELLAR, B.; XU, K.; ONGINI, E. Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A_{2A} adenosine receptors. **J Neurosci.**, Washington, v.22, n.3, p.1054-1062, 2002.

FREDHOLM, B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ.**, London, v.14, n.7, p.1315-1323, 2007.

FREDHOLM, B.B.; LJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.53, n.4, p.527-552, 2001.

FREISSMUTH, M.; SCHUTZ, W.; LINDER, M.E. Interactions of the bovine brain A₁-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.266, n.27, p.17778-17783, 1991a.

FREISSMUTH, M.; SELZER, E.; SCHUTZ, W. Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. **Biochem J.**, London, v.275, n.3, p.651-656, 1991b.

GALZIGNA, L.; RIGOBELLO, M. Proton and potassium fluxes in rat red blood cells incubated with sugar phosphates. **Experientia.**, Basel, v.42, n.2, p. 138–139, 1986.

GALZIGNA, L.; RIZZOLI, V.; BIANCHI, M.; RIGOBELLO, M.; SCURI, R. Some effects of fructose-1,6-diphosphate on rat myocardial tissue related to membrane-stabilizing action. **Cell Biochem. Funct.**, Guildford, v.7, n.2, p.91–96, 1989.

GEISE, R.W. Technical considerations in the use of “high-performance” liquid chromatography in therapeutic drug monitoring. **Clin Chem.**, Baltimore, v.29, n.7, p.1331-1343, 1983.

GRANSTEIN, R. D.; MARGOLIS, R.; MIZEL, S. B.; SAUDER, D. N. In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. **J Clin Invest.**, New Haven, v.77, n.3, p.1020-1027, 1986.

GREGORY, G.A.; WELSH, F.A.; YU, A.C.; CHAN, P.H. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. **Brain Res.**, Amsterdam, v.516, n.2, p.310-312, 1990.

GOLD, M.S.; REICHLING, D.B.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.93, n.3, p.1108-1112, 1996.

GUIMARÃES, L.F.L.; COLLINS, C.H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. São Paulo : Unicamp, p.183-195, 1997.

HARADA, N.; OKAJIMA, K.; KATSURAJI, T. Adenosine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury by inhibiting leukocyte activation. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v.114, n.1, p.159-167, 1999.

HANNINGTON-KIFF, J.G. Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. **Lancet.**, London, v.25, n.7865, p.1019-1020, 1974.

HABAZETTL, H.; CONZEN, P.F.; VOLLMAR, B.; BAIER, H.; CHRIS, M.; GOETZ, A.E.; PETER, K.; BRENDDEL, W. Dilation of coronary microvessels by adenosine induced hypotension in dogs. **Int J Microcirc Clin Exp.**, The Hague, v.11, n.1, p.51-65, 1992.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.**, Oxford, v.25, n.1, p.33-39, 2004.

HARDIN, C.D.; LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; ROBERTS, T.M.; GIARDINA, B.; ROVETTO, M.J. Myocardial metabolism of exogenous FDP is consistent with transport by a dicarboxylate transporter. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, Bethesda, v.281, n.6, p.H2654-H2660, 2001.

HARDIN, C.D.; ROBERTS, T.M. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. **Am J Physiol.**, Washington, v.267, n.6 Pt2, p.H2325-H2332, 1994.

HASSINEN, I.E.; NUUTINEN, E.M.; ITO, K.; NIOKA, S.; LAZZARINO, G.; GIARDINA, B.; CHANCE, B. Mechanism of the effect of exogenous fructose

1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. **Circulation**, Dallas, v.83, n.2, p.584-593, 1991.

HAUET, T.; BAUMERT, H.; MOTHE, D.; GERMONVILLE, T.; CARITEZ, J.C.; CARRETIER, M.; JOURNE, F.; EUGENE, M.; TILLEMENT, J.P. Lipid peroxidation after cold storage and normothermic reperfusion: the effect of trimetazidine. *Transpl Int.*, v.11, n.1, p.S408-S409, 1998.

HAYSLETT, J.P.; MACALA, L.J.; SMALLWOOD, J.I.; KALGHATGI, L.; GASALLA-HERRAIZ, J.; ISALES, C. Adenosine stimulation of Na⁺ transport is mediated by an A1 receptor and a [Ca²⁺]_i-dependent mechanism. **Kidney Int.**, v.47, n.6, p.1576-84, 1995.

