

RAFAEL MARTINS DE OLIVEIRA

**SECREÇÃO GÁSTRICA E CÉLULAS
TIPO-ENTEROCROMAFINS: ANÁLISE DA
PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES DE ADENOSINA.**

Bragança Paulista

2012

RAFAEL MARTINS DE OLIVEIRA

**SECREÇÃO GÁSTRICA E CÉLULAS TIPO-
ENTEROCROMAFINS: ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO
DE RECEPTORES DE ADENOSINA.**

Orientador

Profa. Dra. ALESSANDRA GAMBERO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco (USF), para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2012

WI 302 Oliveira, Rafael Martins de.

O51s Secreção gástrica e células tipo-enterocromafins:
análise da participação de receptores de adenosina /
Rafael Martins de Oliveira. -- Bragança Paulista, 2012.
38 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Células tipo-enterocromafins. 2. Histamina.
3. Receptores adenosinérgicos. 4. Ácido gástrico.
I. Gambero, Alessandra. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



Oliveira, Rafael Martins de "SECREÇÃO GÁSTRICA E CÉLULAS TIPO-ENTEROCROMAFINS: ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES DE ADENOSINA" Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte de Junho de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Fernanda Crossi Pereira de Toledo
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

À minha família

Por sempre acreditarem e incentivarem o meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Aos meus pais, Benedita H. D. Martins de Oliveira e Moacir Tadeu Martins de Oliveira.

À Professora Dra. Alessandra Gambero, por tudo, principalmente pela paciência e confiança, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Imunofarmacologia,
(...) uma pessoa especial e muito profissional que pretendo me espelhar sempre!

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, pela oportunidade da concretização deste sonho e aos funcionários do Biotério da Universidade São Francisco, Sr. Lázaro e Paulo, por sempre nos ajudarem nos cuidados com nossos animais.

Érica, Simone, Caroline, Waldemar, Demétrius, Eloá, colegas de trabalho, que de alguma forma participaram neste projeto e, além disso, proporcionaram momentos felizes na bancada.

Antonio, Ricardo, Ed Boon e John Tobias, que proporcionaram “porres homéricos” e gargalhadas memoráveis.

Em especial a Doutoranda Carolina Stefani pela amizade, companheirismo e por acreditar em mim, me encorajando, motivando e elogiando nas horas mais difíceis do projeto., obrigado por tudo!

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Estudos sugerem que alterações nos níveis endógenos de adenosina atuam como um fator gastroprotetor durante a injúria tecidual, pois a adenosina inibe a secreção de ácido gástrico por diferentes mecanismos. A adenosina é um ribonucleosídeo que atua em receptores acoplados à proteína G e que são classificados em subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. As células tipo-enterocromafins (ECL) desempenham um papel importante no controle da secreção gástrica através da secreção de histamina, mas não há relatos se a adenosina poderia atuar diretamente sobre as ECLs modificando a secreção de ácido clorídrico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de receptores de adenosina e verificar se agonistas e antagonistas destes receptores modificam a secreção de histamina basal ou estimulada por gastrina *in vitro*. ECL foram obtidas de estômagos de ratos após digestão com pronase, enriquecimento por elutriação e purificação com gradiente de concentração de Nycodenz®. A identificação das células ECL foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-histamina. A expressão dos receptores de adenosina foi verificada através de reação de PCR em tempo real. Na avaliação funcional dos receptores de adenosina, células ECL foram cultivadas em placas de 96 poços previamente preparadas com Matrigel® e estimuladas com 2-cloroadenosina (1 e 3 µM), NECA (10 e 100 nM) e IB-MECA (100 e 1000 nM), agonistas de adenosina (A₁, A₂ e A₃) respectivamente. As placas foram centrifugadas e a secreção de histamina foi mensurada utilizando Kit comercial de ELISA. Os resultados de PCR em tempo real comprovam a presença da expressão de RNAm para diversos receptores de adenosina. A secreção de histamina basal e estimulada foi inibida em ECL com agonista A₁ nas concentrações de 1 e 3 µM e com agonista A₃ nas concentrações de 100 e 1000 nM na presença de gastrina. A reversão da inibição da secreção de histamina foi observada quando utilizamos o antagonista do receptor (A₁), DPCPX (1 µM). Deste modo, concluímos que células ECL expressam receptores de adenosina e que a ativação do receptor A₁ inibe a secreção de histamina, atuando como um agente inibidor da produção de ácido gástrico e, portanto, contribuindo para a gastroproteção em situações de injúria tecidual.

Palavras-chave: Células tipo-enterocromafins, receptores adenosinérgicos, histamina, ácido gástrico.

ABSTRACT

Studies suggest that endogenous adenosine acts as a gastroprotective factor during tissue injury through gastric acid inhibition. Adenosine is a ribonucleoside and it acts in G-protein receptors subtypes A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. Enterochromaffin like cells (ECLs) has an important role in gastric acid control through histamine release, but there is no report about an adenosine action directly in these cells, modifying gastric acid. Thus, the aim of this study was to evaluate gene expression for adenosine receptors and the ability of adenosine receptor agonists and antagonist to modify the histamine release by ECL cells *in vitro*. ECL were obtained from rat stomachs after pronase digestion, elutriation enrichment and Nycodenz® gradient purification. Cells were characterized by immunohistochemistry as anti-histamine positive cells. Adenosine receptor gene expression was verified by quantitative RTQ-PCR. To evaluate adenosine receptor function, ECL cells were maintained in 96 well plats previously coated with Matrigel® and stimulated with 2-chloroadenosine (1 and 3 µM), NECA (10 and 100 nM) and IB-MECA (100 and 1000 nM), adenosine agonists for A₁, A₂ and A₃, respectively. Histamine release was measured using ELISA kit. PCR results showed the mRNA presence for all adenosine receptors. Basal and gastrin-stimulated histamine release were inhibited after A₁ agonist at 1 and 3 µM. A₃ agonist was able to inhibit at 100 and 1000 nM, the gastrin-induced histamine release by ECL cells. The inhibition of histamine release was reversed when DPCPX (1 µM), a selective A₁ antagonist, was employed. Thus, we concluded that A₁ receptor activation in ECL cells inhibited histamine release and could acts as a gastroprotective factor during tissue injury.

Key-words: ECL cells, adenosinergic receptors, histamine, gastric acid.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-cloroadenosina – Agonista seletivo de A₁ AR
A₁ AR – Receptor de adenosina A1
A_{2A} AR – Receptor de adenosina A_{2A}
A_{2B} AR – Receptor de adenosina A_{2B}
A₃ AR – Receptor de adenosina A3
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
AMP cíclico – Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK – Proteína cinase ativada por AMP
ANOVA – Análise de variância
AR – Receptor de adenosina
ATP – Trifosfato de adenosina
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
ATPase V – Enzima do tipo V
Azul de Tripano – Corante de exclusão para viabilidade celular
BSA – Soro albumina bovina
Ca²⁺ – Íon Cálcio
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CCK-2 / CCK-B – Receptor de colecistocinina
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DDT – Ditiotreitól
DMEM – (Dulbecco's modified Eagle's médium) Meio modificado Dulbecco Eagle
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPCPX – 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
ECL – Células tipo-enterocromafins
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA – Imunoensaio enzimático
EPM – Erro padrão da média
Gastrin-17 – Hormônio proteico
Golgi – Organela (complexo golgiense)
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCL – Ácido clorídrico
HDC – Enzima histidina descarboxilase
HEPES – 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico sal de sódio ácido N-(2-Hidroxietil) sal piperazina-N'-de sódio (2- ácido etanossulfônico)
IB-MECA – 1-Desoxi-1-[6 - [(3-iodofenil) metil) amino]-9H-purina-9-yl]-N-metil-β-D-ribofuranuronamida N6-(3-iodobenzil) adenosina-5 '-N-metiluronamida
KCl – Cloreto de potássio
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína kinase ativadora de mitose
mg – miligramas
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – minutos
ml – mililitro
mEq/L – miliequivalência do soluto por litro de solvente
Mmol – Milimol
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MTT – 3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] brometo de -2,5 difeniltetrazólio
Na₂H₂PO₄ – Fosfato dissódico
NaCl – Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
NECA – 5'-(N-Etilcarboxamido)adenosina
ng – nanogramas

PBS – Salina Tampão Fosfato
pH – potencial hidrogênio-iônico
PKC – Proteína kinase C
PLC – Fosfolipase C
pM - Picomolar
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA – Ácido ribonucleico
RNAlater – Reagente de estabilização de Ácido ribonucleico
rpm – Rotações por minuto
RQ Study Software – Programa de estudo de quantificação relativa
PCR – Reação em cadeia da polimerase
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel poliacrilamida
Tris – Tris(hidroximetil)-aminometano
U – unidades
UDG – Uracil - DNA glicosilase
v/v – Volume por unidade de volume
VIP – Peptídeo intestinal vasoativo
µg – Microgramas
µl – Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática das diferentes populações celulares presentes no estômago humano.

Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a ação dos principais estímulos sobre a célula parietal gástrica (P) secretora de ácido clorídrico.

Figura 3. Ilustração esquemática da síntese, armazenamento e liberação de histamina em célula ECL.

Figura 4. Diagrama esquemático mostrando a síntese de adenosina através da desfosforilação do ATP.

Figura 5. Diagrama esquemático mostrando a técnica de estômago invertido para obtenção de células gástricas.

Figura 6. Diagrama esquemático mostrando a técnica de isolamento de células gástricas utilizando solução de Pronase, em banho-maria a 37°C com agitação constante e borbulhamento de carbogênio.

Figura 7. Diagrama esquemático mostrando a técnica de elutriação utilizando-se com rotor JE/6B e câmaras Standard e Sanderson.

Figura 8. Diagrama esquemático mostrando a técnica de purificação com gradiente de concentração de Nycodenz®.

Figura 9. Diagrama esquemático mostrando a etapa de imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-histamina.

Figura 10. Diagrama esquemático mostrando a etapa de cultura primária, utilizando Matrigel®.

Figura 11. Imunocitoquímica de células ECL da fração SF2 (cor marrom) utilizando o anticorpo anti-histamina. (400x.).

Figura 12. Expressão gênica em células não purificadas (após dispersão enzimática) de estômagos de ratos.

Figura 13. Expressão gênica em células ECL purificadas de estômagos de ratos.

Figura 14. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A1 (2-cloroadenosina, 1 e 3 μ M).

Figura 15. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de antagonista (DPCPX, 1 μ M) de receptor de adenosina, A1 (2-cloroadenosina, 3 μ M).

Figura 16. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A2 (NECA, 10 e 100 nM).

Figura 17. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A3 (IB-MECA, 100 e 1000 nM).

Figura 18. Avaliação da secreção ácida em animais dos grupos controle, 2-cloroadenosina, Neca e IB-Meca.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers usados na reação de PCR em tempo real.

