

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANA FLÁVIA TORQUATO DE ARAÚJO JUNQUEIRA

ESTUDO DO EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE,  
EHNA, SOBRE A ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* EM  
ALÇA ILEAL ISOLADA DE CAMUNDONGOS.

FORTALEZA

2008

ANA FLÁVIA TORQUATO DE ARAÚJO JUNQUEIRA

ESTUDO DO EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE,  
EHNA, SOBRE A ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* EM  
ALÇA ILEAL ISOLADA DE CAMUNDONGOS.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

FORTALEZA

2008

J94e

Junqueira, Ana Flávia Torquato de Araújo.

Estudo do efeito do inibidor da enzima adenosina desaminase, ehna, sobre a enterite induzida pela toxina a do *Clostridium difficile* em alça ileal isolada de camundongos /Ana Flávia Torquato de Araújo Junqueira; Orientador: Gerly Anne de Castro Brito. - Fortaleza, 2008 .

141f. :il.

Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2008.

1. Adenosina Desaminase 2. Enterite 3 Clostridium difficile I. Brito, Gerly Anne de Castro (Orient.) II. Título

CDD: 615.704

ANA FLÁVIA TORQUATO DE ARAÚJO JUNQUEIRA

ESTUDO DO EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE,  
EHNA, SOBRE A ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* EM  
ALÇA ILEAL ISOLADA DE CAMUNDONGOS.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia.

Aprovada em 06 / 06 / 2008

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ta</sup>. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Universidade Federal do Ceará - UFC

*Dedico esta dissertação a toda a minha família,  
especialmente aos meus pais Mazé e Weber,  
aos meus irmãos Renata e Ricardo,  
e ao meu marido Jerônimo,  
pelo amor e apoio de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pela sua firme orientação e dedicação, imensurável incentivo e, sobretudo, pela amizade e confiança.

Ao professor Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por seu conhecimento e disponibilidade em ajudar.

À professora Mariana Lima Vale, por sua dedicação e pelo grande apoio na realização desse trabalho.

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, exemplo de dedicação à pesquisa e profissionalismo.

À professora Adriana Abalen Martins Dias da Fundação Antonio Prudente, Hospital A C Camargo, pela gentileza na execução das análises por PCR.

Ao Dr. David Lyerly do Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, EUA, por sua gentileza em nos ceder a Toxina A do *Clostridium difficile*.

Ao professor Marcus Raimundo Vale, pela colaboração na dosagem da atividade da adenosina desaminase.

Ao professor Miguel Nasser Hissa, pelo incentivo e exemplo de competência e dedicação ao ensino.

Ao bolsista de iniciação científica André por sua amizade, conhecimento e profissionalismo na execução desse trabalho.

À amiga Antonieila por seu conhecimento, sua disposição constante em ajudar e pela grande colaboração na realização desse trabalho.

À pós-graduanda Ingrid pelas orientações e pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos pós-graduandos do LAFICA Roberto César, Rosa, Pedro, Jand Venes, Caroline, André Luís, Roberta, Hellíada, e todos os outros, pela agradável convivência e ajuda constante.

Ao técnico José Ivan, por sua boa vontade, fé e pela grande ajuda na confecção das lâminas.

À técnica de laboratório Maria Silvandira (Vandinha) pela constante ajuda.

À Aura, secretária da pós-graduação, e a todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

Aos amigos Aline, Denissa, Emanuelle, Fernanda, Jesper, Lícia, Litchia, Luciana, Monique, Pedro, Vanessa, Verônica, Viena e Rodrigo, pelo estímulo e pelos momentos de alegria e descontração compartilhados.

Ao Jerônimo, pelo amor, companheirismo e imensurável apoio, além da indispensável ajuda durante todos os experimentos.

À minha família e a Deus que me guiam e iluminam todos os instantes da minha vida.

## RESUMO

O *Clostridium difficile* tem como principal fator de virulência a toxina A (TxA), a qual provoca inflamação e destruição tecidual aguda em intestinos de animais experimentais e de pacientes com a doença induzida por esta bactéria. Em locais de injúria tecidual, adenosina é produzida em altas concentrações, onde exerce uma série de efeitos antiinflamatórios, limitados por sua rápida degradação pela enzima adenosina desaminase. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da inibição da enzima adenosina desaminase pelo EHNA (eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina) sobre a enterite induzida pela TxA do *C. difficile* em alça ileal de camundongos. Para isto, injetamos EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS i.p. 30 minutos antes da administração de TxA (10 a 100  $\mu\text{g}$ ) ou PBS na alça ileal isolada. Os animais foram sacrificados 3 horas depois da indução da enterite e as alças foram retiradas para estudo. As razões peso/comprimento da alça e volume de secreção/comprimento da alça foram calculadas e amostras de tecido foram coletadas para histopatologia, dosagem de atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 por ELISA, imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NOS induzível e PTX3, e PCR para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PTX3. A injeção de TxA (10 a 100  $\mu\text{g}$ ) nas alças ileais aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) as razões peso/comprimento da alça e volume de secreção/comprimento da alça com resultados consistentes a partir de 50  $\mu\text{g}$ . A TxA promoveu significativa ( $p < 0,05$ ) destruição tecidual, edema, infiltração de células inflamatórias, aumento das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e elevação de iNOS e PTX3. Todos esses parâmetros foram significativamente revertidos com o uso do EHNA ( $p < 0,05$ ). Em adição, a TxA não alterou os níveis de IL-10 em relação ao controle, mas o pré-tratamento com EHNA promoveu uma elevação nos níveis desta citocina. Assim, concluímos que na enterite induzida pela TxA em camundongos o EHNA demonstrou um potente efeito antiinflamatório, reduzindo consideravelmente a lesão tecidual, a migração neutrofílica, a expressão e os níveis de citocinas próinflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e produzindo um aumento nos níveis de IL-10. Além disso, a administração de TxA induziu um aumento na expressão da proteína PTX3 e no número de células imunomarcadas para iNOS no tecido ileal, ambos revertidos pelo EHNA.

Palavras-chave: Toxina A do *Clostridium difficile*, enterite, adenosina, adenosina desaminase, EHNA, pentraxina 3.



## ABSTRACT

The main factor of virulence in *Clostridium difficile* is toxin A (TxA), which can induce inflammation and acute tissue injury in the bowels of animals and humans affected by this organism. The high concentration of adenosine generated upon injury produces a number of antiinflammatory effects limited by rapid degradation by adenosine deaminase. The objective of this study was to determine the effect of EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine) inhibition of adenosine deaminase upon TxA-induced ileal loop enteritis in mice. EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) or PBS was injected i.p. 30 minutes prior to TxA (10-100  $\mu\text{g}$ ) or PBS instillation into the ligated ileal loop. The animals were euthanized 3 hours after enteritis induction and the ileal loops were retrieved for analysis. The weight/length ratio and the secretion volume/length ratio were calculated and tissue samples were submitted to histopathological study, myeloperoxidase assay (MPO), measurement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 levels with ELISA, immunohistochemical tests for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , inducible NOS and PTX3, and PCR assay for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PTX3. The instillation of TxA (10-100  $\mu\text{g}$ ) into the ileal loop significantly increased ( $p<0.05$ ) the weight/length ratio and the secretion volume/length ratio with consistent results above 50  $\mu\text{g}$ . TxA induced a significant amount ( $p<0.05$ ) of histological damage, edema and inflammatory cell infiltration and increased the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS and PTX3. All changes were significantly reverted by treatment with EHNA ( $p<0.05$ ). Moreover, IL-10 levels remained unchanged in animals treated with TxA, but increased in animals receiving EHNA. In conclusion, in mice with TxA-induced enteritis EHNA produced considerable antiinflammatory effects, reducing tissue injury, neutrophil migration, the expression and levels of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and producing an increase in IL-10 levels. In addition, TxA instillation increased PTX3 expression and the number of cells immunolabeled for iNOS in the ileal tissue, both of which were reverted by EHNA.

Keywords: *Clostridium difficile* toxin A, enteritis, adenosine, adenosine deaminase, EHNA, pentraxin 3.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADA	Adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
ADK	Adenosina quinase
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Graus centígrados
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDAD	Doença induzida pelo <i>Clostridium difficile</i>
cm	Centímetro
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
<i>et al.</i>	E colaboradores
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
h	Hora (s)
H&E	Hematoxilina e eosina
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IFN- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
i.p.	Intaperitoneal

kDa	Kilodalton
kg	Kilograma
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
M	Molar
min.	Minuto (s)
MIP	Proteína inflamatória macrofágica
μL	Microlitro
mg	Miligrama
μg	Micrograma
μmol	Micromol
MPO	Mieloperoxidase
n	Número
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nM	Nanomolar
PAF	Fator ativador plaquetário
PBS	Tampão fosfato-salino
pg	Picograma
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA2	Fosfolipase A2
P.M.	Peso molecular
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
PTX-3	Pentraxina 3
r.p.m.	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
TLR	Receptor Toll <i>like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TxA	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>
TxB	Toxina B do <i>Clostridium difficile</i>
U	Unidade
Vs	Versus
x	Vezes

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\kappa$	Capa
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1. O <i>Clostridium difficile</i> e sua relevância no contexto mundial atual.....	16
1.1 Doenças intestinais induzidas pelo <i>Clostridium difficile</i> .....	17
1.2 A Toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (TxA).....	20
2. ADENOSINA.....	24
2.1 Adenosina e inflamação.....	30
2.2 Adenosina Desaminase.....	34
<b>2. JUTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
1. Animais.....	42
2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	42
3. Drogas, soluções e corantes.....	43
3.1 Drogas.....	43
3.2 Corantes.....	44
3.3 Soluções.....	44
3.4 Tampões e Soluções usados na dosagem da atividade de Mieloperoxidase.....	45
3.5 Reagentes usados na dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10.....	45
3.6 Tampões, reagentes e soluções usados para o ensaio de imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ , iNOS, PTX3 e TNF- $\alpha$ .....	46
3.7 Anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ , iNOS, PTX3 e TNF- $\alpha$ .....	46

4. Protocolo Experimental.....	47
4.1 Indução da enterite em alça ileal isolada de camundongo.....	47
4.2 Histopatologia.....	48
4.3 Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	49
4.4 Dosagem de IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10.....	49
4.5 Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , iNOS e PTX3.....	50
4.6 PCR para TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ e PTX3.....	51
4.7 Análise estatística.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
1. Avaliação do efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (TxA) quando injetada dentro de alças ileais isoladas de camundongo.....	54
2. Avaliação do efeito do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase, nas alças ileais de camundongos tratadas com toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (50 $\mu$ g). .....	54
3. Efeito do inibidor da enzima adenosina desaminase, EHNA, sobre as alterações macroscópicas das alças ileais de camundongos induzidas por toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (TxA).....	57
4. Avaliação histológica do efeito do EHNA na enterite induzida por toxina A do <i>Clostridium difficile</i> em alça ileal de camundongos.....	57
5. Efeito do EHNA sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido das alças ileais isoladas de camundongos tratadas com toxina A do <i>Clostridium difficile</i> .....	62
6. Determinação de TNF- $\alpha$ no tecido de alça isolada de camundongos submetidos a tratamento intraluminal com PBS ou toxina A, após injeção intraperitoneal de EHNA ou PBS.....	62
7. Determinação de IL-1 $\beta$ no tecido de alça ileal isolada de camundongos submetidos a tratamento intra-luminal com PBS ou toxina A, após injeção intraperitoneal de EHNA ou PBS.....	67
8. Efeito do EHNA sobre os níveis de IL-10 no tecido de alças ileais isoladas de camundongos tratadas com toxina A do <i>Clostridium difficile</i> .....	67

9. Avaliação microscópica do efeito do EHNA sobre o conteúdo de óxido nítrico sintase induzível no tecido de alças ileais isoladas de camundongos tratadas com toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (TxA).....	72
10. Avaliação do efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> (TxA) e do EHNA sobre a expressão gênica de pentraxina-3 no tecido das alças ileais isoladas de camundongos.....	72
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>133</b>

## **INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1. O *Clostridium difficile* e sua relevância no contexto mundial atual

Isolado pela primeira vez em 1935, o *Clostridium difficile*, bacilo gram positivo anaeróbio formador de esporos, tem sido reconhecido como agente etiológico da colite pseudomembranosa em humanos desde 1978 (HALL & TOOLE, 1935; BARTLETT *et al.*, 1978). Atualmente, é considerado a causa mais importante de diarreia em adultos hospitalizados, especialmente após o uso de antibióticos de largo espectro (ASHA *et al.*, 2006; BLOSSOM & MCDONALD, 2007). A doença induzida por esta bactéria pode variar desde uma diarreia auto-limitada até uma colite fulminante com risco de morte, incluindo perfuração colônica e megacólon tóxico (OWENS, 2007).

Recentemente, vem sendo observado um aumento da incidência e da gravidade desta condição infecciosa em vários hospitais dos EUA, Canadá e Europa, especialmente após o ano 2000 (MCDONALD *et al.*, 2005 e 2006; LOO *et al.*, 2005). Tem sido relatado um aumento do número de casos críticos nos quais tratamentos radicais como colectomia foram utilizados. (MUTO *et al.*, 2005; LOO *et al.*, 2005). Observou-se também um aumento na taxa de recorrência da doença com o tratamento padrão, que era de 10% e subiu para 28% após o ano de 2003. (MCFARLAND, 2008) Nos anos 1990s, estudos mostravam um índice de mortalidade em torno de 2% para a doença induzida pelo *C. difficile*. Entretanto, dados mais recentes apontam para um aumento de mais de três vezes neste índice, que hoje chega a 6,9% (LOO *et al.*, 2005). Foi estimado um acréscimo de 3.600,00 dólares aos custos hospitalares para cada paciente com doença associada ao *C. difficile*, e esses custos podem ultrapassar 1 bilhão de dólares por ano nos Estados Unidos (KYNE *et al.*, 2002).

O aumento da incidência e da gravidade da doença induzida pelo *C. difficile* tem sido atribuído ao surgimento de uma cepa hipervirulenta NAP1/BI/027. (WARNY *et al.*, 2005) Esta cepa hipervirulenta foi isolada nas fezes de pacientes com doença induzida pelo *C. difficile* nos EUA (MCDONALD *et al.*, 2005; MUSHER *et al.*, 2006), Canadá (PEPIN *et al.*, 2005), Inglaterra (KUIJPER *et al.*, 2007), Holanda (VAN STEENBERGEN *et al.*, 2005), Bélgica (DELMEE *et al.*, 2006) França (TACHON *et al.*, 2006), e Japão (KATO *et al.*, 2007).

Esta cepa é caracterizada como “toxintype III”, enquanto historicamente mais de 80% das cepas hospitalares eram “toxintype 0” (GERIC *et al.*, 2004; MCDONALD *et al.*, 2005; WARNY *et al.*, 2005). NAP1/BI/027 produz uma toxina descrita mais recentemente chamada toxina binária e possui uma mutação no gene *tcdC*, um regulador negativo da produção de toxinas A e B (MACCANNELL *et al.*, 2006; POPOFF *et al.*, 1988). Foi encontrado que cepas com esta mutação produzem 16 vezes mais toxina A e 23 vezes mais toxina B comparada a outras cepas do *C. difficile* (WARNY *et al.*, 2005; RUPNIK *et al.*, 2005). Um importante fator associado à disseminação da cepa NAP1/BI/027 tem sido a sua característica resistência as fluoroquinolonas e o freqüente uso desta classe de antibióticos em ambiente hospitalar (MUTO *et al.*, 2005; GAYNES *et al.*, 2004; LOO *et al.*, 2005).

As mudanças recentes na epidemiologia da doença induzida pelo *C. difficile* incluem também o surgimento de novas populações de risco. Relatos demonstram o aumento de casos da doença na comunidade, isto é, em indivíduos não hospitalizados e que não tinham história de uso prévio de antibióticos, bem como em mulheres jovens durante o periparto (MMWR, 2005; DIAL *et al.*, 2005). Pouco se sabe sobre as espécies responsáveis por esses casos adquiridos na comunidade e sua origem, porém ultimamente tem sido relatada contaminação de carne bovina e suína (RODRIGUEZ-PALACIOS *et al.*, 2007; RUPNIK, 2007), sugerindo que alimentos possam estar envolvidos na transmissão do *C. difficile* de animais para humanos.

Apesar da escassez de informações sobre a incidência da doença no Brasil, um estudo multicêntrico demonstrou que entre os enteropatógenos prevalentes na diarreia da comunidade, o *C. difficile* foi a terceira mais freqüente espécie isolada (ANTUNES *et al.*, 2002). Adicionalmente, trabalho realizado na cidade do Rio de Janeiro revelou que espécies de *C. difficile* foram detectadas em 6,7% de amostras de fezes de crianças hospitalizadas ou não (PINTO *et al.*, 2003), sugerindo que investigação para *C. difficile* deve ser considerada na diarreia pediátrica em pacientes hospitalizados ou não nos países em desenvolvimento. Deve-se ainda considerar que a doença pode ser manifestada em formas muito graves na população pediátrica, como enterocolite fulminante (PRICE *et al.*, 1988).

### **1.1 Doenças intestinais induzidas pelo *Clostridium difficile* (CDAD)**

A doença induzida pelo *C. difficile* (CDAD) têm claramente aumentado em incidência e gravidade desde a sua descrição inicial no final dos anos 1970s. Atualmente, reconhece-se que o *C. difficile* é o agente etiológico de até 33% dos casos de diarreia associada à antibioticoterapia e de 90 a 100% dos episódios de colite pseudomembranosa (BLOSSOM & MCDONALD, 2007). Os fatores de risco para o desenvolvimento da CDAD tipicamente incluem a presença de: alteração da flora intestinal normal, exposição e colonização colônica pelo *C. difficile* toxicogênico e susceptibilidade do hospedeiro (MCFARLAND, 2008; POUTANEN & SIMOR, 2004).

O uso de antibióticos, presente em mais de 96% dos casos de CDAD, pode alterar a microflora intestinal de forma a permitir a colonização por bactérias toxicogênicas do *C. difficile* (ADAMS & MERCER, 2007; MCFARLAND, 2008). O uso de cefalosporinas, penicilinas, clindamicina e, mais recentemente, fluoroquinolonas tem sido frequentemente relacionado a essa doença, embora se acredite que qualquer tipo de antimicrobiano possa incitar o desenvolvimento de CDAD. (BARTLETT, 2002; KELLY *et al.*, 1994; LOO *et al.*, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que o uso excessivo de antibióticos tem papel importante na crescente incidência de CDAD observada nos últimos anos, e recomendado a utilização mais criteriosa desses medicamentos (HOOKMAN & BARKIN, 2007; MCDONALD *et al.*, 2006).

CDAD é uma patologia associada primariamente a ambientes hospitalares, asilos e centros de reabilitação, onde a exposição a antibióticos e a contaminação com esporos do *C. difficile* é mais comum (JOHAL *et al.*, 2004; MCFARLAND *et al.*, 1989). Foi demonstrado que a duração da hospitalização é diretamente proporcional a incidência de CDAD (CLABOTS *et al.*, 1992). MCFARLAND e colaboradores (1989) acompanharam 399 pacientes com cultura de fezes negativa para *C. difficile* na época da admissão hospitalar. No curso de sua hospitalização, 21% desses pacientes se tornaram positivos para *C. difficile* e, destes, 37% desenvolveram diarreia. O mesmo autor encontrou que, entre os pacientes hospitalizados que desenvolveram CDAD, 74% foram contaminados pelo *C. difficile* no hospital, 20% eram positivos para *C. difficile* na admissão hospitalar, mas tinham história de hospitalização recente, e apenas 5% adquiriram a bactéria na comunidade. O *C. difficile*, por ser capaz de formar esporos, é capaz de sobreviver em superfícies inanimadas por longos períodos, o que facilita a transmissão fecal-oral desta bactéria (KIM *et al.* 1981; POUTANEN

& SIMOR, 2004). Recentemente, vários trabalhos têm alertado para a alta transmissão de esporos do *C. difficile* através do contato de pacientes com profissionais de saúde, e encorajado a instituição de práticas de controle da infecção, como a freqüente lavagem de mãos com agentes esporocidas (OWENS, 2007; SAMORE *et al.*, 1996; BARTLETT, 2002).

Outro fator de risco importante para o desenvolvimento da CDAD é a colonização intestinal por cepas toxicogênicas do *C. difficile*. Uma série de fatores de virulência, incluindo produção de flagelo e de enzimas hidrolíticas, tem sido associada com o desenvolvimento da doença (TASTEYRE, *et al.*, 2000; SEDDON, *et al.*, 1990). Porém, os mais bem caracterizados e mais importantes fatores de virulência produzidos pelo *C. difficile* são as exotoxinas A e B (BORRIELO, *et al.*, 1998; POXTON, *et al.*, 2001; BONGAERTS & LYERLY, 1994) que estão diretamente relacionadas ao desencadeamento das doenças diarréicas e de suas complicações clínicas (TITOV *et al.*, 2000).

As toxinas A e B são codificadas pelos genes *tcdA* e *tcdB*, respectivamente, que juntos com três genes regulatórios (*tcdC*, *tcdD* e *tcdE*) formam o locus de patogenicidade no cromossomo do *C. difficile* (BRAUN *et al.*, 1996; POXTON *et al.*, 2001; SPIGAGLIA *et al.*, 2002). As toxinas A e B possuem estruturas primárias muito semelhantes e exercem suas atividades enzimáticas em um terminal NH<sub>2</sub> homólogo (VON EICHEL-STREIBER *et al.*, 1990 e 1992; SILVA & SALVIANO, 2003). A maioria das cepas toxigênicas do *C. difficile* produz ambas as toxinas A e B, as quais possuem mecanismos de ação similares: afetam o citoesqueleto de actina da célula intestinal ao induzirem a glicosilação de proteínas da família Rho, resultando em morte celular (RUPNIK *et al.*, 2005; SILVA e SALVIANO, 2003). Uma terceira toxina, a toxina binária, tem sido isolada em 6% dos casos de CDAD. Seu papel na patogênese da doença e sua relevância clínica ainda não foram elucidados (GERIC *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2004), no entanto, existem relatos de que cepas produtoras desta toxina estão relacionadas com doença de maior gravidade (BARBUT *et al.*, 2005).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CDAD associados ao hospedeiro incluem idade avançada, imunossupressão e presença de comorbidades (KYNE *et al.*, 2001). Um estudo observou que pacientes que não conseguiram desenvolver IgG anti-Toxina A eram 48 vezes mais susceptíveis a desenvolver diarréia comparado àqueles que obtiveram resposta imune adequada (KYNE *et al.*, 2001). Além disso, alguns estudos têm relatado uma associação positiva entre CDAD e terapias que reduzem o pH gástrico, como os inibidores de

bomba de próton, procedimentos no trato gastrointestinal e o uso de sonda nasogástrica (DIAL *et al.*, 2005; BIGNARDI, 1998).

Os sintomas de CACD se manifestam tipicamente dentro de 4 a 9 dias após o início da terapia antibiótica, porém podem ocorrer em qualquer tempo até 8 semanas após o início do tratamento (HURLEY & NGUYEN, 2002). Os achados clínicos mais frequentes são diarreia aquosa, cólica abdominal e febre com leucocitose. As formas mais severas da doença compreendem a colite pseudomembranosa e o megacólon tóxico e podem se manifestar com discreta ou mesmo ausência de diarreia (HURLEY & NGUYEN, 2002; BORRIELLO, 1990). As complicações da CACD incluem: desenvolvimento de doença recorrente (20-30%), abdomen agudo, necessidade de colectomia e choque séptico (MCMASTER-BAXTER & MUSHER, 2007).

O diagnóstico da CACD envolve a detecção das toxinas A e B nas fezes de pacientes com achados clínicos da doença. O imunoenensaio (ELISA), que detecta ambas as toxinas A e B em apenas 2 a 6 h com especificidade de 99% e sensibilidade de 70-90%, é o teste mais difundido atualmente (KELLY & LAMONT, 1998). Os achados macroscópicos durante uma endoscopia do cólon de pacientes com CDAD variam amplamente de acordo com a gravidade da doença. Podem ser encontrados na mucosa colônica desde leve edema até eritema difuso, friabilidade, pequenas ulcerações e as patognomônicas pseudomembranas. As pseudomembranas são placas elevadas esbranquiçadas ou amareladas de 0,2 a 2 cm de diâmetro, caracterizadas histologicamente por “lesões vulcânicas” compostas por neutrófilos, mucina e restos celulares (POUTANEN & SIMOR, 2004). Uma vez confirmado o diagnóstico, antibióticos sistêmicos devem ser suspensos na medida do possível e a terapia para erradicar o *C. difficile* é recomendada com metronidazol ou vancomicina oral (ADAMS & MERCER, 2007; STARR, 2005).

## **1.2 A Toxina A do *Clostridium difficile* (TxA)**

A toxina A do *Clostridium difficile* (TxA), uma proteína de alto peso molecular (308 kDa), altera dramaticamente a fisiologia celular, desde as vias de sinalização à manutenção estrutural das células, culminando com a morte celular. Quando introduzida no

lúmen intestinal de animais *in vivo*, a TxA promove destruição do epitélio intestinal, intensa inflamação na mucosa, secreção intestinal e colite hemorrágica, reproduzindo os achados encontrados na doença induzida pelo *C.difficile*. (HUMPHREY *et al.*, 1979; REHG, 1980).

Após ligação a receptores de membrana e internalização no citosol das células intestinais, a TxA induz uma série de alterações na fisiologia celular do hospedeiro (VOTH & BALLARD, 2005). A maioria dos efeitos da toxina A é atribuído a sua capacidade de causar monoglicosilação nas proteínas Rho, Rac e Cdc42, utilizando UDP-glicose como co-substrato (JUST *et al.*, 1995, GENTH *et al.* 2008). Rho, Rac e Cdc42 são pequenas GTPases intracelulares que exercem um papel regulador primário sobre o citoesqueleto de actina e a morfologia celular (HALL, 1990). A monoglicosilação induzida pela TxA promove a inativação dessas proteínas, o que resulta em condensação da actina e conseqüente desarranjo do citoesqueleto, retração e arredondamento celular, marginalização do núcleo, perda da integridade estrutural e morte celular (JUST *et al.*, 1995; HALL, 1998; FIORENTINI *et al.*, 1990).

A colite induzida pela TxA do *C. difficile* está associada a um proeminente influxo de neutrófilos para dentro da mucosa colônica e, assim como a colite pseudomembranosa, é caracterizada por um infiltrado inflamatório agudo e pseudomembranas ricas em neutrófilos (LYERLY *et al.*, 1988). A inativação da proteína Rho pela TxA induz a perda das zônulas de oclusão na barreira epitelial intestinal através de um processo envolvendo proteína quinase C e resulta no aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (NUSRAT *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2002). A alteração da integridade celular e o aumento da permeabilidade epitelial contribuem para a migração neutrofílica e deflagração dos eventos inflamatórios observados na colite induzida pela TxA (VOTH & BALLARD, 2005). QIU e colaboradores (1999) demonstraram que, durante a enterite induzida pela TxA, os neutrófilos reagem liberando metabólitos reativos do oxigênio, exacerbando a inflamação. LIMA e colaboradores (1989) mostraram que após 2h de inoculação com TxA em alças intestinais isoladas de coelho havia infiltrado neutrofílico na lâmina própria e na superfície epitelial bem como destruição da mucosa. Um trabalho do nosso grupo demonstrou que a fucoidina, um inibidor de moléculas de adesão essenciais para a migração leucocitária, reduziu a secreção, a infiltração celular e a lesão histológica induzidas pela TxA em alça isolada de camundongo (BARRETO *et al.*, 2008). Um outro trabalho do nosso grupo demonstrou que a toxina A induziu uma alteração na forma, função e adesividade de neutrófilos ao substrato e que esta

alteração foi acompanhada de inativação de Rho, rearranjo do citoesqueleto celular e aumento de expressão de integrinas em detrimento da selectina L (BRITO *et al.*, 2002a). Estes efeitos sobre neutrófilos poderiam contribuir para a formação das pseudomembranas típicas da colite induzida pelo *C. difficile* que se caracteriza pela presença de muitos neutrófilos aderidos à mucosa lesada.

Tem sido proposto que o recrutamento de neutrófilos na colite induzida pela TxA ocorre em resposta a eventos mediados por moléculas inflamatórias e também através de uma ação quimiotóxica exercida diretamente pela TxA (LYERLY *et al.*, 1988). Estudos com alças ileais de coelho, encontraram que a inflamação induzida pela TxA envolveu a ligação direta da toxina a neutrófilos e essa ligação envolveu um receptor ligado a proteína G (KELLY *et al.*, 1994). Além disso, CASTAGLIUOLO e colaboradores (1998) demonstraram que a TxA é capaz de recrutar neutrófilos indiretamente para o local da inflamação ao aumentar a expressão da proteína inflamatória macrofágica 2 (MIP-2) nas células epiteliais intestinais (KELLY *et al.*, 1994).

Em adição a infiltração neutrofilica, macrófagos e mastócitos respondem à toxina A promovendo um aumento da resposta inflamatória através da produção de mediadores, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (CALDERON *et al.*, 1998). VOTH e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos com deficiência de mastócitos apresentaram uma redução da migração neutrofilica e desenvolveram menor acúmulo de fluido após o tratamento com a TxA.

A TxA estimula a liberação de mediadores endógenos da inflamação, incluindo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e fator ativador plaquetário (PAF) (TRIADAFILOPOULOS *et al.*, 1987 e 1989; FANG *et al.*, 1994). ROCHA e colaboradores (1997) e SOUZA e colaboradores (1997) concluíram que a migração neutrofilica na cavidade peritoneal e na bolsa de ar de ratos induzida pela TxA foi mediada por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e por leucotrienos, liberados por macrófagos residentes. Tem sido demonstrado que a TxA induz a secreção de IL-8 e outras citocinas por uma via que envolve a ativação de NF- $\kappa$ B e AP1 em monócitos e células epiteliais intestinais (JEFFERSON *et al.* 1999; KIM *et al.*, 2006). HE e colaboradores (2002) demonstraram que a liberação de IL-8 induzida pela TxA estimula a produção de espécies reativas do oxigênio e radicais livres em colonócitos

humanos. Em concordância com esses achados, foi demonstrado que a interleucina-11, citocina capaz de bloquear a liberação de TNF- $\alpha$  e outros mediadores, inibiu a lesão induzida pela TxA em íleo de ratos (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1997b). Recentemente, foi demonstrado que a TxA, através da porção C-terminal ARU, poderia ligar-se diretamente à células endoteliais e induzir a produção de IL-6, IL-8 e proteína quimiotática monocítica 1(mcp-1) de maneira dose-dependente (YEH *et al.*, 2008).

A toxina A também modula a atividade da fosfolipase A2 (PLA2), levando a produção de prostaglandinas e leucotrienos (FANG *et al.*, 1994). LIMA e colaboradores (2008) demonstraram que a inibição da PLA2 preveniu a secreção e o dano histológico induzidos pela TxA, sugerindo que a PLA2 é uma via importante na lesão histológica e secreção hemorrágica produzidos pela TxA do *C. difficile*. Outro mediador inflamatório, o fator ativador plaquetário (PAF), tem sido implicado na fisiopatologia da enterite induzida pela TxA. FONTELES e colaboradores (1995) demonstraram que antagonistas do PAF reduziram a secreção induzida por TxA em alça de coelhos.

Há uma clara evidência que neurônios sensoriais primários são também modulados pela TxA (MANTYH *et al.*, 1996b). Estudos iniciais de POTHOUKAKIS e colaboradores (1994) encontraram que uma substância antagonista da substância P atenuou a resposta inflamatória intestinal a TxA. A substância P é um pequeno peptídeo associado a neurônios sensoriais que recobrem regiões da submucosa do epitélio intestinal e está envolvida na diarreia inflamatória (POTHOUKAKIS *et al.*, 1994). A substância P ativa os receptores de neurocinina-1 em uma variedade de tipos de células intestinais incluindo nervos entéricos, células endoteliais e macrófagos da lâmina própria e estimula o extravasamento plasmático, a secreção de fluido, a degranulação de mastócitos e a liberação de citocinas (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1997a; FIGINI *et al.*, 1997; MANTYH, *et al.*, 1996b). O mecanismo pelo qual a TxA modula a produção de substância P ainda não é completamente compreendido, mas tratamento de alças isoladas de ratos com esta toxina leva ao aumento da produção de substancia P (MANTYH, *et al.*, 1996a). Estudos mais recentes mostraram que a deleção da endopeptidase neural, uma importante proteína para o turnover de substância P, exacerba a resposta inflamatória induzida pela TxA (KIRKWOOD *et al.*, 2001).

Apoptose celular tem sido apontada como um importante mecanismo da lesão induzida pela TxA do *C. difficile*. MAHIDA e colaboradores (1998) demonstraram que a TxA



induziu apoptose de linfócitos T purificados, sugerindo que esse fenômeno ocorreu em consequência da interação direta entre essas células e a toxina. BRITO e colaboradores (2002b) demonstraram que a toxina A do *C. difficile* é um potente indutor de apoptose em uma linhagem de células de epitélio intestinal humano e que esta apoptose é mediada por caspases 3, 6, 8, 9 e Bid e por lesão mitocondrial seguida de liberação de citocromo c, e toda esta cascata é dependente da atividade enzimática da TxA em Rho. Confirmando nosso dado, NOTTROT e colaboradores (2007) concluíram em seus trabalhos que a ativação das caspases 3, 8 e 9 é estritamente dependente da glicosilação das GTPases Rho pela TxA, e o uso de um inibidor dessas caspases aboliu a apoptose induzida pela TxA. Outro possível mecanismo responsável pela apoptose celular observada na enterite causada pela TxA foi descrita por KIM e colaboradores (2007). Esse grupo concluiu que a liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) induzida pela TxA promove a ativação do fator nuclear NF-κB e do sistema Fas/FasL causando apoptose e inflamação.

Por último, nosso grupo observou um aumento dos níveis de adenosina deaminase (ADA), enzima que degrada a adenosina, nas alças ileais de camundongos tratadas com TxA. Tem sido relatado que a ADA desempenha um importante papel nas reações inflamatórias e seu nível sérico pode ser usado como marcador bioquímico de doenças inflamatórias (PIRAS *et al.*, 1978; SARI *et al.*, 2003). Também demonstramos que a utilização de um agonista do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina reduziu a secreção, edema, lesão tecidual e infiltração de células inflamatórias provocadas pela TxA, sugerindo que a essa via pode ter papel relevante na fisiopatologia da colite induzida pela TxA do *C. difficile* (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

## 2. ADENOSINA

A adenosina é um nucleosídeo purínico endógeno, amplamente distribuído pelo corpo, que participa da modulação de uma variedade de respostas fisiológicas nos mamíferos (DAVAL *et al.*, 1996). É um potente mensageiro extracelular que atua de forma autócrina e parácrina na homeostasia de vários sistemas como cardiovascular, nervoso, renal e imunológico (CRONSTEIN, *et al.*, 1985, BLACKBURN, 2003). A maioria dos efeitos da adenosina envolve a proteção celular e tecidual durante situações de stress como isquemia e inflamação (THIEL *et al.*, 2003; OKUSA, 2002). Condições como estas podem levar a um

rápido aumento de mais de 200x nos níveis teciduais de adenosina, quando comparado a níveis basais (RIVKEES *et al.* 2001).