HEARN, G.M. A guide to validation in HPLC. **Perkin Elmer**, London, p.20, 1992.

HINGTGEN, C.M.; WAITE, K.J.; VASKO, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. **J Neurosci.**, Baltimore, v.15, n.7 Pt2, p.5411-5419, 1995.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Med (Tokyo)**, Tokyo, v.5, n.1, p.S45-S57, 2003.

HUANG, S.; APASOV, S.; KOSHIBA, M.; SITKOVSKY, M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. **Blood.**, New York, v.90, n.4, p.1600-1610, 1997.

INSEL, P.A. Fármacos Analgésicos - Antipiréticos e Antiinflamatórios e Medicamentos usados no Tratamento da Gota, in *As Bases Farmacológicas da*

Terapêutica (Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Gilmand AG eds) p.450-452, 1996.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedures: methodology. Q2B, Geneve, 1996.

IRVING, M.G.; WILLIAMS, J.F. Kinetic studies on the regulation of rabbit liver pyruvate kinase. **Biochem. J.**, London, v.131, n.2, p.287-301, 1973.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference: I. The interferon. By Alick Isaacs and Jean Lindenmann, 1957. **CA Cancer J Clin.**, New York, v.38, n.5, p.208–290.

ISSEKUTZ, A. C. Role of polymorphonuclear leukocytes in the vascular responses of acute inflammation. **Lab Invest.**, New York, v.50, n.6, p.605-607, 1984.

JABBUR, S.J.; SAADÉ, N.E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain.**, Amsterdam, v.6, p.S87-S92, 1999.

JAIN, N.; KEMP, N.; ADEYEMO, O.; BUCHANAN, P.; STONE, T.W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. **Br J Pharmacol.**, London, v.116, n.3, p.2127-2133, 1995.

JAMES, S.; RICHARDSON, P.J. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. **J Neurochem.**, London, v.60, n.1, p.219-227, 1993.

JUERGENS, T.M.; HARDIN, C.D. Fructose-1,6-bisphosphate as a metabolic substrate in hog ileum smooth muscle during hypoxia. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v.154, n.1, p.83-93, 1996.

KANDA, T.; JACKSON, M.J.; SMITH, L.A.; PEARCE, R.K.; NAKAMURA, J.; KASE, H. Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. **Ann Neurol.**, Boston, v.43, n.4, p.507-513, 1998.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.**, Hilversum, v.4, n.3, p.273-279, 2005.

KARLSTEN, R.; GORDH, T. An A1-selective adenosine agonist abolishes allodynia elicited by vibration and touch after intrathecal injection. **Anesth Analg.**, Cleveland, v.80, n.4, p.844–847, 1995.

KARLSTEN, R.; POST, C.; HIDE, I.; DALY, J.W. The antinociceptive effect of intrathecally administered adenosine analogs in mice correlates with the affinity for the A1-adenosine receptor. **Neurosci Lett.**, Amsterdam, v.121, n.1-2, p.267–270, 1991.

KARLSTEN, R.; GORDH, T.; POST, C. Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. **Pharmacol Toxicol.**, Copenhagen, v.70, n.6, p.434-438, 1992.

KHANDWALA, H.; ZHANG, Z.; LOOMIS, C.W. Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A1 but not A2-receptors in the rat. **Brain Res.**, Amsterdam, v.808, n.1, p.106-109, 1998.

KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J Neurophysiol.**, Washington, v.81, n.3, p.1104-1112, 1999.

KHASAR, S.G.; WANG, J.F.; TAIWO, Y.O.; HELLER, P.H.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.D. Mu-opioid agonist enhancement of prostaglandin-induced hyperalgesia in the rat: A G-protein beta gamma subunit-mediated effect? **Neuroscience.**, Oxford, v. 67, n.1, p. 189-195, 1995.

KLINGER, M.; FREISSMUTH, M.; NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signaling and the role of accessory proteins. **Cell Signal.**, Oxford, v.14, n.2, p.99-108, 2002.

KOCKSKÄMPER, J.; ZIMA, A.V.; BLATTER, L.A. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by glycolysis in cat atrial myocytes. **J Physiol.**, Paris, v.564, n.3, p.697-714, 2005.

LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Ed. Rima, São Carlos, p.62, 2004.

LAPPAS, C.M.; RIEGER, J.M.; LINDEN, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4⁺ T cells. **J Immunol.**, Baltimore, v.174, n.2, p.1073-1080, 2005.