Tabela 2. Efeito dos agonistas adenosinérgicos sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Secreção e inflamação gástrica.....	01
1.2. Células tipo-enterocromafins.....	05
1.3. Receptores de adenosina e secreção gástrica.....	07

2. OBJETIVOS.....09

3. MATERIAL E MÉTODO.....10

3.1. Animais.....	10
3.2. Obtenção das células tipo-enterocromafim gástricas.....	10
3.3. Imunocitoquímica.....	15
3.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	16
3.5. Cultura primária de células tipo-enterocromafins gástricas.....	18
3.6. Ensaio de secreção de histamina.....	19
3.7. Avaliação da secreção de ácido gástrico <i>in vivo</i> : Ligadura de piloro.....	19
3.8. Ensaio de MTT.....	20
3.9. Análise Estatística.....	20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....21

4.1. Rendimento e pureza da suspensão celular obtida.....	21
4.2. Análise da expressão dos genes por PCR em tempo real.....	22
4.3. Efeito dos agonistas adenosinérgicos na secreção de histamina em células ECL.....	24

4.4. Efeito dos agonistas adenosinérgicos sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.....	27
4.5. Efeito dos agonistas adenosinérgicos na secreção de ácido gástrico <i>in vivo</i>	28
5. CONCLUSÃO.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
7. ANEXO.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Secreção e inflamação gástrica

Uma das principais funções do estômago é produzir ácido clorídrico, o qual participa nos processos de digestão de proteínas, absorção de ferro, além de atuar como mecanismo de defesa destruindo microrganismos (Hakanson et al., 1979; Martinsen et al., 2005). A mucosa estomacal possui dois tipos importantes de glândulas tubulares: oxínticas (secretam ácido clorídrico, pepsinogênio, fator intrínseco e muco) e pilóricas (secretam principalmente muco e também gastrina). As células parietais, localizadas profundamente nas glândulas oxínticas no corpo do estômago, são as únicas células que secretam ácido clorídrico (Johnson, 2001).

Entretanto, o mesmo ácido que é importante na digestão proteica pode também ser o causador de lesões na mucosa gástrica, quando ocorre um desequilíbrio nos fatores de proteção, como a produção de muco (Abdel-Salam et al., 2001). Assim, o bloqueio da produção de ácido gástrico muitas vezes é uma abordagem terapêutica de grande importância (Jain et al., 2007).

O controle da produção do ácido gástrico é feito através de mecanismos neurais, endócrinos e parácrinos. Até o presente, seis populações celulares (Figura 1) com funções endócrinas estão descritas e presentes no estômago constituindo cerca de 1-2% do total de células gástricas sendo estas as células G, células D, células tipo-A, células enterocromafins (EC), células D1/P e células tipo-enterocromafins (ECL) (Cui e Waldum, 2007).

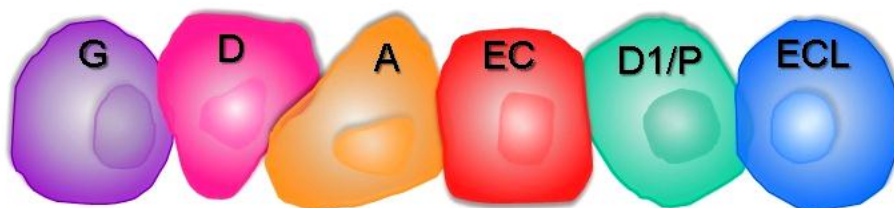


Figura 1. Ilustração esquemática das diferentes populações celulares presentes no estômago humano.

A gastrina é um hormônio peptídico secretado pelas células G localizadas nas glândulas pilóricas no estômago, a acetilcolina (ACh) liberada de neurônios colinérgicos e a histamina liberada das células ECL atuam como os principais estímulos para a produção de ácido clorídrico (HCl) pela célula parietal, como mostra a Figura 2 (Andersson et al., 1999; Bitziou e Patel, 2012). As células parietais são encontradas em glândulas gástricas amplamente distribuídas no estômago, constituindo cerca de 80% do estômago, cada glândula apresenta aproximadamente 70-90 células parietais, desta forma, dependendo do estímulo, estas células conseguem produzir rapidamente grandes quantidades de ácido clorídrico (Johnson, 2001; Duman et al., 2002). Na membrana das células parietais gástricas, existe uma bomba de prótons ($H^+/K^+ATPase$) que é responsável pela secreção de íons hidrogênio (H^+) para formação do ácido (HCl) no lúmen do estômago (Fujii et al., 2011). Vários relatos de literatura descrevem que o bloqueio da via final comum, ou seja, da bomba de prótons é o mais eficiente no controle da secreção do ácido clorídrico.

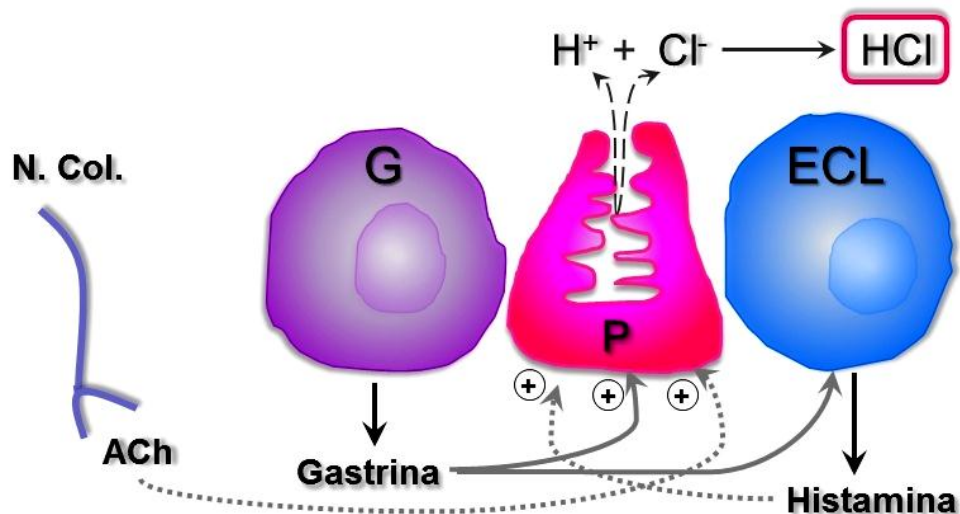


Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a ação dos principais estímulos sobre a célula parietal gástrica (P) secretora de ácido clorídrico.

Uma resposta de defesa à lesão ou injúria tecidual é a inflamação gástrica, que quando ocorre de maneira incontrolada o resultado é o dano tecidual excessivo, resultando em um processo inflamatório crônico. Além do ácido clorídrico que pode ser o causador de lesões na mucosa gástrica (Abdel-Salam et al., 2001), existem outros fatores que também podem contribuir para a gênese das úlceras pépticas, como a infecção da mucosa gástrica pelo *Helicobacter pylori*, o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), o desequilíbrio na proteção da mucosa (muco e bicarbonato) e inibição de síntese local de prostaglandinas E₂ e I₂ e óxido nítrico (Sachs et al., 1995; Smolka e Backert, 2012).

A *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, espiralada, microaerofílica, que coloniza a mucosa gástrica, causa gastrite crônica, úlceras gástricas, displasia e eventualmente adenocarcinoma gástrico (Vitoriano et al., 2011; Smolka e Backert, 2012). A bactéria adere firmemente à superfície das células gástricas epiteliais sem invadi-las (El-Shoura, 1995). A resposta inflamatória do hospedeiro contribui diretamente na patogênese da doença (Dixon, 1995). No estômago a resposta inflamatória que se estabelece ao *H. pylori* afeta várias linhagens celulares gástricas importantes para a homeostase ácida, incluindo células D, produtoras de somatostatina, células G e células parietais. A inflamação gástrica leva ao quadro conhecido como gastrite, a qual, por sua vez, pode levar a uma redução nos níveis de somatostatina. A somatostatina inibe a produção de gastrina, o que, em um caso de inflamação gástrica, onde a produção de somatostatina está reduzida, pode levar a um quadro de hipergastrinemia. Além disso, a produção de gastrina pode ser aumentada por um efeito estimulante direto das citocinas pró-inflamatórias que tiveram sua expressão induzida pela colonização por *H. pylori* (Levi et al., 1989; Moss et al., 1992; Beales e Calam, 1998; Blaser, 2004; Smolka e Backert, 2012).

O efeito do nível de gastrina na homeostase ácida depende principalmente da distribuição topográfica de *H. pylori* e da inflamação resultante desta distribuição. Em uma gastrite predominantemente antral, as células ECL e as células parietais não são afetadas pela inflamação e conseqüentemente, o alto nível de gastrina produzido levaria tanto a um aumento da secreção ácida, quanto a um aumento na massa de células parietais. O aumento da carga ácida no duodeno pode induzir uma metaplasia gástrica nesse local. *H. pylori* não coloniza o duodeno normal, mas coloniza as células metaplasicas gástricas que estão surgindo no duodeno devido a um aumento da exposição ao ácido. Essa colonização, por sua vez, pode provocar uma inflamação que se correlaciona com úlceras duodenais (El-Omar et al., 1995; Gillen et al., 1998; Khulusi et al., 1996; Olbe, 1996; Hamlet e Ohkura et al., 2003).

Esse quadro de gastrite predominantemente antral e hipercloridria é muito comum na infância, e é visto muitas vezes como benéfico, pois aumenta a barreira protetora ácida contra outros patógenos, como os que causam diarreia (Rothenbacher et al., 2000). Esse processo pode ser muito conveniente em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias são geralmente precárias, e conseqüentemente a taxa de diarreia é alta (Rothenbacher et al., 2000).

Quando a inflamação envolve também o corpo do estômago, como em uma pangastrite, ocorre uma inibição na secreção de ácido devido tanto à supressão na produção de histamina, como pelo dano causado nas próprias células parietais. A inflamação persistente afeta o ciclo celular das células gástricas epiteliais, causando uma atrofia desse tecido, além de provocar uma perda progressiva das glândulas gástricas. (Beales e Calam, 1992; Peek et al., 2000; Koike et al., 2001).

1.2. Células tipo-enterocromafins

Atualmente postula-se que as células tipo-enterocromafins (*enterochromaffin-like cells* – ECL), inicialmente descritas por Hakanson e colaboradores em 1971, sejam as células endócrinas dominantes na mucosa oxíntica com função de sintetizar e armazenar histamina e cromogranina A (Cui e Waldum, 2007; Zhao e Chen, 2012). A produção de histamina, pelas células ECL, fica sob controle da gastrina, hormônio que estimula a secreção de ácido clorídrico no estômago. O eixo de ativação gastrina-ECL tem grande importância fisiológica e fisiopatológica, visto que a gastrina, além de estimular a síntese e liberação de histamina e, portanto aumentar a sinalização para a produção de ácido gástrico pela célula parietal, também possui efeito tróficos sobre a mucosa oxíntica (Andersson et al., 1999; Zhao e Chen, 2012).

A gastrina é secretada por células G antrais e age sobre as células ECL via receptor *Cckb / Cck₂*, enquanto a somatostatina outro hormônio produzido por células D é um modulador das células G (Prinz et al., 1993; Sandor et al., 1994). Outros agonistas também podem estimular a secreção de histamina em ECL, como por exemplo, acetilcolina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e adrenalina ou noradrenalina (Prinz et al., 1993; Lindström et al., 1997; Lindström e Håkanson, 2001).