A adenosina é sintetizada por todos os tipos celulares a partir da degradação intracelular do ATP, podendo também ser derivada do metabolismo extracelular de nucleotídeos purínicos (LAPPAS *et al.*, 2005). Especificamente, a quebra de adenosina trifosfato (ATP) induz a elevação dos níveis de adenosina difosfato (ADP). Este é, portanto, degradado a adenosina monofosfato (AMP), levando a um aumento de AMP livre, o qual é desfosforilado em adenosina pela ação da 5'-nucleotidase citosólica (THIEL *et al.*, 2003). Dessa maneira, a adenosina atinge uma alta concentração intracelular sendo, então, transportada para o meio extracelular através de transportadores especializados para que possa se ligar a seus receptores específicos localizados na superfície das células (Figura 1).

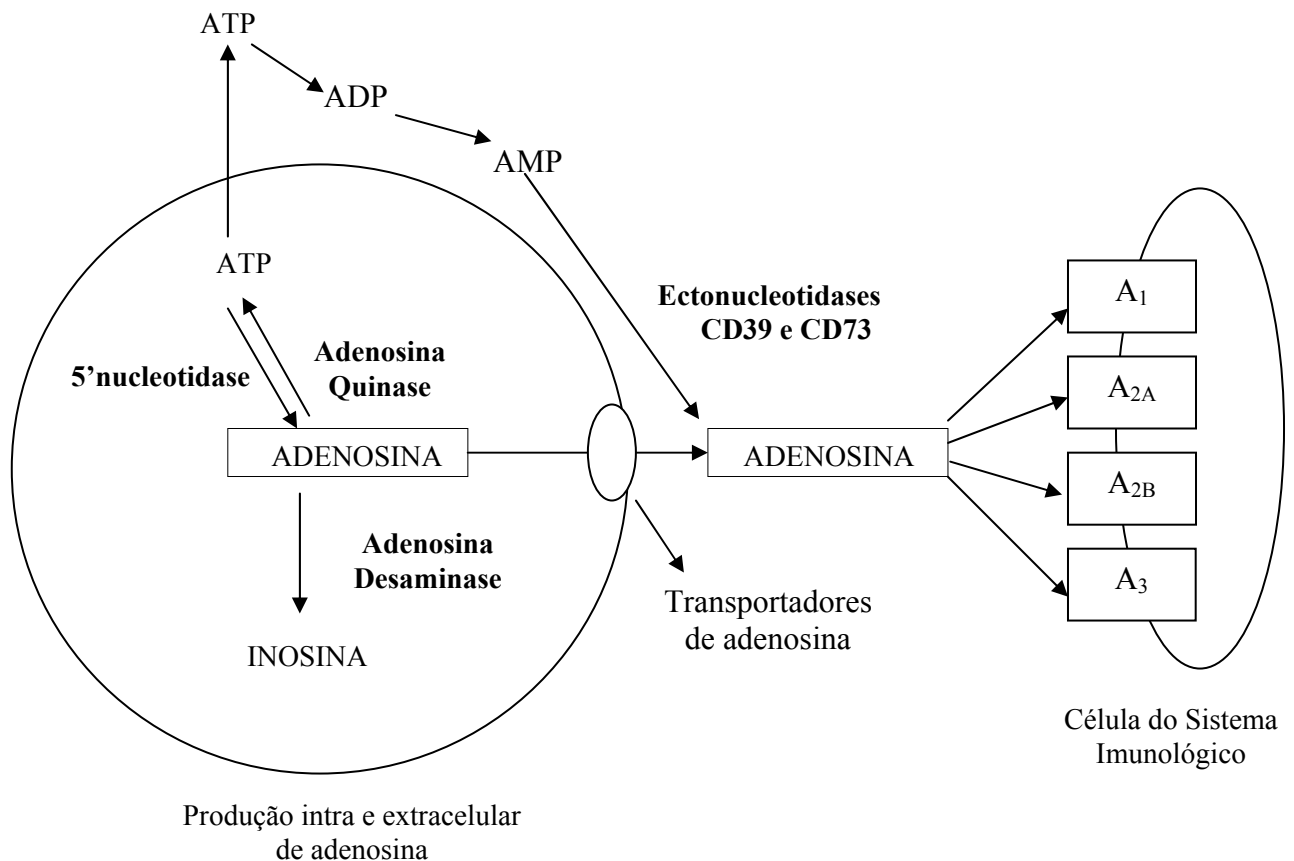


Figura 1. Metabolismo da adenosina. Adaptado de HASKÓ & CRONSTEIN, 2004.

Outra importante forma de aumentar a adenosina extracelular, especialmente em situações de *stress*, pode ser observada pela liberação celular dos precursores nucleotídicos de adenina (ATP, ADP e AMP), que por ação de ectonucleotidases, tais como, CD39 (nucleosídeo trifosfato desfosforilase) e CD73 (5'- ectonucleotidase), sofrem catabolismo extracelular (HASKÓ & CRONSTEIN, 2004). Essas ectonucleotidases são expressas de forma abundante em células endoteliais, neutrófilos e linfócitos T em sítios de *stress* metabólico, inflamação e infecção (CRONSTEIN 1994, LENNON *et al.*, 1998; ELTZSCHIG *et al.*, 2004; DEAGLIO *et al.*, 2007). O papel protetor dessa via tem sido elegantemente demonstrado por estudos genéticos em camundongos, o qual tem mostrado que a presença funcional de CD39 e CD73 é necessária para manter a função da barreira endotelial e prevenir o extravasamento vascular excessivo após a hipóxia (ELTZSCHIG *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2004). Devido ao importante efeito autócrino e parácrino exercido pela adenosina em aspectos críticos da resposta imune e inflamatória, não é surpresa que a expressão de enzimas envolvidas no seu acúmulo esteja sujeita a estrita regulação. Assim, ambas CD39 e CD73 são fortemente induzidas em células endoteliais após o início da hipóxia, e a expressão de CD73 pode ser potenciada também pelo interferon- $\alpha$  e pela própria adenosina via elevação de AMP cíclico (NARRAVULA, 2000; NIEMELA *et al.*, 2004). Além da formação de adenosina pelo aumento da degradação de ATP, a liberação desta é também potencializada pela prevenção de sua reutilização. Assim, em situações hipóxicas, a enzima adenosina quinase (ADK) têm uma reduzida capacidade de refosforilar a adenosina, permitindo um considerável aumento nos seus níveis intra e extracelulares (SITKOVSKY, 2003; DECKING *et al.*, 1997).

Entretanto, o acúmulo de adenosina extracelular é transitório, pois sua biodisponibilidade é limitada pela sua conversão em inosina pela enzima adenosina desaminase (ADA) extracelular ou pelo *reuptake* para as células endoteliais através de transportadores específicos, onde será convertida em inosina pela ADA intracelular ou em AMP pela adenosina quinase (DECKING *et al.*, 1997; FREDHOLM, 2007). (Figura 2).

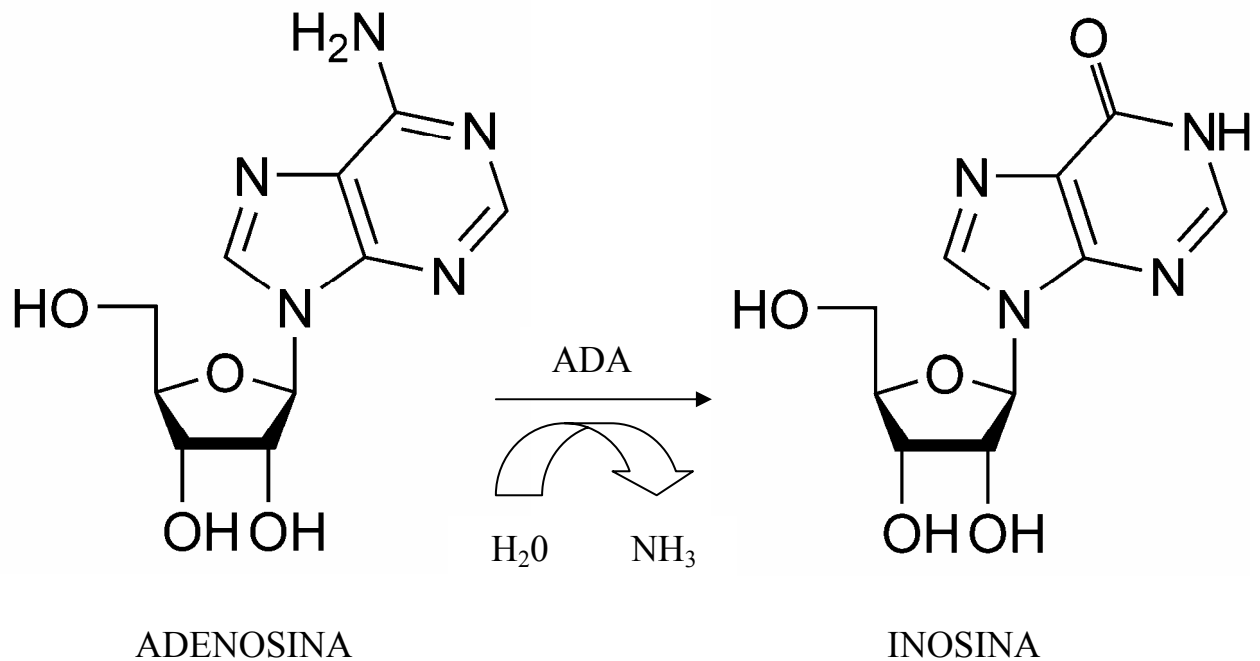


Figura 2. Representação da reação de desaminação da adenosina pela adenosina desaminase (ADA).

Assim, o controle do acúmulo de adenosina e início da sinalização protetora representa claramente um importante mecanismo adaptativo no qual o dano tecidual pode ser minimizado. O efeito protetor da adenosina sobre o sistema cardiovascular é conhecido desde 1929, quando foi inicialmente descrito por Drury e Szent-Györgi (DRURY & SZENT-GYÖRGI, 1929). Numa situação de isquemia ou de sobrecarga cardíaca, ocorre um desequilíbrio entre a síntese e degradação do ATP, ou seja, a taxa de consumo excede a taxa de produção. A seguir, adenosina é liberada por miócitos e células endoteliais e promove vasodilatação coronariana, inibição da condução sinoatrial e átrio-ventricular e antagonização do estímulo adrenérgico. Esses efeitos melhoram a oferta e reduzem a demanda de oxigênio e energia do coração e tentam, dessa forma, evitar as conseqüências patológicas da hipóxia (RUBIO *et al.*, 1974; BERNE *et al.*, 1983; DEUSSEN *et al.*, 1986; BELARDINELLI *et al.* 1989).

Os efeitos farmacológicos da adenosina são mediados por receptores específicos denominados receptores de adenosina e, atualmente, são reconhecidos os quatro sub-tipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Estes receptores, amplamente distribuídos no corpo, pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e, dependendo do tipo de proteína G a qual se ligam, inibem (G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>) ou estimulam (G<sub>s</sub>) a atividade da adenil ciclase (THIEL *et al.*, 2003). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> têm afinidade pelas proteínas G<sub>i</sub> e G<sub>o</sub> enquanto que os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> interagem com as proteínas G<sub>s</sub>, resultando no aumento intracelular de AMPc (OLAH & STILES, 1995). No entanto, além de estimular ou inibir a enzima adenil ciclase, os sub-tipos de receptores de adenosina, via ligação a diferentes tipos de proteína G, podem também agir em outros sistemas efetores, tais como os canais de cálcio e potássio, fosfolipases C, -D, -A2, GMPc e fosfodiesterases que modulam diferentes funções celulares (THIEL *et al.*, 2003).

Estes diferentes receptores de adenosina são expressos em vários tipos celulares e possuem várias ações diferentes, podendo, em alguns casos, exercer efeitos opostos sobre uma mesma função (SITKOVSKY, 2003). BOUMA e colaboradores (1994) e LINK e colaboradores (2000) relataram que a secreção de IL-12 por monócitos humanos induzida por lipopolissacarídeo (LPS) foi inibida pelos receptores A<sub>2A</sub>, mas não pelos receptores A<sub>1</sub> ou A<sub>3</sub>. Assim, o efeito da adenosina sobre um tipo celular irá depender de qual receptor de adenosina se expressa com predomínio sobre a célula (FREDHOLM, 2007). (Tabela 1).

Estudos com animais *knockout* (KO) para o receptor A<sub>1</sub> têm contribuído para o entendimento das funções deste receptor. Foi demonstrado que análogos da adenosina podem induzir efeitos analgésicos em camundongos selvagens pela estimulação de receptores A<sub>1</sub> na medula espinal, mas não em animais KO para estes receptores. Além disso, os animais nocauteados demonstraram aumentada sensibilidade à dor e maior sensibilidade à hipóxia neuronal (GEIGER *et al.*, 1984; FASTBOM *et al.* 1990, JOHANSSON *et al.*, 2001 WU *et al.*, 2005). FEDELE e colaboradores (2006) demonstraram as propriedades neuroprotetoras do receptor A<sub>1</sub> ao observar que camundongos KO para receptores A<sub>1</sub> desenvolveram lesão mais severa após *status epilepticus* que os animais selvagens. Além disso, estes receptores estão associados a importantes funções na fisiologia renal e cardiovascular. Foi demonstrado que camundongos KO para receptores A<sub>1</sub> têm elevação da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e dos níveis de renina quando comparados aos selvagens e que o *feedback* túbulo-glomerular é completamente eliminado nesses animais (BROWN *et al.*, 2001).

Tabela 1. Expressão e principais funções dos receptores de adenosina. Tabela adaptada de FREDHOLM *et al.*, 2001 e FREDHOLM, 2007.

	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2A</sub></b>	<b>A<sub>2B</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>
<b>Expressão</b>	Cérebro, medula espinhal, olho, adrenal, átrio, músculo esquelético, fígado, pâncreas, tecido adiposo, esôfago, cólon, rim, glândulas salivares, testículo, brônquios.	Baço, timo, leucócitos, plaquetas, neurônios dos gânglios da base e do bulbo olfatório, coração, pulmão e vasos sanguíneos.	Ceco, cólon, bexiga, pulmão, vasos sanguíneos, mastócitos, olho, tecido adiposo, adrenal, cérebro, rim, fígado, ovário e glândula pituitária.	Testículos, mastócitos, cérebro, coração, pulmão, tireóide, adrenal, baço, fígado, rim, intestino, testículo.
<b>Proteína G</b>	G <sub>i1/2/3</sub> e G <sub>o</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>olf</sub> e G <sub>15/16</sub>	G <sub>s</sub> e G <sub>q/11</sub>	G <sub>i2/3</sub> e G <sub>q/11</sub>
<b>Principais Funções</b>	Bradycardia, inibição da lipólise, antinocicepção, redução da filtração glomerular, <i>feedback</i> túbulo-glomerular, redução da atividade simpática e parassimpática, inibição pré-sináptica, hiperpolarização neuronal, précondicionamento isquêmico.	Inibição da agregação plaquetária e de leucócitos polimorfonucleares, vasodilatação, proteção contra dano isquêmico, regulação da integração sensório-motora nos gânglios basais, estimulação da atividade neuro-sensorial.	Relaxamento da musculatura lisa nos vasos e intestinos, inibição de monócitos e macrófagos.	Aumento da degranulação de mastócitos e pré-condicionamento isquêmico.

O receptor A<sub>2A</sub> foi o primeiro receptor de adenosina a ser deletado geneticamente em modelo animal e vários estudos têm tentado elucidar o papel deste receptor nos processos fisiológicos. Este receptor está envolvido na regulação de processos inflamatórios, agregação plaquetária, dor, vasodilatação e injúria isquêmica (LEDENT *et al.*, 1997; OHTA & SITKOVSKY, 2001, JACOBSON & GAO, 2006). O estímulo inflamatório induz a níveis

mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e severo dano tecidual em camundongos KO para receptores  $A_{2A}$  comparados a animais normais (ARMSTRONG *et al.*, 2001; OHTA & SITKOVSKY, 2001). Além disso, animais KO para receptores  $A_{2A}$  demonstraram vários distúrbios do sistema nervoso, como agressividade (LEDENT *et al.*, 1997), alteração dos receptores opióides (BAILEY *et al.*, 2002), e respostas atenuadas à psico-estimulantes (CHEN *et al.*, 2003; NAASSILA *et al.*, 2002). A ativação do receptor  $A_{2A}$  é necessária para a função neural dopaminérgica e este receptor tem sido alvo de estudos para o tratamento da doença de Parkinson (SVENNINGSSON *et al.*, 1999 e 2000, DASSESSE *et al.*, 2001; SCHWARZSCHILD *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que o receptor  $A_{2B}$  atua como cardioprotetor e vasodilatador e está envolvido, junto com o receptor  $A_{2A}$ , na regulação do processo inflamatório (YANG *et al.*, 2006, HUA *et al.*, 2007, ECKLE *et al.*, 2007). Estes receptores têm também papel em doenças metabólicas, estando envolvidos na liberação de insulina pelo pâncreas (RÜSING *et al.*, 2006). NEMETH e colaboradores (2007) têm proposto que este receptor tem efeito protetor em pacientes com diabetes tipo 1.

A caracterização do receptor  $A_3$  tem sido dificultada pela escassez de drogas com alta afinidade e especificidade para este receptor. Em roedores, os receptores  $A_3$  estão envolvidos na degranulação de mastócitos, mas ainda não está claro se este achado é importante em humanos (SALVATORE *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2002). Foi demonstrado que os efeitos cardio-protetores da adenosina podem também ser mediados pelos receptores  $A_3$  (PARSONS *et al.*, 2003). Além disso, o receptor  $A_3$  tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de novas drogas contra o câncer de cólon (JACOBSON & GAO, 2006).

## **2.1 ADENOSINA E INFLAMAÇÃO.**

A adenosina regula várias funções no sistema imunológico, sendo considerada uma substância antiinflamatória endógena (HERSHFIELD, 2005; CRONSTEIN, 1994). Mutações genéticas que levam a ausência de adenosina desaminase, enzima que degrada a adenosina, causam uma forma severa de imunodeficiência combinada de células B e T (PARKMAN *et al.*, 1975). Muitas células do sistema imune possuem receptores para

adenosina e as principais atividades antiinflamatórias deste nucleosídeo purínico ocorrem através da estimulação dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  (CRONSTEIN, 1994; BOURS *et al.*, 2006; FREDHOLM, 1997).

A adenosina atua como um importante inibidor da infiltração neutrofílica e subsequente dano tecidual. Os neutrófilos, células que constituem a primeira linha de defesa contra patógenos, liberam tanto ATP quanto adenosina seguindo sua ativação, e expressam CD39 e CD73, que rapidamente convertem ATP em adenosina. Foi descrito que camundongos *knockout* (KO) para CD39 e CD73 tiveram um significativo aumento no acúmulo de neutrófilos quando comparados a camundongos normais, sugerindo que a adenosina derivada do ATP liberado no local da injúria inibe a migração neutrofílica (ELTZSCHIG *et al.*, 2004).

Os neutrófilos expressam os quatro tipos de receptores de adenosina, mas o número de receptores varia de acordo com o estado de ativação da célula. (ELTZSCHIG *et al.*, 2004). Thiel e colaboradores, 2003, demonstraram que o uso de uma substância antagonista dos receptores  $A_{2A}$  aumentou a infiltração neutrofílica em pulmões de ratos após a administração intra-traqueal de LPS. A ativação de receptores  $A_{2A}$  nos neutrófilos inibe de forma potente a fagocitose, a degranulação e a formação de radicais livres do oxigênio, importantes funções bactericidas destas células. Além disso, a estimulação desses receptores também reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e de leucotrienos (CRONSTEIN, 1994; BOURS *et al.*, 2006; FREDHOLM, 1997). Utilizando um modelo de enterite induzida pela Toxina A do *C. difficile*, nosso grupo demonstrou que o uso de uma droga agonista do receptor  $A_{2A}$  reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , a infiltração neutrofílica e a lesão tecidual provocados pela toxina (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

As células endoteliais expressam moléculas de adesão essenciais no recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação e sintetizam e liberam vários mediadores fundamentais para o processo inflamatório. Está bem documentado na literatura que estas células expressam receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  e são importantes fontes de adenosina extracelular (HASKÓ & CROSTEIN, 2004, LENNON *et al.*, 1998). A ativação de receptores  $A_{2B}$  nas células endoteliais inibe a adesão leucocitária e limita o número de neutrófilos que atravessam a vasculatura. YANG e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos KO para  $A_{2B}$  exibiam uma *upregulation* nas moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e ICAM-1, bem



como um aumento da adesão ao endotélio e do rolamento leucocitário. GLOVER e colaboradores (2005 e 2007) utilizando modelos experimentais de infarto do miocárdio em cães, demonstraram que agonistas do receptor  $A_{2A}$  reduzem o tamanho do infarto, bem como inibem a expressão de P-selectina e a infiltração neutrofílica.

As células fagocitárias mononucleares, monócitos na corrente sanguínea e macrófagos nos tecidos, são importantes produtoras de mediadores inflamatórios e fundamentais na orientação do curso do processo inflamatório. Estas células podem ser ativadas, por exemplo, via receptores TOLL-like (TLR), e, após ativação, passam a produzir citocinas e moléculas microbidas (BOURS *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que camundongos KO para CD73, ou seja, com reduzida produção de adenosina, apresentaram aumentados níveis teciduais de macrófagos após estímulos inflamatórios (ZERNECKE *et al.*, 2006).

Um mecanismo molecular chave que tem emergido como sendo crítico para os efeitos inibitórios do receptor  $A_{2A}$  na resposta imunológica e inflamatória é a supressão do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (LINDEN, 2007). NF- $\kappa$ B é um dos mais importantes fatores de transcrição responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias e é ativado por citocinas bem como por agonistas de receptores TOLL-like derivados de patógenos, como o LPS bacteriano. Estudos concluíram que a estimulação do receptor  $A_{2A}$  em células endoteliais humanas previne o acúmulo de dímeros NF- $\kappa$ B ativos no núcleo em resposta a LPS, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  através do bloqueio específico da degradação de proteínas I $\kappa$ B, inibidoras do NF- $\kappa$ B (SANDS *et al.*, 2004). A estimulação do receptor  $A_{2A}$  em células gliais de rato e conseqüente supressão do NF- $\kappa$ B resultou na abolição da indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em resposta a citocinas e ao LPS (SANDS *et al.*, 2004). Similarmente, a deleção de receptores  $A_{2A}$  em macrófagos aumentou a degradação de I $\kappa$ B desencadeada por TNF- $\alpha$ , resultando em um elevado acúmulo de múltiplos transcritos de NF- $\kappa$ B e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 (LUKASHEV *et al.* 2004).

Os receptores  $A_{2B}$  também são expressos de forma significativa nos macrófagos e o IFN- $\gamma$ , potente ativador macrofágico, induz um aumento da expressão destes receptores (XAUS *et al.* 1999a). Estes receptores exercem seus efeitos antiinflamatórios em macrófagos através da inibição da proliferação destas células e pela interferência na produção de citocinas, reduzindo a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e estimulando a de IL-10 (NÉMETH *et al.*,

2005; XAUS *et al.* 1999b; KRECKLER *et al.*, 2006; SIPKA *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que camundongos KO para  $A_{2B}$  tiveram um aumento de 5 vezes nos níveis de TNF- $\alpha$  1 hora pós a administração de LPS. Foram também descritos um significativo aumento nos níveis de IL-6 e uma redução nos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 nos animais que não possuem receptores  $A_{2B}$  (YANG *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado que drogas que estimulam o receptor  $A_{2A}$  reduzem fortemente a resposta inflamatória mediada por linfócitos T numa variedade de tecidos (AKKARI *et al.*, 2006; SULLIVAN *et al.*, 2004; LAPPAS *et al.*, 2005). A ativação de células T leva a uma rápida *upregulation* de receptores  $A_{2A}$  e isso se associa à inibição da liberação de IFN- $\gamma$  por estas células (LAPPAS *et al.*, 2005). Nesse sentido, camundongos KO para receptores  $A_{2A}$  desenvolvem uma resposta inflamatória mediada por linfócitos T exacerbada (OHTA & SITKOVSKY, 2001). A concanavalina A é uma substância que induz lesão nos hepatócitos através de mecanismo que envolve ativação de células T CD4<sup>+</sup> e secreção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 (TIEGS *et al.*, 1992; GANTNER *et al.*, 1995). Camundongos com ausência de receptor  $A_{2A}$  exibiram uma lesão hepática induzida por concanavalin A exacerbada (OHTA & SITKOVSKY, 2001). Essa conclusão foi confirmada por ODASHIMA e colaboradores, 2006, pelas observações de que agonistas do receptor  $A_{2A}$  inibem o dano hepático e a elevação dos níveis de citocinas séricas induzidos pela administração de concanavalina A, sugerindo que a inibição da produção de citocinas pelas células T contribuiu para o efeito protetor observado.

Existem evidências que células *natural killer* (NK) sofrem modulação pela adenosina através de receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  (BOURS *et al.*, 2006). A lesão hepática por isquemia prolongada seguida de reperfusão depende de células NK e de IFN- $\gamma$ . Estudos demonstraram que esse dano pode ser virtualmente eliminado pela administração de agonistas dos receptores  $A_{2A}$ . Além disso, a liberação de IFN- $\gamma$  pelas células NK foi abolida pela estimulação de receptores  $A_{2A}$  (LAPPAS *et al.*, 2006). Existem também evidências descritas na literatura que linfócitos B e células dendríticas apresentadoras de antígeno têm suas funções moduladas pela adenosina endógena (AKKARI *et al.*, 2006; BOURS *et al.*, 2006).

Por último, alguns estudos têm mostrado que a ativação do receptor  $A_3$  pode também contribuir para a ação antiinflamatória da adenosina. HASKÓ e colaboradores, 1998, demonstraram que o uso de agonistas do receptor  $A_3$  reduziu a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  e a

mortalidade em camundongos toxemiados. SZABO e colaboradores, 1998, observaram que a estimulação do receptor  $A_3$  inibiu a síntese da proteína inflamatória macrófaga  $1\alpha$  (MIP)- $1\alpha$  e reduziu a inflamação articular em modelo de artrite em camundongos. MABLEY e colaboradores, 2003, concluíram que a utilização de uma substância agonista do receptor  $A_3$  reduziu a infiltração de células inflamatórias, os níveis de citocinas e o dano tecidual em modelo de colite em camundongos.

## 2.2 ADENOSINA DESAMINASE.

Durante episódios de *stress* tecidual, adenosina endógena é produzida em altos níveis e atua como um metabólico protetor contra a injúria tecidual excessiva associada à inflamação. Entretanto, a adenosina é rapidamente metabolizada e removida dos tecidos. Duas enzimas são fundamentais para a metabolização da adenosina: a adenosina desaminase (ADA) e a adenosina quinase (ADK) (FREDHOLM, 2007). A ADK (EC 2.7.1.20) converte adenosina em AMP e está ativa quando a concentração de adenosina é normal, ou seja, em condições fisiológicas (DECKING *et al.*, 1997). A ADA (EC 3.5.4.4), presente tanto intra como extracelularmente, atua convertendo adenosina em inosina e se mostra mais ativa quando as concentrações de adenosina estão elevadas, acima de  $10 \mu\text{M}$  (ARCH & NEWSHOLME, 1978; LLOYD & FREDHOLM, 1995). ADK é importante para o controle dos níveis de adenosina bem como para a manutenção dos depósitos de nucleotídeos de adenina (BOISON, 2006). No entanto, quando a ADA é bloqueada a capacidade da ADK é excedida e os níveis de adenosina se elevam marcadamente (HERSHFIELD, 2005). Assim, o uso de drogas que inibam a atividade da enzima ADA constitui um importante meio de determinar o papel protetor da adenosina, especialmente em tecidos expostos à lesão por isquemia ou inflamação.

A adenosina desaminase é uma enzima chave no metabolismo das purinas que converte, irreversivelmente, adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente (CONWAY & COOKE, 1939). Esta enzima tem uma ampla distribuição filogenética e sua seqüência de aminoácidos é altamente conservada desde bactérias a humanos (BRADY & O'DONOVAN, 1965; CHANG *et al.*, 1991; KELLY *et al.*, 1996; SHI *et al.*, 1997). A ADA está presente virtualmente em todos os tecidos humanos, sendo os mais

altos níveis encontrados no sistema linfóide, como linfonodos, baço e timo (VAN DERWEYDEN & KELLEY, 1976; ADAMS & HARKNESS, 1976; BARTON *et al.*, 1979; CHECHIK *et al.*, 1981), onde exhibe uma alta atividade em células T (TUNG *et al.*, 1976). A atividade da ADA pode ser encontrada no citosol das células e no meio extracelular (CIRUELA *et al.*, 1996; JOHNSON & ANDERSON, 1996; FRANCO *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 1998), tendo sido detectada na superfície de células hematopoiéticas (ARAN *et al.*, 1991). A ADA também pode se ligar a superfície celular de linfócitos T através da proteína ligante CD26 (KAMEOTA *et al.*, 1993; MARTÍN *et al.*, 1995; VONBONIN *et al.*, 1998; BLANCO *et al.*, 1998).

A atividade da ADA ocorre principalmente através de duas iso-enzimas distintas referidas como ADA-1 e ADA-2 (RATECH *et al.*, 1981; UNGERER *et al.*, 1992). A ADA-1, responsável pela maioria da atividade de ADA intracelular, existe em duas formas, um monômero de peso molecular 33 kDa e um dímero protéico complexo de peso molecular 280 kDa, chamadas de ADA-S e ADA-L, respectivamente. A ADA-2 existe apenas como um monômero de peso molecular 100 kDa (RATECH *et al.*, 1981) e constitui a iso-enzima predominante no plasma, (MURAOKA *et al.*, 1990) mas sua fonte celular e função imunológica não são completamente compreendidas. A importância da atividade de ADA-1 para o desenvolvimento de células T é demonstrada dramaticamente pela deficiência genética desta enzima estar associada com uma forma de severa imunodeficiência combinada, caracterizada por grave disfunção de linfócitos T e agamaglobulinemia (GIBLETT *et al.*, 1972; AGARWAL *et al.*, 1976; MILLS *et al.*, 1976; COHEN *et al.*, 1978). A toxicidade específica em linfócitos é associada principalmente ao elevado acúmulo do substrato 2'-deoxiadenosina e sua subsequente conversão em dATP, o qual inibe a ribonucleotídeo redutase, uma enzima chave na síntese de DNA (COHEN *et al.*, 1978; HIRSHHORN *et al.*, 1995). A ADA-2 está aumentada em várias patologias, particularmente naquelas relacionadas ao sistema imune como artrite reumatóide, psoríase, lúpus e sarcoidose, mas também na tuberculose e na AIDS (YUKSEL *et al.*, 1988; STANCIKOVA *et al.*, 1998; UNGERER *et al.*, 1994; NIEDZWICKI *et al.*, 1991).

Por causa da ação protetora que a adenosina desempenha em diversos tecidos do organismo, uma série de substâncias vem sendo testadas na tentativa de elevar suas concentrações em locais de lesão tecidual (BARANKIEWICZ *et al.*, 1990; FIRESTEIN *et al.*, 1995; GREEN, 1980; VAN BELLE, 1993). Tem sido mostrado em muitas células e tecidos

diferentes que a inibição da ADA é um potente meio de aumentar a meia vida da adenosina e elevar suas concentrações extracelulares quando a degradação de ATP está exacerbada (ACHTERBERG *et al.*, 1985; HUDSPETH *et al.*, 1994; PHILLIS *et al.*, 1988; VAN DEN BERGHE *et al.*, 1980; ZOREF-SHANI *et al.*, 1988). Em contraste, sob condições normais, quando não há elevação na cascata de degradação de ATP, a inibição da ADA não resulta em considerável elevação nos níveis de adenosina (LLOYD & FREDHOLM, 1995). A vantagem desta abordagem é que o aumento nos níveis de adenosina pode ser primariamente restrito àqueles locais onde sua formação é maior, ou seja, em tecidos hipóxicos e inflamados.

Muitos grupos têm estudado o efeito dos inibidores da ADA na liberação de adenosina no sistema nervoso central (SCIOTTI *et al.*, 1993; GOLEMBIOWSKA *et al.*, 1995). Os resultados destes estudos indicaram que o aumento da concentração de adenosina endógena extracelular pode ter importante potencial terapêutico no tratamento de convulsões e desordens neurodegenerativas (WHITE 1996; HEBB & WHITE, 1998; POON & SAYNOK, 1999). Além disso, alguns estudos mostraram que inibidores da ADA atenuaram a injúria isquêmica miocárdica e melhoraram a recuperação da função contrátil após isquemia cardíaca (ZHU *et al.*, 1990; SANDHU *et al.*, 1993). Tem-se também sugerido que a inibição da ADA pode promover proteção cardiovascular em pacientes hipertensos (TOFOVIC, 1998). Em adição, tem sido postulado por muitos estudos que a inibição da ADA pode ser útil na terapia de infecções virais e algumas desordens linfoproliferativas (SMYTH *et al.*, 1985; SPIERS, 1995; JOHNSTON *et al.*, 1986).

O EHNA, (eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina), é um inibidor clássico da enzima adenosina desaminase 1 (SCHAEFFER & SCHWENDER, 1974). Esta substância exerce sua inibição por um mecanismo em duas etapas: inicialmente atua como um inibidor competitivo clássico, a seguir ocorre um rearranjo da enzima levando a formação de um forte complexo ADA-inibidor (KURTZ *et al.*, 1987). BARANKIEWICZ e colaboradores (1997) concluíram que o EHNA possui efeitos cardioprotetores e neuroprotetores em modelos de isquemia miocárdica e cerebral, respectivamente. ANTONIOLI e colaboradores (2007), utilizando um modelo experimental de colite em ratos, demonstraram que inibidores da adenosina desaminase, incluindo o EHNA, reduziram vários parâmetros inflamatórios como os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, a infiltração neutrofílica e a lesão tecidual observados nos animais com colite. (Figura 3).

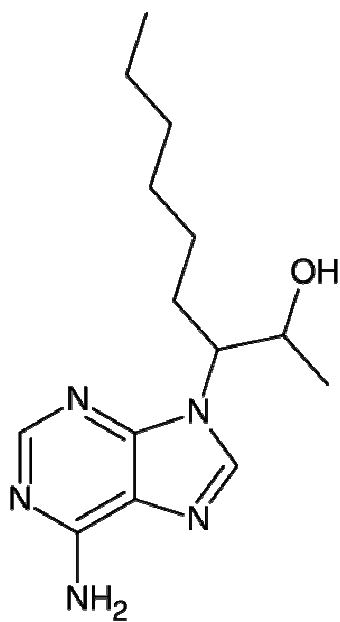


Figura 3. Representação da estrutura química do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase 1 (ADA-1).

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

---

O *Clostridium difficile* tem como principal fator de virulência a secreção de toxina A (TxA), a qual provoca inflamação e destruição tecidual aguda em intestinos de animais experimentais e de pacientes com a doença induzida por esta bactéria (REHG, 1980). O estudo da patogênese da lesão induzida pela TxA se reveste de grande importância no contexto atual, onde se observa aumento da incidência e gravidade da doença induzida pelo *C. difficile*, associado a relatos de recidiva após tratamento padrão (BLOSSOM & MCDONALD, 2007; MUSER *et al.*, 2005; PEPIN *et al.*, 2005).

Em locais de injúria tecidual, adenosina é produzida em altas concentrações, onde exerce uma série de efeitos antiinflamatórios, limitados por sua rápida degradação pela enzima adenosina desaminase (LLOYD & FREDHOLM, 1995). Há apenas um trabalho publicado na literatura, realizado por nosso grupo, que avaliou o papel protetor da adenosina, especificamente sobre os receptores A<sub>2A</sub>, na enterite induzida pela TxA, o qual mostrou resultados promissores (CAVALCANTE *et al.*, 2005). Tendo em vista a importância epidemiológica da doença induzida pelo *C. difficile*, os efeitos antiinflamatórios da adenosina, e a escassez de publicações neste sentido, procuramos avaliar, no presente trabalho, os possíveis efeitos protetores da inibição da enzima adenosina desaminase na lesão induzida pela TxA do *C. difficile*.