LARA, D.R.; BRUNSTEIN, M.G.; GHISOLFI, E.S.; LOBATO, M.I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.; SOUZA, D.O. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. **Int Clin Psychopharmacol.**, London, v.16, n.4, p.235-237, 2001.

LAZZARINO, G.; CATTANI, L.; COSTRINI, R.; MULIERI, L.; CANDIANI, A.; GALZIGNA, L. Increase of intraerythrocytic fructose-1,6-diphosphate after

incubation of whole human blood with fructose-1,6-diphosphate. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.17, n.1, p.42-45, 1984.

LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; GIARDINA, B. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. **Free Radic. Res. Commun.**, Roma, v.16, n.5, p.325-339, 1992.

LAZZARINO, G.; NUUTINEN, M.E.; TAVAZZI, B.; CERRONI, L.; DI PIERRO, D.; GIARDINA, B. Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated langendorff-perfused rat hearts. **J Mol Cell Cardiol.**, London, v.23, n.1, p.13-23, 1991.

LEDENT, C.; VAUGEOIS, J.M.; SCHIFFMANN, S.N.; PEDRAZZINI, T.; EL YACOUBI, M.; VANDERHAEGHEN, J.J. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. **Nature.**, London, v.388, n.6643, p.674-678, 1997.

LEE, J.; HEO, J.; OGILBY, J.D.; CAVE, V.; ISKANDRIAN, B.; ISKANDRIAN A.S. Atrioventricular block during adenosine thallium imaging. **Am Heart J.**, St. Louis, v.123, n.6, p.1569-1574, 1992.

LEE, J.K.; WON, J.S.; SINGH, A.K.; SINGH, I. Adenosine kinase inhibitor attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. **Neuropharmacology**, Oxford, v.48, n.1, p.151-160, 2005.

LEVINE, J.D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E.J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science.**, New York, v.225, n.4663, p.743-745, 1984.

LI, L.Y.; WANG, H.Y.; SHI, J.H. Protective effect of 1,6-diphosphate fructose in ischemic renal failure in elderly rats. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, Beijing, v.74, n.1, p.9-12, 1994.

LIAN, X.Y.; KHAN, F.A.; STRINGER, J.L. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. **J Neurosci.**, Baltimore, v.27, n.44, p.12007-12011, 2007.

LOGUERCIO, C.; NARDONE, G.; SICOLO, P.; CUOMO, R.; DEL VECCHIO, C.; BUDILLON, G. Intravenous load of fructose and fructose 1,6-diphosphate: effects on uricemia in patients with nonalcoholic liver disease. **Am J Gastroenterol.**, New York, v.91, n.3, p.559-564, 1996.

LONDOS, C.; COOPER, D.M.; WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.77, n.5, p.2551-2554, 1980.

LONG, J.; ZHANG, Z.; LI, X. The protective mechanism of fructose-1, 6-diphosphate on ischemic brain injury. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, Beijing, v.82, n.4, p.232-235, 2002.

LOPES, R.P.; LUNARDELLI, A.; PREISLER, T.; LEITE, C.E.; ALVES-FILHO, J.C.; NUNES, F.B.; DE OLIVEIRA, J.R.; BAUER, M.E. The effects of fructose-1,6-bisphosphate and dexamethasone on acute inflammation and T-cell proliferation. **Inflamm. Res.**, Basel, v.55, n.8, p.354-358, 2006.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.114, n.3, p.375-381, 1985.

LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw.**, Montrouge, v.13, n.4, p.456-461, 2002.

LUKKARINEN, H.; LAINE, J.; AHO, H.; ASIKAINEN, E.; PENTTINEN, P.; KAAPA, P. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. **Pediatr Res.**, Basel, v.59, n.3, p.412-417, 2006.

LYNN, B.; O'SHEA, N. R. Inhibition of forskolin-induced sensitisation of frog skin nociceptors by the cyclic AMP-dependent protein kinase A antagonist H-89. **Brain Res.**, Amsterdam, v.780, n.2, p.320–362, 1998.

MACALA, L.J.; HAYSLETT, J.P. Basolateral and apical A1 adenosine receptors mediate sodium transport in cultured renal epithelial (A6) cells. **Am J Physiol Renal Physiol.**, Bethesda, v.283, n.6, p.F1216-25, 2002.