A histamina é um mediador químico – amina ($C_5H_9N_3$) envolvida em vários processos fisiológicos, como a regulação da secreção de ácido gástrico e modulação de reações inflamatórias (Kahlson e Rosengren 1968; Soll e Walsh 1979; Schwartz et al., 1980). A enzima histidina descarboxilase (HDC) é responsável pela síntese de histamina nas células ECL (Dimaline e Sandvik, 1991; Prinz et al., 1994). No citoplasma das células ECL, a histamina fica armazenada em grânulos vesiculares e sua liberação é dependente de cálcio intracelular (Ca^{2+}) via proteína quinase C e AMP cíclico (Nissinen e Panula 1993). A entrada de histamina nos grânulos é realizada por uma ATPase do tipo V, responsável por gerar um gradiente eletroquímico que facilita a entrada deste mediador, quando a ECL é estimulada a histamina é secretada por meio da exocitose, na qual, os grânulos se fundem com a membrana plasmática da célula, como mostra a Figura 3 (Schwartz et al., 1980; Prinz et al., 1994; Duan Chen et al., 2006).

Adicionalmente, estudos com agonistas de receptores histaminérgicos em estômago mostram que a ativação destes resulta em efeitos de proliferação celular no epitélio gástrico (Grandi et al., 2006). Em ensaios com fundo gástrico isolado de rato, a histamina liberada também atua diretamente em receptores (H_3) presentes em terminações neuronais no estômago, alterando a produção de ácido clorídrico (Adami et al., 2004). Assim, acredita-se que seja importante avançar na compreensão dos mecanismos fisiológicos ou patológicos que podem modificar o eixo de ativação gastrina-ECL.

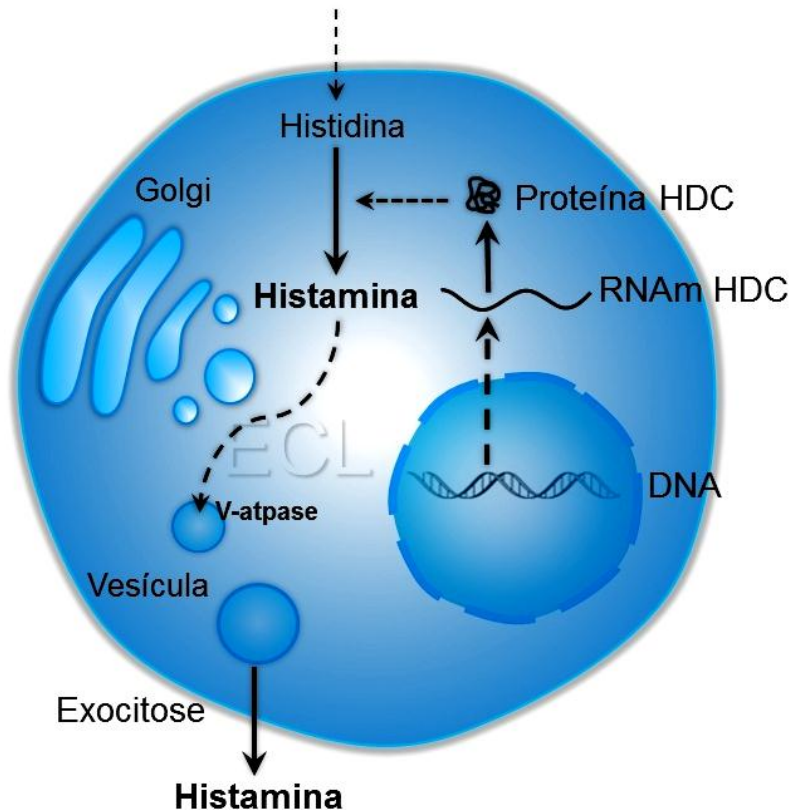


Figura 3. Ilustração esquemática da síntese, armazenamento e liberação de histamina em célula ECL.

1.3. Receptores de adenosina e secreção gástrica

A adenosina é um nucleosídeo, formada pela união de uma base púrica (adenina) e uma pentose (D-ribose), esta desempenha um papel fundamental no metabolismo energético da célula (Smith, 1991; Mieke et al., 2008). De modo geral, a adenosina atua como um mensageiro intercelular e sua síntese ocorre durante a desfosforilação do trifosfato de adenosina, ATP (\rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow adenosina) tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular através da ação de uma família de enzimas conhecidas como 5'-nucleotidases que são expressas em diferentes tecidos de mamíferos (Figura 4), podendo ser encontradas na superfície da membrana e no citosol da célula (Zimmermann, 1992; Mieke et al., 2008).

A adenosina modula várias funções fisiológicas atuando em receptores adenosinérgicos. Estes receptores acoplados à proteína G são classificados em subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ baseados em suas propriedades farmacológicas e propriedades estruturais (Fredholm et al., 2001; Rudich et al., 2012). Estudos clínicos têm sugerido que alterações nos níveis endógenos de adenosina podem influenciar a formação de úlceras, pois acredita-se que a adenosina iniba a secreção de ácido gástrico, e desta forma atua como um agente gastroprotetor (Namiot et al., 1991). No entanto, dados recentes mostram que o uso de um agonista seletivo para A_{2A}, embora apresentasse efeito gastroprotetor, o mesmo não está relacionado à inibição da secreção de ácido gástrico (Odashima et al., 2006). Em estudos com animais tem sido observado um efeito inibitório sobre a secreção de ácido gástrico, o que parece estar relacionado à ação da adenosina em diferentes locais nas diferentes espécies estudadas. Em cobaias e cães, a ação parece estar relacionada a um efeito inibitório da adenosina nas células parietais (Heldsinger et al., 1986; Gerber et al., 1988). Em ratos, a adenosina parece exercer seu efeito inibitório por modificar a secreção de substâncias que controlam este processo, como a gastrina e a somatostatina (Yip e Kwok, 2004).

Novamente, não há relatos se as células ECL expressam receptores para adenosina e se estas podem também ser moduladas por esta substância. Adicionalmente, a adenosina parece estar envolvida no mecanismo de citoproteção adaptativa gástrica desencadeado por condições isquêmicas (Brzozowski et al., 2003).

Os mecanismos de sinalização traduzidos pela ativação dos receptores de adenosina parecem envolver a ativação de p38 MAP quinase, um membro das quinases ativadas por mitógeno além das vias clássicas que levam a geração de AMP cíclico e ativação da PLC (Cobb, 2002; Schulte e Fredholm, 2003).

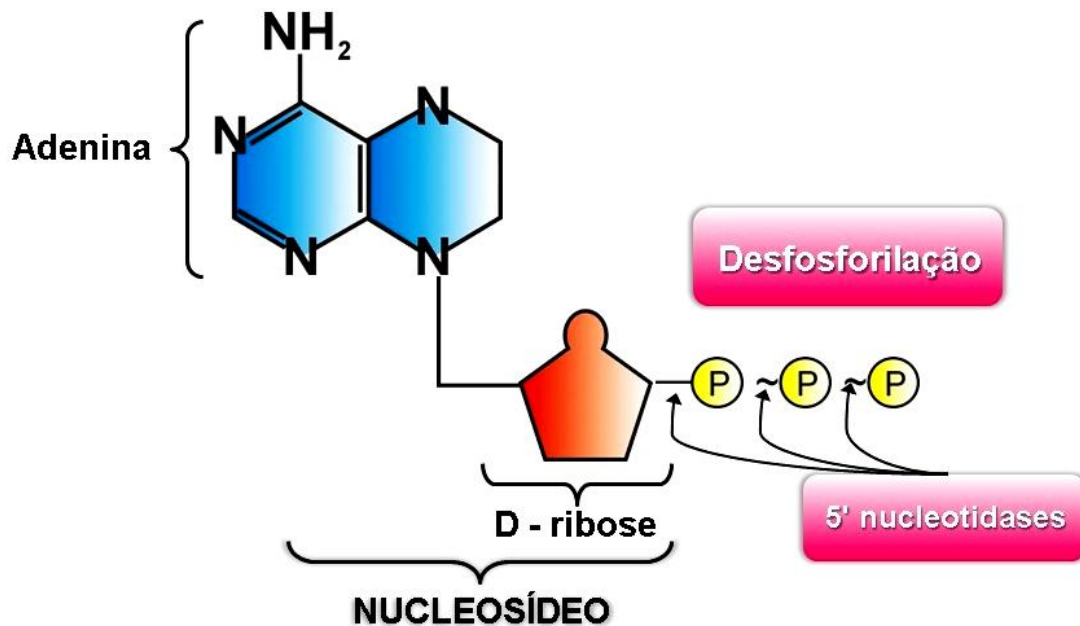


Figura 4. Diagrama esquemático mostrando a síntese de adenosina através da desfosforilação do ATP.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a expressão de receptores adenosinérgicos em células ECL.
- Verificar se agonistas de receptores adenosinérgicos modificam a secreção de histamina basal ou estimulada por gastrina *in vitro*.
- Avaliar se agonistas de receptores adenosinérgicos modificam a secreção de ácido gástrico *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados aproximadamente 40 ratos machos Sprague-Dawley, livres de patógenos específicos, pesando entre 220-320g adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP (UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas, em número de 3 a 5 animais por unidade e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF), com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro. Os animais se serviram *ad libitum* de água e ração. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco, Março, 2008 (Anexo).

3.2. Obtenção das células tipo-enterocromafim gástricas

Os animais foram anestesiados com 100 mg/mL⁻¹ de Ketamina/ 2% de xilazina (1:1 v/v) antes dos experimentos. Após anestesia os ratos foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. Os estômagos foram então removidos e mantidos em solução salina (NaCl, 0,9%). Na sequencia foram lavados novamente em solução salina e a junção gastroesofágica (esôfago e corpo – região glandular) de cada estômago foi unida por meio de sutura – utilizando agulha sem ponta (Inox, 3mm Ø e fio de algodão comum), e esta foi empurrada até a junção gastroduodenal (duodeno e corpo – região glandular) com auxílio da agulha e cuidadosamente o estômago foi invertido, como mostra a Figura 5 (Margaret et al., 1983; Lindstrom et al., 2001; Stefani et al., 2012).

A região gastroduodenal foi suturada, o esfíncter pilórico removido e o corpo do estômago foi parcialmente descartado. A cada experimento foram utilizados cinco estômagos, num total de oito experimentos aproximadamente.

Os estômagos invertidos foram digeridos com solução de Pronase (Roche, Mannheim, Germany), em meio A (0.9 mg/mL), em banho-maria a 37°C com agitação constante e borbulhamento de carbogênio. Inicialmente, os estômagos foram mantidos por 30 minutos em 100 mL de meio A contendo: 0,5 mmol/L de NaH_2PO_4 , 1,0 mmol/L de Na_2HPO_4 , 70 mmol/L de NaCl , 5 mmol/L de KCl , 11 mmol/L de glucose, 2 mmol/L de EDTA, 50 mmol/L de HEPES [pH 7.2], 20 mmol/L de NaHCO_3 e 2% de BSA. O meio foi removido e os estômagos foram mantidos por 10 minutos em 100 mL de meio B contendo: 0,5 mmol/L de NaH_2PO_4 , 1,0 mmol/L de Na_2HPO_4 , 70 mmol/L de NaCl , 5 mmol/L de KCl , 11 mmol/L de glucose, 1,0 mmol/L de CaCl_2 , 1,5 mmol/L de MgCl_2 , 50 mmol/L de HEPES [pH 7.2], 20 mmol/L de NaHCO_3 e 2% de BSA.

