

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS**

LUIZ ARTHUR RANGEL CYRINO

**EFEITO DA QUERCETINA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO
INDUZIDO PELA SUBSTÂNCIA P NA DURA-MÁTER, CEREBELO,
BULBO OLFATÓRIO E CÓRTEX DE RATOS.**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau

**FLORIANÓPOLIS
2000**

**“EFEITO DA QUERCETINA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO
PELA SUBSTÂNCIA P NA DURA-MÁTER, CEREBELO, BULBO OLFATÓRIO E
CÓRTEX DE RATOS”.**

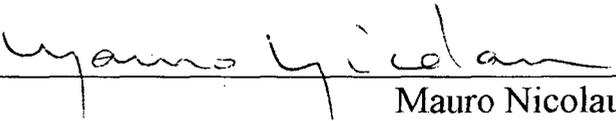
LUIZ ARTHUR RANGEL CYRINO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

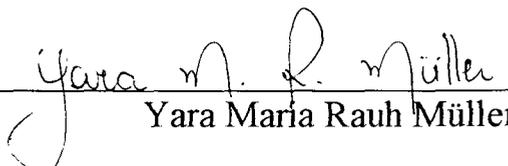
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

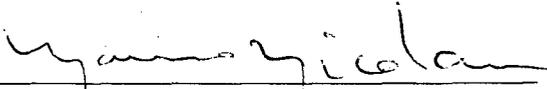
Orientador

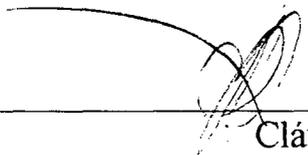

Mauro Nicolau

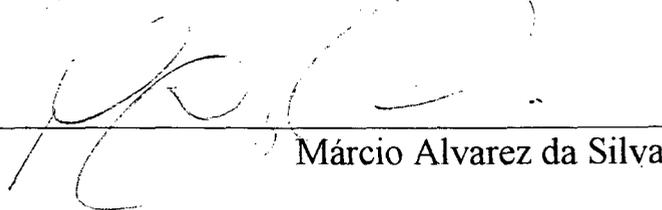
Coordenadora do Curso


Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Mauro Nicolau (Presidente)


Cláudio Antônio Barbosa de Toledo


Márcio Alvarez da Silva

LUIZ ARTHUR RANGEL CYRINO

**EFEITO DA QUERCETINA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO
PELA SUBSTÂNCIA P NA DURA-MÁTER, CEREBELO, BULBO OLFATÓRIO E
CÓRTEX DE RATOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau.

**Florianópolis
2000**

*Dedico esse trabalho com **amor** à **Lisiane, Maurício e Débora** e a todos os **amigos e pacientes** que com imensa paciência souberam enfrentar os momentos de minha ausência. Dedico também com **carinho** aos meus **pais**, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse alcançar esta etapa da minha vida.*

Minha Eterna Gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mauro Nicolau, orientador e amigo, que mostrou -se paciente, habilidoso e apoiador, exemplo de homem e cientista.

Aos professores e amigos, Cristina, Moacir e Cláudio, pela amizade cultivada, pela convivência extremamente agradável e pelos ótimos papos sobre comportamento humano e animal, evolução, educação e política.

Aos professores, pelas orientações, sugestões e crescimento profissional durante a execução deste mestrado.

Aos amigos e colegas pós-graduandos, Ana, Dib, Viviane, Vânia, Rosane, Vera, Silvia e Rita pelos momentos prezeirosos e de descontração durante, as aulas, trabalhos e as festas.

À técnica Luciane P. N. Häckl, que auxiliou na preparação e execução de todos os trabalhos experimentais.

À amiga Luciane, que sem sua ajuda este trabalho se tornaria uma tarefa quase impossível.

À professora Ana Lucia S. Rodrigues, pelos incentivos, sugestões e correções construtivas que ajudaram a despertar um espírito crítico e habilidade para execução do presente trabalho.

Aos professores, Petrônio Guimbala, Julio Schruber, Gilmar Rzinger, Jair Venâncio, Silvio Bertodi e Lenir Krutul, por terem apoiado meu crescimento profissional.

Aos comandantes do 8º Batalhão da Polícia Militar, por terem sempre colaborado e apoiado a realização deste mestrado.

Ao amigo William, cuja participação e habilidade na área de computação, ajudou a despertar minha curiosidade para esse campo da ciência e auxiliou na execução do presente trabalho.

Aos amigos, Ronnie e Bruno, que me auxiliaram nos experimentos, pela amizade, carinho, companherismo, e pelas boas conversas sobre a vida e as suas vicissitudes.

Aos secretários, Nivaldinho e Gilsa, pelo apoio dedicado na realização deste trabalho.

Aos técnicos, Carlinhos, Nivaldo e Vilma, pelo auxílio na execução dos experimentos e pelos cafezinhos e bolos, transformando o ambiente e sempre mais agradável.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meu profundo agradecimento.