MAIONE, S.; DE NOVELLIS, V.; CAPPELLACCI, L.; PALAZZO, E.; VITA, D.; LUONGO, L.; STELLA, L.; FRANCHETTI, P.; MARABESE, I.; ROSSI, F.; GRIFANTINI, M. The antinociceptive effect of 2-chloro-2'-C-methyl-N6-cyclopentyladenosine (2'-Me-CCPA), a highly selective adenosine A1 receptor agonist, in the rat. **Pain.**, Amsterdam, v.131, n.3, p.281-292, 2007.

MALMBERG, A.B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . **Science.**, New York, v.278, n.5336, p.279-283, 1997.

MALHOTRA, J.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y.K. Dopaminergic involvement in adenosine A1 receptor-mediated antinociception in the tail flick latency model in

mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, Barcelona, v.22, n.1, p.37-41, 2000.

MARANGOS, P.J.; FOX, A.W.; RIEDEL, B.J.; ROYSTON, D.; DZIEWANOWSKA, Z.E. Potential therapeutic applications of fructose-1,6-diphosphate. **Expert Opin Investig Drug.**, London, v.7, n.4, p.615-623, 1998.

MARKOV, A.K. Hemodynamics and metabolic effects of fructose 1-6 diphosphate in ischemia and shock--experimental and clinical observations. **Ann Emerg Med.**, Lansing, v.15, n.12, p.1470-1477, 1986.

MARKOV, A.K.; OGLETHORPE, N.C.; BLAKE, T.M.; LEHAN, P.H.; HELLEMS, H.K. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. **Am Heart J.**, St. Louis, v.100, n.5, p.639-646, 1980.

MARTIN, F.L.; MCLEAN, A.E. Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose-1,6-diphosphate. **Toxicology**, Amsterdam, v.108, n.3, p.175-184, 1996.

MIHAS, A.A.; KANJI, V.K.; MIHAS, T.A.; JOSEPH, R.M.; MARKOV, A.K.; HEUMAN, D.M. Fructose diphosphate attenuates the acetaminophen-induced liver injury in the rat evidence for involvement of nitric oxide. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.**, Westbury, v.113-114, p.253-266, 2003.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.**, Oxford, v.57, n.1, p.1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol.**, Oxford, v.66, n.6, p.355-474, 2002.

MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature**, v.246, n.5430, p.217-219, 1973.

MORESCO, R.N.; SANTOS, R.C.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, A.A.; DOS REIS, C.; REICHEL, C.L.; DE OLIVEIRA, J.C. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. **Transplant Proc.**, New York, v.36, n.5, p.1261-1264, 2004.

MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. **Histol Histopathol.**, Murcia, v.14, n.4, p.1321-1340, 1999.

MUNSHI, R.; PANG, I.H.; STERNWEIS, P.C.; LINDEN, J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.266, n.33, p.22285-22289, 1991.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v.135, n.2, p.145-153, 1987.

NAKAI, T.; TANIMURA, H.; TABUSE, K.; NAGAI, Y.; MORI, K.; YAMOTO, H. Beneficial effects of fructose-1,6-diphosphate infusion on liver regeneration after ischemic liver injury. **Gastroenterol Jpn.**, v.26, n.5, p.611-618, 1991.

NARAYAN, P.; MENTZER, R.M. JR; LAZLEY, R.D. Adenosine A1 receptor activation reduces reactive oxygen species and attenuates stunning in ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol.**, London, v.33, n.1, p.121-129, 2001.

NOOTENS, M.; SCHRADER, B.; KAUFMANN, E.; VESTAL, R.; LONG, W.; RICH, S. Comparative acute effects of adenosine and prostacyclin in primary pulmonary hypertension. **Chest.**, Chicago, v.107, n.1, p.54-57, 1995.

NUNES, F.B.; PIRES, M.G.S.; ALVES FILHO, J.C.; WÄCHTER, P.H.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. **Crit Care Med.** v.30, n.9, p.2069-2074, 2002.

NUNES, F.B.; GRAZIOTTIN, C.M.; ALVES-FILHO, J.C.; LUNARDELLI, A.; PIRES, M.G.; WÄCHTER, P.H.; DE OLIVEIRA, J.R. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. **Pharmacol. Res.**, London, v.47, n.1, p.35-41, 2003.

NUUTINEN, E.M.; LAZZARINO, G.; GIARDINA, B.; HASSINEN, I.E. Effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on glycolysis in the isolated perfused rat heart. **Am. Heart. J.**, St. Louis, v.122, n.2, p.523-527, 1991.