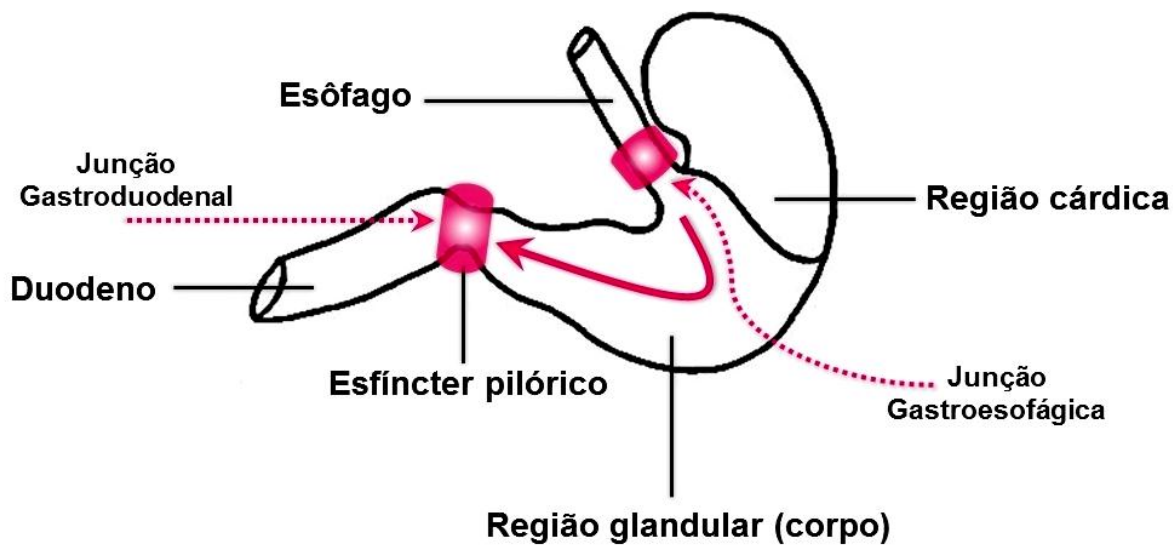


Figura 5. Diagrama esquemático mostrando a técnica de estômago invertido para obtenção de células gástricas.

Dando sequência ao experimento, o meio B foi removido e o meio A foi adicionado, mantido por 15 minutos. O meio A foi removido e o meio B foi adicionado, mantido por 5 minutos. O meio B foi removido e o meio A foi adicionado, mantido por 30 minutos. O meio A foi removido e o meio B foi adicionado, mantido por 15 minutos e coletado (F6). O meio A foi adicionado, mantido por 10 minutos, e finalmente, o meio B foi adicionado, mantido por 15 minutos e coletado (F8), como mostra a figura 6.

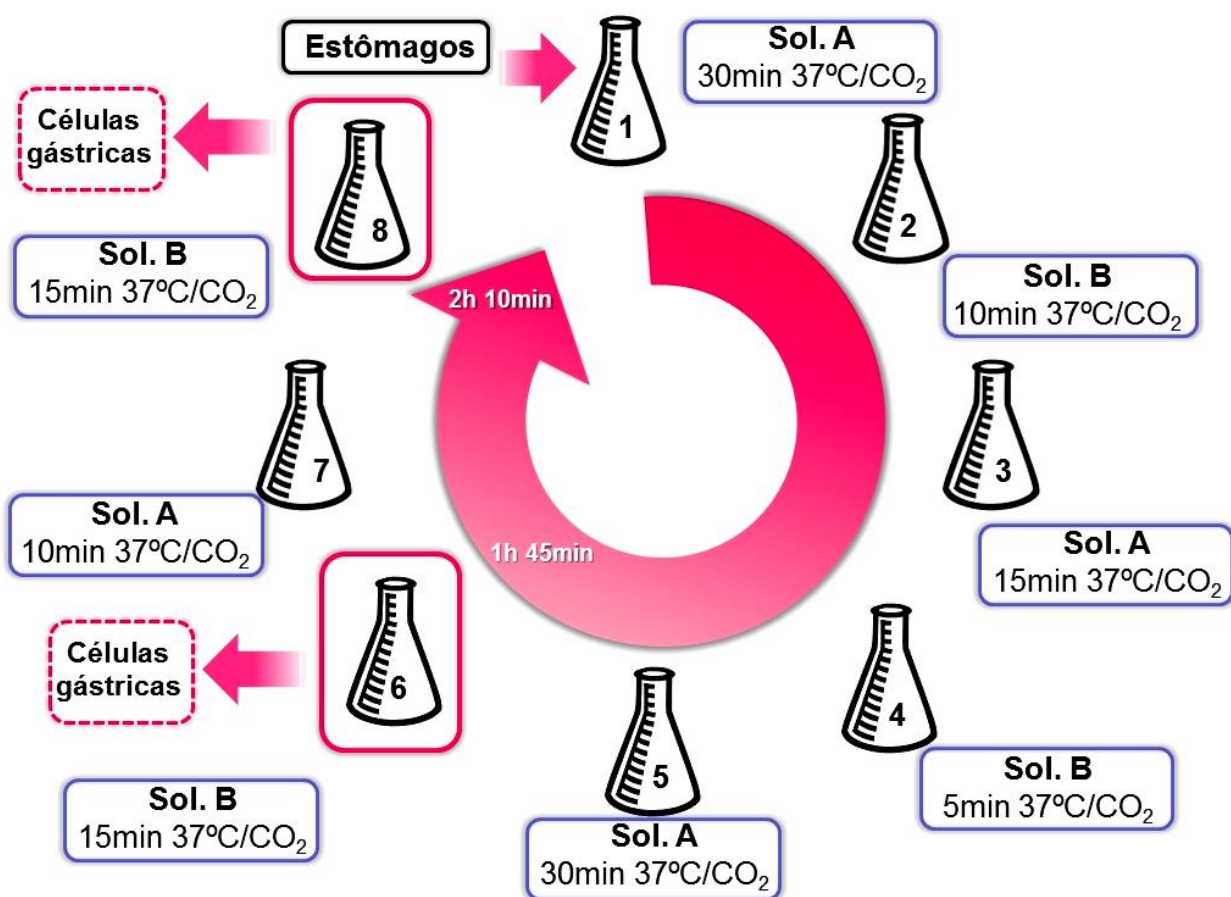


Figura 6. Diagrama esquemático mostrando a técnica de isolamento de células gástricas utilizando solução de Pronase, em banho-maria a 37°C com agitação constante e borbulhamento de carbogênio.

As frações F6 e F8 foram filtradas em malha de nylon de 80 μ M. As frações foram centrifugadas (1000 rpm, 4° C) e unidas e as células ressuspenso em meio C contendo: 1,4 mol/L de NaCl, 102 mmol/L de MgSO₄, 100 mmol/L de CaCl₂, 15 mmol/L de HEPES, 11 mmol/L de glicose, 3% de BSA e 0,5 mmol/L de DTT [pH 7.4]. O número de células foi contado em câmara de Neubauer e a viabilidade celular observada utilizando Azul de Tripano (Sigma-Aldrich).

O enriquecimento da suspensão celular foi realizado utilizando-se a técnica de elutriação utilizando-se centrífuga (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) e rotor (JE-6B / JA-30.50) para elutriação, como mostra a Figura 7 (Dorin, M., Beckman Instruments, 1994). Inicialmente, utilizando a câmara Padrão, injetou-se 5 mL de suspensão celular contendo 15×10^6 células/mL com a centrifugação a 2000 rpm e coletaram-se diferentes frações sendo F0 em fluxo de 10 mL/min, F1 em fluxo de 15 mL/min, F2 em fluxo de 20 mL/min e F3 em fluxo de 60 mL/min, sendo que cada fração continha 100 mL do elutriado. As frações F2 coletadas foram submetidas à centrifugação, o pellet resuspenso em Meio C. As frações F2 foram unidas para novo procedimento de elutriação utilizando Câmara de Sanderson. Neste caso, 5 mL de suspensão celular contendo 2×10^6 células/mL foi injetada.

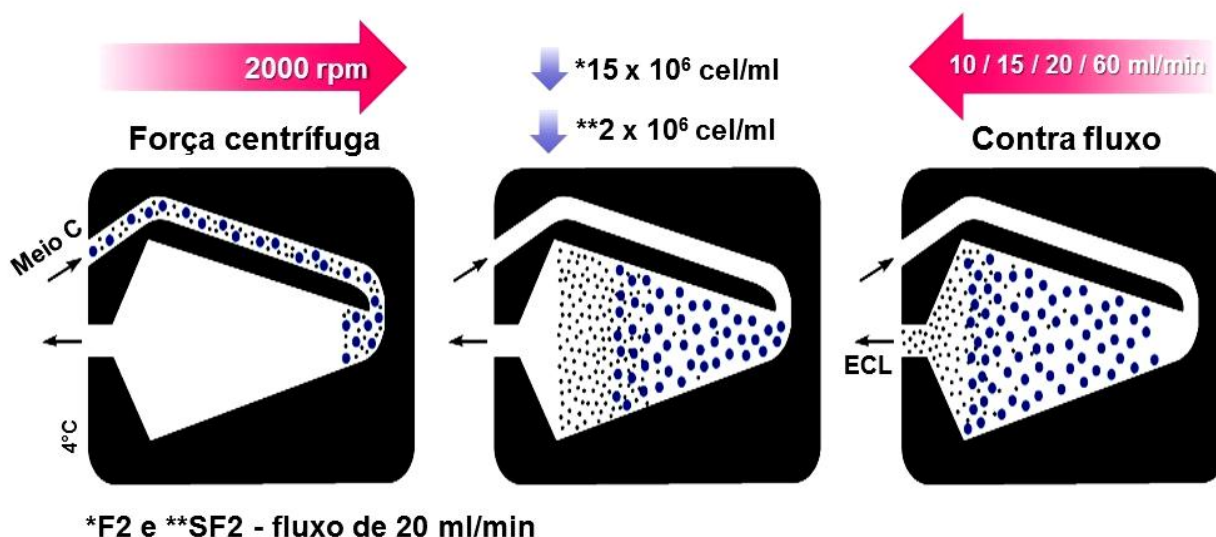


Figura 7. Diagrama esquemático mostrando a técnica de elutriação utilizando-se com rotor JE/6B e câmaras Standard e Sanderson.

A nova sequência de fluxo e as amostras coletadas foram: SF0 em 10 mL/min, SF1 em 15 mL/min, SF2 em 20 mL/min e finalmente, SF3 em 60 mL/min. A fração SF2 foi centrifugada, o pellet resuspenso em Meio C para contagem de células. A suspensão celular SF2 foi utilizada na etapa de purificação final utilizando gradiente de concentração de Nycodenz (NycoPrep – Universal; Axis-Shield, NORWAY).

A solução estoque de Nycodenz (60%) foi diluída em meio C contendo 10 mg de BSA e 1,2 mM de $MgCl_2$ para uma solução final de 15% (1.086 g/mL) e 10,8% (1.056 g/mL). O gradiente foi centrifugado a 1000 rpm, a 4°C, por 11 minutos com acelerações crescentes (1 min. a 500 rpm; seguido de 2 min. a 800 rpm, na sequencia 5 min. a 1000 rpm, depois 1 min. a 800 rpm, 1 min. a 600 rpm e finalizando com 1 min. a 500 rpm), como mostra a Figura 8. Após a centrifugação foram coletados 3 mL da parte superior do gradiente. A amostra foi lavada com meio C e ressuspensa para a contagem do número de células e verificação da viabilidade celular utilizando Azul de Tripano (Sigma-Aldrich).



Figura 8. Diagrama esquemático mostrando a técnica de purificação com gradiente de concentração de Nycodenz®.