Este estudo teve, portanto, como objetivo geral estudar o efeito da inibição da enzima adenosina desaminase (ADA) sobre a enterite induzida pela TxA do *Clostridium difficile* em alça ileal de camundongos. Espera-se, com isso, contribuir para o esclarecimento do papel da adenosina no processo inflamatório induzido pela TxA, e, assim, contribuir para o esclarecimento da patogênese e controle dessa condição de importância epidemiológica crescente mundialmente. Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar o efeito do inibidor da enzima adenosina desaminase, EHNA, no aumento do peso e da secreção da alça ileal induzidos pela TxA em camundongos.



- Investigar o efeito do EHNA na destruição da mucosa intestinal induzida pela TxA através da análise histopatológica.
- Verificar a ação do EHNA sobre a infiltração neutrofílica através da dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na alça ileal.
- Analisar o efeito do EHNA sobre a expressão transcripcional e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido de alça ileal de camundongos.
- Analisar o efeito da TxA e do EHNA sobre os níveis de IL-10 no tecido de alça ileal de camundongos.
- Verificar o efeito da TxA do *C. difficile* e do EHNA sobre o conteúdo de iNOS no tecido de alça ileal.
- Verificar o efeito da TxA e do EHNA sobre a expressão da proteína PTX3 no tecido de alça ileal de camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, pesando 25-30g. Estes animais eram provenientes do Biotério Central do Campus do Pici e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Os animais permaneceram acondicionados em caixas de plástico, forradas com raspa de madeira e receberam água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos em jejum 24 horas antes de todos os procedimentos experimentais, com livre acesso à água. O tratamento dispensado aos animais estava de acordo com o "Guia de Cuidados em Uso de Animais de Laboratório" do National Institutes of Health (Bethesda, MD, EUA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

#### 2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AL200
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV
- Centrífuga Marathon 26KMR
- Banho Maria Modelo 100
- Homogeneizador de Pater
- Autoclave
- Estufa Olidef cz
- Seringas para insulina (B-D, Ultra Fine II) com agulha de calibre 30 Gauges

- Seringas de 1, 3, 5 mL (B-D Plastipak)
- Lâminas para microscopia
- Lamínulas
- Papel de filtro qualitativo
- Alicates para deslocamento cervical
- Tubos de ensaio
- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000 µL
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Material cirúrgico (pinças, tesouras e porta-agulhas)
- Fio de sutura nylon 3-0 Technofio
- Capela de fluxo laminar Vico Biosafe Plus Classe II tipo A
- Probeta graduada
- Tubos de polipropileno para centrífuga (15 e 50mL)
- Espátulas de aço
- Eppendorfs
- Bequeres
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergierstation T8.10 da Ika Labortechnik
- Micrótomo Olympus

### **3. DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES.**

#### **3.1 DROGAS**

- Toxina A do *Clostridium difficile*

Esta toxina foi gentilmente cedida pelo Dr. David M. Lyerly do “Virginia Polytechnic Institute”, Blacksburg, VA, EUA. Oriunda de um filtrado da cultura de *C. difficile* (VPI/ 0463) (linhagem# 10463; peso molecular 308 kDa), foi purificada por precipitação com sulfato de amônia, seguida por cromatografia de troca iônica e cromatografia de imunoafinidade. A homogeneidade da toxina foi determinada por imunoelektroforese cruzada e eletroforese em gel de poliacrilamida. As toxinas foram armazenadas a 4°C.

- EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina, P.M.: 313,83) (Sigma E114).

A atividade inibitória do EHNA foi determinada *in vitro* através da dosagem da atividade da enzima adenosina deaminase (ADA), realizada por nós com a colaboração do Prof. Marcus Raimundo Vale. O ensaio enzimático foi baseado na medida da produção de amônia durante a desaminação da adenosina pelo método de Giusti (GIUSTI, 1974). Durante os experimentos, a droga foi utilizada dissolvida em DMSO.

- Cloridrato de Xilazina (Kensol<sup>®</sup>, König)
- Cloridrato de Quetamina (Vetanarcol<sup>®</sup>, König)
- Xilol (Reagen)
- Peróxido de hidrogênio (Smith)
- Avidina-peroxidase (DAKO)
- O-fenilenediamina diicloreto (OPD- Sigma) dissolvido no tampão substrato descrito no protocolo de ELISA

### 3.2 CORANTES

- Hematoxilina (Reagen)
- Eosina (Merck)

### 3.3 SOLUÇÕES

- Salina tamponada com fosfato (PBS)

Cloreto de sódio (Synth)-----	8,0 g
Cloreto de potássio (Synth) -----	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico (Synth)-----	1,15 g
Fosfato de sódio monobásico (Synth)-----	0,2 g
Água destilada-----	1,0 L

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 0,1N

- Tampão de bicarbonato pH 8,2

NaCO <sub>3</sub> (Synth)-----	0,1M
NaCl (Synth)-----	0,1M

- Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 100%
- Solução salina 0.9% estéril
- Solução BSA 1%
- Solução Estabilizadora de RNA (RNA Later<sup>®</sup> – Ambion)
- Albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem (Sigma)

### 3.4 TAMPÕES E SOLUÇÕES USADOS NA DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE.

- Tampão fosfato de potássio: 988 mL solução a + 12mL solução b  
 Solução a:  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth) ----- 6,8 g  
 Água destilada ----- 1 L  
 Solução b:  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth) ----- 8,7 g  
 Água destilada ----- 1 L
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)  
 HTAB (Sigma) ----- 5 g  
 Tampão fosfato de potássio ----- 1 L
- Peróxido de hidrogênio 0,1%  
 Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) ----- 1 mL  
 Água destilada ----- 29 mL
- Solução de o-dianisidina (DDI)  
 O-dianisidina (Sigma) ----- 16,7 mg  
 Tampão fosfato de potássio ----- 10 mL  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ----- 50 µL  
 Água destilada ----- 90 mL

### 3.5 REAGENTES USADOS NA DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-10.

- Kit DuoSet, R&D Systems, Catálogo DY999.

### 3.6 TAMPÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES USADOS PARA O ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1 $\beta$ , iNOS, PTX3 e TNF- $\alpha$ .

- Tampão Citrato 0.1M pH 6.0  
Citrato de sódio monohidratado ----- 21g  
H<sub>2</sub>O destilada ----- 1 L  
A solução mãe (1M) foi diluída 10 vezes (concentração final 0.1M)
- Solução PBS-BSA 5%  
PBS (pH 7.3) ----- 100 mL  
Albumina bovina ----- 0.5 mg
- Complexo ABC (Kit Santa Cruz Biotechnology®)  
Reagente A (avidina DH) ----- 10  $\mu$  L  
Reagente B (peroxidase biotinizada) ----- 10  $\mu$  L  
PBS ----- 1,6 mL
- Solução Peróxido de hidrogênio 3%
- Solução DAB/peróxido (Kit Santa Cruz Biotechnology®)  
H<sub>2</sub>O destilada ----- 1,6 mL  
Tampão “Substrate Buffer” ----- 5 gotas  
DAB cromógeno ----- 5 gotas  
“Peroxidase Substrate” ----- 1 gota

### 3.7 ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS NO ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1 $\beta$ , iNOS, PTX3 e TNF- $\alpha$ .

- IL-1 $\beta$ :
- Anticorpo de coelho anti-IL-1 $\beta$  murino (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:400

- Anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:200
- iNOS:
  - Anticorpo de coelho anti-iNOS murino (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:200
  - Anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:200
- TNF- $\alpha$ :
  - Anticorpo de cabra anti-TNF- $\alpha$  murino (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:200
  - Anticorpo biotilado de coelho anti-IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:400
- PTX3:
  - Anticorpo de rato anti-PTX3 murino (clone MNB1 – Alexis Biochemicals)-----  
----- Diluição 1:400
  - Anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de rato (Santa Cruz Biotechnology)-----  
----- Diluição 1:400

#### 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

##### 4.1 INDUÇÃO DA ENTERITE EM ALÇA ILEAL ISOLADA DE CAMUNDONGO

O protocolo para indução de enterite experimental por TxA do *Clostridium difficile* em camundongo seguiu o modelo descrito por KIRKWOOD *et al.* (2001), e adaptado por nosso grupo para nossas condições (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Os animais, em jejum por 24 horas, receberam pré-tratamento por via intraperitoneal com EHNA (inibidor da enzima adenosina desaminase, 90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS, administrados 30 minutos antes da indução da enterite (ANTONIOLI *et al.*, 2007). Foi injetado o volume de 1ml com uma seringa de insulina no quadrante inferior direito do abdômen, com o animal contido pelo dorso. Para o procedimento da indução da enterite na alça intestinal isolada, os animais foram



anestesiados com a associação de cloridrato de xilasina (5 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), injetados por via intramuscular. Em seguida foi realizada uma laparotomia mediana de 2-3 cm, incidindo-se, em primeira instância, a pele e, em seguida, o peritônio, para a visualização do intestino delgado. Após exposição do ceco e identificação do íleo, uma porção de aproximadamente 8 cm do tubo entérico terminal foi lavada com PBS, em um volume de 0,5 mL, para remoção de fezes remanescentes. Durante este procedimento, teve-se o cuidado de não traumatizar o íleo nem, tampouco, romper a vascularização entérica. Então, a uma distância de cerca de 3 cm do ceco, um segmento de aproximadamente 4 cm de íleo foi feito, em dupla ligadura obstrutiva, com linha de algodão, para isolamento da alça. Posteriormente, através de uma seringa de insulina, foi injetado na alça isolada volumes de 100 µL de PBS (controle) ou TxA na dose de 50 µg/alça. Para o experimento da dose-resposta com TxA, foi injetado na alça isolada volumes de 100 µL de PBS (controle) ou TxA nas doses de 10-100 µg/alça e, neste caso, não foi administrado pré-tratamento por via intraperitoneal com EHNA (90 µmol/kg) ou PBS 30 minutos antes da indução da enterite. A seguir, as alças intestinais foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal e a incisão cirúrgica foi suturada com fios de nylon 3-0.

Após 3 horas da injeção do controle ou da TxA nas alças (KIRKWOOD *et al.*, 2001, CAVALCANTE *et al.*, 2006), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após a reabertura da cavidade abdominal (pele e peritônio) dos animais, as alças isoladas foram retiradas, medidas em centímetros, pesadas em miligrama, e o volume de seu conteúdo mensurado em microlitros, por meio de seringa de 1 mL e acondicionado em tubos plásticos. O edema e a secreção foram calculados dividindo-se o peso da alça pelo seu comprimento, expresso em mg/cm, e pelo volume do fluido recuperado pelo comprimento da alça intestinal, expresso em µL/cm.

## 4.2 HISTOPATOLOGIA

Logo após o sacrifício dos animais e remoção das alças intestinais, fragmentos do íleo da alça foram extraídos e acondicionados em frascos contendo formol a 10% por 12 horas. A seguir, as peças foram dispostas em álcool etílico a 70% para desidratação, para posterior processamento e inclusão em parafina. Após microtomia na espessura de 4 micrômetros, procedeu-se a coloração pela hematoxilina & eosina.

Realizou-se avaliação histológica onde foram atribuídos escores variando de escores 0 (ausência de alterações), 1 (alterações brandas), 2 (alterações moderadas) a 3 (alterações severas), de acordo com o dano epitelial, edema e infiltração neutrofílica, conforme previamente descrito (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

#### 4.3 DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE.

Após os experimentos de enterite induzida por TxA em alça isolada foram colhidos fragmentos da alça do íleo para posterior dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO). Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6.0; 50 mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente, foram centrifugadas a 4.500 r.p.m., durante 12min a 4°C, e o sobrenadante foi colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados usando técnica descrita por BRADLEY *et al.* (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para a MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C. No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido.

#### 4.4 DOSAGEM DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), FATOR DE NECROSE TUMORAL $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) E INTERLEUCINA-10 (IL-10).

Os experimentos da enterite induzida por TxA em alça isolada de íleo de camundongo forneceram fragmentos de tecido do íleo para posterior dosagem de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão para citocinas como descrito por SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995. A detecção das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), usando o Kit DuoSet (R&D

Systems). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4°C com 100µL por poço de anticorpo de captura para IL-1β, TNF-α e IL-10. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300µL de tampão de lavagem e bloqueadas com 100µL por poço BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100µL das amostras e da curva padrão foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 300µL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1β, TNF-α e IL-10. Após o período de incubação à 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300µL de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 µL de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300µL de tampão de lavagem e 100 µL da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A Reação enzimática foi parada com a solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a absorbância medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

#### 4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1β, TNF-α, iNOS E PTX3.

Os cortes histológicos do tecido ileal foram colocados em lâminas especiais silanizadas. As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. O ensaio imunohistoquímico foi realizado seguindo o protocolo a seguir:

- Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0) e aquecidas a 95°C durante 15 min
- Resfriamento em temperatura ambiente durante 20 min
- Lavagem em PBS (5 min)
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 3% (15 min)
- Lavagem com PBS (5 min)
- Diluição do anticorpo primário em PBS – BSA 5%
- Incubação com anticorpo primário de rato para TNF-α, IL-1β, iNOS ou PTX3 (*overnight*)
- Lavagem com PBS (2 min)
- Diluição do anticorpo secundário em PBS-BSA 5%
- Incubação com anticorpo secundário biotilado anti-IgG (30 min)

- Preparo do complexo ABC
- Lavagem das peças em PBS (2 min)
- Incubação com o complexo ABC (30 min)
- Lavagem com PBS (5 min)
- Incubação com DAB/peróxido (2 min)
- Lavagem com H<sub>2</sub>O destilada (5 min)
- Contra-coloração com hematoxilina de Harry's
- Desidratação e montagem das lâminas

#### 4.6 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) PARA IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ E PTX3.

Após o sacrifício dos animais e remoção da alça intestinal, fragmentos do íleo foram colocados imediatamente em solução de RNA Later e, posteriormente estocados em freezer -80°C para extração de RNA pelo método Trizol<sup>®</sup> seguindo as instruções do fabricante. Aliquotas de 2  $\mu$ g do RNA total extraído foram reversamente transcritas usando como iniciador oligo(dT)<sub>15</sub> e o kit ImProm-II Reverse Transcription System seguindo as especificações do fabricante (Promega).

A expressão dos genes de interesse foi avaliada pela técnica de PCR em tempo Real. O padrão de expressão foi determinado pelo método de quantificação relativa utilizando os camundongos do tipo selvagem como amostra de referência. Para a normalização das reações foram utilizados pelo menos 3 genes de expressão constitutiva (“housekeeping genes”). As reações foram realizadas em duplicatas no aparelho 7300 da Applied Biosystems utilizando o sistema de detecção Syber Green I. Os iniciadores para as reações de PCR em Tempo Real foram desenhados em exons diferentes e na porção mais próxima à região 3' do gene e seguindo os parâmetros utilizados pelo software Primer Express da Applied Biosystems. Para a padronização das reações de amplificação foram variadas as concentrações dos iniciadores para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PTX3 e do cDNA. A especificidade das reações foi avaliada através de curva de dissociação e gel de poliácridamida. Após a padronização, a eficiência de amplificações dos diferentes pares de iniciadores foi determinada por meio de diluições seriadas do cDNA utilizado como molde. Foi construída uma reta na qual o valor de CT (ciclo de amplificação no qual a fluorescência ultrapassou o valor do background) foi analisado em função do log da diluição. A inclinação da reta foi utilizada para calcular a eficiência de amplificação segundo a fórmula  $eff=10(-1/\alpha)$ , onde  $\alpha$

corresponde a inclinação da reta. Para a quantificação relativa foi utilizada a fórmula matemática proposta por PFAFFL (2001), a qual leva em consideração a eficiência de amplificação dos iniciadores no cálculo da expressão relativa:  $R = \frac{E_g (C_{Tref} - C_{Tamostra})}{E_n (C_{Tref} - C_{Tamostra})}$ , onde R= expressão relativa,  $E_g$ = eficiência de amplificação dos iniciadores do gene em estudo e  $E_n$ = eficiência de amplificação dos iniciadores do gene normalizador.

Estas dosagens foram realizadas em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Adriana Abalen Martins Dias, da Fundação Antônio Prudente, Hospital AC Camargo, São Paulo, SP.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparação entre vários grupos de ensaios foi utilizado ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Nas análises histológicas, os dados foram expressos como mediana seguida de variação e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prism, versão 4, da GraphPad Software. O *n* diz respeito ao número de alças isolada em cada grupo estudado, onde foram utilizados de cinco a doze animais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

---

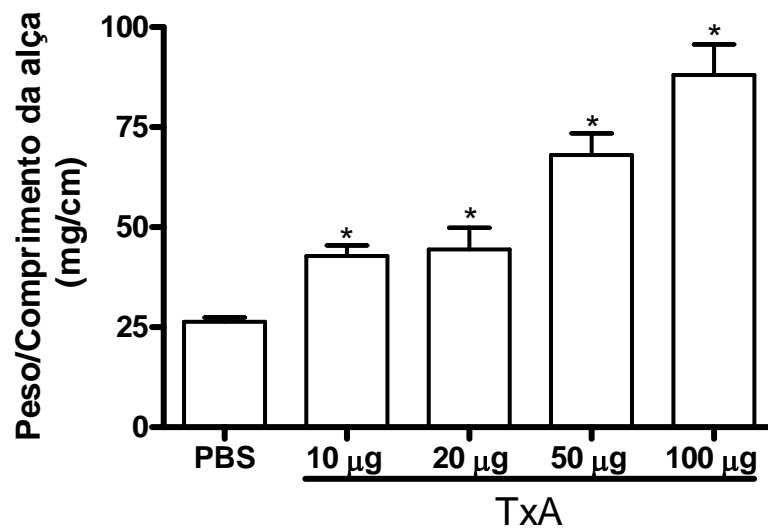
### **1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXINA A DO *Clostridium difficile* (TxA) QUANDO INJETADA DENTRO DE ALÇAS ILEAIS ISOLADAS DE CAMUNDONGO.**

Na figura 4 observa-se que TxA aumentou de forma dose dependente as razões peso da alça e volume de secreção/comprimento das alças ileais isoladas de camundongos. As doses de 50 µg e 100 µg mostraram resultados bastante consistentes, optando-se pela dose de 50 µg para os experimentos seguintes (peso/comprimento da alça em mg/cm: PBS = 26,42 ± 1,077 Vs TxA 50 µg = 68,06 ± 5,379 e volume/comprimento em µL/cm: PBS = 0,39 ± 0,391 Vs TxA 50 µg = 32,52 ± 5,548). **FIGURAS 4A E 4B.**

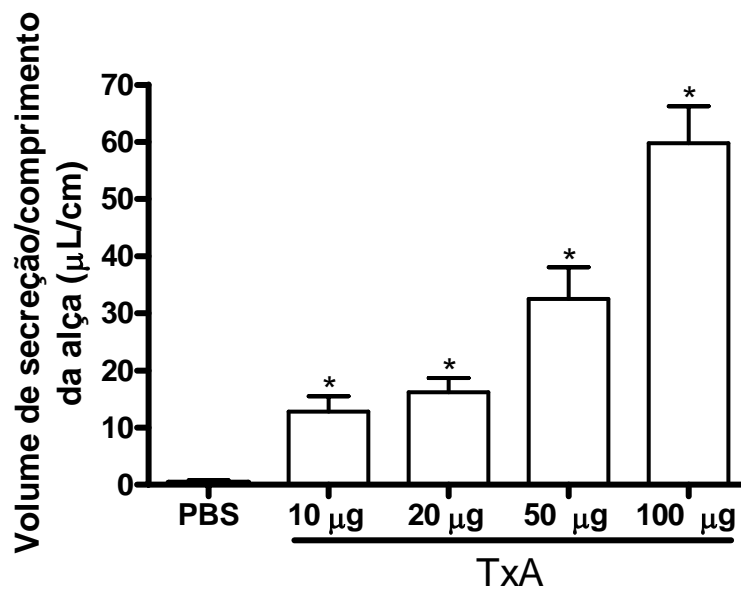
### **2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EHNA, INIBIDOR DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE, NAS ALÇAS ILEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM TOXINA A DO *Clostridium difficile* (50 µg).**

A dose de 90 µmol/kg do EHNA reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o aumento do peso/comprimento da alça (Figura 5A) (TxA = 73,24 ± 5,683 mg/cm Vs EHNA+TxA = 54,62 ± 4,987 mg/cm) e do volume de secreção/comprimento da alça (Figura 5B) (TxA = 39,26 ± 5,307 µL/cm Vs EHNA+TxA = 27,05 ± 4,390 µL/cm) induzidos pela TxA (50 µg/alça). **FIGURAS 5A E 5B.**

A



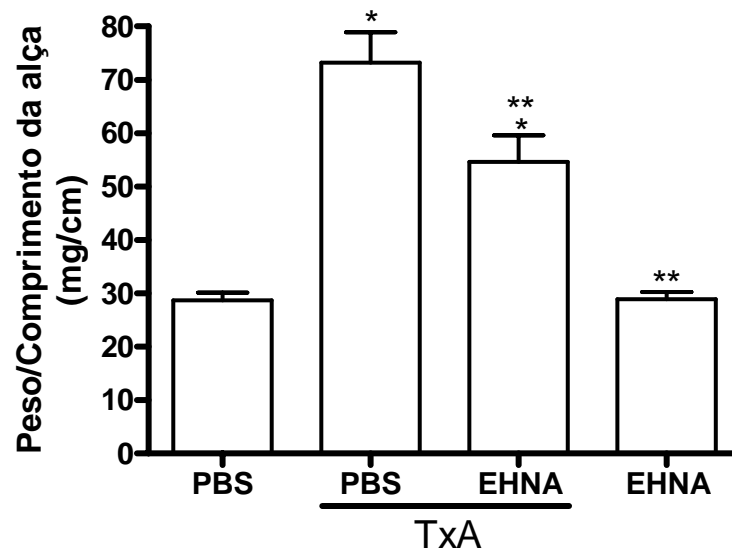
B



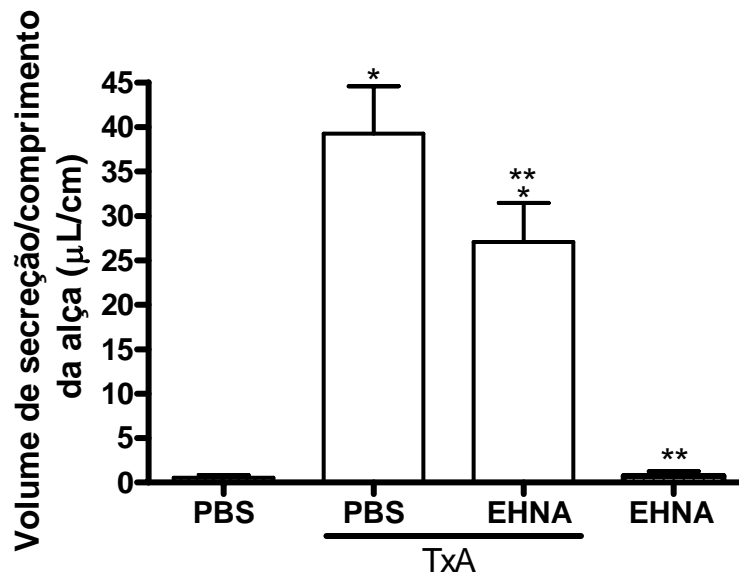
**Figura 4.** Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) sobre o peso (A) e o volume de secreção (B) da alça ileal em camundongos C57BL/6. Os animais foram tratados com TxA (10; 20; 50; 100 µg/alça) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração da TxA ou PBS. Os dados, peso/comprimento da alça (mg/cm) e volume de secreção/comprimento da alça (µL/cm), estão plotados como média ± EPM (n=6-12). (\*)  $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle (PBS). ANOVA/Bonferroni.



A



B



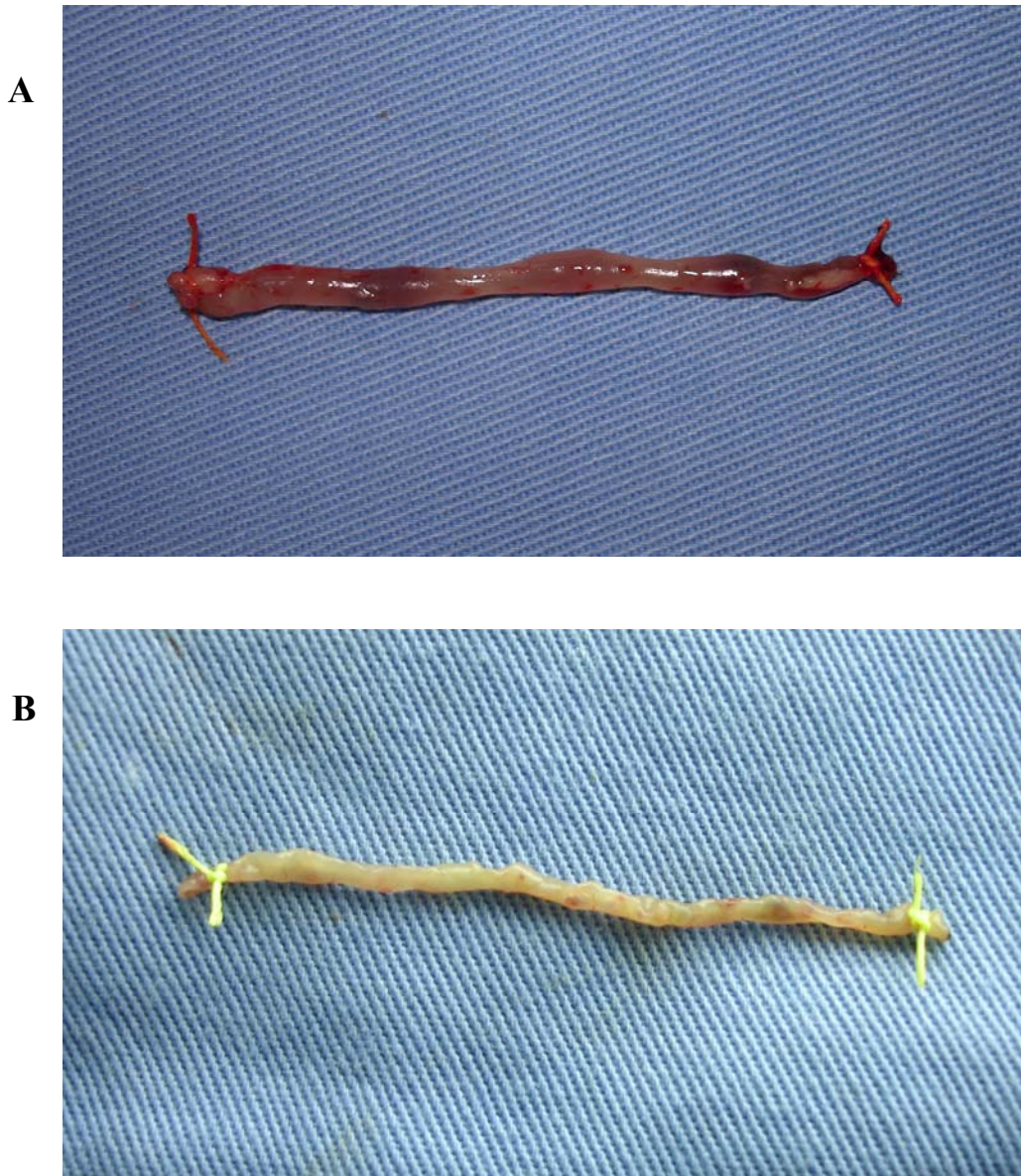
**Figura 5. Efeito do inibidor da enzima adenosina desaminase, EHNA, sobre o aumento no peso (A) e no volume de secreção (B)/comprimento da alça ileal induzidos por toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) em camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90 μmol/kg) i.p. 30 minutos antes da injeção de TxA (50 μg/alça) dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração da TxA. Os dados, peso/comprimento da alça (mg/cm) e volume de secreção/comprimento da alça (μL/cm), estão plotados como média ± EPM (n=10-12). (\*)  $p < 0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.

### **3. EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ADENOSINA DESAMINASE, EHNA, SOBRE AS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS DAS ALÇAS ILEAIS DE CAMUNDONGOS INDUZIDAS POR TOXINA A DO *Clostridium difficile* (TxA).**

A TxA na dose de 50 µg promoveu mudanças macroscópicas evidentes nas alças ileais de camundongos. A alça ileal que recebeu TxA (Figura 6A) mostrou-se com edema, evidenciado pelo brilho, e preenchida por secreção sanguinolenta. Na alça ileal de camundongos tratados com o EHNA (Figura 6B) houve redução do edema e da secreção, bem como ausência de secreção sanguinolenta. **FIGURAS 6A E 6B.**

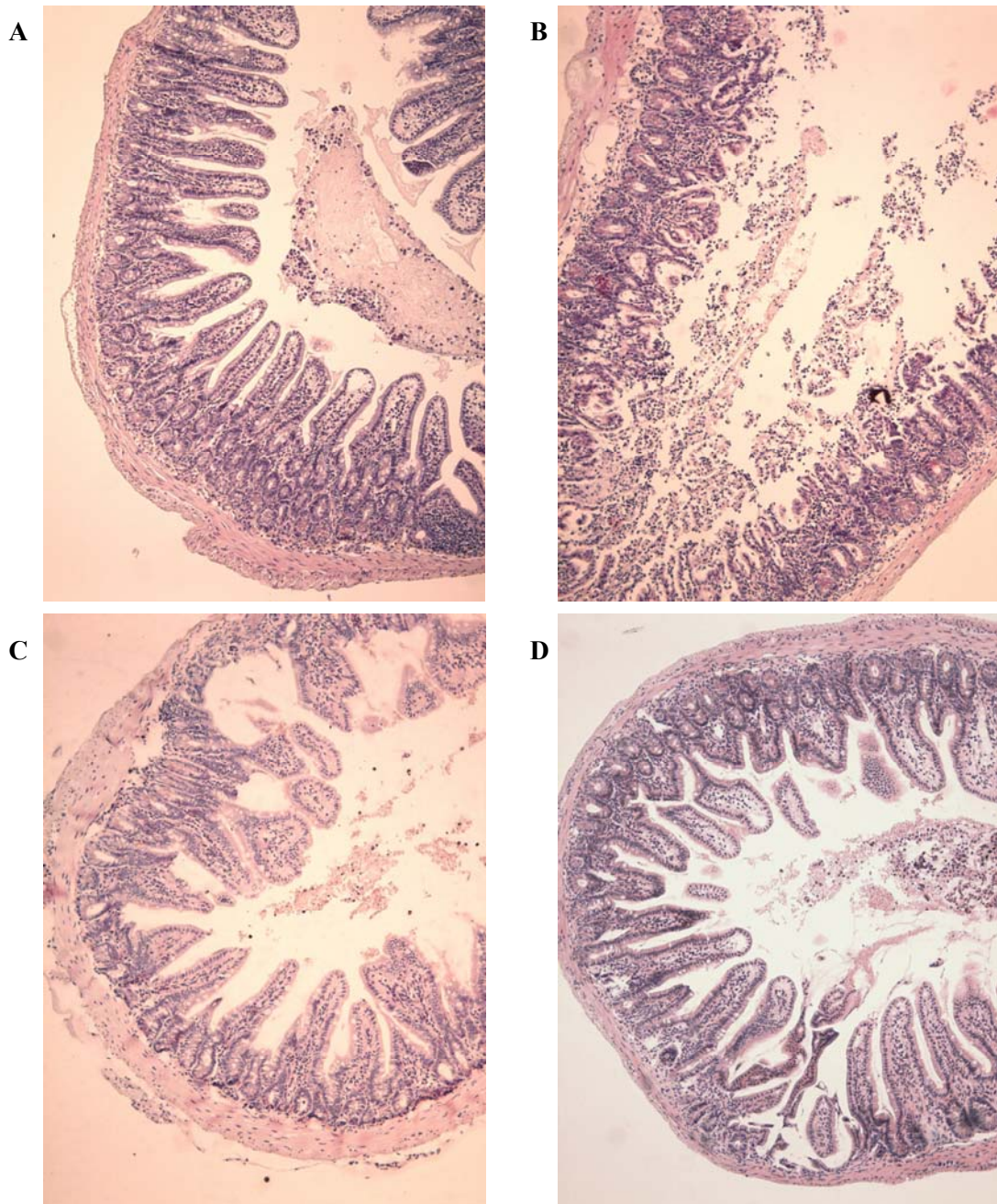
### **4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO EHNA NA ENTERITE INDUZIDA POR TOXINA A DO *Clostridium difficile* EM ALÇA ILEAL DE CAMUNDONGOS.**

A TxA na dose de 50 µg promoveu mudanças histológicas visíveis em cortes de tecido do íleo na coloração H&E em relação às alças tratadas apenas com PBS, havendo uma destruição intensa da mucosa, aumento do infiltrado celular inflamatório e edema intersticial. Tais efeitos foram significativamente revertidos com o uso de EHNA (90 µmol/kg) i.p. 30 minutos antes da indução da enterite. **FIGURAS 7 E 8 E TABELA 2.**



**Figura 6. Efeito do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase, sobre o aspecto macroscópico da alça ileal de camundongos induzido pela toxina A do *Clostridium difficile*.** As figuras são fotografias das alças ileais de camundongos que receberam PBS i.p + TxA 50 µg/alça (figura A) e EHNA 90 µmol/kg i.p + TxA 50 µg/alça (figura B). Observa-se que a alça ileal que recebeu TxA apresenta-se com edema, evidenciado pelo brilho, e está preenchida de secreção sanguinolenta. Na alça ileal dos camundongos que receberam EHNA i.p. houve redução do edema e da secreção, bem como ausência de secreção sanguinolenta.



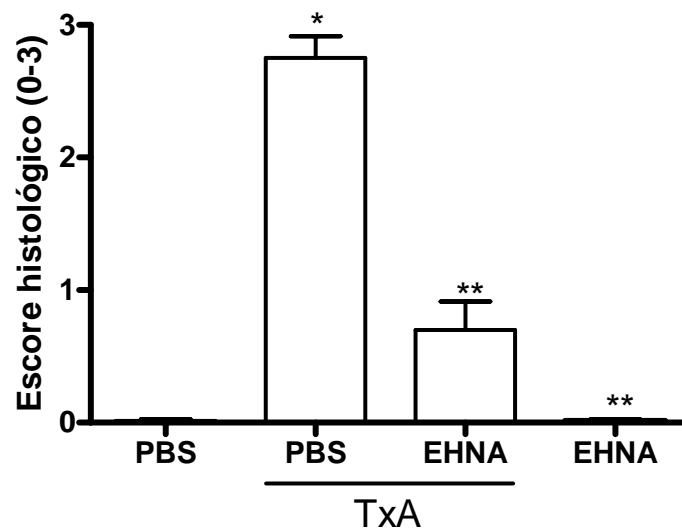


**Figura 7. Efeito do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase, sobre a destruição da mucosa e infiltrado celular na alça ileal de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile* (TxA).** As figuras são fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados pelo método de H&E do tecido do íleo de camundongos que receberam: PBS i.p. + PBS (A), PBS i.p. + TxA 50 µg/alça (B), EHNA 90 µmol/kg i.p + TxA50 µg/alça (C), e EHNA 90 µmol/kg i.p + PBS (D). Observa-se que a TxA induziu intensa destruição da mucosa com aumento do infiltrado celular inflamatório e que o EHNA diminuiu a destruição da mucosa e o infiltrado celular inflamatório. Aumento de 100x.