OKUSA, M.D. A(2A) adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. **Am J Physiol Renal Physiol.**, Bethesda, v.282, n.1, p.F10-F18, 2002.

OYANAGUI, Y. Fructose-1,6-diphosphate enhanced oxyradicals and nitric oxide-dependent suppressions by dexamethasone of ischemic and histamine paw edema of mice. **Life Sci.**, Oxford, v.62, n.15, p.PL241-PL249, 1998.

PAN, H.L.; XU, Z.; LEUNG, E.; EISENACH, J.C. Allosteric adenosine modulation to reduce allodynia. **Anesthesiology.**, Philadelphia, v.95, n.2, p.416-420, 2001.

PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v.100, n.5, p.2923–2928, 2003.

PARONI, R.; FAIONI, E.M.; RAZZARI, C.; FONTANA, G.; CATTANEO, M. Determination of vitamin K(1) in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, Amsterdam, v.877, n.3, p.351-354, 2009.

PENNEY, D.G.; CASCARANO J. Anaerobic rat heart. Effects of glucose and tricarboxylic acid-cycle metabolites on metabolism and physiological performance. **Biochem J.**, v.118, n.2, p.221–227, 1970.

PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **J Chromatogr.**, Amsterdam, v.531, p.3-50, 1990.

PETERS, F.T.; MAURER, H.H. Bioanalytical method validation and its implication for forensic and clinical toxicology – a review. **Accred Qual Assur.**, New York, v.7, p.441-449, 2002.

PLANAS, M.E.; SANCHEZ, S.; GONZALEZ, P.; DE OLIVEIRA, J.R.; BARTRONS, R. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.237, n.2-3, p.251-255, 1993.

POMMIER, F.; SIOUFI, A.; GODBILLON, J. Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.**, Amsterdam, v.703, n.1-2, p.147-158, 1997.

POLOSA, R.; RORKE, S.; HOLGATE, S.T. Evolving concepts on the value of adenosine hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v.57, n.7, p.649–654, 2002.

POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines, in: *Cytokines and Pain*, eds. Watkins, L.R.; Maier, S.F. (Eds.), Birkhäuser, Basel, p. 59–87, 1999.

POON, A.; SAWYNOK, J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.384, n.2-3, p.123-138, 1999.

PORKKA-HEISKANEN, T. Adenosine in sleep and wakefulness. **Ann Med.**, Helsinki, v.31, n.2, p.125-129, 1999.

POZHARITSKAYA, O.N.; KARLINA, M.V.; SHIKOV, A.N.; KOSMAN, V.M.; MAKAROVA, M.N.; MAKAROV, V.G. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. **Phytomedicine.**, Stuttgart, Epub ahead of print, 2008.

QUEIROZ, R.H.; BERTUCCI, C, MALFARÁ WR, DREOSSI SA, CHAVES AR, VALÉRIO DA, QUEIROZ ME. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal.**, Oxford, v.48, n.2, p.428-34, 2008.

QUEIROZ, R.H.; PEREIRA, R.C.; GOTARDO, M.A.; CORDEIRO, D.S.; MELCHIOR JR, E. Determination of clofazimine in leprosy patients by high-performance liquid chromatography. **J Anal Toxicol.**, Niles, v.27, n.6, p.377-380, 2003.

QUEIROZ, R.H.; LANCHOTE, V.L.; BONATO, P.S.; DE CARVALHO, D. Simultaneous HPLC analysis of tricyclic antidepressants and metabolites in plasma samples. *Pharm Acta Helv.*, Zürich, v.70, n.2, p.181-186, 1995.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol.**, Baltimore, v.50, n.3, p.413-492, 1998.

RAMAKERS, B.P.; RIKSEN, N.P.; RONGEN, G.A.; VAN DER HOEVEN, J.G.; SMITS, P.; PICKKERS, P. The effect of adenosine receptor agonists on cytokine release by human mononuclear cells depends on the specific Toll-like receptor subtype used for stimulation. **Cytokine.**, Philadelphia, v.35, n.1-2, p.95-99, 2006.

RAMOS, R.C.; DE MEIS, L. Glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate can be used as ATP-regenerating systems by cerebellum Ca²⁺-transport ATPase. **J Neurochem.**, Oxford, v.72, n.1, p.81-86, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.; MELO, L.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, J.A.; SEBASTIAO, A.M.; DE MENDONCA, A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug News Perspect.**, Barcelona, v.16, n.2, p.80-86, 2003.