3.3. Imunocitoquímica

A identificação das células ECL foi realizada por imunocitoquímica, como mostra a Figura 9 (Simerly et al., 2003). Para a realização da análise foi adicionado 100 µL de suspensão celular em lâminas de microscopia previamente silanizadas com organossilano (3-aminopropiltriétoxi-silano; Sigma Chemical Co®, St. Louis, MO, USA). As lâminas foram secas em temperatura ambiente. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ -10%) por 20 minutos, seguido de bloqueio com solução de leite desnatado à 3% em solução basal, durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS. Acrescentou-se 60 µL do anticorpo primário (1:1500 – *Anti-Histamine* – rabbit; Euro-diagnostica; Cat.no. B 80-1) e incubou-se por 30 min. a 37°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS/0,1% de Tween. Acrescentou-se 60 µL do anticorpo secundário biotilado (1:1000 – anti-rabbit; Santa Cruz) e incubou-se por 30 min. a 37°C em câmara úmida (cuba de vidro, contendo gase umedecida com água destilada). As lâminas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS. A imunocitoquímica foi finalizada utilizando os reagentes do Kit Santa Cruz. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, depois foram desidratadas e montadas com lamínulas para análise em microscópio ótico com câmera de Vídeo Digital (Nikon DS-Fi1 5.0mega pixels).

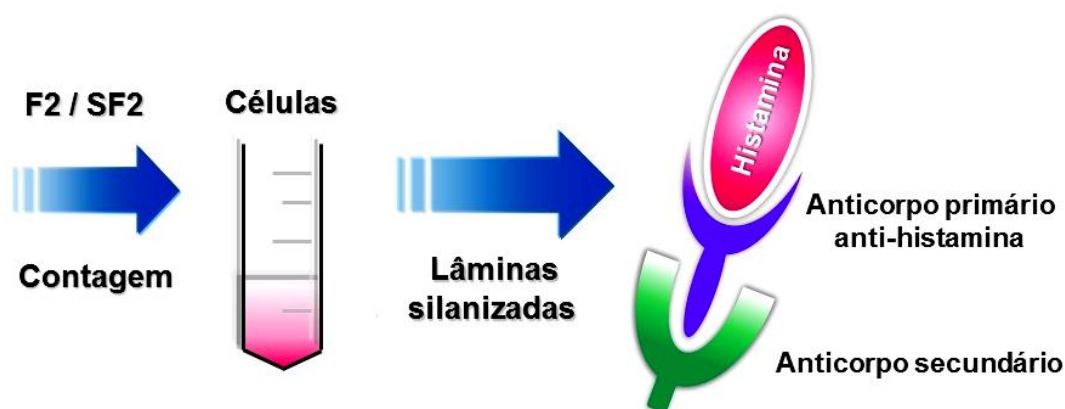


Figura 9. Diagrama esquemático mostrando a etapa de imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-histamina.

3.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

As células tipo-enterocromafins gástricas foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNeasy[®] tissue kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, $\sim 100\ \mu\text{g}$ de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A análise de expressão dos genes que codificam receptores de adenosina, A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 e do gene constitutivo β -actina foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Os primers utilizados neste estudo foram desenhados com o auxílio do site <https://orf.invitrogen.com/lux/> e estão mostrados na Tabela 1. As amostras foram cicladas no equipamento 7300 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em triplicata, e as amostras foram normalizadas usando-se o controle constitutivo β -actina. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{(Rt-Et)}/2^{(Rn-En)}$ (Buckhaults et al., 2001).

A reação da PCR em tempo real foi feita usando o Platinum[®] qPCR Supermix UDG (Invitrogen[™] Life Technologies, Alameda, CA, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Em resumo, para um volume final de $50\ \mu\text{L}$ foram adicionados $25\ \mu\text{L}$ do Platinum[®] SuperMix, $10\ \text{nM}$ de cada primer (Tabela 1) e $100\ \text{ng}$ do cDNA. Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: $2\ \text{min}$ a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de $2\ \text{min}$ a 95°C , seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por $15\ \text{s}$, anelamento a 59°C por $15\ \text{s}$, e uma extensão a 72°C por $30\ \text{s}$, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada $15\ \text{s}$ iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

Tabela 1. Primers usados na reação de PCR em tempo real.

Gene	Primer	Sequência (5' → 3')
β-actin	Sense	GCTACAGCTTCACCACCACA
	Antisense	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT
Histidina Descarboxilase	Sense	AGAAGTCACCTCCCCCAGAT
	Antisense	TCAGCTTTTTGAAGCCACCT
Cckbr	Sense	ACAAACCTGGTCCGTGCTAC
	Antisense	TAGGTAGAGTTCGCGGGAGA
Receptor A1	Sense	GGATCGATACCTCCGAGTCA
	Antisense	CAAGGGAGAGAATCCAGCAG
Receptor A2 _A	Sense	CAGATCCCCTGGAGAAGTCA
	Antisense	CAGCCCTTTCCTCACAAGAG
Receptor A2 _B	Sense	CCTTTGGCATTGGACTGACT
	Antisense	CAGGGCAGCAGCTCTTATTC
Receptor A3	Sense	TCTGTGCTGTAGTGGGCAAC
	Antisense	CAACAGCAATGTCAGCCAGT

3.5. Cultura primária de células tipo-enterocromafins gástricas

As células foram cultivadas em placas de 96 poços previamente preparadas com Matrigel® (1:10) por 48 h (Figura 10). O meio de cultura utilizado consistia de DMEM-Ham's F12 (1:1) suplementado com 2% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 IU/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 250 ng/mL de anfotericina B, 10 mg/mL de insulina, 5,5 mg/mL de transferrina, 5 ng/mL de ácido selenico, 0,5 mg/mL de soro albumina bovina, 15 mM HEPES, 10 mM fosfato de 5-pyridoxal e 100 pM gastrin-17. Duas horas antes da realização dos experimentos, o meio de cultura foi substituído por meio fresco sem suplementos.

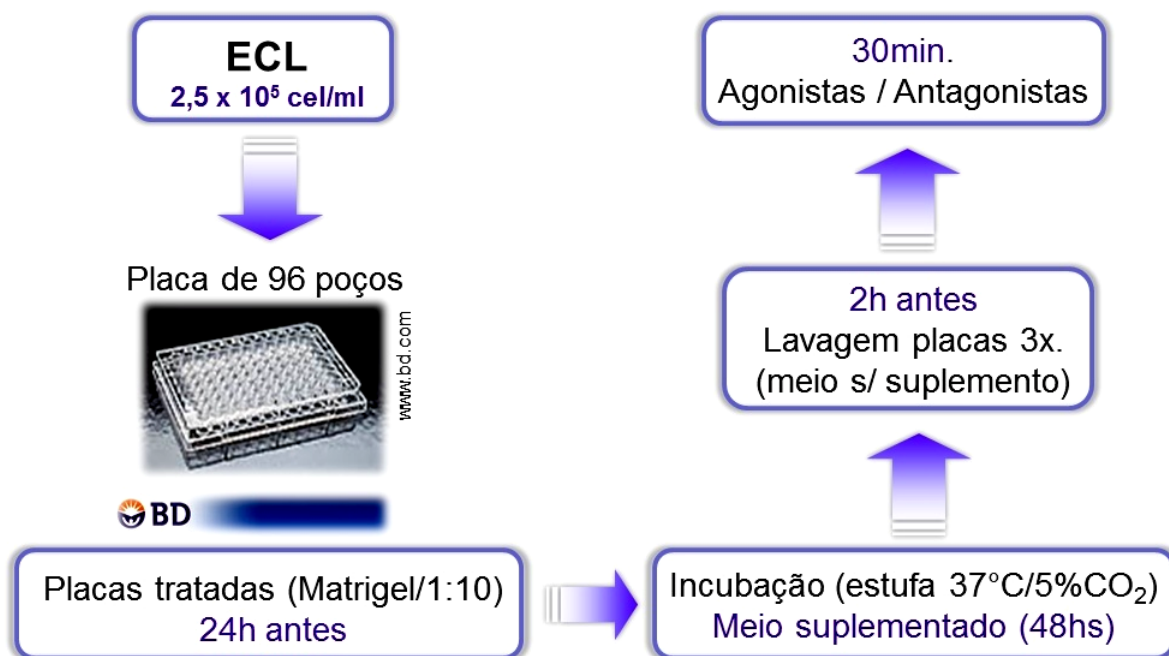


Figura 10. Diagrama esquemático mostrando a etapa de cultura primária, utilizando Matrigel® (1:10) e DMEM-Ham's F12.

3.6. Ensaios de secreção de histamina

Após 48 h de cultura, as células foram estimuladas com gastrina na concentração final de 10 nM na presença ou ausência dos agonistas e antagonistas adenosinérgicos: 2-cloroadenosina (seletivo A1), NECA (A2), CGS21680 (A2_A) e IB-MECA (A3) por 30 min (estufa a 37°C / 5% CO₂). O sobrenadante da placa de ELISA foi coletado e estocado para posterior análise de histamina. A histamina liberada foi mensurada utilizando Kit comercial de Imunoensaio (SPIbio - Bertin Phama, Cayman Chemicals). Em outro experimento, as células foram pré-tratadas com o antagonista DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µM por 10 min. antes de receberem o agonista 2-cloroadenosina nas concentrações de 1 e 3 µM.

3.7. Avaliação da secreção de ácido gástrico in vivo: Ligadura de piloro.

A avaliação da ação dos agonistas adenosinérgicos sobre a produção de ácido gástrico foi feita em animais com ligadura de piloro. Os animais foram colocados em jejum nas 24 horas que antecederam a realização da cirurgia. Após indução de anestesia com uma mistura de quetamina e xilasina 1:1 (v/ip) 0,1 mL/kg de peso corporal, os animais tiveram o abdômen aberto e o piloro ligado conforme descrito por MARÓSTICA e colaboradores em 2007.

Decorrido 1 hora da cirurgia e passado o período de sedação cada animal recebeu através de sonda orogástrica, utilizando cânula de gavage, um volume de 1 mL dos agonistas adenosinérgicos 2-cloroadenosina, Neca e IB-Meca nas concentrações de 30 µg/kg, 30 µg/kg e 10 µg/kg, respectivamente. Os controles receberam 1 mL de água e DMSO (veículo utilizado para diluição das drogas/agonistas) pela mesma via. Os animais foram sacrificados 4 h após o procedimento e o conteúdo gástrico foi coletado para determinação da acidez. A quantidade de ácido gástrico foi determinada por titulação com 0,01 M de NaOH (hidróxido de sódio) em pHmetro até pH 7,0.

3.8. Ensaio de MTT

A toxicidade celular foi avaliada usando o teste de redução do sal tetrazólio (MTT; 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas como descrito e, após a retirada do sobrenadante, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS). As células foram incubadas durante 3 h, a 37°C e 5% de CO₂, após este tempo foram adicionados a cada poço, 100 uL de SDS - dodecil sulfato de sódio a 10% em HCl (0,01 M). As amostras foram então incubadas durante 18h a 37°C e 5% de CO₂ a absorvância foi medida a 540 nm utilizando leitor de microplacas (Multiscan MS; Labsystems, Joensuu, Finlândia).

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste t de Student não-pareado ou teste de Dunnett para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento e pureza da suspensão celular obtida

O rendimento final de células após o gradiente de concentração foi de $3,83 \pm 1,7 \cdot 10^5$ células (n=5). A viabilidade final da suspensão celular gástrica foi superior a 90% e a análise por imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-histamina, indicou que $90,0 \pm 2,52$ % das células presentes eram ECL.