**Tabela 2.** Efeito do EHNA sobre as alterações histológicas na enterite induzida pela TxA nas alças ileais de camundongos.

	Grupos			
	PBS	TxA		EHNA
		PBS	EHNA	
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)*	1 (0-2)**	0 (0-0)**

EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS foram injetados i.p. 30 minutos antes da injeção de TxA (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS nas alças ileais. As alças foram removidas para processamento e coloração pelo H&E. A análise histológica considerou escores de 0-3 baseados nos seguintes parâmetros: dano epitelial, edema e infiltração de neutrófilos. Os dados estão relatados como mediana seguida de variação. (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. Kruskal-Wallis/Dunn.



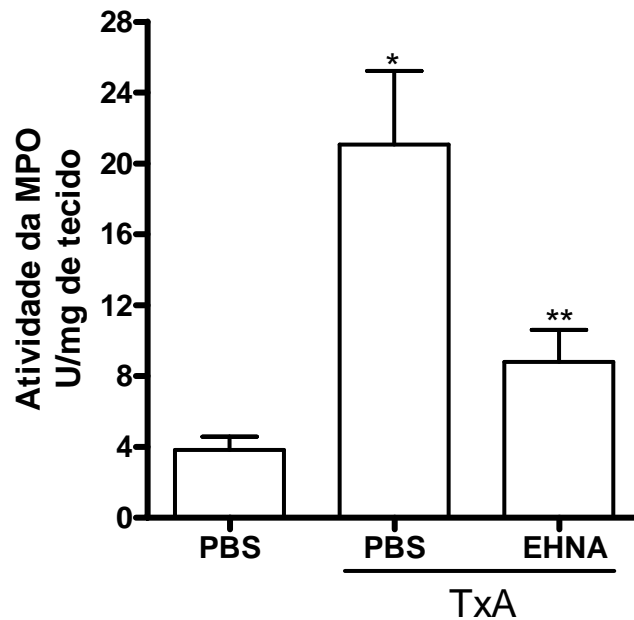
**Figura 8. Avaliação histológica do efeito do EHNA sobre a destruição da mucosa, o infiltrado celular e o edema intersticial na alça ileal de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile* (TxA).** EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS foram injetados i.p. 30 min antes da injeção de TxA (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS nas alças ileais. As alças foram removidas para processamento e coloração pelo H&E. A análise histológica considerou escores de 0-3 baseados nos seguintes parâmetros: dano epitelial, edema e infiltração de neutrófilos. Observou-se que o EHNA diminuiu de forma significativa a destruição da mucosa, o edema e o infiltrado celular inflamatório provocados pela TxA do *Clostridium difficile*. Os dados estão plotados como média  $\pm$  EPM (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. Kruskal-Wallis/Dunn

## **5. EFEITO DO EHNA SOBRE A ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NO TECIDO DAS ALÇAS ILEAIS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM TOXINA A DO *Clostridium difficile*.**

A administração de TxA na dose de 50 µg nas alças ileais isoladas promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do conteúdo de MPO no tecido de íleo de camundongos em comparação as alças tratadas apenas com PBS (controle). A pré- administração de EHNA (90 µmol/kg) aos animais tratados com TxA (50 µg/alça) reduziu significativamente a atividade de MPO no íleo desses animais (PBS + PBS =  $3,829 \pm 0.753$  U/mg Vs PBS + TxA =  $21,07 \pm 4,152$  U/mg Vs EHNA + TxA =  $8,788 \pm 1,813$  U/mg). **FIGURA 9.**

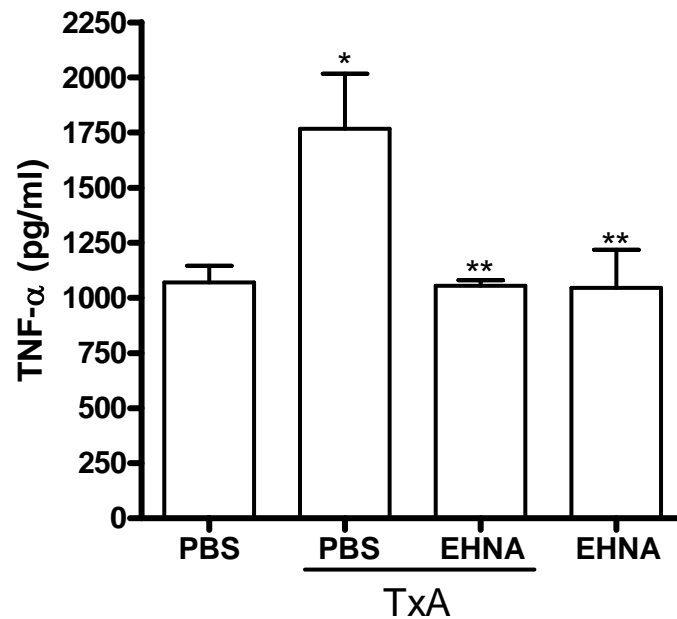
## **6. DETERMINAÇÃO DE TNF- $\alpha$ NO TECIDO DE ALÇA ISOLADA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO INTRALUMINAL COM PBS OU TOXINA A, APÓS INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE EHNA OU PBS.**

A administração intra-luminal de toxina A, na dose de 50 µg, nas alças isoladas de camundongos produziu um aumento significativo nos níveis e expressão transcricional de TNF-  $\alpha$  no tecido ileal, 3h após a injeção do estímulo inflamatório, em relação às alças tratadas apenas com PBS. Nos animais pré-tratados com EHNA (90 µmol/kg) houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da quantidade de RNA mensageiro e dos níveis de TNF- $\alpha$  nas amostras, em relação aos animais que receberam pré-tratamento com PBS. (Dosagem de TNF-  $\alpha$  em pg/ml: PBS + TxA =  $1767 \pm 249,9$  Vs EHNA + TxA =  $1054 \pm 26,61$ ; Razão de expressão de TNF- $\alpha$ : PBS + TxA =  $3,54 \pm 0,37$  Vs EHNA + TxA =  $0,07 \pm 0,67$ ). A redução do conteúdo de TNF-  $\alpha$  após pré-tratamento com EHNA foi também observada na mucosa intestinal através da análise microscópica de cortes de tecido do íleo marcados por imunohistoquímica (aumento de 400x). **FIGURAS 10, 11 E 12.**

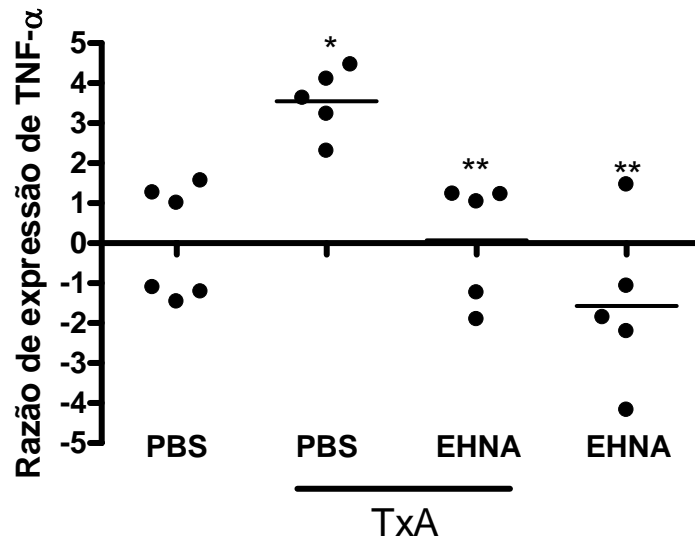


**Figura 9. Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido ileal de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intra-luminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e a atividade de MPO determinada por método enzimático colorimétrico. Os dados, U/mg, estão plotados como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ). (\*)  $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p<0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.

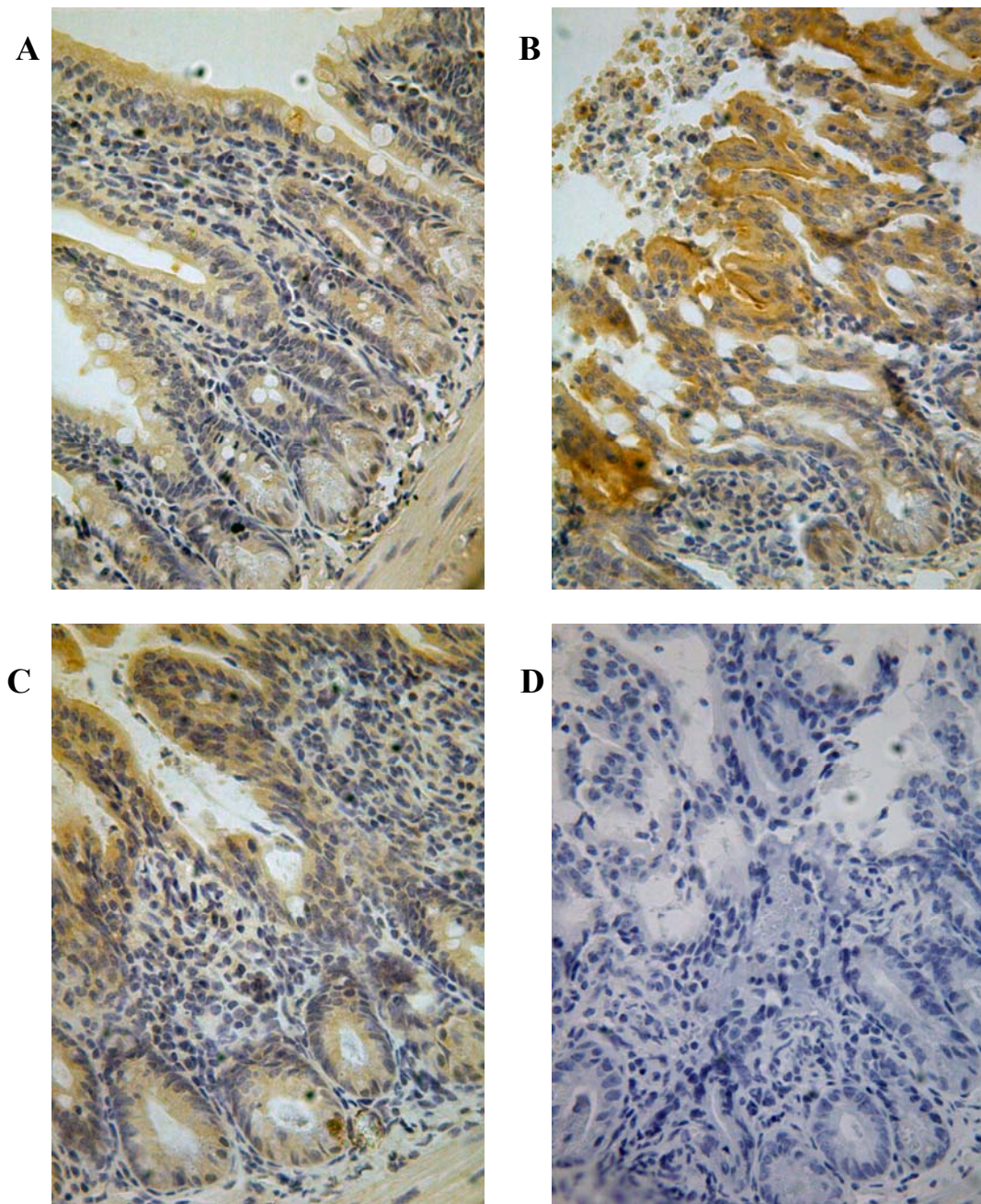




**Figura 10. Dosagem de TNF- $\alpha$  no tecido do íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu$ mol/kg) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu$ g/alça) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intra-luminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas para dosagem de TNF- $\alpha$  determinada por ELISA. As colunas representam a média  $\pm$  EPM da quantidade de TNF- $\alpha$  em pg/ml das amostras (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.



**Figura 11. Expressão gênica de TNF- $\alpha$  no tecido do íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intraluminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas para dosagem de RNA mensageiro para TNF-  $\alpha$  por PCR. Os pontos representam valores da razão da quantidade de RNA mensageiro para TNF-  $\alpha$  em relação ao grupo controle (PBS). As barras representam a média da razão da expressão de TNF-  $\alpha$  nas amostras (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.



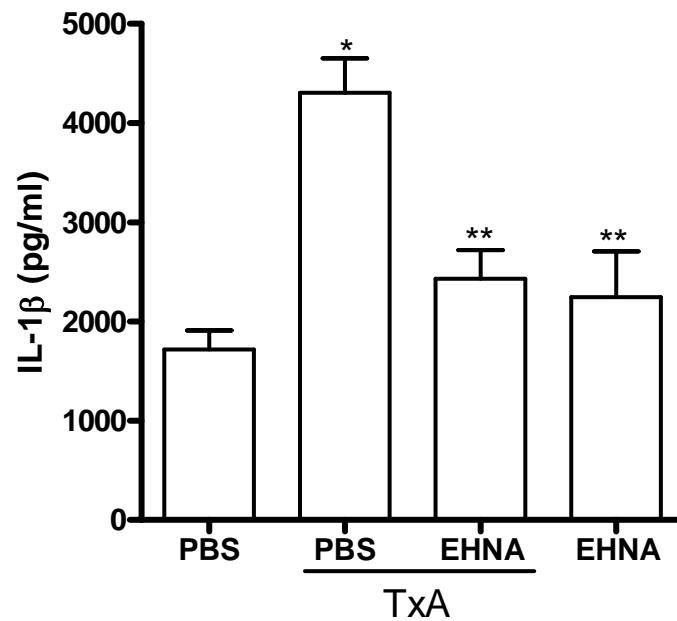
**Figura 12. Efeito do EHNA sobre o conteúdo de TNF- $\alpha$  no tecido do íleo de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile*.** As figuras são fotomicrografias representativas de cortes histológicos, incubados com anticorpos específicos para TNF- $\alpha$ , do tecido do íleo de camundongos que receberam na alça TxA (50  $\mu$ g/alça) ou PBS (controle) 30 minutos após pré-tratamento i.p. de EHNA (90  $\mu$ mol/kg) ou PBS. A foto B (PBS + TxA) ilustra coloração marrom mais proeminente nas células inflamatórias e epiteliais intestinais indicativa de maior quantidade de TNF- $\alpha$  em alças ileais tratadas com TxA. A foto C mostra a significativa redução do aumento da quantidade de TNF- $\alpha$  induzida pela TxA na presença de EHNA. As fotos A e D ilustram o aspecto de uma alça tratada apenas com PBS (controle) e o controle negativo, respectivamente. Aumento de 400x.

## **7. DETERMINAÇÃO DE IL-1 $\beta$ NO TECIDO DE ALÇA ILEAL ISOLADA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO INTRA-LUMINAL COM PBS OU TOXINA A, APÓS INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE EHNA OU PBS.**

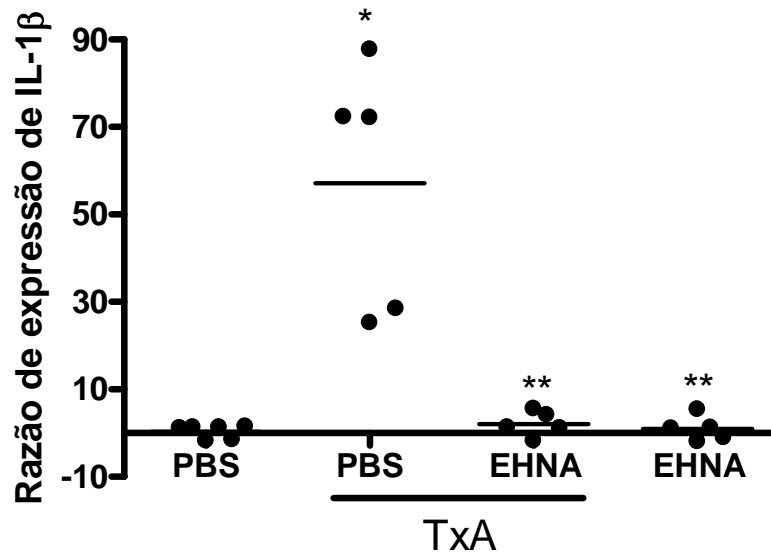
A administração intra-luminal de toxina A, na dose de 50  $\mu$ g, nas alças isoladas de camundongos produziu um aumento significativo nos níveis e expressão gênica de IL-1 $\beta$  no tecido ileal, 3h após a injeção do estímulo inflamatório, em relação às alças tratadas apenas com PBS. Nos animais pré-tratados com EHNA (90  $\mu$ mol/kg) houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da quantidade de RNA mensageiro e dos níveis de IL-1 $\beta$  nas amostras, em relação aos animais pré-tratados com PBS (Dosagem de IL-1 $\beta$  em pg/ml: PBS + TxA = 4307  $\pm$  346,4 Vs EHNA + TxA = 2430  $\pm$  289,9; Razão de expressão de IL-1 $\beta$ : PBS + TxA = 57,15  $\pm$  12,71 Vs EHNA + TxA = 2,04  $\pm$  2,86). A redução da quantidade de IL-1 $\beta$  após pré-tratamento com EHNA foi também observada principalmente no epitélio intestinal através da análise microscópica de cortes de tecido do íleo marcados por imunohistoquímica (aumento de 400x). **FIGURAS 13, 14 E 15.**

## **8. EFEITO DO EHNA SOBRE OS NÍVEIS DE IL-10 NO TECIDO DE ALÇAS ILEAIS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM TOXINA A DO *Clostridium difficile*.**

A administração de TxA, na dose de 50  $\mu$ g, nas alças ileais isoladas não alterou ( $p > 0,05$ ) o conteúdo de IL-10 no tecido do íleo de camundongos em comparação as alças tratadas apenas com PBS (controle). A pré-administração de EHNA (90  $\mu$ mol/kg) aos animais tratados com TxA (50  $\mu$ g/alça) elevou significativamente os níveis ileais de IL-10 em relação aos animais que receberam PBS i.p. antes da injeção intra-luminal de TxA (PBS + PBS = 907,3  $\pm$  46,35 pg/ml Vs PBS + TxA = 888,7  $\pm$  128,7 pg/ml Vs EHNA + TxA = 1482  $\pm$  103,8 pg/ml). **FIGURA 16.**

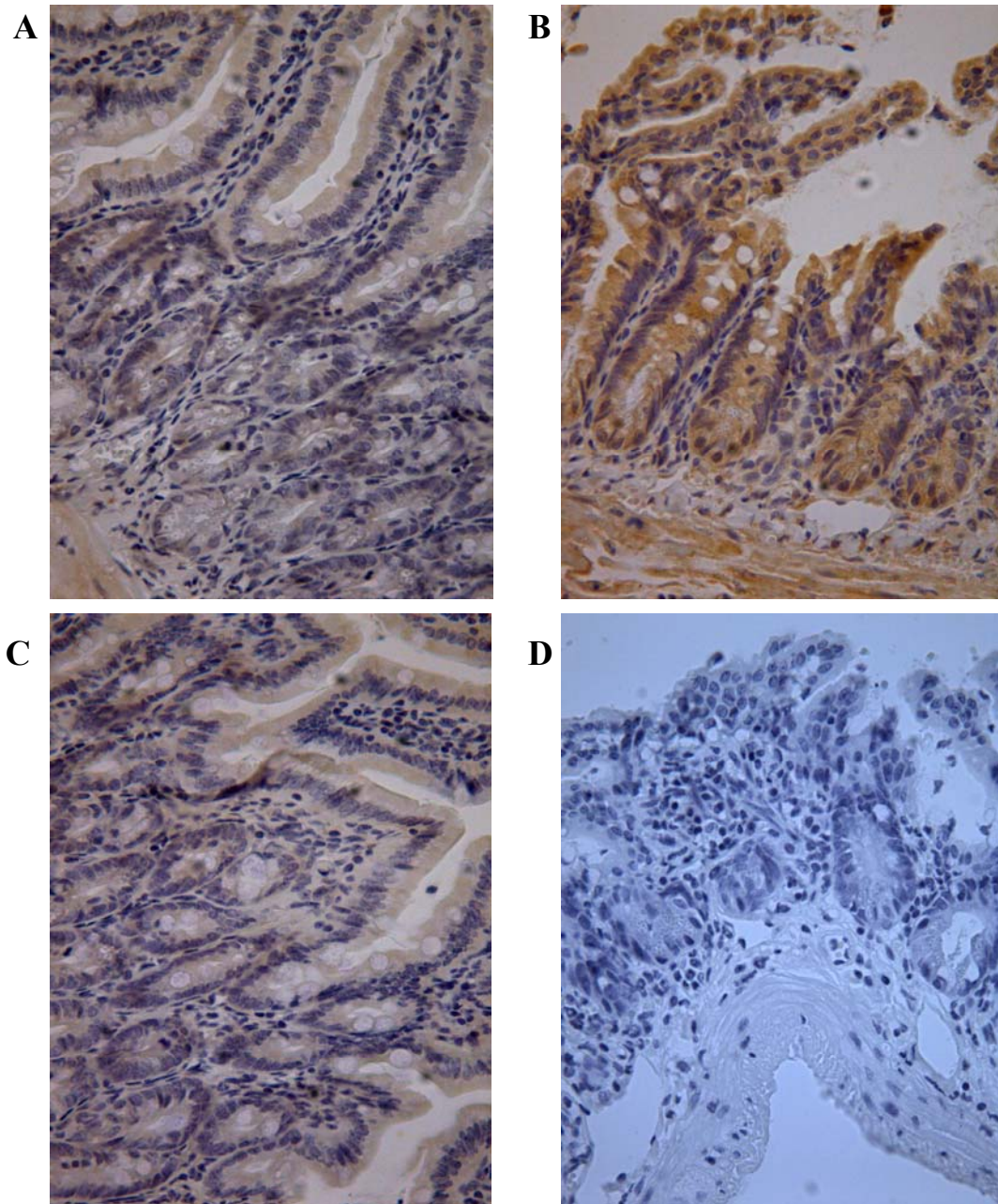


**Figura 13. Dosagem de IL-1 $\beta$  no tecido do íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu$ mol/kg) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu$ g/alça) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intra-luminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas para dosagem de IL-1 $\beta$  determinada por ELISA. As colunas representam a média  $\pm$  EPM da quantidade de IL-1 $\beta$  em pg/ml das amostras (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.

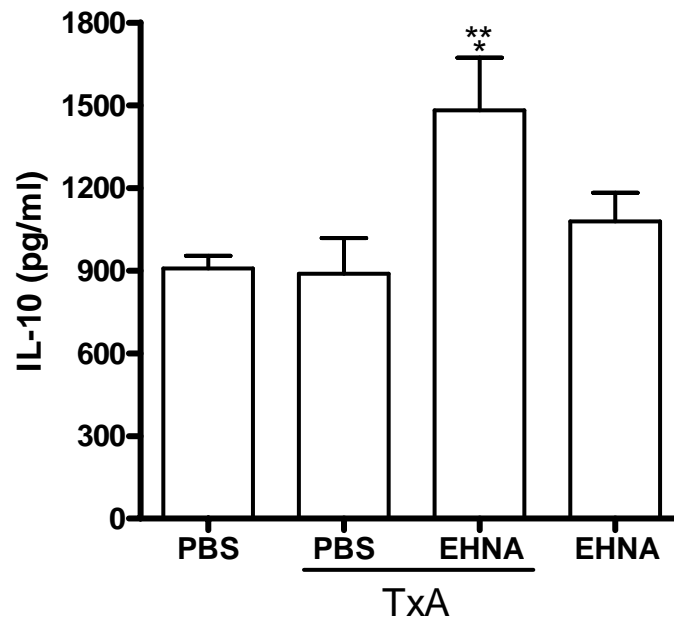


**Figura 14. Expressão gênica de IL-1 $\beta$  no tecido do íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu$ mol/kg) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu$ g/alça) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intraluminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas para dosagem de RNA mensageiro para IL-1 $\beta$  por PCR. Os pontos representam valores da razão da quantidade de RNA mensageiro para IL-1 $\beta$  em relação ao grupo controle (PBS). As barras representam a média da razão da expressão de IL-1 $\beta$  nas amostras (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.





**Figura 15. Efeito do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase, sobre o conteúdo de Interleucina-1 $\beta$  no tecido do íleo de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile*.** As figuras são fotomicrografias representativas de cortes histológicos, incubados com anticorpos específicos para IL-1 $\beta$ , do tecido do íleo de camundongos que receberam na alça TxA (50  $\mu$ g/alça) ou PBS (controle) 30 minutos após tratamento i.p. com EHNA (90  $\mu$ mol/kg) ou PBS. A foto B (PBS + TxA) ilustra coloração marrom mais proeminente nas células epiteliais intestinais indicativa de maior quantidade de IL-1 $\beta$  em alças ileais tratadas com TxA. A foto C (EHNA + TxA) mostra a significativa redução do aumento da quantidade de IL-1 $\beta$  induzida pela TxA na presença de EHNA. As fotos A e D ilustram o aspecto de uma alça tratada apenas com PBS (controle) e o controle negativo, respectivamente. Aumento de 400x.



**Figura 16. Dosagem de IL-10 no íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intra-luminal das drogas. Amostras do tecido do íleo foram removidas e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e seu conteúdo de IL-10 determinado por ELISA. As colunas representam a média  $\pm$  EPM da quantidade de IL-10 em pg/ml das amostras ( $n=5-6$ ). (\*)  $p<0,05$  indica diferença estatística em relação ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p<0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.

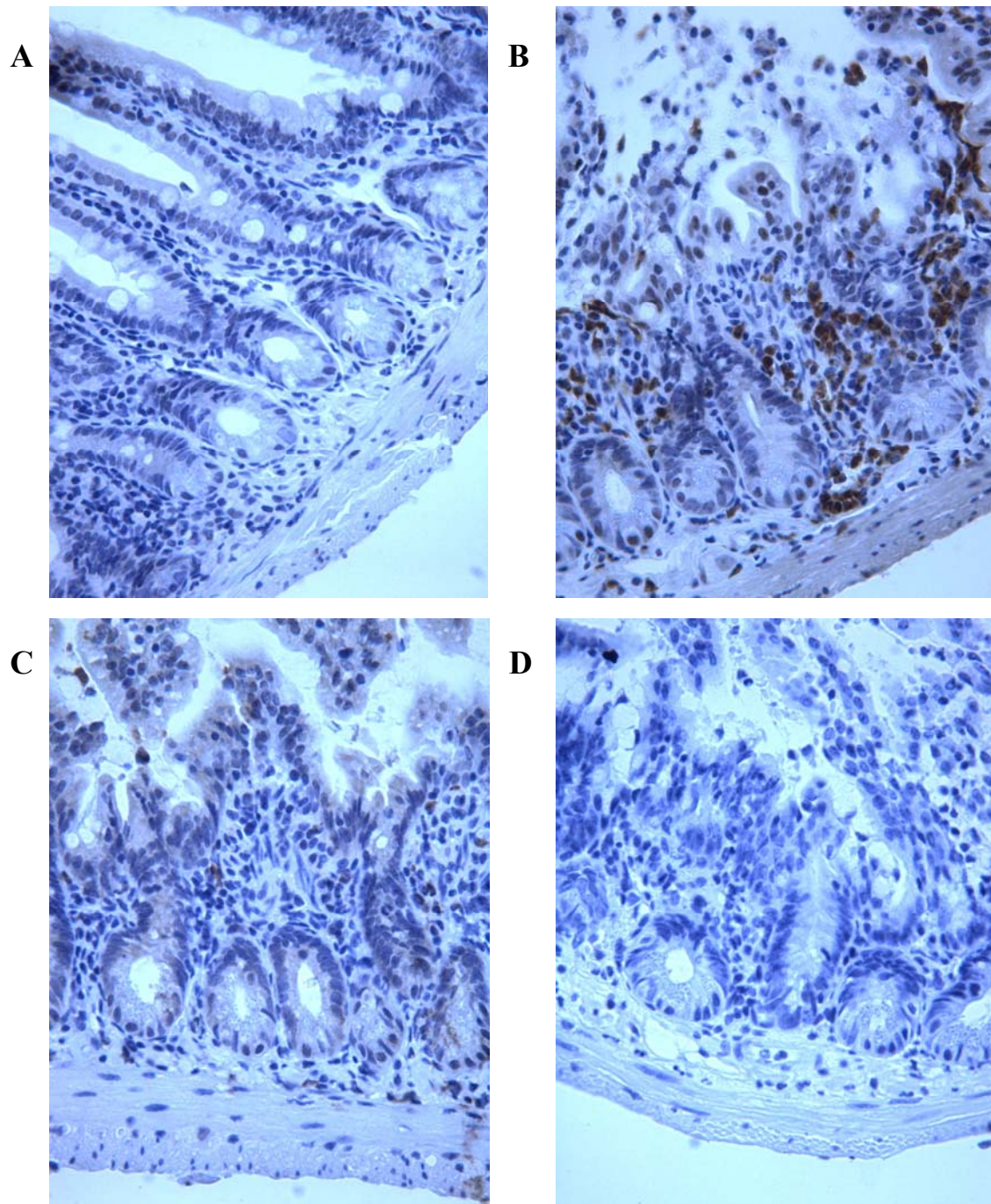


## **9. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EFEITO DO EHNA SOBRE O CONTEÚDO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NO TECIDO DE ALÇAS ILEAIS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS TRATADAS COM TOXINA A DO *Clostridium difficile* (TxA).**

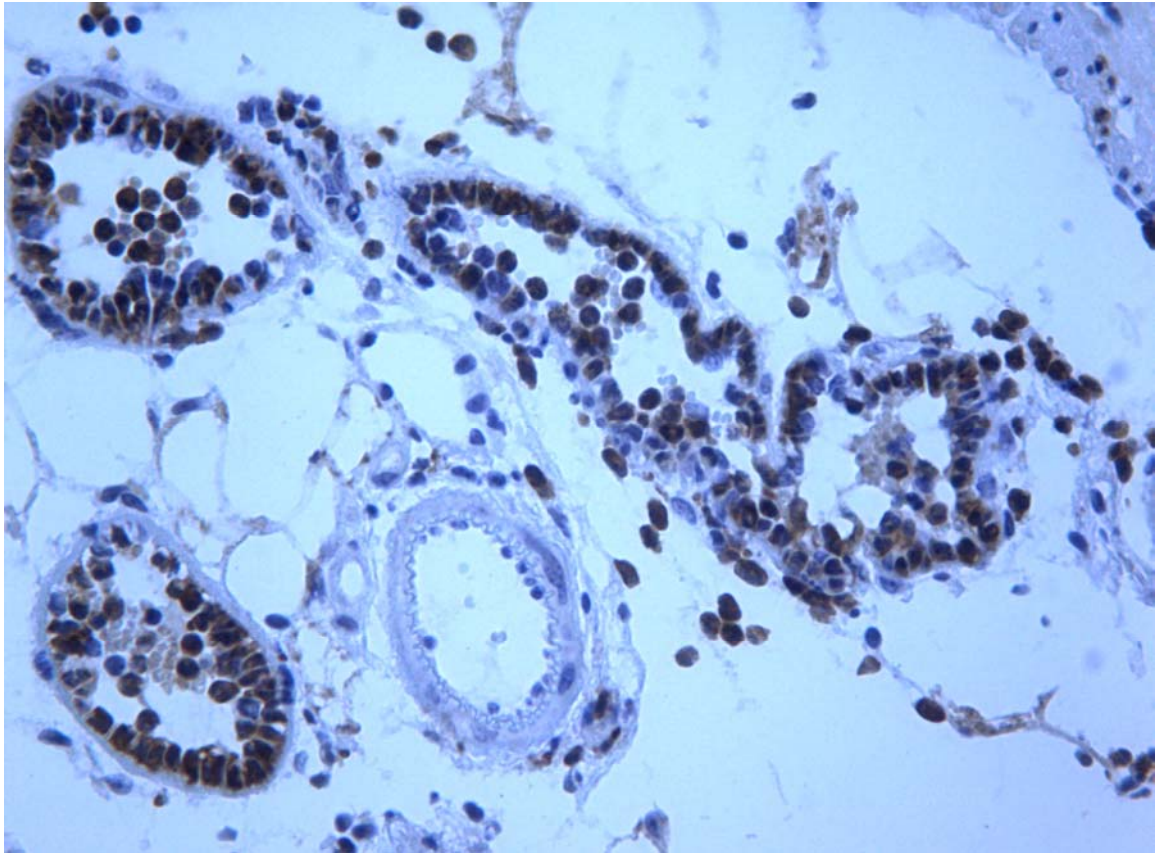
A administração intra-luminal de toxina A, na dose de 50 µg, nas alças ileais isoladas de camundongos produziu um aumento significativo da quantidade de células marcadas para iNOS por imunohistoquímica no tecido ileal, 3h após a injeção do estímulo inflamatório, em relação às alças tratadas apenas com PBS. Nos animais pré-tratados com EHNA (90 µmol/kg) houve uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da quantidade de células marcadas para iNOS nas amostras ileais, em relação aos animais pré-tratados apenas com PBS. (PBS + PBS =  $11 \pm 2,23$  Vs PBS + TxA =  $129,2 \pm 11,65$  Vs EHNA + TxA =  $58,50 \pm 4,88$ ). **FIGURAS 17, 18 E 19.**

## **10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXINA A DO *Clostridium difficile* (TxA) E DO EHNA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE PENTRAXINA-3 NO TECIDO DAS ALÇAS ILEAIS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS.**

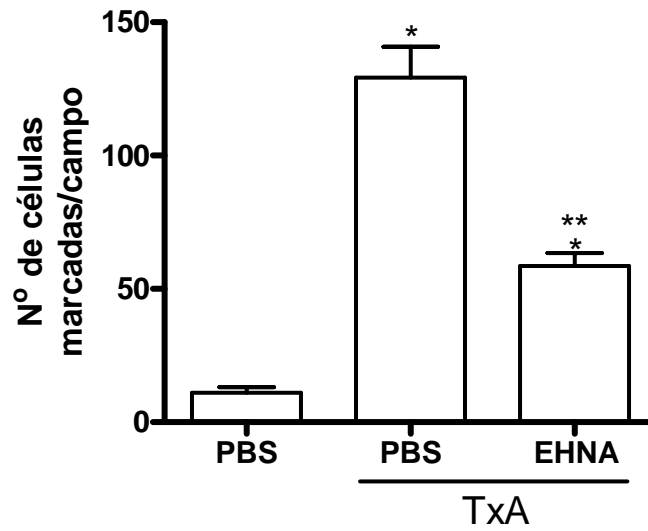
A administração de TxA na dose de 50 µg nas alças isoladas promoveu aumento significativo ( $p<0,05$ ) da expressão gênica de PTX3 no tecido de íleo de camundongos em comparação as alças tratadas apenas com PBS (controle). Nos animais pré-tratados com EHNA (90 µmol/kg) houve uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da quantidade de RNA mensageiro para PTX3 nas amostras (PBS + PBS =  $0 \pm 1,21$  Vs PBS + TxA =  $113,8 \pm 18,97$  Vs EHNA + TxA =  $22,68 \pm 15,59$ ). O aumento do conteúdo de PTX3 pela TxA e sua reversão pelo EHNA foi também constatado através da análise microscópica de tecido ileal marcado por técnica de imunohistoquímica. **FIGURAS 20 E 21.**



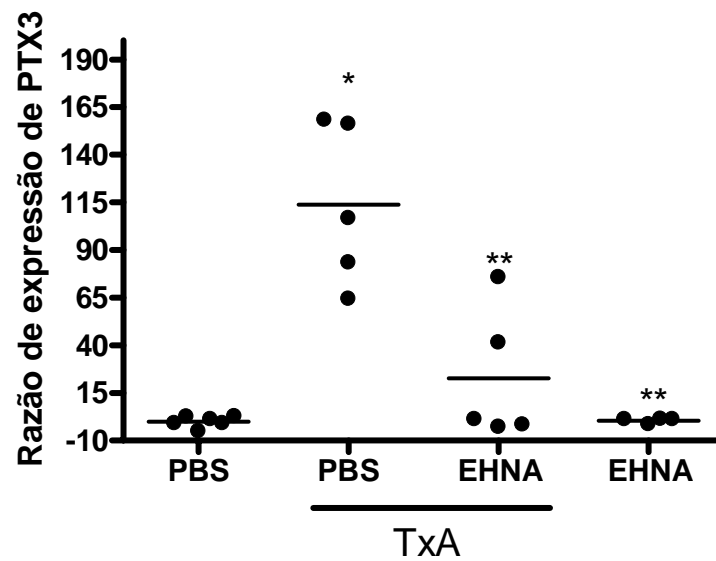
**Figura 17.** Avaliação microscópica do efeito do EHNA sobre o número de células marcadas por imunohistoquímica para iNOS na alça ileal de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile* (TxA). O EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou o PBS foram injetados i.p. 30 minutos antes da injeção de TxA (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS nas alças ileais. As alças foram removidas para processamento e os cortes histológicos foram incubados com anticorpos específicos e corados para quantificação de células marcadas. Observou-se que o EHNA (foto C) diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a elevação do número de células inflamatórias expressando iNOS (marcadas em marrom) induzida pela TxA do *Clostridium difficile* (foto B). As fotos A e D representam PBS (controle) e controle negativo, respectivamente. Aumento de 400x.