RIGOBELLO, M.P.; BIANCHI, M.; DEANA, R.; GALZIGNA, L. Interaction of fructose-1,6-diphosphate with some cell membranes. **Agressologie.**, Paris, v.23, n.2, p.63-66, 1982.

RIRIE, D.G.; EISENACH, J.C. Age-dependent responses to nerve injury-induced mechanical allodynia. **Anesthesiology.**, Philadelphia, v.104, n.2, p.344-350, 2006.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents Actions.**, Basel, v.43, n.3-4, p.86-90, 1994.

ROCHA, J.B.; MELLO, C.F.; SARKIS, J.J.; DIAS, R.D. Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fractions of weanling rats. **Br J Nutr.**, Cambridge v.63, n.2, p.273-283, 1990.

ROIG, T.; BARTRONS, R.; BERMÚDEZ, J. Exogenous fructose 1,6-bisphosphate reduces K⁺ permeability in isolated rat hepatocytes. **Am J Physiol.**, Washington, v.273, n.2 Pt 1, p.C473-478, 1997.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol Toxicol.**, Copenhagen, v.66, n.5, p.382–386, 1990.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu Rev Med.**, v.49, p.123-133, 1998.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, London, v.115, n.7, p.1265-1275, 1995.

SALA-NEWBY, G.B.; SKLADANOWSKI, A.C.; NEWBY, A.C. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.274, n.25, p.17789–17793, 1999.

SALA-NEWBY, G.B.; FREEMAN, N.V.; SKLADANOWSKI, A.C.; NEWBY, A.C. Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.275, n.16, p.11666–11671, 2000.

SANO, W.; WATANABE, F.; TAMAI, H.; FURUYA, E.; MINO, M. Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. **Gastroenterology**, Baltimore, v.108, n.6, p.1785-1792, 1995.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm Technol.**, Eugene, v.2, p.12-20, 1998.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.347, n.1, p. 1-11, 1998.

SAWYNOK, J. Purines and pain management. **Eccur Opin Invest Drug.**, v.1, p. 27-38, 1999.

SAWYNOK, J.; DOAK, G.; POON A. Adenosine and Pain: Recent Findings with Directly and Indirectly Acting Agents. **Drug Dev Res.**, New York, v.45, n.3, p.304–311, 1998.

SAWYNOK, J.; REID, A.; POON, A. Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat formalin test. **Pain.**, Amsterdam, v.74, n.1, p.75–81, 1998.

SAWYNOK, J.; REID, A.; LIU, X.J. Acute paw oedema induced by local injection of adenosine A(1), A(2) and A(3) receptor agonists. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.386, n.2-3, p.253-261, 1999.

SAWYNOK, J.; ZARRINDAST, M.R.; REID, A.R.; DOAK, G.J. Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdam, v.333, n.1, p.1–7, 1997.

SCHRIER, D.J.; LESCH, M.E.; WRIGHT, C.D.; GILBERTSEN, R.B. The antiinflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenan-induced pleural inflammatory response in rats. **J Immunol.**, Baltimore, v.145, n.6, p.1874-1879, 1990.

SCHUBERT, P.; KOMP, W.; KREUTZBERG, G.W. Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. **Brain Res.**, Amsterdam, v.168, n.2, p.419-424, 1979.

SEDGWICK, A.D.; MOORE, A.R.; AL-DUAIJ, A.; WILLOUGHBY, D.A. Studies into the association between leucocyte accumulation and oedema formation. **Agents Actions.**, Basel, v.17, n.2, p.209-213, 1985.

SHAH, P.V.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N.; POWELL, M.L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation: a revisit with a decade of progress. **Pharm Res.**, New York, v.17, n.12, p. 1551-1557, 2000.

SHIROSHIMA, M.; WIDJAJA, A.; YASUDA, M.; OGINO, H.; ISHIMI, K.; ISHIKAWA, H. Theoretical investigation of fructose 1,6-diphosphate production and simultaneous ATP regeneration by conjugated enzymes in an ultrafiltration hollow-fiber reactor. **J Biosci Bioeng.**, Osaka, v.88, n.6, p.632-639, 1999.

SITKOVSKY, M.V. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v.65, n.4, p.493-501, 2003.

SOLA, A.; PANES, J.; XAUS, C.; HOTTER, G. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. **J Leukoc Biol.**, New York, v.73, n.1, p.74-81, 2003.