Nossos resultados estão de acordo com relatos de literatura que apontam para a obtenção de suspensão celular final contendo 90-95% de células ECL (Kidd et al., 1997; Lindstrom et al., 2001).

A reação de imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-histamina, foi realizada como forma de monitorar o processo de obtenção de uma suspensão enriquecida de células ECL (Figura 10). A biossíntese de histamina nas células ECL é realizada pela ação da enzima histidina descarboxilase (HDC). Ensaio *in vivo* e *in vitro* mostram um aumento da transcrição do gene da HDC quando as células ECL são estimuladas por gastrina (Dimaline e Sandvik, 1991; Prinz et al., 1994).

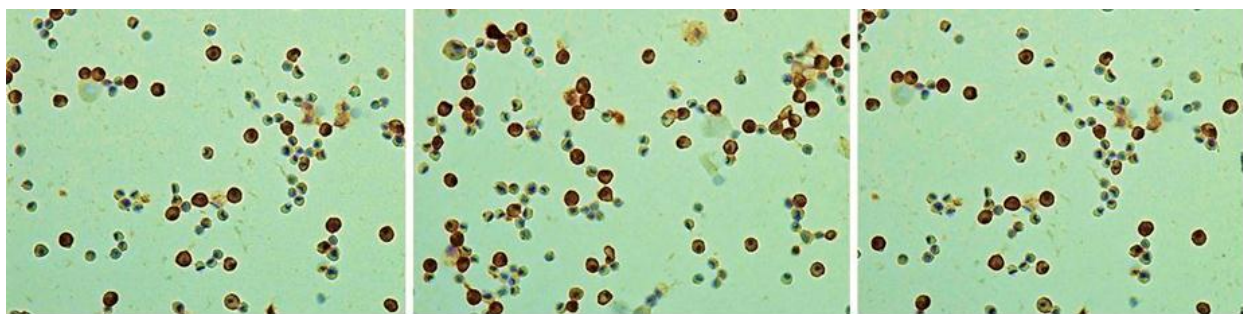


Figura 11. Imunocitoquímica de células ECL da fração SF2 (cor marrom) utilizando o anticorpo anti-histamina (400x.).

4.2. Análise da expressão dos genes por PCR em tempo real

Inicialmente analisamos a expressão do gene para enzima histidina descarboxilase (HDC) e para o receptor de gastrina/colecistocinina B (Cckbr) que sabemos serem genes expressos nas células ECL (Lambrecht et al., 2007). Esta análise confirmou a presença de ECLs purificadas, pois foi superior a expressão destes mesmos genes na suspensão celular bruta (Figura 12).

A expressão dos genes de receptores de adenosina foi determinada tanto nas ECLs como na suspensão celular bruta. Nota-se que a expressão do gene para o receptor A1 foi maior nas ECLs do que na suspensão celular bruta (Figura 13). Não há relatos na literatura descrevendo a expressão ou função dos receptores de adenosina em ECLs, mas sabe-se que a expressão do receptor A1 é baixa em análises feitas com estômago total (Dixon et al., 1996).

Os receptores A1 e A2_A são expressos na mucosa antral e corporal gástrica, e no plexo entérico, na qual, células G e D expressam receptor A1 e as células D expressam o receptor A2_A (Yip et al., 2004). Receptores de adenosina também são expressos em células parietais caninas e acredita-se que estes estejam envolvidos com a inibição da secreção do ácido gástrico (Gerber et al., 1988).

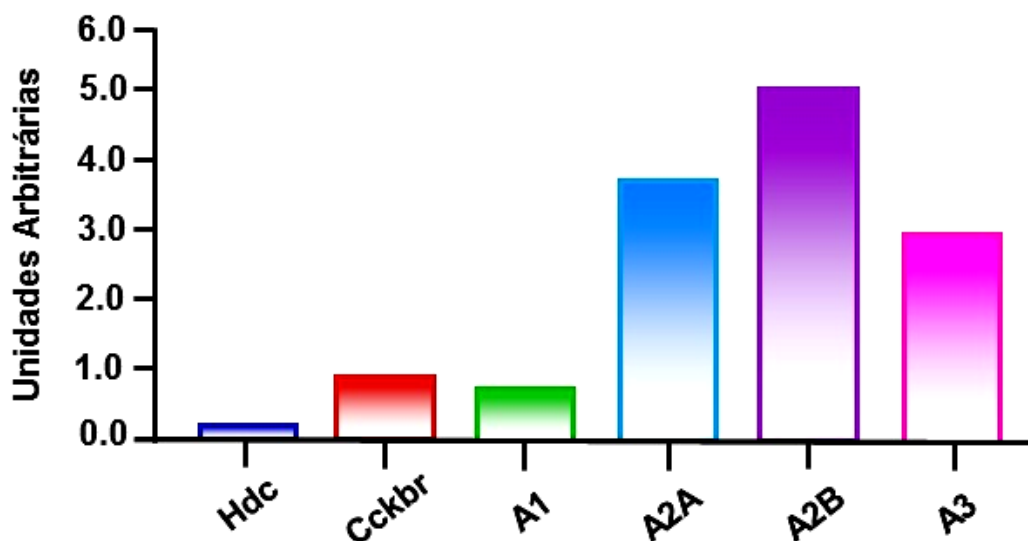


Figura 12. Expressão gênica em células não purificadas (após dispersão enzimática) de estômagos de ratos. O nível de expressão de cada gene normalizado pelo nível de expressão do gene β -Actina. Cada barra representa o desvio padrão de 2 experimentos realizados.

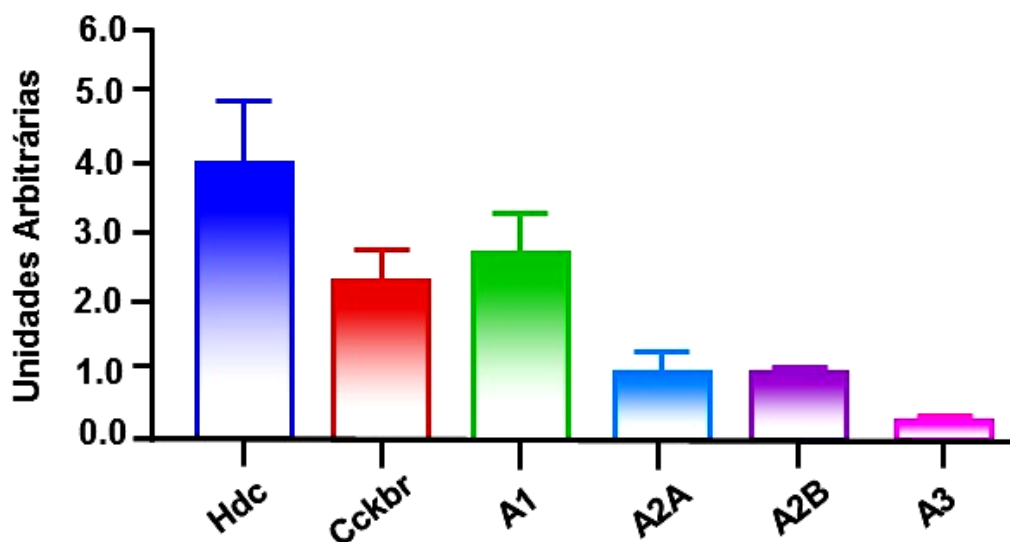


Figura 13. Expressão gênica em células ECL purificadas de estômagos de ratos. O nível de expressão de cada gene foi corrigido pelo nível de expressão do gene β -actina. Cada barra representa a média de 4 experimentos realizados, acompanhado do seu respectivo erro padrão da média.

4.3. Efeito dos agonistas adenosinérgicos na secreção de histamina em células ECL

A funcionalidade dos receptores de adenosina foi avaliada através de ensaios com agonistas e antagonistas em células mantidas em cultura primária.

Os agonistas de receptores de adenosina foram capazes de modificar a secreção de histamina em células ECL. O agonista seletivo do receptor (A1), 2-cloroadenosina, inibiu a secreção de histamina basal e estimulada por gastrina na concentração de 3 μ M (Figura 14). Observamos a reversão da inibição da secreção de histamina quando utilizamos o antagonista do receptor (A1), DPCPX na concentração de 1 μ M (Figura 15).

Ao avaliarmos o agonista do receptor (A2), NECA, não observamos efeito sobre a secreção de histamina basal ou estimulada pela gastrina (Figura 16). Quando utilizamos IB-MECA, agonista de receptor (A3), a liberação de histamina induzida por gastrina foi reduzida quando comparado com o controle sem agonista (Figura 17).

Os receptores de adenosina parecem mediar efeitos protetores na mucosa gástrica, inibindo a secreção de ácido gástrico e modificando a liberação de peptídeos regulatórios (Yip et al., 2004). A compreensão da funcionalidade destes receptores em ECL e a utilização de agonistas ou antagonistas como ferramentas farmacológicas pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas com base na modulação destes receptores e contribuir no avanço do entendimento da fisiopatologia gástrica.

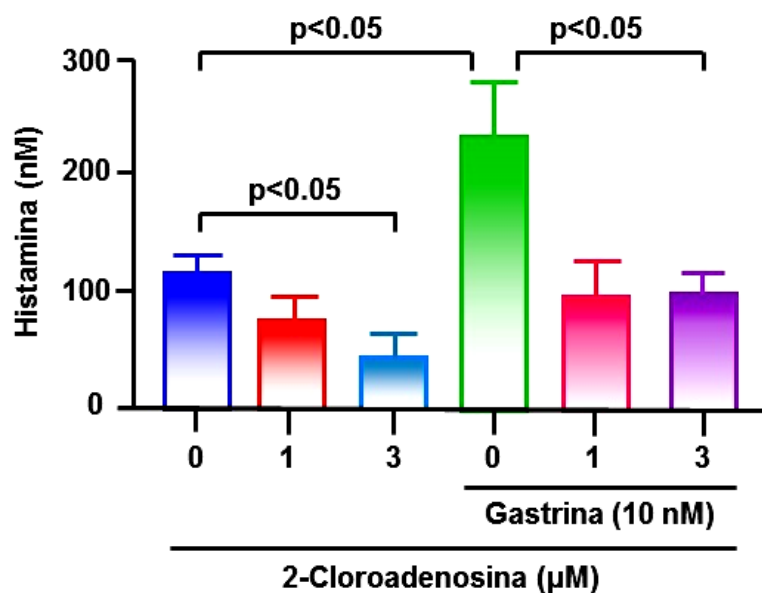


Figura 14. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A1 (2-cloroadenosina, 1 e 3 µM). Cada barra representa a média de 4 experimentos realizados, acompanhado do seu respectivo erro padrão da média.