**Figura 18. Avaliação microscópica do efeito da toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) sobre o número de células inflamatórias marcadas para iNOS por imunohistoquímica na alça ileal de camundongos.** A figura acima é uma fotomicrografia de corte histológico de alça ileal de camundongo tratada com TxA (50 µg/alça). A alça foi removida para processamento e o corte histológico foi incubado com anticorpos específicos e corado para quantificação de células marcadas. Observa-se na foto o grande número de células inflamatórias expressando iNOS (marcadas em marrom) em processo de transmigração nas vênulas da serosa da alça ileal de camundongo tratada com TxA. Aumento de 400x.

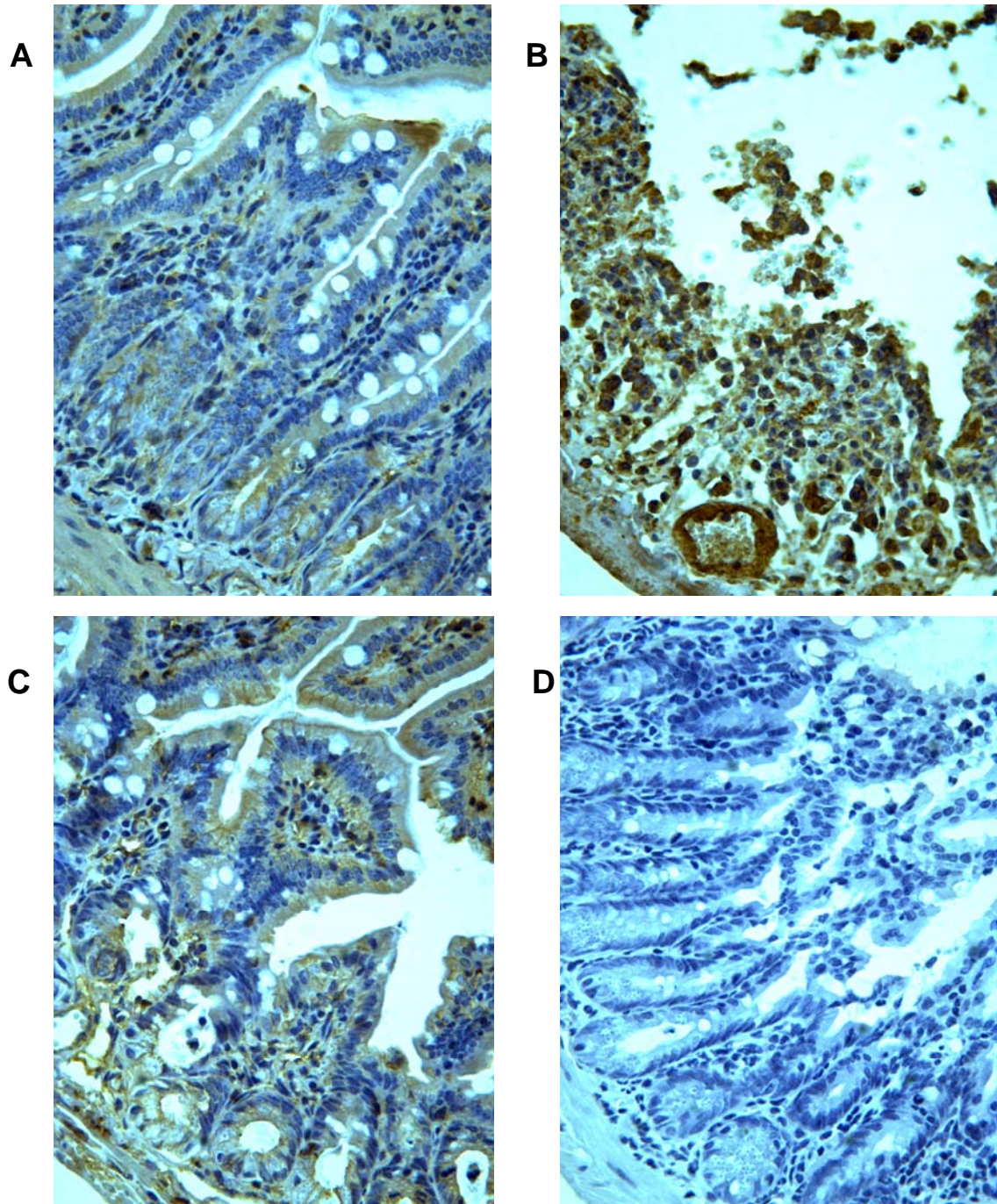


**Figura 19. Avaliação microscópica do efeito do EHNA sobre o número de células marcadas por imunohistoquímica para iNOS na alça ileal de camundongos tratados com toxina A do *Clostridium difficile* (TxA).** EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS foram injetados i.p. 30 minutos antes da injeção de TxA (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS nas alças ileais. As alças foram removidas para processamento e os cortes histológicos foram incubados com anticorpos específicos e corados para quantificação de células marcadas. Foram analisados seis campos diferentes em cada corte no aumento de 400x. O número de células imunomarcadas por campo foi contabilizado. Observou-se que o EHNA diminuiu de forma significativa a elevação do número de células marcadas para iNOS provocada pela TxA do *Clostridium difficile*. Os dados estão plotados como média  $\pm$  EPM (n=6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.



**Figura 20. Expressão gênica de PTX3 no tecido do íleo de camundongos.** Os animais foram tratados com EHNA (90  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou PBS i.p. 30 minutos antes da injeção de toxina A (50  $\mu\text{g/alça}$ ) ou PBS dentro da alça ileal e sacrificados 3 horas após a administração intraluminal das drogas. O RNA das amostras de tecido ileal foi purificado e processado por método de PCR para quantificar a expressão gênica de PTX3. Os pontos representam valores da razão da quantidade de RNA mensageiro para PTX3 em relação ao grupo controle (PBS). As barras representam a média da razão da expressão de PTX3 nas amostras (n=5-6). (\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). (\*\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS + TxA. ANOVA/Bonferroni.





**Figura 21. Efeito do EHNA, inibidor da enzima adenosina desaminase, sobre o conteúdo de Pentraxina-3 (PTX3) no tecido ileal de camundongos tratados com toxina A do *C. difficile*.** As figuras são fotomicrografias representativas de cortes histológicos, incubados com anticorpos específicos para PTX3, do tecido do íleo de camundongos que receberam na alça TxA (50 µg/alça) ou PBS (controle) 30 minutos após tratamento i.p. com EHNA (90 µmol/kg) ou PBS. Observou-se que a TxA (foto B) induziu o aumento da quantidade de células imunomarcadas para PTX3 (coloração marrom) em relação ao grupo que recebeu apenas PBS (foto A). A foto C (EHNA + TxA) mostra a significativa redução do aumento da quantidade de PTX3 induzida pela TxA na presença de EHNA. A foto D representa o controle negativo. Aumento de 400x.

## **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

---

No presente trabalho, tivemos como objetivo investigar o efeito de um antagonista da enzima adenosina deaminase, o EHNA (eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina) (SCHAEFFER & SCHWENDER, 1974), sobre a lesão induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) em alças ileais isoladas em camundongos.

Para isso, inicialmente verificamos qual seria a dose de TxA que induziria uma elevação significativa do peso e da secreção em relação ao comprimento das alças ileais isoladas de camundongos C57BL/6. Concluímos que a injeção de 50 e 100 µg de TxA produziu um aumento significativo do peso e da secreção da alça ileal de camundongos 3 horas após sua injeção. Escolhemos, então, a dose de 50 µg de TxA para os experimentos subseqüentes, uma vez que essa dose proporcionou resultados consistentes com a administração de menor quantidade de droga, e resultou em erro padrão menor no aumento do peso e volume da secreção das alças ileais.

O modelo de enterite induzida pela TxA que utilizamos neste trabalho está bem estabelecido na literatura mundial, além de ter sido também previamente utilizado em nosso laboratório. POTHOUKAKIS e colaboradores (1994) demonstraram que a injeção de TxA em alça isolada de ratos *Wistar* promoveu aumento de 20x na permeabilidade da mucosa intestinal. KIRKWOOD e colaboradores (2001), utilizando camundongos C57BL/6, verificaram que 3h após a administração de TxA dentro da alça ileal ocorreu significativo aumento da secreção intestinal, além de outros parâmetros inflamatórios. Nosso grupo, utilizando camundongos *Swiss*, demonstrou que 5 µg de TxA produziram considerável aumento de peso e secreção da alça ileal isolada 3 horas após a injeção da toxina (CAVALCANTE *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2008). Mais recentemente, KIM e colaboradores (2007), demonstraram que a injeção de TxA promoveu, entre outras alterações, aumento de secreção na alça ileal isolada de camundongos C3H/HeJ. Os nossos resultados mostram que camundongos C57BL/6 apresentaram maior resistência a TxA, sendo necessária dose maior (50 µg/alça) para obter inflamação e destruição do tecido ileal comparável a encontrada com 5 µg/alça em camundongos *Swiss*.



Após determinar a dose de TxA a ser utilizada, iniciamos o estudo para avaliar um possível efeito protetor do EHNA sobre a enterite induzida pela TxA em alça ileal de camundongo. O EHNA é um potente inibidor da adenosina deaminase, enzima responsável pela inativação da adenosina, e promove, dessa forma, a elevação dos níveis extracelulares de adenosina endógena (BESSODES *et al.*, 1982). Muitos trabalhos têm demonstrado a habilidade da adenosina em exercer uma ação antiinflamatória em uma variedade de modelos experimentais. Considerando inflamação intestinal, SIEGMUND e colaboradores (2000) demonstraram que o aumento dos níveis endógenos de adenosina promoveu a melhora da colite induzida por dextran sulfato em camundongos. ODASHIMA e colaboradores (2005) observaram que a estimulação do receptor  $A_{2A}$  da adenosina reduziu a severidade da ileíte em modelo experimental de doença inflamatória intestinal em coelhos. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a estimulação do receptor  $A_{2A}$  da adenosina reduziu a lesão tecidual e a inflamação na enterite induzida pela toxina A do *C. difficile* em camundongos (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Neste mesmo trabalho, demonstramos, pela primeira vez, que a TxA induziu aumento acentuado da atividade de ADA, o que nos motivou a averiguar o efeito da inibição da atividade desta enzima na lesão induzida por toxina A em camundongos. Tem sido relatado que a ADA desempenha um importante papel nas reações inflamatórias e que seu nível sérico pode ser usado como marcador bioquímico de doenças inflamatórias (PIRAS *et al.*, 1978; SARI *et al.*, 2003). Nossos dados, anteriormente publicados, mostraram que a inibição da infiltração neutrofílica com fucoidina reduziu a atividade de ADA no tecido ileal de camundongos tratados com a toxina A do *C. difficile* (BARRETO *et al.*, 2008). Em adição, ANTONIOLI e colaboradores (2007), observaram que a inibição da ADA pelo EHNA reduziu tanto as alterações inflamatórias intestinais quanto as sistêmicas na colite induzida pelo ácido 2,4-dinitrobenzenosulfídico em ratos. Baseado nesses achados, o sistema da adenosina pode representar um alvo promissor de terapias de desordens inflamatórias do trato gastrointestinal.

Verificamos então o efeito do EHNA, na dose de 90  $\mu\text{mol/kg}$ , administrado i.p. 30 minutos antes da indução da enterite pela TxA, sobre o peso e secreção da alça. Encontramos que o EHNA reduziu de forma significativa o aumento do peso e volume da secreção das alças ileais induzidos pela TxA. BEUBLER e colaboradores (1993) concluíram que a secreção de fluido observada na enterite induzida pela TxA era causada pela severa lesão da mucosa intestinal. POTHOUKAKIS (2000) observou que a TxA promove aumento da secreção intestinal por dois mecanismos principais. O primeiro seria pela desagregação dos

filamentos de actina e quebra das zônulas de oclusão induzida pela inativação das proteínas Rho, o que promoveria o aumento da permeabilidade intestinal. Trabalho do nosso grupo demonstra que a TxA induz apoptose de células epiteliais colônicas humanas *in vitro*, sugerindo que a morte das células intestinais seria um evento importante para o contato da toxina com o tecido conjuntivo da lâmina própria e com a indução de inflamação e aumento de permeabilidade (BRITO *et al.*, 2002b). O segundo seria pela reação inflamatória induzida pela TxA, que cursa com produção de citocinas e mediadores, infiltração de células inflamatórias, liberação de substância P e lesão tecidual. Tem sido largamente demonstrado que a adenosina tem uma forte atividade antiinflamatória, principalmente através da atuação em seus receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  (CRONSTEIN, 1994; BOURS *et al.*, 2006; FREDHOLM, 1997). A adenosina endógena, liberada em locais de *stress* tecidual, inibe a produção de citocinas, a migração de células inflamatórias e a lesão celular (EIGLER *et al.*, 2000; HASKÓ & CRONSTEIN, 2004). Assim, nossa hipótese é de que a ação antiinflamatória da adenosina, especialmente sobre a produção de citocinas próinflamatórias e migração de células do sistema imunológico, pode ter sido o mecanismo pela qual o uso do EHNA preveniu o aumento do peso e da secreção induzidos pela TxA do *C. difficile* na alça ileal de camundongos.

Deve ser ressaltado, entretanto, que esta redução no peso e na secreção da alça tratada com TxA foi apenas parcial, ou seja, a administração de EHNA não reduziu estes parâmetros ao nível do grupo controle. Consideramos como uma possível explicação, o fato do receptor  $A_{2B}$  de adenosina poder induzir a secreção de fluido pelas células epiteliais intestinais. STROHMEIER e colaboradores (1995) demonstraram que a estimulação do receptor  $A_{2B}$ , mas não de  $A_1$  ou  $A_{2A}$ , promoveu um aumento da secreção de  $Cl^-$  no epitélio intestinal. Este dado é compatível com o fato que, em estudo prévio, nosso grupo demonstrou que um agonista específico dos receptores  $A_{2A}$  reduziu o peso e a secreção das alças expostas à com TxA ao nível do controle (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Portanto, nossa hipótese é de que o aumento da adenosina induzido pela inibição de ADA reduziu significativamente o peso e a secreção da alça porque inibiu o processo inflamatório e o dano celular, mas a redução foi parcial, pois a estimulação do receptor  $A_{2B}$  pode ter induzido a secreção de  $Cl^-$  pelas células epiteliais intestinais.

Nesse estudo, a análise histopatológica dos tecidos de alças intestinais tratadas com TxA mostrou destruição intensa da mucosa com perda de células epiteliais, proeminente

infiltrado celular inflamatório, edema intersticial e hemorragia tecidual. Hemorragia e edema estavam também evidentes na observação macroscópica da alça ileal. Nossos achados estão de acordo com os encontrados na literatura. FANG e colaboradores (1994) mostraram que a exposição de segmentos de alças ileais de coelhos a TxA induziu uma intensa destruição da mucosa e um significativo infiltrado neutrofílico. KELLY e colaboradores (1994) relataram que ocorreu um extenso dano epitelial, com quase completa destruição das vilosidades e criptas, associado a um denso infiltrado inflamatório na lâmina própria das alças ileais de coelhos tratadas com TxA. MENEZES (2002) observou que alças ileais isoladas de coelhos tratadas com TxA mostraram uma acentuada diminuição nas vilosidades e na espessura da mucosa, com destruição de epitélio e glândulas, bem como exsudação neutrofílica na mucosa intestinal. Dados do nosso grupo também confirmaram estas alterações histopatológicas tanto em coelho como em camundongos (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2008).

Observamos que o EHNA reverteu todas essas alterações histológicas, reduzindo a destruição da mucosa, o edema, o infiltrado celular inflamatório e a hemorragia. Demonstramos, assim, pela primeira vez na literatura, que a inibição da enzima adenosina desaminase pelo EHNA preveniu a lesão tecidual induzida pela TxA em alça ileal de camundongos. Esse achado corroborou nossa hipótese de que as ações antiinflamatórias da adenosina podem reduzir a lesão intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

É bem reconhecido o importante papel que os neutrófilos desempenham na patogênese da colite pseudomembranosa (LYERLY *et al.*, 1988). Tem sido demonstrado em vários trabalhos que a TxA, quando utilizada em modelos animais de alças intestinais isoladas, leva a um intenso processo inflamatório com infiltração maciça de neutrófilos (ROCHA *et al.*, 1997; KELLY *et al.*, 1994; CASATAGLIUOLO *et al.*, 1998; CAVALCANTE *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2008). Observamos, no nosso trabalho, que houve um aumento da atividade de mieloperoxidase nas alças ileais tratadas com TxA. A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos que atua na produção de agentes oxidantes citotóxicos. A dosagem da sua atividade representa um método indireto de verificar a infiltração e a atividade neutrofílica local. Verificamos que o uso do EHNA preveniu o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido por TxA em alça ileal de camundongos. Estes dados sugerem que o efeito protetor do EHNA sobre a inflamação e

destruição da mucosa induzida pela TxA é, pelo menos em parte, relacionada a inibição da infiltração e a atividade neutrofílica pela adenosina.

Tem sido demonstrado que a inibição da transmigração neutrofílica protege contra a lesão induzida pela TxA, fortalecendo nossa hipótese. KELLY e colaboradores (1994) e KUROSE e colaboradores (1994) mostraram que a inibição do recrutamento de neutrófilos por anticorpos para integrinas ou P-selectina diminuiu o dano intestinal em animais expostos à TxA. Também foi demonstrado que anticorpos para as moléculas de adesão neutrofílicas, CD11-CD18, marcadamente reduziram a secreção de fluido e o dano tecidual induzidos pela TxA (KELLY, *et al.*, 1994). Nosso trabalho recentemente publicado demonstrou que a inibição da infiltração neutrofílica com um bloqueador de L-selectina, a fucoidina, reduziu a injúria tecidual e a inflamação induzida pela toxina A em alça ileal de camundongos (BARRETO *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido descrito que a adenosina, pela estimulação de receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , limita o número de neutrófilos que atravessam a vasculatura. Foi descrito que camundongos *knockout* (KO) para CD39 e CD73, ou seja, com reduzidos níveis de adenosina, tiveram um significativo aumento no acúmulo de neutrófilos quando comparados a camundongos normais (ELTZSCHIG *et al.*, 2004). GLOVER e colaboradores (2005 e 2007) demonstraram que agonistas do receptor  $A_{2A}$  inibem a expressão de P-selectina e a infiltração neutrofílica. YANG e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos KO para  $A_{2B}$  exibiam uma *upregulation* nas moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e ICAM-1, bem como um aumento da adesão ao endotélio e do rolamento leucocitário, o que não foi encontrado em camundongos com expressão normal destes receptores.

Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que a TxA modifica a forma e a função dos neutrófilos, promovendo um aumento de sua adesividade ao substrato, o que poderia contribuir para a formação das pseudomembranas e para a intensa reação inflamatória encontrada na doença induzida pelo *C. difficile* (BRITO *et al.*, 2002a). QIU e colaboradores (1999) mostraram que a TxA purificada, quando administrada no lúmen de alças intestinais de rato, induziu a geração de grande quantidade de metabólitos reativos de oxigênio gerados primariamente pela infiltração neutrofílica, o que contribuiu para o dano tecidual. Vários estudos têm mostrado que a adenosina também interfere com a função neutrofílica. BURKEY & WEBSTER (1993) e VISSER e colaboradores (2000) mostraram que a adenosina inibiu a produção de superóxido pelos neutrófilos estimulados pelo fMLP. THIEL e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação de receptores  $A_{2A}$  nos neutrófilos inibiu de forma potente

a fagocitose, a degranulação e a formação de radicais livres do oxigênio. Estes trabalhos reforçam nossa sugestão de que o EHNA preveniu a lesão intestinal induzida pela TxA, pelo menos em parte, através da inibição da migração e função neutrofílica.

Tem sido demonstrado que a TxA estimula a produção de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e que isso pode contribuir para os estágios precoces da reação inflamatória observada na colite pseudomembranosa (FLEGEL *et al.*, 1991). Nesse sentido, ROCHA e colaboradores (1997) concluíram que a migração neutrofílica na cavidade peritoneal de ratos e na bolsa de ar induzidos pela TxA era mediado por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , liberadas por macrófagos residentes, sugerindo que esses mediadores inflamatórios exercem importante contribuição na colite inflamatória induzida pela TxA do *C. difficile*. CARNEIRO-FILHO e colaboradores (2001) mostraram que os inibidores da produção de TNF- $\alpha$ , talidomida e pentoxifilina, inibiram a migração neutrofílica induzida pela TxA do *C. difficile*. Trabalho do nosso grupo demonstrou que a estimulação de células epiteliais intestinais colônicas humanas (T84) com TxA *in vitro* resulta na secreção de TNF- $\alpha$ , sugerindo que as células de revestimento do intestino humano também estão envolvidas na resposta inflamatória a TxA (BRITO *et al.*, 2002b). No presente trabalho, verificamos os níveis e a expressão transcripcional de TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido de alça ileal de camundongos C27BL/6, 3 horas após tratamento com TxA do *C. difficile*. Nossos resultados reafirmaram o que existe na literatura, ou seja, a exposição à TxA induziu um aumento na síntese de TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na alça ileal.

TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são potentes mediadores da resposta inflamatória aguda e contribuem para a migração de leucócitos polimorfonucleares para os sítios de inflamação. São produzidos principalmente por macrófagos e sua produção é mediada pela ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) (PARKIN & COHEN, 2001). NF-  $\kappa$ B é um fator de transcrição envolvido na regulação positiva de genes que codificam citocinas, bem como enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a ciclooxigenase-2, e as moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina (BARNES, 1997). Este fator de transcrição pode ser ativado por vários produtos derivados de patógenos, bem como pelas próprias citocinas, produzindo rápidas mudanças na expressão gênica celular. KIM e colaboradores (2006) concluíram que a ativação de NF-  $\kappa$ B é essencial para a expressão de citocinas em células epiteliais intestinais expostas à TxA do *C. difficile*. JEFFERSON e colaboradores (1999) demonstraram que a síntese de IL-8 induzida pela TxA em monócitos depende da ativação de NF-  $\kappa$ B.

Decidimos, então, investigar o efeito do pré-tratamento com EHNA sobre o aumento na síntese das citocinas próinflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que a inibição da enzima adenosina deaminase reduz o aumento dos níveis e do RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzidos por TxA em alça ileal de camundongos. Diante destes dados, podemos sugerir que o efeito protetor do EHNA sobre a inflamação e destruição da mucosa induzida pela TxA está, pelo menos em parte, relacionado a inibição da síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pela adenosina, e que possivelmente esta inibição ocorre por uma ação a nível de transcrição gênica. Vários estudos têm demonstrado que a adenosina reduz a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e mais recentemente, tem sido proposto que este nucleosídeo pode inibir o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). KRECKLER e colaboradores (2006) concluíram que a adenosina inibe a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de ratos via receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, e que isso poderia contribuir para os efeitos antiinflamatórios da adenosina. SIPKA e colaboradores (2005) demonstraram que a adenosina inibe a liberação de IL-1 $\beta$  por monócitos humanos ativados e que receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> estão envolvidos nesse processo. Outro estudo demonstrou que, 1 hora após a administração de LPS, camundongos KO para receptores A<sub>2B</sub> tiveram um aumento de 5 vezes nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação a camundongos normais (YANG *et al.*, 2006). Trabalho do nosso grupo demonstrou que ATL 313, um agonista do receptor A<sub>2A</sub> da adenosina, reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  em alça ileal de camundongos (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Estes estudos suportam nossos resultados de que a inibição da adenosina desaminase, e conseqüente aumento nos níveis de adenosina, reduz a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzida pela TxA do *C. difficile*.

Além disso, a inibição do fator NF- $\kappa$ B tem sido identificada como uma possível via de sinalização celular envolvida na ação antiinflamatória da adenosina, o que vai de encontro com os relatos da literatura de que a TxA ativa essa via de sinalização para a produção de citocinas. SANDS e colaboradores (2004) concluíram que a ativação do receptor A<sub>2A</sub> em células endoteliais humanas previne o acúmulo de dímeros NF- $\kappa$ B ativos no núcleo em resposta a estímulos como LPS, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . LUKASHEV e colaboradores (2004) mostraram que a deleção de receptores A<sub>2A</sub> em macrófagos resultou em um elevado acúmulo de múltiplos transcritos de NF- $\kappa$ B e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12. JIJON e colaboradores (2005) concluíram que a adenosina atua como potente regulador negativo da sinalização de NF- $\kappa$ B e MAPK para a produção de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais intestinais humanas. De acordo com estes dados, é possível

que vias de sinalização que resultem na inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B estejam envolvidas na redução da síntese de TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e no efeito protetor do EHNA sobre a enterite induzida pela TxA.

Dando continuidade ao nosso trabalho, realizamos a dosagem de interleucina-10 (IL-10) e verificamos que os níveis desta citocina não estão aumentados no tecido da alça ileal tratada com TxA em relação ao grupo controle. A IL-10 é uma potente citocina reguladora da resposta inflamatória que limita o dano tecidual provocado pela resposta exacerbada do sistema imunológico a patógenos (MOORE *et al.*, 2001). A IL-10 atua inibindo a ativação de macrófagos e a produção de citocinas inflamatórias, além de regular a função de linfócitos T. Esta citocina é secretada por várias células do sistema imune e há também relatos de que é secretada de forma constitutiva por células epiteliais intestinais humanas (AUTSCHBACH *et al.*, 1998). É bem conhecido na literatura que camundongos com deficiência de IL-10 desenvolvem uma enterocolite espontânea induzida por uma resposta imune não balanceada a antígenos de bactérias entéricas residentes, sugerindo que a IL-10 é uma citocina imunoreguladora essencial no trato gastrointestinal (KÜHN *et al.*, 1993).

Nossos achados, de que 3 horas após a injeção de TxA na alça ileal os níveis de IL-10 se mantiveram iguais aos dos animais que receberam apenas PBS, são inéditos na literatura. Não existem dados na literatura sobre a medida dos níveis de IL-10 na enterite provocada pela TxA e na doença induzida pelo *C. difficile*. RIGBY e colaboradores (2005) concluíram que a síntese de IL-10 por células dendríticas colônicas, 4 horas após exposição a produtos bacterianos, varia de acordo com o estímulo antigênico. A produção de IL-10 foi aumentada em resposta a *Bifidobacteria longum*, mas não aumentou após a exposição ao *Streptococcus faecium* e ao LPS de *Escherichia coli*, sugerindo que produtos de diferentes bactérias podem direcionar a resposta imunológica para vias diferentes no intestino, o que contribuiria para a capacidade do intestino de tolerar a presença de alguns microorganismos e ativar uma resposta inflamatória citotóxica a outros. Não podemos, no entanto, afirmar que houve realmente uma inibição da síntese de IL-10 e que a ausência da elevação dos níveis desta citocina é um mecanismo contribuinte para a lesão induzida por TxA. É possível que o período de 3 horas não tenha sido suficiente para a produção de IL-10. DE WAAL MALEFYT e colaboradores (1991) demonstraram que a secreção de IL-10 por macrófagos foi detectada apenas 7,5 horas após a estimulação com LPS, e atingiu a máxima produção 20 a 48 horas após a ativação macrofágica. Assim, mais estudos precisam ser feitos para avaliar

se a não elevação dos níveis de IL-10 ou o atraso na produção desta citocina fazem parte da patogênese da lesão induzida pela TxA do *C. difficile*.

Encontramos, neste estudo, que a administração de EHNA foi capaz de induzir uma elevação significativa nos níveis de IL-10 no tecido de alça ileal tratada com TxA. Estes dados podem ser importantes para o entendimento do mecanismo de proteção que a inibição da degradação da adenosina desempenha na lesão intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*. HASKÓ e colaboradores (1996) demonstraram que a injeção i.p. de agonistas dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> de adenosina aumentaram os níveis sistêmicos de IL-10 em modelo de camundongos toxemiados, o que, segundo os autores, explicaria algumas ações imunomodulatórias da adenosina liberada em grandes quantidades nos sítios de inflamação. Adicionalmente, foi descrito que macrófagos de camundongos que não possuem receptores A<sub>2B</sub> mostraram uma significativa redução nos níveis de IL-10 de 1 a 24 horas após exposição ao LPS (YANG *et al.*, 2006). NÉMETH e colaboradores (2001) concluíram que a ativação de receptores da adenosina aumentou a produção de IL-10 em macrófagos estimulados pelo LPS, sem, no entanto, afetar a atividade de promotores nem os níveis de RNA-mensageiro, indicando um mecanismo pós-transcricional. Assim, segundo este estudo, a adenosina é capaz de aumentar a tradução do RNAm da IL-10, constituindo um mecanismo rápido de aumentar os níveis desta citocina e suas ações antiinflamatórias. Podemos então, a partir do que foi exposto, sugerir que a inibição da adenosina desaminase pode ter prevenido a enterite induzida pela TxA do *C. difficile* através da elevação dos níveis de IL-10.

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel e radical livre que participa da sinalização de inúmeros processos fisiológicos, como relaxamento do músculo liso e vasodilatação, neurotransmissão e agregação plaquetária (RADOMSKI & MONCADA, 1993; KIM *et al.*, 2001). Apesar de ser um crítico sinalizador envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, o NO também tem habilidade de atuar como uma molécula citotóxica, envolvida na patogenia de uma lista crescente de doenças humanas (JEREMY *et al.*, 2002; SZABO, 2003; WALIA *et al.*, 2003). No trato gastrointestinal, o NO possui importante papel no controle da motilidade, fluxo sanguíneo e secreção de muco e bicarbonato (UEKI *et al.*, 1988; WHITTLE *et al.*, 1981; KUBES *et al.*, 1991; WALLACE & MILLER, 2000). De uma maneira geral, estes efeitos benéficos no trato gastrointestinal têm sido associados à presença deste gás em baixas concentrações, enquanto altas concentrações estão associadas a processos inflamatórios e podem induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio que são tóxicos



para diversas linhagens celulares (WALLACE & MILLER, 2000; MUSCARÁ & WALLACE, 1999).

O NO é formado pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) sobre a L-Arginina, um aminoácido endógeno, na presença de oxigênio molecular. Atualmente, existem três isoformas conhecidas de NOS: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (MONCADA *et al.*, 1991; PFEILSCHIFTER *et al.*, 2001). Sob condições fisiológicas, as células produzem apenas uma pequena quantidade de NO a partir da atividade das enzimas constitutivas, a eNOS e a nNOS (FLEMING & BUSSE, 1999; RANG *et al.*, 2004). Portanto, é a iNOS a responsável pela produção de NO em altos níveis e a enzima envolvida na maioria dos efeitos tóxicos atribuídos ao óxido nítrico (XIE *et al.*, 1992).

A iNOS está normalmente ausente em células sob condições basais. Sua expressão pode ser induzida em diferentes tipos de células e tecidos seguindo a exposição a estímulos imunológicos e inflamatórios como o LPS bacteriano, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , individualmente ou em combinação (SANDERS *et al.*, 1999; WAHL *et al.*, 2003). A região 5' terminal do gene da iNOS de humanos e roedores divide 66% de homologia e contém seqüências conservadas responsivas a NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (CHARTRAIN *et al.*, 1994). De fato, agentes reconhecidos por interferir com a atividade de NF- $\kappa$ B parecem modular a produção de iNOS e várias classes de agentes têm mostrado prevenir a expressão de iNOS pela inibição do sistema de transdução do NF- $\kappa$ B, como os glicocorticóides, por exemplo (GRISCAVAGE *et al.*, 1996; DI ROSA *et al.*, 1990).

Neste trabalho, realizamos a imunomarcagem da iNOS em tecido proveniente de íleo tratado com TxA do *C. difficile*. Nossos resultados mostraram uma marcante elevação do número de células marcadas para iNOS em animais tratados com TxA em relação aos controles, mais evidente em células inflamatórias. Não existem na literatura trabalhos com a medida da expressão ou da atividade de iNOS após exposição a TxA. Entretanto, nossos achados contrastaram parcialmente com a literatura, pois os estudos disponíveis não mostraram, até o momento, um papel do NO ou da iNOS na fisiopatologia da enterite induzida pela TxA do *C. difficile*. MELO FILHO e colaboradores (1997) demonstraram que a TxA e a TxB não aumentaram os níveis de NO em macrófagos *in vitro* e o uso de um inibidor de NOS não alterou o curso da lesão celular induzida pelas toxinas. CALDERÓN e

colaboradores (1998) demonstraram que a TxA não induziu um aumento dos níveis de NO em mastócitos de ratos *in vitro*.

Mais recentemente, tem sido demonstrado que a inibição de GTPases da família Rho induzem e aumentam a expressão de iNOS (MUNIYAPPA *et al.*, 2000; HAUSDING *et al.*, 2000). As toxinas A e B do *C. difficile* têm como mecanismo de ação celular a inativação das proteínas Rho (Rho, Rac e Cdc42) através da sua glicosilação (JUST *et al.*, 1995). Trabalhos *in vitro* utilizando TxB têm demonstrado que esta toxina promoveu um aumento da expressão de iNOS. MUNIYAPPA e colaboradores (2000) demonstraram que a TxB do *C. difficile*, através da inativação das GTPases da família Rho, aumentaram a expressão de iNOS de maneira dose dependente em células musculares lisas de vasos de ratos. O mesmo estudo mostrou que a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B teve um papel fundamental para o aumento da expressão de iNOS. HAUSDING e colaboradores (2000) demonstraram que a TxB aumentou a expressão de iNOS em células epiteliais alveolares humanas bem como em fibroblastos murinos expostos a citocinas. Esse aumento ocorreu através da inibição de proteínas da família Rho, que resultou no aumento da atividade promotora do gene e na estabilização do RNA mensageiro de iNOS.

Tem sido relatado um aumento dos níveis de iNOS e NO em várias patologias do trato gastrointestinal como: gastroenterites infecciosas agudas, retocolite ulcerativa, doença de Crohn, colite linfocítica e colite colagenosa (HERUFL *et al.*, 1999; MIDDLETON *et al.*, 1993; BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; LUNDBERG *et al.*, 1997). No entanto o papel deste aumento nos níveis de iNOS e NO tem gerado estudos com resultados divergentes.