SOLA, A.; ROSELLO-CATAFAU, J.; GELPI, E.; HOTTER, G. Fructose-1,6-biphosphate in rat intestinal preconditioning: involvement of nitric oxide. **Gut.**, London, v.48, n.2, p.168-175, 2001.

SOLA, A.; DE OCA, J.; ALFARO, V.; XAUS, C.; JAURRIETA, E.; HOTTER, G. Protective effects of exogenous fructose-1,6-biphosphate during small bowel transplantation in rats. **Surgery**, St. Louis, v.135, n.5, p.518-526, 2004.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett.**, Amsterdam, v.361, n.1-3, p.184-187, 2004.

SOSNOWSKI, M.; STEVENS, C.W.; YAKSH, T.L. Assessment of the role of A1/A2 adenosine receptors mediating the purine antinociception, motor and autonomic function in the rat spinal cord. **J Pharmacol Exp Ther.**, Baltimore, v.250, n.3, p.915–922, 1989.

SOUZA, A.L.; MOREIRA, F.A.; ALMEIDA, K.R.; BERTOLLO, C.M.; COSTA, K.A.; COELHO, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br J Pharmacol.**, London, v.135, n.1, p.239-247, 2002.

SOYINKA, J.O.; ONYEJI, C.O.; OMORUYI, S.I. Simultaneous liquid chromatographic analysis of ritonavir, quinine and 3-hydroxyquinine in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, Amsterdam, Epub ahead of print, 2008.

SULLIVAN, G.W.; FANG, G.; LINDEN, J.; SCHELD, W.M. A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis. **J Infect Dis.**, Chicago, v.189, n.10, p.1897-1904, 2004.

SULLIVAN, L.P.; GRANTHAM, J.J. Specificity of basolateral organic anion exchanger in proximal tubule for cellular and extracellular solutes. **J Am Soc Nephrol.**, Baltimore, v.2, n.7, p.1192–1200, 1992.

SUN, J.X.; FARIAS, L.A.; MARKOV, A.K. Fructose-1,6-diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. **Gastroenterology.**, Baltimore, v.98, n.1, p.117–126, 1990.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Tech.**, New York, p.12-18, 1998.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience.**, Oxford, v.32, n.3, p.577-580, 1989.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. **Neuroscience.**, Oxford, v.38, n.3, p.757-762, 1990.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, Oxford, v.44, n.1, p.131-135, 1991.

TAMAKI, T.; NAKAI, T.; YAMAUE, H. Fructose-1,6-Bisphosphate inhibits excess activation of Kupffer cell function induced by endotoxin. **Dig Dis Sci.**, New York, v.47, n.10, p.2179-2185, 2002.

TAVAZZI, B.; STARNES, J.W.; LAZZARINO, G.; DI PIERRO, D.; NUUTINEN, E.M.; GIARDINA, B. Exogenous fructose-1,6-bisphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart. **Basic Res Cardiol.**, Darmstadt, v.87, n.3, p.280-289, 1992.

TAYLOR, C.B.; BAILEY, E. Activation of liver pyruvate kinase by fructose-1,6-diphosphate. **Biochem J.**, London, v.102, n.2, p.32C-33C, 1967.

TAYLOR, M.D.; GRAND, T.J.; COHEN, J.E.; HSU, V.; LIAO, G.P.; ZENTKO, S.; BERRY, M.F.; GARDNER, T.J.; WOO, Y.J. Ethyl pyruvate enhances ATP levels, reduces oxidative stress, and preserves cardiac function in a rat model of off-pump coronary bypass. **Heart Lung Circ.**, Carlton, v.14, n.1, p.25–31, 2005.

THIEL, M.; CALDWELL, C.C.; SITKOVSKY, M.V. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **Microbes Infect.**, Paris, v.5, n.6, p.515-26, 2003.

TIAN, Y.H.; SCHAFER, T.; SCKELL, A.; SCHILING, M.K. Adenosine deaminase inhibition attenuates reperfusion low flow and improves graft survival after rat liver transplantation. **Transplantation.**, Baltimore, v.69, n.11, p.2277-2281, 2000.

TOLONE, G.; BONASERA, L.; BRAI, M.; TOLONE, C. Prostaglandin production by human polymorphnuclear leucocytes during phagocytosis in vitro. **Experientia.**, Basel, v.33, n.7, p.961-962, 1977.

TRAMS, E.G.; LAUTER, C.J. On the sidedness of plasma membrane enzymes. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.345, n.2, p.180-197, 1974.