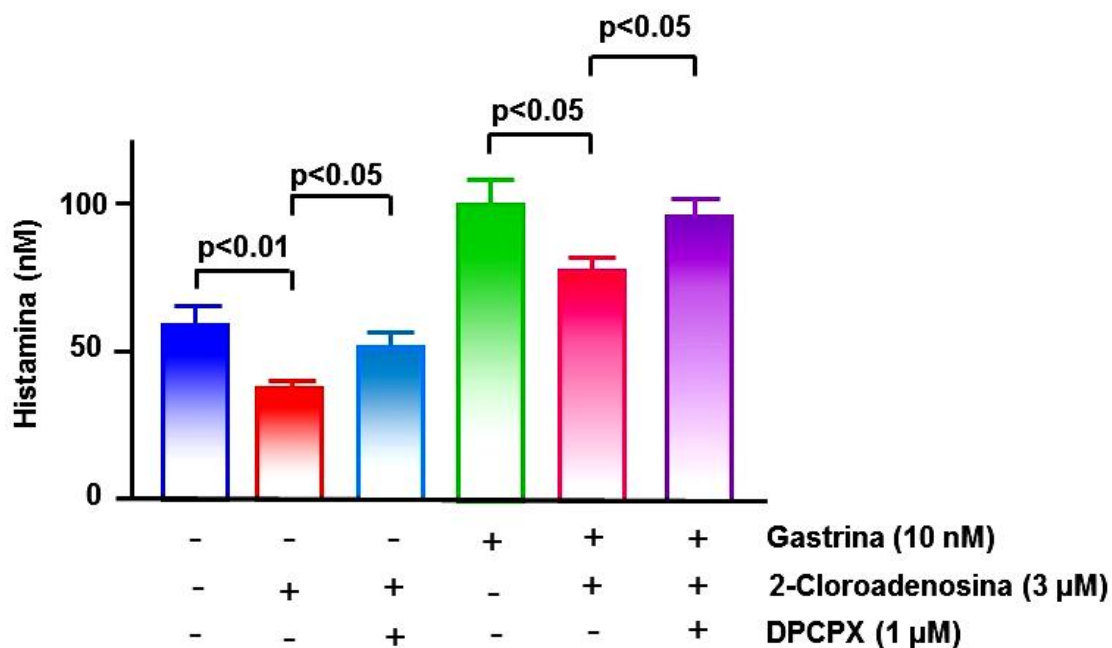


Figura 15. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de antagonista (DPCPX, 1 µM) de receptor de adenosina, A1 (2-cloroadenosina, 3 µM). Cada barra representa a média de 4 experimentos realizados, acompanhado do seu respectivo erro padrão da média.

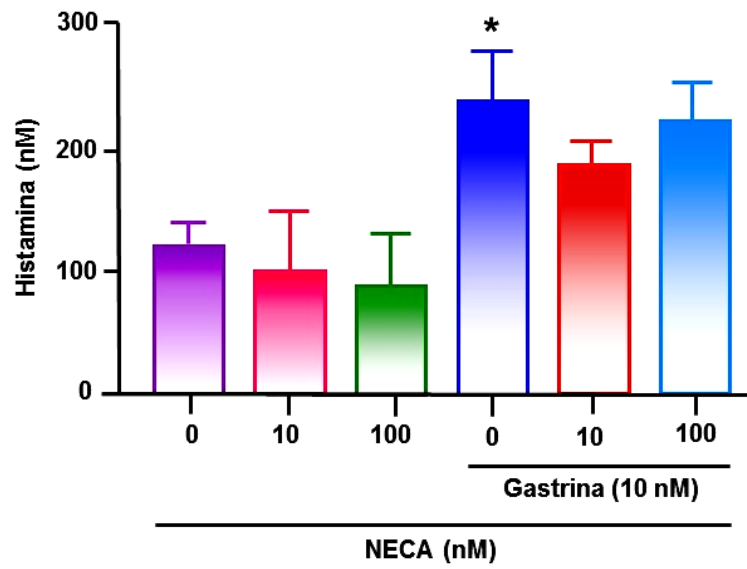


Figura 16. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A2 (NECA, 10 e 100 nM). Cada barra representa a média de 4 experimentos realizados, acompanhado do seu respectivo erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado com a secreção basal de histamina.

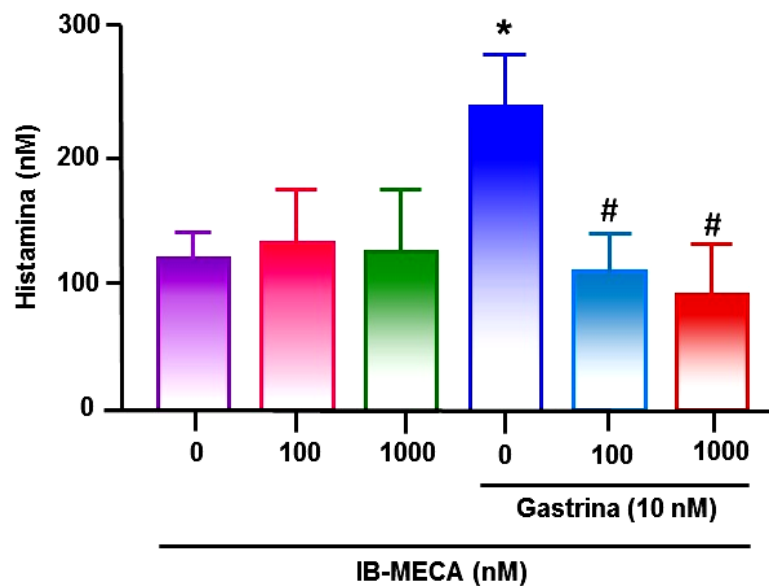


Figura 17. Secreção de histamina basal e após estímulo com gastrina em células ECL na presença de agonista de receptor de adenosina, A3 (IB-MECA, 100 e 1000 nM). Cada barra representa a média de 4 experimentos realizados, acompanhado do seu respectivo erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado com a secreção basal de histamina e # $p < 0,05$ quando comparado com o controle na presença do agonista.

4.4. Efeito dos agonistas adenosinérgicos sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.

As doses dos agonistas adenosinérgicos que resultaram em inibição da secreção de histamina em células ECL em cultura primária foram avaliadas quanto a um possível efeito citotóxico utilizando o Ensaio de MTT. Verificou-se que as doses empregadas não apresentam efeito citotóxico sobre as células, excluindo a possibilidade de que o efeito inibitório observado seja decorrente de ações tóxicas (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito dos agonistas adenosinérgicos sobre a viabilidade celular utilizando ensaio de MTT.

Tratamento	Redução de MTT (OD / 2,5 x 10⁵ cel/mL)
Veículo	0,597±0,098
IB-MECA (100 nM)	0,608±0,101
IB-MECA (1000 nM)	0,572±0,197
2-CLOROADENOSINA (1 µM)	0,575±0,175
2-CLOROADENOSINA (3 µM)	0,530±0,144

4.5. Efeito dos agonistas adenosinérgicos na secreção de ácido gástrico *in vivo*.

In vivo a inibição da secreção de ácido gástrico em animais com ligadura de piloro foi observada utilizando o agonista seletivo A1, 2-cloroadenosina quando comparado com o grupo controle, que recebeu somente água e DMSO (Figura 18). Outro estudo (Westerberg e Geiger, 1989) utilizando agonistas (análogos) de adenosina em modelo de ligadura de piloro em ratos, observou-se a mesma inibição da secreção de ácido clorídrico utilizando o agonista 2-cloroadenosina.

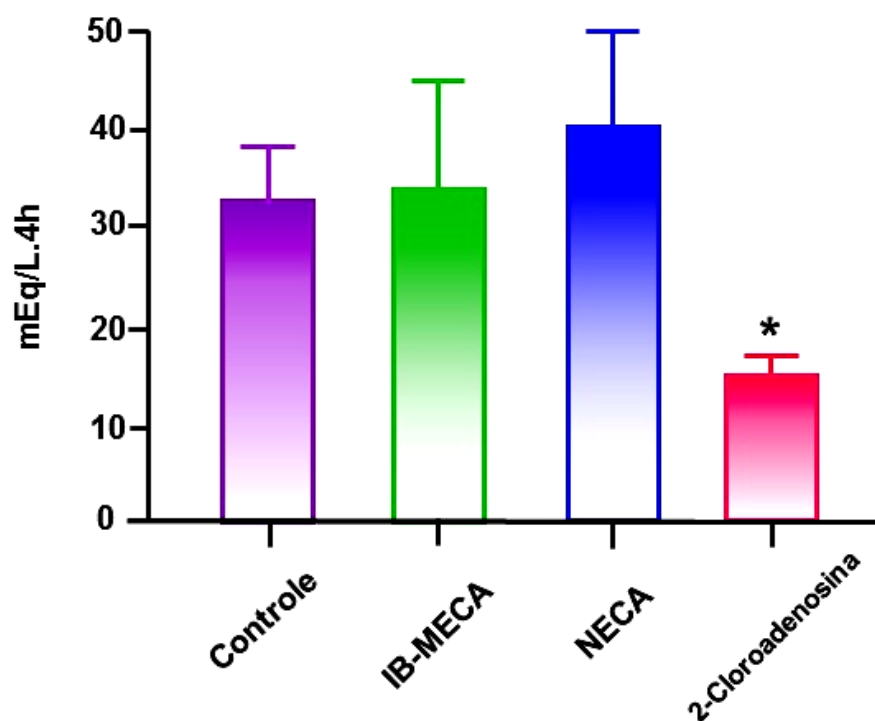


Figura 18. Avaliação da secreção ácida em animais dos grupos controle, 2-cloroadenosina (30 µg/kg), Neca (30 µg/kg) e IB-Meca (10 µg/kg). Dados expressos como média acompanhada de erro padrão da média (EPM) de n=3 e * p<0,05.

5. CONCLUSÕES

Células ECL isoladas da mucosa gástrica de ratos expressam RNAm para receptores de adenosina, sendo alta a expressão do receptor A1.

Funcionalmente, a ativação de receptores A1 resulta em inibição da secreção de histamina basal ou estimulada pela gastrina em células ECL, sendo o antagonista seletivo de receptor de adenosina A1 capaz de reverter tais efeitos.

O agonista de receptor A1 também foi capaz de inibir a secreção de ácido gástrico *in vivo*, sugerindo que receptores de adenosina possam mediar efeitos protetores na mucosa gástrica, constituindo potenciais alvos terapêuticos para a inibição da secreção de ácido gástrico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Salam, O. M.; Czimmer, J.; Debreceni, A.; Szolcsanyi, J.; Mozsik, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. **An overview. J Physiol Paris**, 95(1-6):105-27, 2001.

Adami, M.; Coruzzi, G.; Guaita, E.; Schunack, W.; Kitbunnadaj, R.; Timmermann, H. Neuronal histamine H(3) receptors mediate antisecretory effects in the rat isolated gastric fundus. **Inflamm Res**, 1:S25-6, 2004.

Andersson, N.; Rhedin, M.; Peteri-Brunbäck, B.; Andersson, K.; Cabero, J. L. Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin-like cells following long-term hypergastrinaemia *in vivo*. **Biochim Biophys Acta**, 1451(2-3):297-304, 1999.

Beales, I. L.; Calam, J. The histamine H3 receptor agonist N alpha-methylhistamine produced by *Helicobacter pylori* does not alter somatostatin release from cultured rabbit fundic D-cells. **Gut**, 176-81, 1998.

Bitziou, E.; Patel, B. A. Simultaneous detection of gastric acid and histamine release to unravel the regulation of acid secretion from the guinea pig stomach. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Epub ahead of print, 2012.

Blaser, M. J.; Atherton, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J.Clin Invest**, 321-33, 2004.

Brzozowski, T.; Ptak, A.; Kwiecień, S.; Pajdo, R.; Drozdowicz, D.; Pawlik, M.; Konturek, S. J.; Pawlik, W. W. Importance of nitric oxide (NO) and adenosine in the mechanism of gastric preconditioning induced by short ischemia. **Rocz Akad Med Białymst**, 48:42-7, 2003.