Vários estudos têm sido feitos com camundongos nocautes para iNOS e tem sido demonstrado que, dependendo do micróbio, a contribuição da iNOS pode ser crítica, imperceptível ou deletéria para o hospedeiro (NATHAN, 1997). Fatores que parecem direcionar os efeitos da expressão de iNOS incluem o tipo de insulto, tipo de tecido, nível e duração da expressão, bem como o estado oxidativo do tecido (MOLLACE *et al.*, 2005). Entre seus efeitos protetores, o NO gerado pela iNOS tem sido descrito como microbicida, antiviral, antiparasitário e antitumoral (KLEINERT *et al.*, 2003). Entre seus efeitos deletérios estão a formação de peroxinitrito e radicais derivados do nitrogênio, importantes mediadores de citotoxicidade e citoestasia. (RADI *et al.*, 1991; MOLLACE *et al.*, 2005). Além disso, estudos mostraram que a gastroenterite induzida por bactérias invasivas, como *Escherichia*

*coli* e *Salmonella dublin*, promoveram a *upregulation* das enzimas iNOS e COX-2, o que contribuiu para o aumento da secreção e disfunção da barreira epitelial intestinal (RESTA-LENERT & BARRETT, 2002). Nossos resultados mostraram que existe uma forte indução da enzima iNOS em tecidos tratados com TxA, e é possível que o NO nas concentrações produzidas por esta enzima faça parte da patogenia da doença. QIU e colaboradores (1996) mostraram que o uso de um inibidor da NOS aumentou a secreção ileal induzida por TxA em ratos. Este estudo não utilizou um inibidor seletivo de iNOS, portanto o papel específico desta enzima na fisiopatologia da enterite induzida por TxA merece estudos adicionais.

A seguir, medimos as células imunomarcadas para iNOS em tecido ileal de animais que receberam EHNA antes da indução da enterite pela TxA. Nossos resultados mostraram uma redução significativa do número de células marcadas para esta proteína. Estes achados estão em acordo com o que existe na literatura. HASKÓ e colaboradores (1996) demonstraram que o uso de agonistas da adenosina preveniu o aumento dos níveis de NO induzido por LPS tanto *in vitro* como *in vivo*. XAUS e colaboradores (1999b) mostraram que a estimulação de receptores A<sub>2B</sub> inibiu a expressão da iNOS e citocinas próinflamatórias induzidas pelo IFN- $\gamma$  em macrófagos de coelhos. PINGLE e colaboradores (2007) concluíram que a ativação de receptores A<sub>1</sub> de adenosina protegeu contra a citotoxicidade do vírus HIV através da inibição de NF- $\kappa$ B, o que provocou a redução da expressão de iNOS, radicais derivados do NO e apoptose em neurônios. MARTIN e colaboradores (2006) mostraram que a estimulação de receptores A<sub>3</sub> de adenosina reduziu a iNOS induzida por LPS em macrófagos murinos e essa redução envolveu a inibição de Ca<sup>++</sup> intracelular e do fator NF- $\kappa$ B. Assim, é possível que a redução do conteúdo de iNOS observado em nosso trabalho tenha contribuído para o efeito protetor do EHNA na lesão induzida pela TxA em íleo de camundongos. No entanto, precisamos antes compreender como os altos níveis de iNOS interferem na lesão intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

A pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína pertencente a superfamília das pentraxinas, proteínas multifuncionais caracterizadas por uma estrutura multimétrica, usualmente pentamérica (PEPYS & BALTZ, 1983; BAUMANN & GAULDIE, 1994; GARLANDA *et al.*, 2005). Baseadas em sua estrutura, as pentraxinas podem ser divididas em dois grupos: as pentraxinas curtas, as quais fazem parte a proteína C reativa (CRP) e o componente amilóide P do soro (SAP), e as pentraxinas longas, na qual a PTX3 é o protótipo. A PTX3 possui similaridades estruturais com o grupo da pentraxinas curtas, mas se diferencia pela presença

de um domínio N-terminal longo distinto (BOTTAZZI *et al.*, 2006). Ao contrário das pentraxinas curtas, cujas seqüências e regulação têm divergido do camundongo para o homem, a PTX3 é altamente conservada na evolução, tornando os resultados obtidos em modelos experimentais com camundongos informativos para a função desta proteína no homem (BOTTAZZI *et al.*, 2006).

A PTX3 é uma proteína solúvel, multifuncional, produzida em resposta a estímulos próinflamatórios durante a resposta imunológica inata. Através da interação com numerosos ligantes, a PTX3 apresenta funções como reconhecimento e opsonização de micróbios, ativação da via clássica do complemento, modulação da resposta inflamatória e remodelação tecidual (BOTTAZZI *et al.*, 2006). O gene para PTX3 tem sua expressão regulada positivamente em resposta a sinais inflamatórios primários, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ativação dos receptores do tipo TOLL (TLR), e moléculas microbianas como LPS (GARLANDA *et al.*, 2005; BOTTAZZI *et al.*, 2006; JEANNIN *et al.*, 2005). Em termos de sinalização celular, foi demonstrado, em estudos de mapeamento da região promotora no gene da PTX3, que o fator NF- $\kappa$ B é um elemento chave na transcrição deste gene em resposta ao TNF- $\alpha$  (BASILE *et al.*, 1997). Estudos têm descrito que o pico de produção do RNAm para PTX3 ocorre em média 4 a 6 horas após a exposição celular ao estímulo pró-inflamatório (INTRONA *et al.*, 1996; ALLES *et al.*, 1994; BREVIARIO *et al.*, 1992). As células produtoras de PTX3 incluem células dendríticas, fagócitos mononucleares, fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso, adipócitos, células sinoviais, condrócitos e células epiteliais alveolares e renais (DONI *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 1993; BREVIARIO *et al.*, 1992; ALLES *et al.*, 1994; KLOUCHE *et al.*, 2004; ABDERRAHIM *et al.*, 2003; LUCHETTI *et al.*, 2000; NAUTA *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2004).

Em humanos, os níveis sanguíneos de PTX3 são muito baixos em condições normais, porém aumentam rapidamente durante condições inflamatórias e infecciosas. Assim, vários estudos têm demonstrado que os níveis de PTX3 podem ser úteis como marcadores precoces de gravidade e prognóstico em várias patologias (MANTOVANI *et al.*, 2008). MULLER e colaboradores (2001), em estudo prospectivo com pacientes sépticos criticamente enfermos, demonstraram que o aumento dos níveis de PTX3 foi um indicador direto da gravidade do envolvimento tecidual nos processos inflamatórios e infecciosos e estava associado a um pior prognóstico. Altos níveis de PTX3 foram também associados à gravidade

de doenças infecciosas como dengue e tuberculose pulmonar (MAIRUHU *et al.*, 2005; AZZURRI *et al.*, 2005). Considerando doenças intestinais, KATO e colaboradores (2007) demonstraram que a PTX3 é produzida em altos níveis pelo intestino de pacientes com doença inflamatória intestinal, e que seus níveis poderiam ser usados como marcadores da atividade da doença. Adicionalmente, tem sido relatado que esta proteína pode ser usada como um marcador de prognóstico em pacientes com várias outras patologias como vasculites, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica (FAZZINI *et al.*, 2001; LATINI *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.* 2008; MALAPONTE *et al.*, 2007).

Como moduladora da resposta imune, as ações da PTX3 têm sido associadas a uma atividade protetora, tornando-se essencial na resposta contra determinados patógenos, e a uma ação danosa induzida pela resposta inflamatória exagerada em outras circunstâncias. DIAS e colaboradores (2001) demonstraram que animais transgênicos que produzem quantidades aumentadas de PTX3, por conterem várias cópias extras do gene, apresentaram maior resistência ao choque tóxico induzido por LPS, bem como à infecção experimentalmente induzida pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco. Nestes animais transgênicos foram detectados níveis séricos aumentados de citocinas proinflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os macrófagos provenientes destes animais apresentaram uma capacidade fagocítica aumentada em comparação com os macrófagos do tipo selvagem, além de serem capazes de produzir quantidades mais elevadas de óxido nítrico (NO) quando estimulados (DIAS *et al.*, 2001; DINIZ *et al.*, 2004). No entanto, outro estudo mostrou que animais transgênicos que expressam níveis aumentados de PTX3 apresentaram uma resposta inflamatória exacerbada e foram mais vulneráveis à morte em decorrência de injúria por isquemia e reperfusão intestinal. Nesta situação, altos níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram associados a uma letalidade aumentada. Além de TNF- $\alpha$ , outros mediadores inflamatórios foram também encontrados mais elevados nos animais transgênicos em comparação com os camundongos do tipo selvagem, inclusive no intestino (IL-1 $\beta$ , MCP-1, KC) (SOUZA *et al.*, 2002).

O papel que a PTX3 desempenha na defesa contra patógenos tem sido demonstrado pela observação de que animais nocautes para PTX3 são mais susceptíveis a infecção por determinados microorganismos como *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, enquanto são resistentes a infecção por *Listeria*

*monocytogens* e *Staphilococcus aureus* (GARLANDA *et al.*, 2002). Assim, animais com deficiência de PTX3 são mais susceptíveis à aspergilose pulmonar e os macrófagos derivados destes animais mostraram reconhecimento defectivo da conídia do fungo e, conseqüentemente, uma capacidade fagocítica prejudicada (GARLANDA *et al.*, 2002). Além disso, em um modelo experimental de infecção por *Klebsiella pneumoniae*, um dos principais agentes etiológicos de pneumonia nosocomial, foi verificado que a PTX3 é uma importante moduladora da produção de TNF- $\alpha$ , KC e óxido nítrico no pulmão, influenciando a migração de neutrófilos para este tecido (SOARES *et al.*, 2006). Os resultados dos estudos com animais nocautes para PTX3 deixaram claro o papel relevante *in vivo* desta proteína na resposta inata a certos tipos de patógenos, além de evidenciarem sua ação moduladora da resposta inflamatória, agindo localmente nos sítios de infecção e inflamação.

Considerando nosso objetivo de contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da enterite provocada pela TxA do *C. difficile*, nos pareceu relevante verificar a participação da PTX3 neste contexto, uma vez que, até o momento, não há na literatura referências sobre o papel da PTX3 na doença induzida pelo *C. difficile* ou na lesão induzida pela TxA. Assim, verificamos que 3 horas após a injeção de TxA na alça ileal de camundongos ocorreu uma significativa elevação na transcrição gênica para PTX3 em relação ao grupo controle. A partir de nossos achados, podemos concluir que a PTX3 tem participação na reação inflamatória aguda induzida pela TxA do *C. difficile* em camundongos C57BL/6. Diante do exposto anteriormente, poderíamos sugerir que o aumento de PTX3 observado pode ter estimulado a síntese de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e potencializado a resposta inflamatória. No entanto, são necessários mais estudos para analisar se a elevação da PTX3 contribui para uma resposta inflamatória exacerbada e para a piora da lesão, e para verificar se os níveis desta proteína de fase aguda se correlacionam com a severidade da lesão induzida pela TxA do *C. difficile*.

A seguir, medimos a expressão transcripcional para PTX3 em animais que receberam EHNA antes da indução da enterite pela TxA. Nossos resultados mostraram uma redução substancial da transcrição para esta proteína, que praticamente voltou ao nível dos animais controles. Não existem na literatura descrições sobre alguma associação entre adenosina e PTX3. Assim, nossos achados poderiam ser justificados por uma ação da adenosina, através da ativação de seus receptores, sobre a transcrição do gene da PTX3. No

entanto, há grandes chances de que nossos achados sejam um reflexo da redução da inflamação observada nos animais tratados com EHNA.

Assim, concluímos que na enterite induzida pela TxA em camundongos o EHNA demonstrou um potente efeito antiinflamatório, reduzindo consideravelmente a lesão tecidual, a migração neutrofílica, a expressão e os níveis de citocinas próinflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e produzindo um aumento nos níveis de IL-10. Além disso, a administração de TxA induziu um aumento na expressão da proteína PTX3 e no número de células imunomarcadas para iNOS no tecido ileal, ambos reduzidos pelo uso de EHNA.

**CONCLUSÕES**



## 6. CONCLUSÕES

---

- A toxina A do *Clostridium difficile* induz um intenso processo inflamatório em alça ileal de camundongos caracterizado por secreção, edema, hemorragia, infiltração neutrofílica e destruição tecidual.
- A enterite aguda induzida pela TxA cursa com uma elevação da síntese das citocinas próinflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mas não altera os níveis tecidais de IL-10. Esta toxina também estimula a produção em altos níveis de iNOS e da proteína de fase aguda PTX3 na alça ileal.
- O inibidor da enzima adenosina desaminase, EHNA, utilizado neste trabalho, reduziu a secreção, o edema, a destruição da mucosa intestinal, a infiltração neutrofílica, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e PTX3 induzidos pela TxA nas alças ileais de camundongos. Além disso, o tratamento com EHNA promoveu a elevação dos níveis da citocina antiinflamatória IL-10. Nossos achados sugerem que esse inibidor da adenosina desaminase tem uma potente ação antiinflamatória neste modelo de enterite induzida pela toxina A do *C. difficile*.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABDERRAHIM-FERKOUNE A, BEZY O, CHIELLINI C, MAFFEI M, GRIMALDI P, BONINO F, MOUSTAID-MOUSSA N, PASQUALINI F, MANTOVANI A, AILHAUD G, AMRI EZ. Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. **J Lipid Res.** 2003 May; 44(5):994-1000.

ACHTERBERG PW, HARMSSEN E, DE JONG JW. Adenosine deaminase inhibition and myocardial purine release during normoxia and ischemia. **Cardiovasc Res.** 1985;19:593-598.

ADAMS A, HARKNESS RA. Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. **Clin Exp Immunol.** 1976; 26:647-649.

ADAMS SD, MERCER DW. Fulminant *Clostridium difficile* colitis. **Curr Op in Critical Care.** 2007; 13: 450-455.

AGARWAL RP, CRABTHREE GW, PARKS RE JR. Purine nucleoside metabolism in the erythrocytes of patients with adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency. **J Clin Invest.** 1976; 57:1025-1035.

AKKARI R, BURBIEL JC, HOCKEMEYER J, MÜLLER CE. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. **Curr Top Med Chem.** 2006; 6:1375–1399.

ALLES VV, BOTTAZZI B, PERI G, GOLAY J, INTRONA M, MANTOVANI A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. **Blood.** 1994 Nov 15; 84(10):3483-93.

ANTONIOLI L, FORNAI M, COLUCCI R, GHISU N, DA SETTIMO F, NATALE G, KASTSIUCHENKA O, DURANTI E, VIRDIS A, VASSALLE C, LA MOTTA C, MUGNAINI L, BRESCHI MC, BLANDIZZI C, DEL TACA M. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther.** 2007 Aug;322(2):435-42.

ANTUNES EN, FERREIRA EO, VALLIM DC, PAULA GR, SELDIN L, SABRA A, FERREIRA MC, DOMINGUES RM. Pattern III non-toxicogenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) strain in Brazil. **Anaerobe.** 2002; 8:17-22.

ARAN JM, COLOMER D, MATUTES E, VIVES-CORRONS JL, FRANCO R. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. **J Histochem Cytochem.** 1991;39:1001-1008.

ARCH JR, NEWSHOLME EA. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. **Biochem J.** 1978 Sep 15;174(3):965-77.

ARMSTRONG J.M., et al. Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice. **Biochem J.** 2001;354:123-130.

ASHA NJ, TOMPKINS D, WILCOX MH. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** 2006 Aug; 44(8):2785-91.

AUTSCHBACH F, BRAUNSTEIN J, HELMKE B, ZUNA I, SCHÜRMAN G, NIEMIR ZI, WALLICH R, OTTO HF, MEUER SC. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. **Am J Pathol.** 1998 Jul; 153(1):121-30.

AZZURRI A, SOW OY, AMEDEI A, BAH B, DIALLO S, PERI G, BENAGIANO M, D'ELIOS MM, MANTOVANI A, DEL PRETE G. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes Infect.** 2005 Jan;7(1):1-8.

BAILEY A., LEDENT C., KELLY M., HOURANI S.M., KITCHEN I. Changes in spinal delta and kappa opioid systems in mice deficient in the A2A receptor gene. **J. Neurosci.** 2002; 22:9210-9220.

BARANKIEWICZ J, DANKS AM, ABUSHANAB E, MAKINGS L, WIEMANN T, WALLIS RA, PRAGNACHARYULU PV, FOX A, MARANGOS PJ. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. **J Pharmacol Exp Ther.** 1997 Dec; 283(3):1230-8.

BARANKIEWICZ J, JIMENEZ R, RONLOV G, MAGILL M, GRUBER HE. Alteration of purine metabolism by AICA-riboside in human B lymphoblasts. **Arch Biochem Biophys.** 1990; 282:377-385.

BARBUT F, DECRE D, LALANDE V, BURGHOFFER B, NOUSSAIR L, GIGANDON A, ESPINASSE F, RASKINE L, ROBERT J, MANGEOL A, BRANGER C, PETIT JC. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. **J Med Microbiol.** 2005 Feb;54(Pt 2):181-5.

BARNES P J. Nuclear factor- $\kappa$ B. **Int. J. Biochem.** 1997; 29:867.

BARRETO AR, CAVALCANTE IC, CASTRO MV, JUNQUEIRA AF, VALE MR, RIBEIRO RA, SOUZA MH, BRITO GA. Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig Dis Sci.** 2008 Apr; 53(4):990-6.

BARTLETT JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. **N Engl J Med.** 2002; 346:334-339.

BARTLETT JG, CHANG TW, GURWITH M. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. **N Engl J Med.** 1978;298:531-7.

BARTON R, MARTINUIK F, HIRSCHHORN R, GOLDSCHNEIDER I. The distribution of adenosine deaminase among lymphocyte populations in the rat. **J Immunol.** 1979;122:216-220.

BASILE A, SICA A, D'ANIELLO E, BREVIARIO F, GARRIDO G, CASTELLANO M, MANTOVANI A, INTRONA M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF- $\kappa$ B in tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  regulation. **J Biol Chem.** 1997 Mar 28;272(13):8172-8.

BELARDINELLI L, LINDEN J, BERNE RM. The cardiac effects of adenosine. **Prog Cardiovasc Dis.** 1989 Jul-Aug;32(1):73-97.

BERNE RM, KNABB RM, ELY SW, RUBIO R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. **Fed Proc.** 1983 Dec;42(15):3136-42.

BESSODES M, BASTIAN G, ABUSHANAB E, PANZICA RP, BERMAN SF, MARCACCIO EJ, CHEN SF, STOECKLER JD, PARKS RE. Effect of chirality in erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) on adenosine deaminase inhibition. **Biochem Pharmacol.** 1982; 31:879-882.

BEUBLER E, SCHIRGI-DEGEN A, PABST MA, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. Effects of purified *Clostridium difficile* toxin A in the small intestine of the rat in vivo. **Nat Toxins.** 1993;1(6):369-75.

BIGNARDI GE. RISK FACTORS FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION. **J Hosp Infect.** 1998 Sep;40(1):1-15.

BLACKBURN MR. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends Pharmacol Sci.** 2003 Feb;24(2):66-70.

BLANCO J, NGUYEN C, CALLEBAUT C, JACOTOT E, KRUST B, NAZALEYRAT JP, WAKSELMAN M, HOVANESSIAN AG. Dipeptidyl-peptidase IV- $\beta$  - Further characterization and comparison to Dipeptidyl-peptidase IV activity of CD26. **Eur J Biochem.** 1998; 256:369-378.

BLOSSOM DB, MCDONALD LC. The challenges Posed by Reemerging Clostridium difficile infection. **Emerg Infect Dis.** 2007;15:222-227.

BOISON D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. **Trends Pharmacol Sci.** 2006; 27: 652-658.

BONGAERTS GP, LYERLY DM. Role of toxins A and B in the pathogenesis of Clostridium difficile disease. **Microb Pathog.** 1994; Jul;17(1):1-12.

BORRIELLO SP. 12th C.L. Oakley lecture. Pathogenesis of Clostridium difficile infection of the gut. **J Med Microbiol.** 1990;33:207-15.

BORRIELLO SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **J Antimicrob Chemother.** 1998 May;41 Suppl C:13-9.

BOUGHTON-SMITH NK, EVANS SM, HAWKEY CJ, COLE AT, BALSITIS M, WHITTLE BJ, MONCADA S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet.** 1993 Aug 7;342(8867):338-40.

BOUMA MG, STAD RK, VAN DEN WILDENBERG FA, BUURMAN WA. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. **J Immunol.** 1994 Nov 1; 153(9):4159-68.

BOURS MJ, SWENNEN EL, DI VIRGILIO F, CRONSTEIN BN, DAGNELIE PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther** 2006; 112: 358-404.

BOTTAZZI B, GARLANDA C, SALVATORI G, JEANNIN P, MANFREDI A, MANTOVANI A. Pentraxins as a key component of innate immunity. **Curr Opin Immunol**. 2006 Feb;18(1):10-5.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular mieloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. 1982;60:618-22.

BRADY TG, O'DONOVAN CI. A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. **Comp Biochem Physiol**. 1965; 14:101-119.

BRAUN V, HUNDSBERGER T, LEUKEL P, SAUERBORN M, VON EICHEL-STREIBER C (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. **Gene**. 181:29–38

BREVIARIO F, D'ANIELLO EM, GOLAY J, PERI G, BOTTAZZI B, BAIROCH A, SACCONI S, MARZELLA R, PREDAZZI V, ROCCHI M. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**. 1992 Nov 5;267(31):22190-7.

BRITO GA, FUJII J, CARNEIRO-FILHO BA, OBRIG T, LIMA AAM, GUERRANT RL. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **J Infect Dis**, 2002b. 186:1438-47.

BRITO GAC, SULLIVAN GW, CIESLA WPJR, CARPER HT, MANDELL GL, GUERRANT RL. *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function. **J Inf Diseases**. 2002a; 185:1297-306.

BROWN R, OLLERSTAM A, JOHANSSON B, SKÖTT O, GEBRE-MEDHIN S, FREDHOLM B, PERSSON AE. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2001 Nov;281(5):R1362-7.

BURKEY TH, WEBSTER RO. Adenosine inhibits fMLP-stimulated adherence and superoxide anion generation by human neutrophils at an early step in signal transduction. **Biochim Biophys Acta**. 1993 Feb 17;1175(3):312-8.

CALDERÓN GM, TORRES-LÓPEZ J, LIN TJ, CHAVEZ B, HERNÁNDEZ M, MUÑOZ O, BEFUS AD, ENCISO JÁ. Effects of Toxin A from *Clostridium difficile* on Mast Cell Activation and Survival. **Infect Immun**. 1998 June; 66(6): 2755–2761.

CARNEIRO-FILHO BA, SOUZA ML, LIMA AA, RIBEIRO RA. The effect of tumour necrosis factor (TNF) inhibitors in *Clostridium difficile* toxin-induced paw oedema and neutrophil migration. **Pharmacol Toxicol**. 2001 Jun;88(6):313-8.

CASTAGLIUOLO I, KEATES AC, QIU B, KELLY CP, NIKULASSON S, LEEMAN SE, POTHOUKAKIS C. Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997a Apr 29;94(9):4788-93.

CASTAGLIUOLO I, KEATES AC, WANG CC, PASHA A, VALENICK L, KELLY CP, NIKULASSON ST, LAMONT JT, POTHOUKAKIS C. *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. **J Immunol**. 1998 Jun 15;160(12):6039-45.

CASTAGLIUOLO I, KELLY CP, QIU BS, NIKULASSON ST, LAMONT JT, POTHOUKAKIS C. IL-11 inhibits *Clostridium difficile* toxin A enterotoxicity in rat ileum. **Am J Physiol**. 1997b Aug;273(2 Pt 1):G333-41.

CAVALCANTE IC. Estudo do efeito de um novo agonista do receptor agonista do receptor A2A de adenosina, ATL 313, sobre a enterite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em alça ileal isolada de camundongos. Fortaleza, 2005. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, Universidade Federal do Ceará, 2005.

CAVALCANTE IC, CASTRO MV, BARRETO AR, SULLIVAN GW, VALE M, ALMEIDA PR, LINDEN J, RIEGER JM, CUNHA FQ, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, BRITO GA. Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* toxin A-induced murine ileal enteritis. **Infect Immun**. 2006 May; 74(5):2606-12.

CHANG Z, NYGAARD P, CHONAULT AC, KELLEMS RE. Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionary conserved amino acid residues: implication for catalytic function. **Biochemistry**. 1991;30:2273-2280.

CHARTRAIN NA, GELLER DA, KOTY PP, SITRIN NF, NUSSLER AK, HOFFMAN EP, BILLIAR TR, HUTCHINSON NI, MUDGETT JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem**. 1994 Mar 4;269(9):6765-72.



CHECHIK BE, SCHREDER WP, MINOWADA J. An immunomorphological study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. **J Immunol.** 1981;126:1003-1007.

CHEN JF, MORATALLA R, YU L, MARTÍN AB, XU K, BASTIA E, HACKETT E, ALBERTI I, SCHWARZSCHILD MA. Inactivation of adenosine A2A receptors selectively attenuates amphetamine-induced behavioral sensitization. **Neuropsychopharmacology.** 2003; 28:1086-1095.

CHEN ML, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. **J Biol Chem.** 2002 Feb 8;277(6):4247-54.

CIRUELA F, SAURA C, CANELA EI, MALLOL J, LLUIS C, FRANCO R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. **FEBS Lett.** 1996; 380 (3): 219-223.

CLABOTS CR, JOHNSON S, OLSON MM. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidenced for colonized new admissions as a source of infection. **J Infect Dis.** 1992; 166:561-567.

COHEN A, HIRSCHHORN R, HOROWIZ SD, RUBINSTEIN A, POLMAR SK, HONG R, MARTIN DWJR. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1978;75:472-476.

CONWAY EJ, COOKE R. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. **Biochem J.** 1939;33:479-492.

COTENA A, MAINA V, SIRONI M, BOTTAZZI B, JEANNIN P, VECCHI A, CORVAIA N, DAHA MR, MANTOVANI A, GARLANDA C. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. **J Immunol.** 2007 Nov 1;179(9):6311-7.

CRONSTEIN BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **J Appl Physiol.** 1994 Jan; 76(1):5-13.

CRONSTEIN BN, ROSENSTEIN ED, KRAMER SB, 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.** 1985 Aug; 135(2):1366-71.

DASSESE D., LEDENT C., PARMENTIER M., SCHIFFMANN S.N. Acute and chronic caffeine administration differentially alters striatal gene expression in wild-type and adenosine A(2A) receptor-deficient mice. **Synapse**. 2001;42:63–76.

DAVAL JL, NICOLAS F, DORIAT JF. Adenosine physiology and pharmacology: how about A2 receptors? **Pharmacol Ther**. 1996;71(3):325-35.

DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A, ERAT A, CHEN JF, ENJYOJI K, LINDEN J, OUKKA M, KUCHROO VK, STROM TB, ROBSON SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J Exp Med**. 2007 Jun 11;204(6):1257-65.

DECKING UK, SCHLIEPER G, KROLL K, SCHRADER J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. **Circ Res**. 1997 Aug; 81(2):154-64.

DELMEE M. Epidemiology of Clostridium difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium, 2006. **Euro Surveil**. 11: 2006. E060914.2

DEUSSEN A, MÖSER G, SCHRADER J. Contribution of coronary endothelial cells to cardiac adenosine production. **Pflugers Arch**. 1986 Jun;406(6):608-14.

DI ROSA M, RADOMSKI M, CARNUCCIO R, MONCADA S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**. 1990 Nov 15;172(3):1246-52.

DIAL S, DELANEY JA, BARKUN AN, SUISSA S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease. **JAMA**. 2005 Dec 21; 294(23):2989-95.

DIAS AA, GOODMAN AR, DOS SANTOS JL, GOMES RN, ALTMAYER A, BOZZA PT, HORTA MF, VILCEK J, REIS LF. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol**. 2001 Jun;69(6):928-36.

DINIZ SN, NOMIZO R, CISALPINO PS. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol.** 2004;75:649-656.

DONI A, PERI G, CHIEPPA M, ALLAVENA P, PASQUALINI F, VAGO L, ROMANI L, GARLANDA C, MANTOVANI A. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. **Eur J Immunol.** 2003 Oct;33(10):2886-93.

DOS SANTOS CC, HAN B, ANDRADE CF, BAI X, UHLIG S, HUBMAYR R, TSANG M, LODYGA M, KESHAVJEE S, SLUTSKY AS, LIU M. DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNFalpha, LPS, and cyclic stretch. **Physiol Genomics.** 2004 Nov 17;19(3):331-42.

DRURY AN, SZENT-GYÖRGYI A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol.** 1929; 68(3):213-237.

ECKLE T, KRAHN T, GRENZ A, KÖHLER D, MITTELBRONN M, LEDENT C, JACOBSON MA, OSSWALD H, THOMPSON LF, UNERTL K, ELTZSCHIG HK. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. **Circulation.** 2007 Mar 27;115(12):1581-90.

EIGLER A, MATSCHKE V, HARTMANN G, ERHARDT S, BOYLE D, FIRESTEIN GS, AND ENDRES S.

Suppression of TNF-alpha production in human mononuclear cells by an adenosine kinase inhibitor. **J Leukoc Biol.** 2000; 68:97-103.

ELTZSCHIG HK, IBLA JC, FURUTA GT, LEONARD MO, JACOBSON KA, ENJYOJI K, ROBSON SC, COLGAN SP. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **J Exp Med.** 2003 Sep 1;198(5):783-96. Epub 2003 Aug 25.

ELTZSCHIG HK, THOMPSON LF, KARHAUSEN J, COTTA RJ, IBLA JC, ROBSON SC, COLGAN SP. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. **Blood.** 2004 Dec 15;104(13):3986-92.

FANG G, LIMA AAM, THIELMAN N, FONTELES M, YOTSEFF P, LYERLY D, GUERRANT RL. Role of phospholipase A2 in histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile* toxin A. **Biomedical Journal.** 1994; 1:71-76

FASTBOM J, POST C, FREDHOLM BB. Antinociceptive effects and spinal distribution of two adenosine receptor agonists after intrathecal administration. **Pharmacol Toxicol.** 1990 Jan;66(1):69-72.

FAZZINI F, PERI G, DONI A, DELL'ANTONIO G, DAL CIN E, BOZZOLO E, D'AURIA F, PRADERIO L, CIBODDO G, SABBADINI MG, MANFREDI AA, MANTOVANI A, QUERINI PR. PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. **Arthritis Rheum.** 2001 Dec;44(12):2841-50.

FEDELE DE, LI T, LAN JQ, Fredholm BB, Boison D. Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. **Exp Neurol.** 2006 Jul;200(1):184-90.

FIGINI M, EMANUELI C, GRADY EF, KIRKWOOD K, PAYAN DG, ANSEL J, GERARD C, GEPPETTI P, BUNNETT N. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. **Am J Physiol.** 1997 Apr;272(4 Pt 1):G785-93.

FIorentini C, MALORNI W, PARADISI S, GIULIANO M, MASTRANTONIO P, DONELLI G. Interaction of Clostridium difficile toxin A with cultured cells: cytoskeletal changes and nuclear polarization. **Infect Immun.** 1990 Jul;58(7):2329-36.

FIRESTEIN GS, BULLOUGH DA, ERION MD, JIMENEZ R, RAMIREZ-WEINHOUSE M, BARANKIEWICZ J, SMITH CW, GRUBER HE, MULLANE KM. Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. **J Immunol.** 1995 Jan 1;154(1):326-34.

FLEGEL WA, MÜLLER F, DÄUBENER W, FISCHER HG, HADDING U, NORTHOFF H. Cytokine response by human monocytes to Clostridium difficile toxin A and toxin B. **Infect Immun.** 1991 Oct;59(10):3659-66.

FLEMING I, BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res.** 1999 Aug 15;43(3):532-41

FONTELES M, FANG G, THIELMAN NM, YOTSEFF PS, GUERRANT RL. Role of platelet activating factor in the inflammatory and secretory effects of Clostridium difficile toxin A. **J Lipid Mediat Cell Signal.** 1995 Mar;11(2):133-43.

FRANCO R, CASADÓ V, CIRUELA F, SAURA C, MALLOL J, CANELA EI, LLUIS C. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progr Neurobiol.** 1997; 52:283-294.

FRANCO R, VALENZUELA A, LLUIS C, BLANCO J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol Rev.** 1998;161:27-42.

FREDHOLM BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ.** 2007;14:1315-1323.

FREDHOLM BB. Purines and neutrophil leukocytes. **Gen Pharmacol.** 1997; 28:345-350.

FREDHOLM BB, CHEN JF, MASINO SA, VAUGEOIS JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2005; 45:385-412.

FREDHOLM BB, IJZERMAN AP, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev.** 2001 Dec;53(4):527-52.

GANTNER F, LEIST M, LOHSE AW, GERMANN PG, TIEGS G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. **Hepatology.** 1995 Jan;21(1):190-8.

GARLANDA C, BOTTAZZI B, SALVATORI G, DE SANTIS R, COTENA A, DEBAN L, MAINA V, MOALLI F, DONI A, VELIZ-RODRIGUEZ T, MANTOVANI A. Pentraxins in innate immunity and inflammation. **Novartis Found Symp.** 2006;279:80-6; discussion 86-91, 216-9.

GARLANDA C, BOTTAZZI B, BASTONE A, MANTOVANI A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol.** 2005;23:337-66.

GARLANDA C, HIRSCH E, BOZZA S, SALUSTRI A, DE ACETIS M, NOTA R, MACCAGNO A, RIVA F, BOTTAZZI B, PERI G, DONI A, VAGO L, BOTTO M, DE SANTIS R, CARMINATI P, SIRACUSA G, ALTRUDA F, VECCHI A, ROMANI L, MANTOVANI A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature.** 2002 Nov 14;420(6912):182-6.

GAYNES R, RIMLAND D, KILLUM E, LOWERY HK, JOHNSON TM 2ND, KILLGORE G, TENOVER FC. Outbreak of Clostridium difficile infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. **Clin Infect Dis.** 2004 Mar 1;38(5):640-5.

GEIGER JD, LABELLA FS, NAGY JI. Ontogenesis of adenosine receptors in the central nervous system of the rat. **Brain Res.** 1984 Mar;315(1):97-104.

GENTH H, DREGER SC, HUELSENBECK J, JUST I. Clostridium difficile toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. **Int J Biochem Cell Biol.** 2008;40(4):592-7.

GERIC B, RUPNIK M, GERDING DN, GRABNAR M, JOHNSON S. Distribution of Clostridium difficile variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. **J Med Microbiol.** 2004 Sep;53(Pt 9):887-94.

GIBLETT ER, ANDERSON JE, COHEN F, POLLARA B, MEUWISSEN HJ. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. **Lancet.** 1972;2:1067-1069.

GIUSTI G. ADENOSINE DEAMINASE. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.) Methods of Enzymatic Analysis vol. 2. **Academic Press Inc.**, New York pp. 1092-1099. 1974.

GLOVER DK, RIOU LM, RUIZ M, SULLIVAN GW, LINDEN J, RIEGER JM, MACDONALD TL, WATSON DD, BELLER GA. Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2005 Apr;288(4):H1851-8.

GLOVER DK, RUIZ M, TAKEHANA K, PETRUZELLA FD, RIEGER JM, MACDONALD TL, WATSON DD, LINDEN J, BELLER GA. Cardioprotection by adenosine A2A agonists in a canine model of myocardial stunning produced by multiple episodes of transient ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2007 Jun;292(6):H3164-71.