TRIMARCHI, G.R.; ARCADI, F.A.; IMPERATORE, C.; RUGGERI, P.; COSTA, G. Effects of fructose-1,6-biphosphate on microsphere-induced cerebral ischemia in the rat. **Life Sci.**, Oxford, v.61, n.6, p.611-622, 1997.

UNITED STATES. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES AND HUMAN SERVICES; FDA; CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. **Guidance for industry:** Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, New York, 1998.

VERRI, W.A. JR; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther.**, Oxford, v.112, n.1, p.116–138, 2006a.

VILCEK, J. The cytokines: an overview. In THOMSON, A.W.; LOTZE, M.T. The cytokines handbook., **Academic Press.**, v.1, p.3–18, London, 2003.

VIVANCOS, G.G.; VERRI, W.A. JR.; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res.**, São Paulo, v.37, p.391-399, 2004.

WIESNER, J.B.; UGARKAR, B.G.; CASTELLINO, A.J.; BARANKIEWICZ, J.; DUMAS, D.P.; GRUBER, H.E.; FOSTER, A.C.; ERION, M.D. Adenosine kinase inhibitors as a novel approach to anticonvulsant therapy. **J Pharmacol Exp Ther.**, Baltimore, v.289, n.3, p.1669-1677, 1999.

XU, K.; STRINGER, J.L. Pharmacokinetics of fructose-1,6-Diphosphate after intraperitoneal and oral administration to adult rats. **Pharmacol Res.**, London, v.57, n.3, p.234-238, 2008.

ZHANG, J.N.; ZHANG, F.M.; MA, W.S.; FORRESTER, T. Protective effect of exogenous fructose-1,6-diphosphate in cardiogenic shock. **Cardiovasc Res.**, London, v.22, n.12, p.927-932, 1988.

ZHENG, J.; WANG, R.; ZAMBRASKI, E.; WU, D.; JACOBSON, K.A.; LIANG, B.T. Protective roles of adenosine A1, A2A, and A3 receptors in skeletal muscle

ischemia and reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, Bethesda, v.293, n.6, p.H3685-H3691, 2007.

ZHUANG, Z.Y.; WEN, Y.R.; ZHANG, D.R.; BORSELLO, T.; BONNY, C.; STRICHARTZ, G.R.; DECOSTERD, I.; JI, R.R. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **J Neurosci.**, Baltimore, v.26, n.13, p.3551-3560, 2006.

ZIGANSHIN, A.U.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Dev Res.**, New York, v.32, n.3, p.134-146, 1994.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Dev Res.**, New York, v.52, n.1-2, p.44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases - molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. **Prog. Brain Res.**, Amsterdam, v.120, p.371-385, 1999.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. **J Auton Pharmacol.**, North Ferriby, v.16, n.6, p.397-400, 1996.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol.**, v.49, n.6, p.589– 618, 1996.

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.362, n.4-5, p.299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochem Int.**, Oxford, v.32, n.5-6, p.421-425, 1998.

WANKOWICZ, Z.; MEGYERI, P.; ISSEKUTZ, A. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. **J Leukoc Biol.**, New York, v.43, n.3, p.349-356, 1988.

WEDMORE, C. V., WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature.**, London, v.289, n.5799, p.646-650, 1981.

WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat Rev Drug Discov.**, London, v.4, n.10, p.834-844, 2005.

WIDJAJA, A.; OGINO, H.; YASUDA, M.; ISHIMI, K.; ISHIKAWA, H. Experimental investigation of fructose 1,6-diphosphate production and simultaneous ATP regeneration by conjugated enzymes in an ultrafiltration hollow-fiber reactor. **J Biosci Bioeng.**, Osaka, v.88, n.6, p.640-645, 1999.

WILLIAMS, T.C.; JARVIS, S.M. Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. **Biochem J.**, London, v.274, n.1, p.27-33, 1991.

YIN, H.; JIN, X.B.; GONG, Q.; YANG, H.; HU, L.Y.; GONG, F.L.; ZHU, J.Y. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **Int Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.8, n.13-14, p.1842-1847, 2008.

ZIMA, A.V.; KOCKSKÄMPER, J.; BLATTER, L.A. Cytosolic energy reserves determine the effect of glycolytic sugar phosphates on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cat ventricular myocytes. **J Physiol.**, Paris, v.577, n.1, p.281-293, 2006.