Buckhaults, P.; Rago, C.; St Croix, B.; Romans, K. E.; Saha, S.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. **Cancer Res**, 61(19),6996-7001, 2001.

Chen, D.; Aihara, T.; Zhao, C. M.; Håkanson, R.; Okabe, S. Differentiation of the Gastric Mucosa. I. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 291(4):G539-44, 2006.

Cobb, B. R.; Ruiz, F.; King, C. M.; Fortenberry, J.; Greer, H.; Kovacs, T.; Sorscher, E. J.; Clancy, J. P. A(2) adenosine receptors regulate CFTR through PKA and PLA(2). **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 282(1):L12-25, 2002.

Cui, G.; Waldum, H. L. Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. **World J Gastroenterol**, 13(4):493-6, 2007.

Dimaline, R.; Baxendale, A. J. Control of histidine decarboxylase gene expression in enterochromaffin-like cells., **Yale J Biol Med**, 71(3-4):195-205, 1998.

Dimaline, R.; Sandvik, A. K. Histidine decarboxylase gene expression in rat fundus is regulated by gastrin. **FEBS Let**, 281:20-22, 1991.

Dixon, A. K.; Gubitza, A. K.; Sirinathsinghji, D. J. S.; Richardson, P. J.; Freeman, T. C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br. J. Pharmacol**, 118:1461–1468, 1996.

Dixon, M. F. Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. **Baillieres Clin Gastroenterol**, 9(3):467-86, 1995.

Duman, J. G.; Pathak, N. J.; Ladinsky, M. S.; McDonald, K. L.; Forte, J. G. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. **J Cell Sci**, 115: 1251–1258, 2002.

El Omar, E. M.; Penman, I. D.; Ardill, J. E.; Chittajallu, R. S.; Howie, C.; McColl, K. E. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology**, 681-91, 1995.

El-Shoura, S. M. *Helicobacter pylori*: I. Ultrastructural sequences of adherence, attachment, and penetration into the gastric mucosa. **Ultrastruct Pathol**, 19(4):323-33, 1995.

Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, 53(4):527-52, 2001.

Fujii, T.; Fujita, K.; Takeguchi, N.; Sakai, H. Function of K⁺-Cl⁻ cotransporters in the acid secretory mechanism of gastric parietal cells. **Biol Pharm Bull**, 34(6):810-2, 2011.

Gerber, J. G.; Payne, N. A. Endogenous adenosine modulates gastric acid secretion to histamine in canine parietal cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 244(1):190-4, 1988.

Gillen, D.; El Omar, E. M.; Wirz, A. A.; Ardill, J. E.; McColl, K. E. The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects, **Gastroenterology**, 50-7, 1998.

Håkanson, R.; Alumets, J.; Ekelund, M.; Hedenbro, J.; Liedberg, G.; Lorén, I.; Sundler, F.; Vallgren, S. Stimulation of gastric acid secretion. **Scand J Gastroenterology**, 55:21-8, 1979.

Hamlet, A.; Olbe, L. The influence of *Helicobacter pylori* infection on postprandial duodenal acid load and duodenal bulb pH in humans. **Gastroenterology**, 391-400, 1996.

Heldsinger, A. A.; Vinik, A. I.; Fox, I. H. Inhibition of guinea-pig oxyntic cell function by adenosine and prostaglandins. **J Pharmacol Exp Ther**, 237(2):351-6, 1986.

Jain, K. S.; Shah, A. K.; Bariwal, J.; Shelke, S. M.; Kale, A. P.; Jagtap, J. R.; Bhosale, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg Med Chem**, 15(3):1181-205, 2007.

Johnson, L. R. Gastrointestinal Physiology. **Human Physiology**, 6th ed. St. Louis: Mosby, 2001.

Kahlson, G.; Rosengren, E. New approaches to the physiology of histamine. **Physiol Rev**, 48:155–196, 1968.

Khulusi, S.; Badve, S.; Patel, P. Pathogenesis of gastric metaplasia of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration. **Gastroenterology**, 452-8, 1996.

Kidd, M.; Miu, K.; Tang, L. H.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Sandor, A.; Modlin, I. M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates histamine release and DNA synthesis in rat enterochromaffin-like cells. **Gastroenterology**, 113(4):1110-7, 1997.

Koike, T.; Ohara, S.; Sekine, H. *Helicobacter pylori* infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. **Gut**, 49: 330-34, 2001.

Lambrecht, N. W. G.; Yakubov, I.; Sachs, G. Fasting-induced changes in ECL cell gene expression. **Physiological Genomics**, 31 183–192, 2007.

Levi, S.; Beardshall, K.; Swift, I. Antral *Helicobacter pylori*, hypergastrinaemia, and duodenal ulcers: effect of eradicating the organism. **BMJ**, 1504-5, 1989.

Lindström, E.; Björkqvist, M.; Boketoft, A.; Chen, D.; Zhao, C. M.; Kimura, K.; Håkanson, R. Neurohormonal regulation of histamine and pancreastatin secretion from isolated rat stomach ECL cells. **Regul Pept**, 15;71(2):73-86, 1997.

Lindström, E.; Lerner, U. H.; Håkanson, R. Isolated rat stomach ECL cells generate prostaglandin E(2) in response to interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and bradykinin. **Eur J Pharmacol**, 416:255-263, 2001.

Lindström, E.; Lerner, U. H.; Håkanson, R. Neurohormonal regulation of secretion from isolated rat stomach ECL cells: a critical reappraisal. **Regul. Pept**, 97, 169 – 180, 2001.

Margaret, J. C. The Anatomy of the Laboratory Mouse. **M.R.C. Laboratory Animals Centre Carshalton**, Surrey, England, Academic Press, 1983.

Maróstica, M.; Açari, D. P.; Bartchewsky, W. Jr; Ribeiro, M. L.; Pedrazzoli, J. Jr.; Gambero, A. Effects of a one-week treatment with acid gastric inhibitors on *Helicobacter pylori*-infected mice. **Scand J Gastroenterol**, 42(12):1404-12, 2007.

Martinsen, T. C.; Bergh, K.; Waldum, H. L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 96(2):94-102, 2005.

Mieke, V.; Postma, D. S.; Timens, W.; Hylkema, M. N. Effects of IL-4 and IL-13 on adenosine receptor expression and responsiveness of the human mast cell line 1. **Int Immunopharmacol**, 8(6):866-73, 2008.

Moss, S. F.; Legon, S.; Bishop, A. E.; Polak, J. M.; Calam, J. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. **Lancet**, 930-2, 1992.

Namiot, Z.; Rutkiewicz, J.; Stasiewicz, J.; Barańczuk, E.; Marcinkiewicz, M. Adenosine deaminase activity in the gastric mucosa in patients with gastric ulcer. Effects of ranitidine and sucralfate. **Eur J Pharmacol**, 205(1):101-3, 1991.

Nissinen, M. J.; Panula, P. Histamine-storing cells in the oxyntic mucosa of the rat stomach: a transmission electron microscopic study employing fixation with carbodiimide. **J Histochem Cytochem**, 41(9):1405-12, 1993.

Odashima, M.; Otaka, M.; Jin, M.; Komatsu, K.; Wada, I.; Horikawa, Y.; Matsuhashi, T.; Hatakeyama, N.; Oyake, J.; Ohba, R.; Watanabe, S.; Linden, J. Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by aspirin through activation of A2A adenosine receptor in rats. **World J Gastroenterol**, 12(4):568-73, 2006.

Peek, R.M.; Wirth, H. P.; Moss, S. F. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. **Gastroenterology**, 48-59, 2000.

Prinz, C.; Kajimura, M.; Scott, D.; Mercier, F.; Helander, H.; Sachs, G. Histamine secretion from rat enterochromaffin-like cells. **Gastroenterology**, 105:449–61, 1993.

Prinz, C.; Scott, D. R.; Hurwitz, D.; Helander, H. F.; Sachs, G. Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin-like cells in primary culture. **Am. J. Physiol**, 267:G663-G670, 1994.

Rothenbacher, D.; Blaser, M. J.; Bode, G.; Brenner, H. Inverse relationship between gastric colonization of *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. **J Infect Dis**, 1446-9, 2000.

Rudich, N.; Ravid, K.; Sagi-Eisenberg, R. Mast cell adenosine receptors function: a focus on the a3 adenosine receptor and inflammation. **Front Immunol**, 3:134, 2012.

Sachs, G.; Shin, J. M.; Briving, C.; Wallmark, B.; Hersey S. The pharmacology of the gastric acid pump: the H⁺,K⁺ ATPase. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 35:277-305, 1995.

Sandor, A.; Kidd, M.; Lawton, G. P.; Miu, K.; Tang, L. H.; Modlin, I. M. Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion. **Gastroenterology**, 110:1084–92, 1996.

Schulte, G.; Fredholm, B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell Signal**, 15(9):813-27, 2003.

Schwartz, J. C.; Pollard, H.; Quach, T. T. Histamine as a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem**, 35:26–35, 1980.

Simerly, C. R.; Moreno, R.; Ramalho-Santos, J.; Hewitson, L.; Schatten, G. Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes. **In A Laboratory Guide of the Mammalian Embryo**, Press, pp. 165-183, 2003.

Smith, D. O. Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. **J. Physiol**, 432: p. 343-354, 1991.

Smolka, A. J.; Backert, S. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. **J Gastroenterol**, Epub ahead of print, 2012.

Soll, A. H.; Walsh, J. H. Regulation of gastric acid secretion. **Annu Rev Physiol**, 41:35–53, 1979.

Stefani, C. B.; de Oliveira, R. M.; Silveira, A. A.; Ferraz, L. F.; Ribeiro, M. L.; Gambero, A.; Pedrazzoli Júnior, J. Expression of Toll-Like Receptors in Enterocromaffin-Like Cells and Their Function in Histamine Release. **Dig Dis Sci**, Epub ahead of print, 2012.

Vitoriano, I.; Saraiva-Pava, K. D.; Rocha-Gonçalves, A.; Santos, A.; Lopes, A. I.; Oleastro, M.; Roxo-Rosa, M. Ulcerogenic *Helicobacter pylori* strains isolated from children: a contribution to get insight into the virulence of the bacteria. **PLoS One**, 6(10):e26265, 2011.

Westerberg, V. S.; Geiger, J. D. Adenosine analogs inhibit gastric acid secretion. **Eur J Pharmacol**, 160(2):275-81, 1989.

Yip, L.; Leung, H. C.; Kwok, Y. N. Role of adenosine A1 receptor in the regulation of gastrin release. **J Pharmacol Exp Ther**, 310(2):477-87, 2004.

Zhao, C. M.; Chen, D. The ECL cell: relay station for gastric integrity. **Curr Med Chem**, 19(1):98-108, 2012.

Zimmermann, H. 50-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects., **Biochem. J**, 285: p. 345-365, 1992.

7. ANEXO



Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 14 de Março de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: "SECREÇÃO GÁSTRICA E CELULAS TIPO-ENTEROCROMAFINS: ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE TOLL-LIKE RECEPTORS E RECEPTORES DE ADENOSINA."

Autor(es): JOSE PEDRAZZOLI JUNIOR

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

MARCELO LIMA RIBEIRO

VICE- COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825

CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300

CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933