GOLEMBIOWSKA K, WHITE TD, SAWYNOK J. Modulation of adenosine release from rat spinal cord by adenosine deaminase and adenosine kinase inhibitors. **Brain Res.** 1995; 699:315-320.

GONÇALVES C et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol.** 2004 42: 1933–1939.

GREEN RD. Adenosine transport by a variant of C1300 murine neuroblastoma cells deficient in adenosine kinase. **Biochim Biophys Acta.** 1980 May 23;598(2):366-74.

GRISCAVAGE JM, WILK S, IGNARRO LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996 Apr 16;93(8):3308-12.

HALL A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. **Science**. 1990 Aug 10;249(4969):635-40.

HALL A. Rho GTPases and actin cytoskeleton. **Science**. 1998;279:509-14.

HALL IC, O'TOOLE E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **Am J Dis Child** 1935;49:390-402.

HASKÓ G, CRONSTEIN BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**. 2004 Jan;25(1):33-9.

HASKÓ G, NÉMETH ZH, VIZI ES, SALZMAN AL, SZABÓ C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. **Eur J Pharmacol**. 1998 Oct 9;358(3):261-8.

HASKÓ G, SZABO C, NEMETH ZH, KVETAN V, PASTORES SM, VIZI ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **J Immunol**. 1996 Nov 15; 157(10):4634-40.

HAUSDING M, WITTECK A, RODRIGUEZ-PASCUAL F, VON EICHEL-STREIBER C, FÖRSTERMANN U, KLEINERT H. Inhibition of small G proteins of the rho family by statins or clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. **Br J Pharmacol**. 2000 Oct;131(3):553-61.

HE D, SOUGIOULTZIS S, HAGEN S, LIU J, KEATES S, KEATES AC, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. Clostridium difficile toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. **Gastroenterology**. 2002 Apr;122(4):1048-57.

HEBB MO, WHITE TD. Co-administration of adenosine kinase and deaminase inhibitors produces supraadditive potentiation of N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine formation in cortex. **Eur J Pharmacol**. 1998;344:121-125.

HERSHFIELD MS. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine. **Eur J Immunol**. 2005; 35: 25-30.

HERULF M, SVENUNGSSON B, LAGERGREN A, LJUNG T, MORCOS E, WIKLUND NP, LUNDBERG JO, WEITZBERG E. Increased nitric oxide in infective gastroenteritis. **J Infect Dis.** 1999 Aug;180(2):542-5.

HIRSHHORN R. Adenosine deaminase deficiency: molecular basis and recent developments. **Clin Immunol Immunopathol.** 1995;76:S219-S227.

HOOKMAN P, BARKIN JS. Review: Clostridium difficile-associated disorders/diarrhea and Clostridium difficile colitis: the emergence of a more virulent era. **Dig Dis Sci.** 2007 Apr;52(4):1071-5.

HUA X, KOVAROVA M, CHASON KD, NGUYEN M, KOLLER BH, TILLEY SL. Enhanced mast cell activation in mice deficient in the A2b adenosine receptor. **J Exp Med.** 2007 Jan 22;204(1):117-28.

HUDSPETH DA, WILLIAMS MW, ZHAO ZQ, SATO H, NAKANISHI K, MCGEE DS, HAMMON JW JR, VINTEN-JOHANSEN J, VAN WYLEN DG. Pentostatin-augmented interstitial adenosine prevents postcardioplegia injury in damaged hearts. **Ann Thorac Surg.** 1994 Sep;58(3):719-27.

HUMPHREY CD, CONDON CW, CANTEY JR, PITTMAN FE. Partial purification of a toxin found in hamsters with antibiotic-associated colitis. Reversible binding of the toxin by cholestyramine. **Gastroenterology.** 1979 Mar;76(3):468-76.

HURLEY BW, NGUYEN CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. **Arch Intern Med.** 2002; 162:2177-2184.

INTRONA M, ALLES VV, CASTELLANO M, PICARDI G, DE GIOIA L, BOTTAZZAI B, PERI G, BREVIARIO F, SALMONA M, DE GREGORIO L, DRAGANI TA, SRINIVASAN N, BLUNDELL TL, HAMILTON TA, MANTOVANI A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. **Blood.** 1996 Mar 1;87(5):1862-72.

JACOBSON KA, GAO ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov.** 2006 Mar;5(3):247-64.

JEANNIN P, BOTTAZZI B, SIRONI M, DONI A, RUSNATI M, PRESTA M, MAINA V, MAGISTRELLI G, HAEUW JF, HOFFEL G, THIEBLEMONT N, CORVAIA N, GARLANDA C, DELNESTE Y, MANTOVANI A. Complexity and complementarity of



outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. **Immunity**. 2005 May;22(5):551-60.

JEFFERSON KK, SMITH MF JR, BOBAK DA. Roles of intracellular calcium and NF-kappa B in the Clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. **J Immunol**. 1999 Nov 15;163(10):5183-91.

JEREMY JY, YIM AP, WAN S, ANGELINI GD Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. **J Card Surg**. 2002 Jul-Aug;17(4):324-7.

JIJON HB, WALKER J, HOENTJEN F, DIAZ H, EWASCHUK J, JOBIN C, MADSEN KL. Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells. **Cell Immunol**. 2005 Oct;237(2):86-95

JOHAL SS, HAMMOND J, SOLOMON K, JAMES PD, MAHIDA YR. Clostridium difficile associated diarrhoea in hospitalised patients: onset in the community and hospital and role of flexible sigmoidoscopy. **Gut**. 2004 May;53(5):673-7.

JOHANSSON B, HALLDNER L, DUNWIDDIE TV, MASINO SA, POELCHEN W, GIMÉNEZ-LLORT L, ESCORIHUELA RM, FERNÁNDEZ-TERUEL A, WIESENFELD-HALLIN Z, XU XJ, HÅRDEMARK A, BETSHOLTZ C, HERLENIUS E, FREDHOLM BB. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Jul 31;98(16):9407-12.

JOHNSON MD, ANDERSON BD. Localization of purine metabolizing enzymes in bovine brain microvessel endothelial cells: an enzymatic blood-brain barrier for dideoxynucleosides? **Pharm Res**. 1996;13: 1881-1886.

JOHNSTON JB, BEGLEITER A, PUGH L, LEITH MK, WILKINS JA, CAVERS DJ, ISRAELS LG. Biochemical changes induced in hairy-cell leukemia following treatment with the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin. **Cancer Res**. 1986;46:2179-2184.

JUST I, WILM M, SELZER J, REX G, VON EICHEL-STREIBER C, MANN M, AKTORIES K. The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. **J Biol Chem**. 1995 Jun 9;270(23):13932-6.

KAMEOTA J, TANAKA T, NOJIMA Y, SCHLOSSMAN SF, MORIMOTO C. Direct association of adenosine deaminase with a T-cell activation antigen. **Science**. 1993;261:466-469.

KATO H et al. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. **Euro Surveill.** 2007 12: E070111.3

KATO S, OCHIAI M, SAKURADA T, OHNO S, MIYAMOTO K, SAGARA M, ITO M, TAKEUCHI K, IMAKI J, ITOH K, YAKABI K. Increased Expression of Long Pentraxin PTX3 in Inflammatory Bowel Diseases. **Dig Dis Sci.** 2007 Nov 8.

KELLY CP, BECKER S, LINEVSKY JK, JOSHI MA, O'KEANE JC, DICKEY BF, LAMONT JT, POTHOUKAKIS C. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. **J Clin Invest.** 1994 Mar;93(3):1257-65.

KELLY CP, LAMONT JT. *Clostridium difficile* infection. **Annu Rev Med.** 1998; 49:375–390.

KELLY CP, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. *Clostridium difficile* colitis. **N Engl J Med.** 1994 Jan 27;330(4):257-62.

KELLY MA, Vestling MM, Murphy CM, Hua S, Sumpter T, Fenselau C. Primary structure of bovine adenosine deaminase. **J Pharm Biomed Anal.** 1996;14:1513-1519.

KIM JM, LEE JY, YOON YM, OH YK, YOUN J, KIM YJ. NF-kappa B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with *Clostridium difficile* toxin A. **Scand J Immunol.** 2006 Jun;63(6):453-60.

KIM KH, FEKETY R, BATTS DH, BROWN D, CUDMORE M, SILVA J JR, WATERS D. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. **J Infect Dis.** 1981 Jan;143(1):42-50.

KIM H, RHEE SH, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT. Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. **Gastroenterology.** 2007;133:875-886

KIM, P.K.; ZAMORA, R.; PETROSKO, P.; BILLIAR, T.R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1421-1441, 2001.

KIRKWOOD KS, BUNNETT NW, MAA J, CASTAGLIOLO I, LIU B, GERARD N, ZACKS J, POTHOUKAKIS C, GRADY EF. Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* toxin A. **Am J Physiol Gastroint Liver Physiol.** 2001;281:G544-G551.

KLEINERT H, SCHWARZ PM, FÖRSTERMANN U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol Chem.** 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64.

KLOUCHE M, PERI G, KNABBE C, ECKSTEIN HH, SCHMID FX, SCHMITZ G, MANTOVANI A. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis.** 2004 Aug;175(2):221-8.

KRECKLER LM, WAN T.C., GE Z.D., AUCHAMPACH J.A. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2006;317:172-180.

KUROSE I, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, ANDERSON DC, PAULSON JC, MIYASAKA M, WOLF R, GRANGER DN. Clostridium difficile toxin A-induced microvascular dysfunction. Role of histamine. **J Clin Invest.** 1994; 94:1919-26.

KÜHN, R., J. LÖHLER, D. RENNICK, K. RAJEWSKY, AND W. MÜLLER. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell.** 1993; 75:263-274.

KUIJPER EJ et al. Update of Clostridium difficile-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. **Euro Surveill.** 2007; 12: E1-2.

KURTZ LC, WEITKAMP E, FRIEDEN C. Adenosine deaminase: viscosity studies and mechanism of binding of substrate and of ground- and transition-state inhibitors. **Biochemistry.** 1987;26:3027-3032.

KYNE L, HAMEL MB, POLAVARAM R, KELLY CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to Clostridium difficile. **Clin Infect Dis.** 2002 Feb 1;34(3):346-53.

KYNE L, WARNY M, QAMAR A, KELLY CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea. **Lancet.** 2001 Jan 20; 357(9251):189-93.

LAPPAS CM, DAY YJ, MARSHALL MA, ENGELHARD VH, LINDEN J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. **J Exp Med.** 2006; 203: 2639-2648.

LAPPAS CM, RIEGER JM, LINDEN J. A<sub>2A</sub> adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4<sup>+</sup> T cells. **J Immunol.** 2005 Jan 15;174(2):1073-80.

LAPPAS CM, SULLIVAN GW, LINDEN J. Adenosine A<sub>2A</sub> agonists in development for the treatment of inflammation. **Expert Opin Investig Drugs.** 2005; 14: 797–806.

LATINI R, MAGGIONI AP, PERI G, GONZINI L, LUCCI D, MOCARELLI P, VAGO L, PASQUALINI F, SIGNORINI S, SOLDATESCHI D, TARLI L, SCHWEIGER C, FRESCO C, CECERE R, TOGNONI G, MANTOVANI A; Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation.** 2004 Oct 19;110(16):2349-54.

LEDENT C, VAUGEOIS JM, SCHIFFMANN SN, PEDRAZZINI T, EL YACOUBI M, VANDERHAEGHEN JJ, COSTENTIN J, HEATH JK, VASSART G, PARMENTIER M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2a</sub> receptor. **Nature.** 1997 Aug 14;388(6643):674-8.

LEE GW, LEE TH, VILCEK J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. **J Immunol.** 1993 Mar 1;150(5):1804-12.

LENNON PF, TAYLOR CT, STAHL GL, COLGAN SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A<sub>2B</sub> receptor activation. **J Exp Med.** 1998 Oct 19; 188(8):1433-43.

LIMA AA, LYERLY DM, WILKINS TD, INNES DJ, GUERRANT RL. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infect Immun.** 1988; 56:582-8.

LIMA AA, INNES DJ JR, CHADEE K, LYERLY DM, WILKINS TD, GUERRANT RL. Clostridium difficile toxin A. Interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab Invest.** 1989 Oct;61(4):419-25.

LIMA AA, NASCIMENTO NR, FANG GD, YOTSEFF P, TOYAMA MH, GUERRANT RL, FONTELES MC. Role of phospholipase A<sub>2</sub> and tyrosine kinase in Clostridium difficile toxin A-induced disruption of epithelial integrity, histologic inflammatory damage and intestinal secretion. **J Appl Toxicol.** 2008 Apr 1.

LINDEN J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. **J Clin Invest.** 2006 July 3; 116(7): 1835–1837.

LINK AA, KINO T, WORTH JA, MCGUIRE JL, CRANE ML, CHROUSOS GP, WILDER RL, ELENKOV IJ. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. **J Immunol.** 2000 Jan 1;164(1):436-42.

LLOYD HG, FREDHOLM BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. **Neurochem Int.** 1995 Apr;26(4):387-95.

LOO VG, POIRIER L, MILLER MA, OUGHTON M, LIBMAN MD, MICHAUD S, BOURGAULT AM, NGUYEN T, FRENETTE C, KELLY M, VIBIEN A, BRASSARD P, FENN S, DEWAR K, HUDSON TJ, HORN R, RENE P, MONCZAK Y, DASCAL A. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. **N Engl J Med.** 2005 Dec 8;353(23):2442-9.

LUKASHEV D, OHTA A, APASOV S, CHEN JF, SITKOVSKY M. Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. **J Immunol.** 2004 Jul 1;173(1):21-4.

LUCHETTI MM, PICCININI G, MANTOVANI A, PERI G, MATTEUCCI C, POMPONIO G, FRATINI M, FRATICELLI P, SAMBO P, DI LORETO C, DONI A, INTRONA M, GABRIELLI A. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol.** 2000 Jan;119(1):196-202.

LUNDBERG JO, HERULF M, OLESEN M, BOHR J, TYSK C, WIKLUND NP, MORCOS E, HELLSTRÖM PM, WEITZBERG E, JÄRNEROT G. Increased nitric oxide production in collagenous and lymphocytic colitis. **Eur J Clin Invest.** 1997 Oct;27(10):869-71.

LYERLY DM, KRIVAN HC, WILKINS TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clin Microbiol Rev.** 1988; 1:1-18.

MABLEY J, SORIANO F, PACHER P, HASKÓ G, MARTON A, WALLACE R, SALZMAN A, SZABÓ C. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. **Eur J Pharmacol.** 2003 Apr 18;466(3):323-9.

MACCANNELL DR, LOUIE TJ, GREGSON DB, LAVERDIERE M, LABBE AC, LAING F, HENWICK S. Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. **J Clin Microbiol.** 2006 Jun;44(6):2147-52.

MAHIDA YR, GALVIN A, MAKH S, et al. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human colonic lamina propria cells: early loss of macrophages followed by T-cell apoptosis. **Infect Immun**. 1998; 66:5462-9.

MAIRUHU AT, PERI G, SETIATI TE, HACK CE, KORAKA P, SOEMANTRI A, OSTERHAUS AD, BRANDJES DP, VAN DER MEER JW, MANTOVANI A, VAN GORP EC. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. **J Med Virol**. 2005 Aug;76(4):547-52.

MALAPONTE G, LIBRA M, BEVELACQUA Y, MERITO P, FATUZZO P, RAPISARDA F, CRISTINA M, NASELLI G, STIVALA F, MAZZARINO MC, CASTELLINO P. Inflammatory status in patients with chronic renal failure: the role of PTX3 and pro-inflammatory cytokines. **Int J Mol Med**. 2007 Oct 20(4):471-81.

MANTOVANI A, GARLANDA C, DONI A, BOTTAZZI B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol**. 2008 Jan;28(1):1-13.

MANTYH CR, MAGGIO JE, MANTYH PW, VIGNA SR, PAPPAS TN. Increased substance P receptor expression by blood vessels and lymphoid aggregates in *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis. **Dig Dis Sci**. 1996a Mar;41(3):614-20.

MANTYH CR, PAPPAS TN, LAPP JA, WASHINGTON MK, NEVILLE LM, GHILARDI JR, ROGERS SD, MANTYH PW, VIGNA SR. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. **Gastroenterology**. 1996b Nov; 111(5):1272-80.

MARTIN L, PINGLE SC, HALLAM DM, RYBAK LP, RAMKUMAR V. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. **J Pharmacol Exp Ther**. 2006 Jan;316(1):71-8.

MARTÍN M, HUGUET J, CENTELLES JJ, FRANCO R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex: possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. **J Immunol**. 1995;155:4630-4643.

MCDONALD LC, KILLGORE GE, THOMPSON A, OWENS RC JR, KAZAKOVA SV, SAMBOL SP, JOHNSON S, GERDING DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **N Engl J Med**. 2005 Dec 8;353(23):2433-41.

MCDONALD LC, OWINGS M, JERNIGAN DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. **Emerg Infect Dis**. 2006 Mar;12(3):409-15.

MCFARLAND LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**. 2008 Jan;5(1):40-8.

MCFARLAND LV, MULLIGAN ME, KWOK RY, STAMM WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **N Engl J Med** 1989; 320:204–210.

MCMASTER-BAXTER NL AND MUSER DM. *Clostridium difficile*: recent epidemiologic findings and advances in therapy. **Pharmacotherapy**. 2007; 27: 1029–1039

MELO FILHO AA, SOUZA MH, LYERLY DM, CUNHA FQ, LIMA AA, RIBEIRO RA. Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon**. 1997 May;35(5):743-52.

MENEZES, AT. Estudo da modulação farmacológica do efeito enterotóxico induzido pela toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho. Fortaleza, 2002. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, Universidade Federal do Ceará, 2002.

MIDDLETON SJ, SHORTHOUSE M, HUNTER JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**. 1993 Feb 20;341(8843):465-6.

MILLS GC, SCHMALSTIEG FC, TRIMMER KB, GOLDMAN AS, GOLDBLUM RM. Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1976;73:2867-2871.

MMWR\* Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk-four states, 2005. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. 2005; 54:1201-5

MOLLACE V, MUSCOLI C, MASINI E, CUZZOCREA S, SALVEMINI D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Rev**. 2005 Jun;57(2):217-52.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**., v. 43, p. 109-142, 1991.

MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** 2001;19:683-765.

MULLER B, PERI G, DONI A, TORRI V, LANDMANN R, BOTTAZZI B, MANTOVANI A. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. **Crit Care Med.** 2001 Jul;29(7):1404-7.

MUNIYAPPA R, XU R, RAM JL, SOWERS JR. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2000 Jun;278(6):H1762-8.

MURAOKA T, KATSURAMAKI T, SHIRAISHI H, YOKOYAMA MM. Automated enzymatic measurements of adenosine deaminase isozymes activities in serum. **Anal Biochem.** 1990;187:278-282.

MUSCARÁ MN, WALLACE JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am J Physiol.** 1999 Jun;276(6 Pt 1):G1313-6.

MUSHER DM, ASLAM S, LOGAN N, NALLACHERU S, BHAILA I, BORCHERT F, HAMILL RJ. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. **Clin Infect Dis.** 2005 Jun 1;40(11):1586-90.

MUSHER DM et al. Epidemic *Clostridium difficile*. **N Engl J Med.** 2006; 354: 1199–1203.

MUTO CA, POKRYWKA M, SHUTT K, MENDELSON AB, NOURI K, POSEY K, ROBERTS T, CROYLE K, KRISTOFIAK S, PATEL-BROWN S, PASCULLE AW, PATERSON DL, SAUL M, HARRISON LH. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2005 Mar;26(3):273-80.

NAASSILA M., LEDENT C., DAOUST M. Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. **J. Neurosci.** 2002;22:10487–10493.

NARRAVULA S, LENNON PF, MUELLER BU, COLGAN SP. Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. **J Immunol.** 2000 Nov 1;165(9):5262-8.

NATHAN C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest.** 1997 Nov 15;100(10):2417-23.



NAUTA AJ, DE HAIJ S, BOTTAZZI B, MANTOVANI A, BORRIAS MC, ATEN J, RASTALDI MP, DAHA MR, VAN KOOTEN C, ROOS A. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. **Kidney Int.** 2005 Feb;67(2):543-53.

NÉMETH ZH, BLEICH D, CSÓKA B, PACHER P, MABLEY JG, HIMER L, VIZI ES, DEITCH EA, SZABÓ C, CRONSTEIN BN, HASKÓ G. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. **FASEB J.** 2007 Aug;21(10):2379-88.

NÉMETH ZH., LUTZ CS, CSÓKA B, DEITCH EA, LEIBOVICH SJ, GAUSE WC, TONE M, PACHER P, VIZI ES, HASKÓ G. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. **J. Immunol.** 2005; 175:8260–8270.

NIEDZWICKI JG, KOUTTAB NM, MAYER KH, CARPENTER CC, PARKS RE JR, ABUSHANAB E, ABERNETHY DR. Plasma adenosine deaminase2: a marker for human immunodeficiency virus infection. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 1991;4:178-182.

NIEMELÄ J, HENTTINEN T, YEGUTKIN GG, AIRAS L, KUJARI AM, RAJALA P, JALKANEN S. IFN- $\alpha$  induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. **J Immunol.** 2004 Feb 1;172(3):1646-53.

NOTTROTT S, SCHOENTAUBE J, GENTH H, JUST I, GERHARD R. Clostridium difficile toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. **Apoptosis.** 2007 Aug;12(8):1443-53.

NUSRAT A, GIRY M, TURNER JR, COLGAN SP, PARKOS CA, CARNES D, LEMICHEZ E, BOQUET P, MADARA JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995 Nov 7;92(23):10629-33.

ODASHIMA M, BAMIAS G, RIVERA-NIEVES J, LINDEN J, NAST CC, MOSKALUK CA, MARINI M, SUGAWARA K, KOZAIWA K, OTAKA M, WATANABE S, AND COMINELLI F . Activation of A2a adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.**2005; 129:26-33.

ODASHIMA M, OTAKA M, JIN M, HORIKAWA Y, MATSUHASHI T, OHBA R. A selective A2aR agonist, ATL-146e, prevents concanavalin A-induced acute liver injury in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006; 347:949-954.

OHTA A, SITKOVSKY M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**. 2001 Dec 20-27;414(6866):916-20.

OKUSA MD. A2A adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2002; 282:F10-F18.

OLAH ME, STILES GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 1995;35:581-606.

OWENS RC. Clostridium difficile-associated disease: changing epidemiology and implications for management. **Drugs**. 2007;67(4):487-502.

PALMER TM, TREVETHICK MA. Suppression of inflammatory and immune responses by the A2a adenosine receptor: an introduction. **British J Pharmacology**. 2008; 153:S27-S34.

PARKMAN R, GELFAND EW, ROSEN FS, SANDERSON A, HIRSCHHORN R. Severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase deficiency. **N Engl J Med**. 1975 Apr 3;292(14):714-9.

PARKIN J, COHEN B. An overview of the immune system. **Lancet**. 2001 Jun 2;357(9270):1777-89.

PARSONS M, YOUNG L, LEE JE, JACOBSON KA, LIANG BT. Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D. **FASEB J**. 2000 Jul;14(10):1423-31.

PEPIN J, ALARY ME, VALIQUETTE L, RAICHE E, RUEL J, FULOP K, GODIN D, BOURASSA C. Increasing risk of relapse after treatment of Clostridium difficile colitis in Quebec, Canada. **Clin Infect Dis**. 2005 Jun 1;40(11):1591-7.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. 2001 May 1;29(9):e45

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUWILER, A. Nitric oxide and mechanisms of redox signalling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. **Eur J Pharmacol**. 2001; v. 429: p. 279-286.

PHILLIS JW, O'REGAN MH, WALTER GA. Effects of deoxycoformycin on adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid release from the hypoxemic rat cerebral cortex. **J Cereb Blood Flow Metab.** 1988 Oct;8(5):733-41.

PINGLE SC, JAJOO S, MUKHERJEA D, SNIDERHAN LF, JHAVERI KA, MARCUZZI A, RYBAK LP, MAGGIRWAR SB, RAMKUMAR V. Activation of the adenosine A1 receptor inhibits HIV-1 tat-induced apoptosis by reducing nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric-oxide synthase. **Mol Pharmacol.** 2007 Oct;72(4):856-67.

PINTO LJ, ALCIDES AP, FERREIRA EO, AVELAR KE, SABRA A, DOMINGUES RM, FERREIRA MC. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. **J Med Microbiol.** 2003 Dec;52(Pt 12):1095-9.

PIRAS MA, GAKIS C, BUDRONI M, ANDREONI G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. **Br Med J.** 1978; 2:1751-1752.

POON A, SAYNOK J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitors. **Eur J Pharmacol.** 1999;384:123-138.

POPOFF MR, RUBIN EJ, GILL DM, BOQUET P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. **Infect Immun.** 1988 Sep;56(9):2299-306.

POTHOULAKIS C. Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. **Ann N Y Acad Sci.** 2000;915:347-56.

POTHOULAKIS C, CASTAGLIUOLO I, LAMONT JT, JAFFER A, O'KEANE JC, SNIDER RM, LEEMAN SE. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** February 1994; 91: 947-951.

POUTANEN SM, SIMOR AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **CMAJ.** 2004 Jul 6;171(1):51-8.

POXTON IR, MCCOUBREY J, BLAIR G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Clin Microbiol Infect.** 2001 Aug;7(8):421-7.

PRICE EM, WRIGHT VM, WALKER-SMITH JA, TABAQCHALI S. *Clostridium difficile* and acute enterocolitis. **Arch Dis Child.** 1988; 63: 543-545.

QIU B, POTHOUKAKIS C, CASTAGLIUOLO I, NIKULASSON S, LAMONT JT. Participation of reactive oxygen metabolites in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats. **Am J Physiol.** 1999 Feb;276(2 Pt 1):G485-90.

QIU B, POTHOUKAKIS C, CASTAGLIUOLO I, NIKULASSON Z, LAMONT JT. Nitric oxide inhibits rat intestinal secretion by Clostridium difficile toxin A but not Vibrio cholerae enterotoxin. **Gastroenterology.** 1996 Aug;111(2):409-18.

RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys.** 1991 Aug 1;288(2):481-7.

RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. **Thromb Haemost.** 1993; v. 70, p. 36-41.

RATECH H, HIRSCHHORN R. Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient-severe combined immunodeficiency. **Clin Chim Acta.** 1981;115:341-347.

RATECH H, THORBECKE GJ, MEREDITH G, HIRSCHHORN R. Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in aves and humans. **Enzyme.** 1981;26:74-84.

REHG JE. Cecal toxin(s) from guinea pigs with clindamycin-associated colitis, neutralized by Clostridium sordellii antitoxin. **Infect Immun.** 1980 Feb;27(2):387-90.

RESTA-LENERT S, BARRETT KE. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. **Gastroenterology.** 2002 Apr;122(4):1070-87.

RIGBY R J, KNIGHT S C, KAMM M A, STAGG A J. Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. **Clin Exp Immunol.** 2005 February; 139(2): 245–256.

RIVKEES SA, ZHAO Z, PORTER G, TURNER C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. **Mol Genet Metab.** 2001 Sep-Oct;74(1-2):160-71.

ROCHA MF, MAIA ME, BEZERRA LR, LYERLY DM, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, LIMA AA. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. **Infect Immun.** 1997; 65:2740-6.

RODRIGUEZ-PALACIOS A, STAEMPFLI HR, DUFFIELD T, WEESE JS. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. **Emerg Infect Dis.** 2007 Mar;13(3):485-7.

RUBIO R, WIEDMEIER VT, BERNE RM. Relationship between coronary flow and adenosine production and release. **J Mol Cell Cardiol.** 1974 Dec;6(6):561-6.

RUPNIK M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? **Clin Microbiol Infect.** 2007 May;13(5):457-9.

RUPNIK M et al. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. **J Med Microbiol.** 2005. 54: 113–117.

RÜSING D, MÜLLER CE, VERSPOHL EJ. The impact of adenosine and A(2B) receptors on glucose homeostasis. **J Pharm Pharmacol.** 2006 Dec;58(12):1639-45.

SAFIEH-GARABEDIAN B, POOLE S, ALLCHORNE A, WINTER J, WOOLF CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** 1995 Aug;115(7):1265-75.

SALVATORE CA, TILLEY SL, LATOUR AM, FLETCHER DS, KOLLER BH, JACOBSON MA. Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. **J Biol Chem.** 2000 Feb 11;275(6):4429-34.

SAMORE MH, VENKATARAMAN L, DEGIROLAMI PC, ARBEIT RD, KARCHMER AW. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **Am J Med.** 1996 Jan;100(1):32-40.

SANDERS DB, LARSON DF, JABLONOWSKI C, OLSEN L. Differential expression of inducible nitric oxide synthase in septic shock. **J Extra Corpor Technol.** 1999 Sep;31(3):118-24.

SANDHU GS, BURRIER AC, JANERO DR. Adenosine deaminase inhibitors attenuate injury and preserve energy balance in isolated guinea pig heart. **Am J Physiol.** 1993; 262:H1249-H1256.

SANDS WA, MARTIN AF, STRONG EW, PALMER TM. Specific inhibition of nuclear factor-kappaB-dependent inflammatory responses by cell type-specific mechanisms upon A2A adenosine receptor gene transfer. **Mol Pharmacol**. 2004 Nov;66(5):1147-59.

SARI RA, TAYSI S, YILMAZ O, BAKAN N. Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 2003; 21:87-90

SCHAEFFER HJ, SCHWENDER CF. Enzyme inhibitors. 26. Bridging hydrophobic and hydrophilic regions on adenosine deaminase with some 9-(2-hydroxy-3-alkyl)adenines. **J Med Chem** 1974;17:6-8.

SCIOTTI VM, VANWYLEN DGL. Increases in interstitial adenosine and cerebral blood flow with inhibition of adenosine kinase and adenosine deaminase. **J Cerebral Blood Flow Metab**. 1993;13:201-207.

SEDDON SV, HEMINGWAY I, BORRIELLO SP. Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. **J Med Microbiol**. 1990 Mar;31(3):169-74.

SIEGMUND B, RIEDER F, ALBRICH S, WOLF K, BIDLINGMAIER C, FIRESTEIN GS, BOYLE D, LEHR HA, LOHER F, HARTMANN G, ENDRES S, AND EIGLER A. Adenosine kinase inhibitor GP 515 improves experimental colitis in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. 2000;296:99-105.

SILVA CHPM & SALVIANO CR. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções por *Clostridium difficile*. **RBAC**. 2003; 35(2):65-71

SIPKA S, KOVÁCS I, SZÁNTÓ S, SZEGEDI G, BRUGÓS L, BRUCKNER G, JÓZSEF SZENTMIKLÓSI A. Adenosine inhibits the release of interleukin-1beta in activated human peripheral mononuclear cells. **Cytokine**. 2005;31:258-263.

SITKOVSKY MV. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochem Pharmacol**. 2003 Feb 15;65(4):493-501.

SHI D, WINSTON JH, BLACKBURN MR, DATTA SK, HANTEN G, KELLEMS RE. Diverse genetic regulatory motifs required for murine adenosine deaminase gene expression in the placenta. **J Biol Chem**. 1997;272:2334-2341.

SMYTH JF, PRENTIGE HG, PROCTOR S, HOFFBRAND AV. Deoxycoformycin in the treatment of leukemias and lymphomas. **Ann NY Acad Sci.** 1985;451:123-128.

SOARES AC, SOUZA DG, PINHO V, VIEIRA AT, NICOLI JR, CUNHA FQ, MANTOVANI A, REIS LF, DIAS AA, TEIXEIRA MM. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes Infect.** 2006. Apr;8(5):1321-9. 2006.

SOUZA DG, SOARES AC, PINHO V, TORLONI H, REIS LF, TEIXEIRA MM, DIAS AA. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol.** 2002 May;160(5):1755-65.

SOUZA MH, MELO-FILHO AA, ROCHA MF, LYERLY DM, CUNHA FQ, LIMA AA, RIBEIRO RA. The involvement of macrophage-derived tumour necrosis factor and lipoxigenase products on the neutrophil recruitment induced by Clostridium difficile toxin B. **Immunology.** 1997 Jun;91(2):281-8.

SPIERS ASD. The activity of deoxycoformycin (pentostatin) in refractory leukemias and lymphomas. **Ann NY Acad Sci.** 1985;451:138-141.

SPIGAGLIA P, MASTRANTONIO P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among Clostridium difficile clinical isolates. **J Clin Microbiol.** 2002; 40:3470–3475.

STANCIKOVA M, LUKAC J, ISTOK R, CRISTALLI G, ROVENSKY J. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol.** 1998;16:583-586.

STARR J. Clostridium difficile associated diarrhoea: diagnosis and treatment. **BMJ.** 2005 Sep 3;331(7515):498-501.

STROHMEIER GR, REPERT SM, LENCER WI, MADARA JL. The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. **J Biol Chem.** 1995 Feb 3;270(5):2387-94.

SULLIVAN GW, FANG G, LINDEN J, SCHELD WM. A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis. **J Infect Dis.** 2004; 189: 1897–1904.

SUZUKI S, TAKEISHI Y, NIIZEKI T, KOYAMA Y, KITAHARA T, SASAKI T, SAGARA M, KUBOTA I. Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. **Am Heart J.** 2008 Jan;155(1):75-81.

SVENNINGSSON P, LINDSKOG M, LEDENT C, PARMENTIER M, GREENGARD P, FREDHOLM BB, FISONE G. Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000 Feb 15;97(4):1856-60.

SVENNINGSSON P, LE MOINE C, FISONE G, FREDHOLM BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. **Prog Neurobiol.** 1999 Nov;59(4):355-96.

SZABO AJ, WAGNER L, ERDELY A, LAU K, BAYLIS C. Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. **Kidney Int.** 2003 Nov;64(5):1765-71.

SZABÓ C, SCOTT GS, VIRÁG L, EGNACZYK G, SALZMAN AL, SHANLEY TP, HASKÓ G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. **Br J Pharmacol.** 1998 Sep;125(2):379-87.

TACHON M et al. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. **Euro Surveill.** 2006. 11: E060504.1

TASTEYRE A, KARJALAINEN T, AVESANI V, DELMEE M, COLLIGNON A, BOURLIOUX P, BARC MC. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. **J Clin Microbiol.** 2000 Sep;38(9):3179-86.

THIEL M, CALDWELL CC, SITKOVSKY MV. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **Microbes Infect.** 2003 May;5(6):515-26.

THOMPSON LF, ELTZSCHIG HK, IBLA JC, VAN DE WIELE CJ, RESTA R, MOROTE-GARCIA JC, COLGAN SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. **J Exp Med.** 2004 Dec 6;200(11):1395-405.

TIEGS G, HENTSCHEL J, WENDEL A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **J Clin Invest.** 1992 Jul;90(1):196-203.



TITOV L, LEBEDKOVA N, SHABANOV A, TANG YJ, COHEN SH, SILVA J JR. Isolation and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients and the hospital environment in Belarus. **J Clin Microbiol**. 2000 Mar;38(3):1200-2.

TOFOVIC SP, KUSAKA H, LI P, JACKSON EK. Effects of adenosine deaminase inhibition on blood pressure in old spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Hyperten**. 1998;20:329-344.

TRIADAFILOPOULOS G, POTHOUKAKIS C, O'BRIEN MJ, LAMONT JT. Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. **Gastroenterology**. 1987 Aug;93(2):273-9.

TRIADAFILOPOULOS G, POTHOUKAKIS C, WEISS R, GIAMPAOLO C, LAMONT JT. Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. **Gastroenterology**. 1989 Nov;97(5):1186-92.

TUNG R, SILBER R, QUAGLIARA F, CONKLYN M, GOTTESMAN J, HIRSCHHORN R. Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia: relationship to B- and T-cell subpopulation. **J Clin Invest**. 1976;57:756-761.

UEKI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. Gastric motility is an important factor in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. **Dig Dis Sci**. 1988; v. 33, p. 209-216.

UNGERER JP, OOSTHUIZEN HM, BISSBORT SH, VERMAAK WJ. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. **Clin Chem**. 1992;38:1322-1326.

UNGERER JP, OOSTHUIZEN HM, RETIEF JH, BISSBORT SH. Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. **Chest**. 1994;106:33-37.

VAN BELLE H. Nucleoside transport inhibition: a therapeutic approach to cardioprotection via adenosine? **Cardiovasc Res**. 1993 Jan;27(1):68-76.

VAN DEN BERGHE G, BONTEMPS F, HERS HG. Purine catabolism in a isolated rat hepatocytes. **Biochem J**. 1980;188:913-919

VAN DER WEYDEN MB, KELLEY WN. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J Biol Chem**. 1976;251:5446-5456.

VAN STEENBERGEN J et al. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. **Euro Surveill.** 2005; 10: E050714.1

VISSER SS, THERON AJ, RAMAFI G, KER JA, ANDERSON R. Apparent involvement of the A 2A) subtype adenosine receptor in the anti-inflammatory interactions of CGS 21680, cyclopentyladenosine, and IB-MECA with human neutrophils. **Biochem Pharmacol.** 2000 Oct 1;60(7):993-9.

VON EICHEL-STREIBER C, LAUFENBERG-FELDMANN R, SARTINGEN S, SCHULZE J, SAUERBORN M. Cloning of *Clostridium difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. **Med Microbiol Immunol.** 1990;179(5):271-9

VON EICHEL-STREIBER C, LAUFENBERG-FELDMANN R, SARTINGEN S, SCHULZE J, SAUERBORN M. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. **Mol Gen Genet.** 1992 May;233(1-2):260-8.

VONBONIN A, HUHN J, FLEISCHER B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells - Analysis of an alternative Tcell activation pathway. **Immunol Rev.** 1998;161:43-53.

VOTH DE, BALLARD JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. **Clin Microbiol Rev.** 2005 Apr;18(2):247-63

WAHL SM, MCCARTNEY-FRANCIS N, CHAN J, DIONNE R, TA L, ORENSTEIN JM. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? **Cells Tissues Organs.** 2003;174(1-2):26-33.

WALIA M, SAMSON SE, SCHMIDT T, BEST K, KWAN CY, GROVER AK. Effects of peroxynitrite on pig coronary artery smooth muscle. **Cell Calcium.** 2003 Jul;34(1):69-74.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology.**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WARNY M, PEPIN J, FANG A, KILLGORE G, THOMPSON A, BRAZIER J, FROST E, MCDONALD LC. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet.** 2005 Sep 24-30;366(9491):1079-84.

WHITTLE BJ. Nitric oxide-modulating agents for gastrointestinal disorders. **Expert Opin Investig Drugs**. 2005 Nov;14(11):1347-58.

WHITE TD. Potentiation of excitatory amino acid-evoked adenosine release from rat cortex by inhibitors of adenosine kinase and adenosine deaminase and by acadesine. **Eur J Pharmacol**. 1996;303:27-38.

WU WP, HAO JX, HALLDNER L, LÖVDAHL C, DELANDER GE, WIESENFELD-HALLIN Z, FREDHOLM BB, XU XJ. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**. 2005 Feb;113(3):395-404.

WU WP, HAO JX, HALLDNER-HENRIKSSON L, XU XJ, JACOBSON MA, WIESENFELD-HALLIN Z, FREDHOLM BB. Decreased inflammatory pain due to reduced carrageenan-induced inflammation in mice lacking adenosine A3 receptors. **Neuroscience**. 2002;114(3):523-7

XAUS J, MIRABET M, LLOBERAS J, SOLER C, LLUIS C, FRANCO R, CELADA A. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. **J Immunol**. 1999a;162:3607-3614.

XAUS J, VALLEDOR AF, CARDÓ M, MARQUÈS L, BELETA J, PALACIOS JM, CELADA A. Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression. **J Immunol**. 1999b Oct 15;163(8):4140-9.

XIE QW, CHO HJ, CALAYCAY J, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD, DING A, TROSO T, NATHAN C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**. 1992 Apr 10;256(5054):225-8.

YANG D, ZHANG Y, NGUYEN HG, KOUPENOVA M, CHAUHAN AK, MAKITALO M, JONES MR, ST HILAIRE C, SELDIN DC, TOSELLI P, LAMPERTI E, SCHREIBER BM, GAVRAS H, WAGNER DD, RAVID K. The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. **J Clin Invest**. 2006 Jul;116(7):1913-23.

YEH CY, LIN CN, CHANG CF, LIN CH, LIEN HT, CHEN JY, CHIA JS. C-terminal repeats of Clostridium difficile toxin A induce production of chemokine and adhesion molecules in endothelial cells and promote migration of leukocytes. **Infect Immun**. 2008 Mar;76(3):1170-8.

YUKSEL H, AKOGLU TF. Serum and synovial fluid adenosine deaminase activity in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. **Ann Rheum Dis.** 1988;47:492-495.

ZHU Q, CHEN S, ZOU C. Protective effects of an adenosine deaminase inhibitor on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat heart. **Am J Physiol.** 1990; 259:H835-H838.

ZOREF-SHANI E, KESSLER-ICEKSOEN G, Sperling O. Pathways of adenine nucleotide catabolism in primary rat cardiomyocyte cultures. **J Mol Cell Cardiol.** 1988;20:23-33

ZERNECKE A, BIDZHEKOV K, OZÜYAMAN B, FRAEMOHS L, LIEHN EA, LÜSCHER-FIRZLAFF JM. CD73/ecto-50-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. **Circulation.** 2006; 113: 2120–2127.



**ANEXO**

## Fucoidin Prevents *Clostridium difficile* Toxin-A-Induced Ileal Enteritis in Mice

A. R. F. Barreto · I. C. Cavalcante · M. V. Castro · A. F. T. A. Junqueira ·  
M. R. Vale · R. A. Ribeiro · M. H. L. P. Souza · G. A. C. Brito

Received: 20 March 2007 / Accepted: 1 August 2007 / Published online: 1 September 2007  
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

**Abstract** Recent reports suggest increased incidence and severity of *Clostridium difficile*-associated diseases. These facts have raised the need for additional clarification of pathogenesis and for a search for new therapeutic strategies. This study evaluated the effects of the polysaccharide fucoidin, an L-selectin blocker, on toxin-A-induced mouse enteritis. Fucoidin (25 mg/kg) or saline (0.1 ml) were injected systemically (ocular plexus) 5 min prior to local challenge with toxin A (5 µg/ileal loop) or phosphate-buffered saline (PBS). Intestinal fluid volume/length and ileal loop weight/length ratios were calculated 3 h later. Ileal tissues were collected for histopathology and measurement of myeloperoxidase and adenosine deaminase activity. Fucoidin significantly ( $P < 0.05$ ) prevented the toxin-A-induced increase in weight/length and volume/length ratios and reduced mucosal disruption, as shown in histopathology. Fucoidin also significantly ( $P < 0.05$ ) reduced toxin-A-induced myeloperoxidase and adenosine deaminase activities. In conclusion, fucoidin reduces tissue injury and inflammation in toxin-A-induced mouse enteritis.

**Keywords** Fucoidin · *Clostridium difficile* toxin A · Inflammation · ADA activity

### Introduction

*Clostridium difficile*, a gram-positive, anaerobic, spore-forming bacillus, is the most common cause of nosocomial bacterial diarrhea and accounts for 10–20% of cases of antibiotic-associated diarrhea [1, 2]. *C. difficile* infection can result in asymptomatic carriage, mild diarrhea, or fulminant pseudomembranous colitis [3]. The main virulence factors of *C. difficile* are two large exotoxins, toxin A and toxin B. Both toxins disrupt the actin cytoskeleton of intestinal epithelial cells by the glycosylation of proteins from the Rho and Ras subfamilies [4–6]. A third toxin, designated binary toxin, or CDT, with actin-specific adenosine diphosphate (ADP)-ribosyltransferase activity, was described from *C. difficile* strain CD196 in 1988 [7].

The historically low rates of severe disease and death may have led to an underestimation of the importance of *C. difficile*-associated disease. However, a recently conducted analysis has suggested that both the rate and the severity of *C. difficile*-associated disease may be increasing in health care facilities [8, 9]. In addition, indications of increased severity of *C. difficile*-associated disease include several reports of cases resulting in colectomies and deaths [10–12]. Moreover, certain strains of *C. difficile* have a propensity to cause outbreaks in health care facilities. These outbreak-associated strains are also resistant to common antibiotics, such as clindamycin and fluoroquinolones, whose usage may have provided them with a selective advantage over strains that are not associated with outbreaks [13–15]. The higher severity of *C. difficile*-associated disease, including outbreak

---

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

---

A. R. F. Barreto · A. F. T. A. Junqueira · G. A. C. Brito (✉)  
Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Delmiro de Farias, sn, Fortaleza, CE CEP 60.416-030, Brazil  
e-mail: gerlybrito@hotmail.com

I. C. Cavalcante · M. V. Castro · M. R. Vale ·  
R. A. Ribeiro · M. H. L. P. Souza · G. A. C. Brito  
Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

infections, may be due to strains carrying CDT genes or a deletion in the *tcdC*, a pathogenicity locus gene, which may result in a loss of negative regulatory function, leading to increased production of toxins A and B [12, 16, 17]. As a consequence, the treatment has more progressively been associated with failure and recurrence, and some cases of *C. difficile*-associated colitis (CDAC) have become less responsive to treatment with metronidazole, resulting in augmented use of oral vancomycin. All these facts have raised the need for additional clarification of the pathogenesis of CDAC and for a search for new therapeutic strategies.

Sulfated fucans, frequently referred to simply as fucans, constitute a class of polysaccharides first isolated from marine brown algae in 1913. Recently, the search for new drugs has generated increased interest in sulfated fucans. The polysaccharide fucoidin, a homopolymer of sulfated L-fucose, is known to interfere with the function of L-selectin [18]. L-selectin is an adhesion molecule present on the surface of leukocytes interacting with oligosaccharides on the surface of endothelial cells and forming weak bind in that leukocytes in the blood stream attach to and detach from the endothelium continually, a process known as rolling [19]. Thus, while interfering with L-selectin function, fucoidin inhibits leukocyte rolling, which is an early and essential step in the process of leukocyte extravasation into inflamed sites [20].

The aim of this study was to determine the effect of the polysaccharide fucoidin on toxin-A (TxA)-induced enteritis in mice through evaluation of secretion, mucosal disruption, inflammatory parameters, and adenosine deaminase (ADA) activity.

## Methods

### Animals

Male Swiss mice (25–30 g) from our own animal facilities were housed in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. All experimental protocols were approved by the local Animal Care and Use Committee.

### Drugs and toxins

The following drugs were used: purified TxA from *C. difficile* (strain # 10463; molecular weight 308 kDa), kindly provided through our collaboration with Dr. David Lyerly, Tech Lab, Blacksburg, VA, USA; and fucoidin (Sigma, St. Louis, MO, USA), an L-selectin inhibitor; all these substances were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4.

### Induction of intestinal inflammation

Mice were fasted overnight but allowed access to water and then anesthetized with ketamine and xylazine (60 and 5 mg/kg intramuscularly, respectively). Through a midline laparotomy, one 4-cm ileal loop was ligated and injected with either 0.1 ml of PBS pH 7.4 (control) or buffer containing TxA (1–10 µg) [21, 22]. The abdomen was closed, and the animals were allowed to regain consciousness. Three hours after administration of TxA, mice were sacrificed, and the intestinal loops were removed. Loop length, weight, and fluid volume were recorded. A portion of the loop was frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  for measurement of myeloperoxidase (MPO) and ADA activities. The remaining tissue was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin, and sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological grading of ileal inflammation [21, 22]. Some mice received systemic injection (ocular plexus) of fucoidin (25 mg/kg) or saline (0.1 ml) 5 min prior to PBS or TxA (5 µg) local treatment.

### Histology

Inflammation severity was scored in coded slides by a pathologist on a scale of 1 (mild) to 3 (severe) for epithelial damage, edema, and neutrophil infiltration as previously described [21, 22].

### Myeloperoxidase assay

The extent of neutrophil accumulation in ileal tissue was estimated by measuring MPO activity as previously described [23]. Briefly, 50–100 mg of ileal tissue was homogenized in 1 ml of hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer for each 50 mg of tissue. Then, the homogenate was centrifuged at 4,000 g for 7 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . MPO activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in absorbance at 450 nm using o-dianisidine dihydrochloride and 1% hydrogen peroxide. The results were reported as MPO U/mg of tissue. A unit of MPO activity was defined as that converting 1 (mol of hydrogen peroxide to water in 1 min at  $22^{\circ}\text{C}$ ).

### Adenosine deaminase activity

Tissue samples were collected from PBS, TxA, and TxA + fucoidin-injected mice. The tissues were homogenized in eight volumes of cold phosphate buffer (50 mmol/l, pH 7.2). These preparations were centrifuged at 10,000 g in a refrigerated centrifuge at  $5-8^{\circ}\text{C}$ , for 30 min. The sediments were discarded and supernatants assayed for



ADA activity and protein content [24]. The ADA assay was based on the measurement of ammonia produced during the deamination of adenosine by the method of Giusti [25], with slight modifications. In brief, to obtain a final volume of 220  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$  of supernatant of tissue homogenate were added to 200  $\mu\text{l}$  of adenosine (21 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2). A control tube (200  $\mu\text{l}$  of adenosine 21 mM), a standard tube (200  $\mu\text{l}$  of ammonium sulphate 75  $\mu\text{M}$  in phosphate buffer), and a blank tube (200  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer) were also produced. One hour after incubation at 37°C, the reactions were stopped with 600  $\mu\text{l}$  of phenol/potassium nitroprusside (106 mM/101.7 mM), and 20  $\mu\text{l}$  of sample were added to control, standard, and blank tubes. Following the addition of 600  $\mu\text{l}$  of sodium hypochlorite (11 mM) in 125 mM NaOH, all tubes were again incubated at 37°C for 30 min and read at 628 nm. The enzyme activity in the tissue was expressed as micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) of ammonium formed per milligram (mg) of protein per hour

## Statistics

Results are reported as means  $\pm$  standard error of mean (SEM) or as median values and range, where appropriate. Univariate analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test was used to compare means, and the Kruskal–Wallis followed by Dunn's test was used to compare medians. A probability value of  $P < 0.05$  was considered to indicate significant differences.

## Results

### Effect of systemic fucoidin pretreatment on murine ileal loops injected with *Clostridium difficile* toxin A

The injection of TxA (5  $\mu\text{g}/\text{loop}$ ) into mouse ligated ileal loops induced a statistically significant increase in weight/

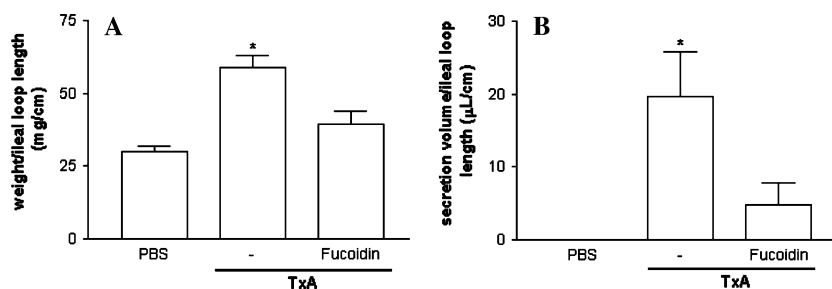
ileal loop length (PBS =  $30.0 \pm 1.7$  vs. TxA =  $58.9 \pm 3.9$  mg/cm) and secretion volume/ileal loop-length ratios (PBS =  $0.0 \pm 0.0$  vs. TxA =  $19.7 \pm 6.0$   $\mu\text{L}/\text{cm}$ ) (Fig. 1A, B) compared with the control group challenged only with PBS. Systemic pretreatment with the L-selectin blocker fucoidin (25 mg/kg), significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the increase in TxA (5  $\mu\text{g}/\text{loop}$ )-induced weight/ileal loop length (TxA =  $58.9 \pm 3.9$  vs. fucoidin =  $39.3 \pm 4.3$  mg/cm) and secretion volume/ileal loop-length ratios (TxA =  $19.7 \pm 6.0$  vs. fucoidin =  $4.8 \pm 2.9$   $\mu\text{L}/\text{cm}$ ) (Fig. 1A, B).

### Effect of systemic fucoidin pretreatment on *Clostridium difficile* toxin-A-induced histological alterations

Histological analysis of ileal tissue by H&E staining demonstrated that TxA (5  $\mu\text{g}/\text{loop}$ ) caused intense mucosal disruption and inflammatory-cell infiltration. These alterations were substantially prevented by pretreatment with fucoidin (25 mg/kg) (Fig. 2 and Table 1).

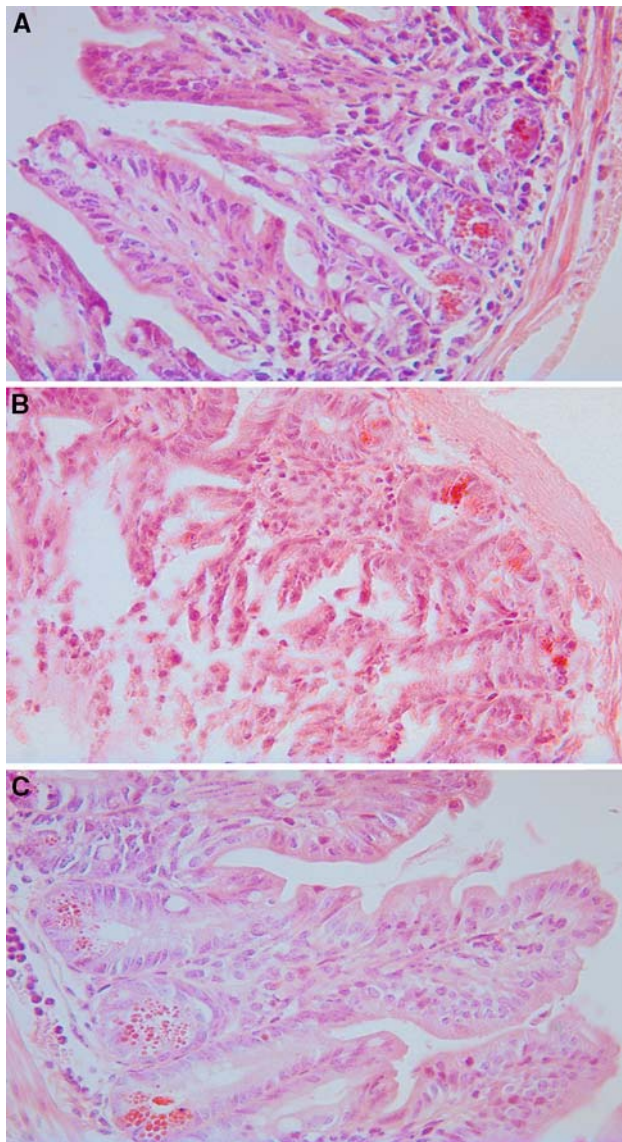
### Effect of fucoidin on *Clostridium difficile* toxin-A-induced myeloperoxidase activity

MPO is a microbicidal enzyme present in the azurophilic granules of neutrophils, and its presence in tissues has been used as an index of neutrophil infiltration [23]. TxA (5  $\mu\text{g}/\text{loop}$ ) caused a statistically significant ( $P < 0.05$ ) increase in MPO activity in ileal tissue compared with loops from the control group injected with only PBS (TxA =  $2.2 \pm 0.27$  vs. PBS =  $0.9 \pm 0.06$  U/mg). Pretreatment with fucoidin (25 mg/kg) markedly reduced MPO activity ( $P < 0.05$ ; TxA =  $2.24 \pm 0.27$  vs. fucoidin =  $1.16 \pm 0.30$  U/mg). MPO activity in ileal tissue collected from animals injected with systemic fucoidin 5 min prior to TxA intraluminal injection was comparable with that observed in the PBS control animals (Fig. 3).



**Fig. 1** Effect of fucoidin on weight (A) and secretion volume (B) of murine ileal loops. The animals were treated intravenously with fucoidin (25 mg/kg) or phosphate-buffered saline (PBS) 5 min prior to the injection of toxin A (TxA) (5  $\mu\text{g}/\text{loop}$ ) or PBS in the ileal loops. Three hours after administration of TxA, mice were killed. Weight/

ileal loop length (mg/cm) (A) and secretion volume/ileal loop length ( $\mu\text{L}/\text{cm}$ ) (B) are presented as means  $\pm$  standard error of mean (SEM) ( $n = 5-6$ ). \*  $P < 0.05$  compared with control (PBS) and fucoidin + TxA groups [analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni]



**Fig. 2** Effect of fucoidin (L-selectin blocker) on *Clostridium difficile* toxin-A (TxA)-induced histological alterations in murine ileal segments. The mice received local treatment with phosphate-buffered saline (PBS) (A) or TxA (5 µg/loop) (B, C) 5 min after systemic injection of PBS (A, B) or fucoidin (25 mg/kg) (C). Fucoidin substantially prevented inflammatory-cell infiltration and mucosal disruption induced by TxA. Hematoxylin and eosin staining. Magnification ×400

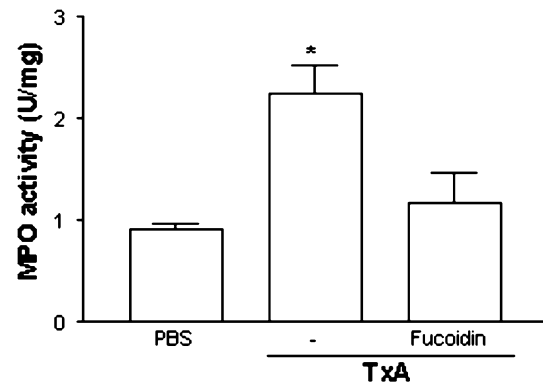
Effect of fucoidin on *Clostridium difficile* toxin-A-induced adenosine deaminase activity

The injection of TxA (5 µg/loop) into mouse ligated ileal loops significantly increased ADA activity within the ileal tissue ( $P < 0.05$ ) compared with the control group challenged only with PBS (PBS =  $2.06 \pm 0.54$  vs. TxA =  $4.20 \pm 0.31$  µmol NH<sub>3</sub>/mg protein/h) (Fig. 4). Systemic pretreatment with fucoidin (25 mg/kg) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced ADA activity in the ileal tissue in

**Table 1** Effect of fucoidin on *Clostridium difficile* toxin-A (TxA)-induced histological alterations in murine ileal loops

Score	Groups		
	PBS	TxA	
		-	Fucoidin
	0 (0–0)	3 (2–3)*	1 (0–3)

Mice received systemic pretreatment (ocular plexus) with fucoidin (25 mg/kg) or phosphate-buffered saline (PBS) (100 µl) 5 min prior to the local injection of TxA (5 µg/loop). The control group received only PBS. Three hours after administration of TxA, mice were sacrificed, and ileal tissues were collected for histopathology. Histological analysis considered a 0–3 grade score based on the following parameters: epithelial damage, edema, and neutrophil infiltration. Data is reported as medians with range within parentheses. \*  $P < 0.05$  compared with PBS and fucoidin + TxA groups (Kruskal–Wallis + Dunn’s test)

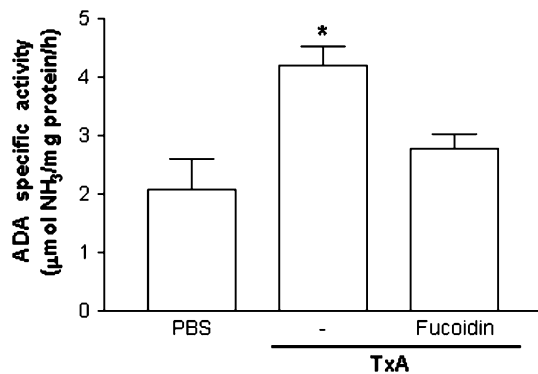


**Fig. 3** Effect of fucoidin on *Clostridium difficile* toxin-A (TxA)-induced myeloperoxidase (MPO) activity. The mice received systemic treatment with fucoidin (25 mg/kg) or phosphate-buffered saline (PBS) 5 min prior to local injection of TxA (5 µg/loop) or PBS. Three hours later, mice were killed, and the intestinal loops were removed and frozen (–70°C) for measurement of MPO activity. Bars on the graph represent the MPO activity (U/mg) as mean ± standard error of mean (SEM) ( $n = 5$ ). \*  $P < 0.05$  compared with control (PBS) and fucoidin + TxA groups (PBS) [analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni]

TxA-challenged animals (TxA =  $4.206 \pm 0.316$  vs. fucoidin =  $2.772 \pm 0.258$  µmol NH<sub>3</sub>/mg protein/h) (Fig. 4).

Discussion

In this study we demonstrated that fucoidin, a polysaccharide that acts as a ligand for L-selectin, significantly reduces tissue injury and inflammation in *C. difficile* TxA-induced mouse enteritis. L-selectin is a lectin found on the surface of leukocytes, which interacts with oligosaccharides on the surface of endothelial cells during the rolling



**Fig. 4** Effect of fucoidin on adenosine deaminase (ADA) activity in murine ileum tissue. The mouse ileal loops were injected with phosphate-buffered saline (PBS) or toxin A (TxA) (5 μg/loop) 5 min after systemic injection of fucoidin (25 mg/kg) or PBS. Three hours after the administration of TxA and PBS, mice were killed, and the intestinal loop tissue was removed for ADA assay by the method of Giusti [25]. Bars on the graphs represent the ADA specific activity, μmol of NH<sub>3</sub>/mg of protein/h, in the ileum tissue as mean ± standard error of mean (SEM) ( $n = 5$  to 6). \*  $P < 0.05$  compared with control (PBS) and fucoidin + TxA groups (PBS) [analysis of variance (ANOVA)/Bonferroni]

of leukocytes prior to firm adhesion. Thus, the interaction between fucoidin and selectins inhibits leukocyte rolling, which is an early and essential step in the process of leukocyte extravasation into inflamed sites [19, 26].

The enterotoxic activity of *C. difficile* in animals has been mainly attributed to TxA. Purified TxA causes mucosal disruption with epithelial cell death, intestinal secretion, intense mucosal inflammation, and hemorrhagic enteritis when introduced in vivo to the intestinal lumen [27–34]. Studies by our group have shown that TxA plays an important role in neutrophil migration, form, and function and that these effects may be involved in the formation of pseudomembranes pathognomonic to pseudomembranous colitis [35]. It has been shown that inhibition of polymorphonuclear leukocyte (PMNL) adherence with antibodies to  $\beta_2$  integrins or P selectins decreases intestinal damage in TxA-exposed animals, suggesting that PMNL play an important role in *C. difficile*-induced disease [36, 37]. Although neutrophils have an important role in host defense, they are also implicated in tissue damage during inflammation, and thus promote disease [38]. The important role of neutrophils in the pathogenesis of colitis caused by infection with *C. difficile* and the abundant presence of neutrophils within TxA-induced pseudomembranes is well known [32, 35]. Thus, it is reasonable to conclude that the protective effect of fucoidin on TxA-induced mucosal disruption shown here is mediated, at least in part, by the inhibition of neutrophil recruitment. However, fucoidin is considered a polyvalent reagent, and an effect on macrophage scavenger receptor and on tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  release has also been

shown [39, 40]. Thus, modulation of macrophage function and cytokine release by fucoidin in this model deserves further investigation.

The effect of fucoidin preventing neutrophil infiltration in mouse-model TxA-induced enteritis was clearly confirmed in our study by the reduction of TxA-induced increase of MPO activity to the level of control. According to our data, it has been reported that perfusion with fucoidin can reduce neutrophil infiltration and myocardial injury after ischemia/reperfusion [41]. Furthermore, recruitment of leukocytes into cerebrospinal fluid in a meningitis model is reduced by fucoidin [42].

In this study, we have shown that systemic fucoidin pretreatment significantly reduced TxA-induced secretion. In agreement with this finding, it has been demonstrated, using a human epithelial cell line (T84), that fucoidin also interferes with polymorphonuclear neutrophil migration across the epithelial barrier [43]. Thus, the effect of fucoidin reducing TxA-induced secretion, as found here, may be related to the prevention of neutrophil infiltration by this polysaccharide, as neutrophil transepithelial migration is known to modulate barrier function and direction transport of ions and water [43]. In addition, it has been reported that leukocyte migration is associated with an increase in vascular permeability [44]. Thus, the inhibition of neutrophil migration by fucoidin may also contribute to the reduction of ileal-loop edema that, together with reduced secretion, may account for the decrease in weight/ileal loop length.

In another study, our group showed that TxA induces a marked increase in the activity of the adenosine catabolizing enzyme ADA in mouse ileal tissue [45]. ADA catalyzes the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively [46]. It has been reported that ADA has an important role in acute immune inflammatory reactions, and its serum level has been used as a biochemical marker for inflammation and disease [47, 48]. We found here that fucoidin also significantly reduced TxA-induced increase in ADA activity. In agreement with our data, it has been shown that in pleurisy induced by carragenan, MPO and ADA levels peaked in parallel to neutrophil presence [49]. This may have occurred because increased ADA activity is a consequence of inflammation. Thus, it is possible that fucoidin decreased ADA activity in the ileal tissue by reducing neutrophil infiltration, which is consistent with the observed fucoidin-induced decrease in MPO activity in ileal tissue of TxA-challenged mice.

In conclusion, this study demonstrated for the first time an important effect of fucoidin, an inhibitor of leukocyte rolling through L-selectin blockage, on TxA-induced secretion, edema, mucosal disruption, ADA activity, and inflammatory-cell infiltration.



**Acknowledgements** We gratefully acknowledge the technical assistance of Maria Silvandira França Pinheiro and José Ivan Rodrigues de Sousa.

## References

- Bartlett JG (2002) Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 346:334–339
- Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT (1994) *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 330:257–262
- Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000) Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 342:390–397
- Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K (1995) The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 270:13932–13936
- Just I, Selzer J, von Eichel-Streiber C, Aktories K (1995) The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J Clin Invest* 95:1026–1031
- Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K (1995) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375:500–503
- Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 56:2299–2306
- Rubin MS, Bodenstern LE, Kent KC (1995) Severe *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum* 38:350–354
- Archibald LK, Banerjee SN, Jarvis WR (2004) Secular trends in hospital-acquired *Clostridium difficile* disease in the United States, 1987–2001. *J Infect Dis* 189:1585–1589
- Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL (2002) Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg* 235:363–372
- Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S, Pasculle AW, Paterson DL, Saul M, Harrison LH (2005) A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluorquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:273–280
- McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW, Zheng L (2005) A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clin Infect Dis* 40:265–272
- Johnson S, Samore MH, Farrow KA, Killgore GE, Tenover FC, Lyras D, Rood JI, DeGirolami P, Baltch AL, Rafferty ME, Pear SM, Gerding DN (1999) Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 341:1645–1651
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433–2441
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC (2005) Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366:1079–1084
- Spigaglia P, Mastrantonio P (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 40:3470–3475
- Spigaglia P, Mastrantonio P (2004) Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *J Med Microbiol* 53:1129–1136
- Berteau O, Mulloy B (2003) Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13:29R–40R
- Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777–1789
- Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, Taenaka N, Yoshiya I, Honda T (1996) Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 153:307–311
- Castagliuolo I, Riegler M, Pasha A, Nikulasson S, Lu B, Gerard C, Gerard NP, Pothoulakis C (1998) Neurokinin-1 (NK-1) receptor is required in *Clostridium difficile*-induced enteritis. *J Clin Invest* 101:1547–1550
- Pothoulakis C, Castagliuolo I, LaMont JT, Jaffer A, O’Keane JC, Snider RM, Leeman SE (1994) CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:947–951
- Souza MH, Troncon LE, Cunha FQ, Oliveira RB (2003) Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res* 36:1383–1390
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Giusti G (1974) Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Academic, New York, pp 1092–1099
- Lasky LA (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 64:113–139
- Brito GA, Fujii J, Carneiro-Filho BA, Lima AA, Obrigt T, Guerrant RL (2002) Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. *J Infect Dis* 186:1438–1447
- Alcantara CS, Jin XH, Brito GA, Carneiro-Filho BA, Barrett LJ, Carey RM, Guerrant RL (2005) Angiotensin II subtype 1 receptor blockade inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal secretion in a rabbit model. *J Infect Dis* 191:2090–2096
- Humphrey CD, Condon CW, Cantey JR, Pittman FE (1979) Partial purification of a toxin found in hamsters with antibiotic-associated colitis. Reversible binding of the toxin by cholestyramine. *Gastroenterology* 76:468–476
- Lima AA, Innes DJ Jr, Chadee K, Lysterly DM, Wilkins TD, Guerrant RL (1989) *Clostridium difficile* toxin A. Interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. *Lab Invest* 61:419–425
- Lima AA, Lysterly DM, Wilkins TD, Innes DJ, Guerrant RL (1988) Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect Immun* 56:582–588
- Lysterly DM, Krivan HC, Wilkins TD (1988) *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1:1–18
- Lysterly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD (1982) Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 35:1147–1150
- Rehg JE (1980) Cecal toxin(s) from guinea pigs with clindamycin-associated colitis, neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Infect Immun* 27:387–390
- Brito GA, Sullivan GW, Ciesla WP Jr, Carper HT, Mandell GL, Guerrant RL (2002) *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro

- adherent neutrophil morphology and function. *J Infect Dis* 185:1297–1306
36. Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, LaMont JT, Pothoulakis C (1994) Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest* 93:1257–1265
  37. Kurose I, Pothoulakis C, LaMont JT, Anderson DC, Paulson JC, Miyasaka M, Wolf R, Granger DN (1994) *Clostridium difficile* toxin A-induced microvascular dysfunction. Role of histamine. *J Clin Invest* 94:1919–1926
  38. Assreuy AM, Martins GJ, Moreira ME, Brito GA, Cavada BS, Ribeiro RA, Flores CA (1999) Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol* 161:1988–1993
  39. Hsu HY, Hajjar DP, Khan KM, Falcone DJ (1998) Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 273:1240–1246
  40. Heinzelmann M, Polk HC Jr, Miller FN (1998) Modulation of lipopolysaccharide-induced monocyte activation by heparin-binding protein and fucoidan. *Infect Immun* 66:5842–5847
  41. Omata M, Matsui N, Inomata N, Ohno T (1997) Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:717–724
  42. Granert C, Raud J, Waage A, Lindquist L (1999) Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infect Immun* 67:2071–2074
  43. Colgan SP, Parkos CA, McGuirk D, Brady HR, Papayianni AA, Frenzl G, Madara JL (1995) Receptors involved in carbohydrate binding modulate intestinal epithelial-neutrophil interactions. *J Biol Chem* 270:10531–10539
  44. Di RM, Papadimitriou JM, Willoughby DA (1971) A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pathol* 105:239–256
  45. Cavalcante IC, Castro MV, Barreto AR, Sullivan GW, Vale M, Almeida PR, Linden J, Rieger JM, Cunha FQ, Guerrant RL, Ribeiro RA, Brito GA (2006) Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* toxin A-induced murine ileal enteritis. *Infect Immun* 74:2606–2612
  46. Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E (2001) Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 21:105–128
  47. Piras MA, Gakis C, Budroni M, Andreoni G (1978) Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J* 2:1751–1752
  48. Sari RA, Taysi S, Yilmaz O, Bakan N (2003) Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21:87–90
  49. Frode TS, Medeiros YS (2001) Myeloperoxidase and adenosine deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm* 10:223–227