“Todos os fenômenos mentais e espirituais são produtos da matéria. Nenhuma noção poderia ser mais perturbadora as profundas tradições do ocidente do que a afirmação de que a mente por mais complexa e poderosa – é simplesmente um produto do cérebro.”
Darwin

RESUMO

Neste estudo procuramos avaliar o efeito da quercetina no extravasamento plasmático induzido pela substância P em diversos tecidos do sistema nervoso central de ratos (cerebelo, bulbo olfatório e córtex) assim como na dura-máter, e examinamos também o efeito da inibição da endopeptidase neutra pelo fosforamidon e da enzima conversora da angiotensina pelo captopril enzimas que inativam a substância P. Quercetina, é um flavonóide presente na natureza, que possui atividade inibitória multienzimática. A avaliação do extravasamento plasmático foi feita com a técnica do corante de azul de Evans, determinada por espectrofotometria (620 nm) e expresso em $\mu\text{g/g}$ de peso de tecido seco. A substância P (10 nmol/Kg e 30 nmol/Kg, i.v.) aumentou o extravasamento plasmático de modo dose relacionada na dura-máter ($47,4 \pm 4,2$ para $72,2 \pm 4,9$ e $96,1 \pm 8,4$), não alterando nos outros tecidos. A inibição farmacológica seletiva da endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina com fosforamidon e captopril respectivamente aumentaram o extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter de ratos. O pré-tratamento isolado com quercetina (30mg/kg, v.o.) aumentou o extravasamento plasmático, em relação ao controle, em todos os tecidos: dura-máter ($47,4 \pm 4,2$ para $88,6$

$\pm 3,6$), cerebelo ($37,7 \pm 2,1$ para $49,5 \pm 1,4$), bulbo olfatório ($41,2 \pm 4,1$ para $56,7 \pm 2,1$) e córtex ($42,4 \pm 3,5$ para $66,0 \pm 5,9$). O tratamento prévio dos animais com quercetina (30 mg/kg, v.o) potencializou significativamente o extravasamento plasmático, induzido pela substância P exógena (10 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter ($100,4 \pm 8,8$), não alterando nos outros tecidos. A quercetina provocou um aumento no extravasamento plasmático quando administrada isoladamente e potencializou o extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter, tecido onde há inervação peptidérgica, o que coincide com a modulação da endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina. Portanto, é possível admitir que a ação potencializadora da quercetina seja devido a inibição de uma dessas enzimas. Além do mais, o pré-tratamento com antagonistas dos receptores NK-1 e B₂ foram usados para identificar os mediadores do extravasamento plasmático induzido pela quercetina. Os resultados mostraram que somente o antagonista dos receptores NK-1 bloqueou este efeito, sugerindo que a redução na degradação da substância P foi a causa do aumento no extravasamento plasmático induzido pela quercetina na dura-máter e da potenciação do efeito da substância P.

ABSTRACT

In this work we evaluated the effect of quercetin, a naturally occurring flavonoid which is known to inhibit a variety of enzymes, on the plasma extravasation induced by substance P in selected rat central nervous system tissues (cerebellum, olfactory bulb and cortex) and dura mater. We also examined the effect of selective inhibition of the substance P metabolising enzymes neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme by phosphoramidon and captopril, respectively. Plasma extravasation was evaluated with Evans blue dye, quantified by spectrophotometry (620 nm) and expressed as $\mu\text{g/g}$ of dry tissue. Substance P (10 nmol/kg and 30 nmol/kg, i.v.) increased plasma extravasation in a dose dependent manner in the dura mater (control 47.4 ± 4.2 ; substance P, 10 nmol/kg, 72.2 ± 4.9 ; substance P, 30 nmol/kg, 96.1 ± 8.4) with no effect in the other tissues; this effect was potentiated by both phosphoramidon and captopril. Quercetin (30 mg/kg v.o.) increased plasma extravasation in relation to control in all of the tissues studied (dura mater, 47.4 ± 4.2 to 88.6 ± 3.6 ; cerebellum, 37.7 ± 2.1 to 49.5 ± 1.4 ; olfactory bulb, 41.2 ± 4.1 to 56.7 ± 2.1 ; cortex, 42.4 ± 3.5 to 66.0 ± 5.8). Quercetin pretreatment significantly potentiated the plasma extravasation induced by exogenous substance P (10 nmol/kg) in the dura mater (72.2 ± 4.9 to 100.4 ± 8.8). Pretreatment with HOE 140, but not RP 67580 (specific

antagonists of NK-1 and B₂ receptors, respectively) blocked the quercetin effect on substance P induced plasma extravasation in the dura mater. This study suggests that the plasma extravasation induced by quercetin in rat dura mater is mediated by the inhibition of substance P degradation and the subsequent potentiation of exogenous substance P effects. Plasma extravasation induced by quercetin in the central nervous system tissues studied, which are believed not to contain a peptidergic innervation, requires further investigation.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. - Taquicininas

1.1.1. - Histórico

Taquicininas pertencem à uma família de neuropeptídeos conservados evolucionariamente (Khawaja e Rogers, 1996). O nome taquicininas resultou da similaridade farmacológica desses peptídeos com a bradicinina, que agia como mediador inflamatório endógeno o qual apresentava uma contração lenta do íleo de cobaias distintamente do que ocorria com as taquicininas ao qual tinham perfil farmacológico semelhante, porém induziam uma contração imediata e rápida do mesmo tecido (Pernow, 1963). Em mamíferos, as taquicininas incluem os seguintes neuropeptídeos: substância P, a neurocinina A e neurocinina B, as quais exibem afinidade preferencial pelos receptores específicos: NK-1, NK-2 e NK-3, respectivamente (Regoli *et al.*, 1994). Estas três substâncias são caracterizadas pela seqüência comum Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ que parece ser essencial para a atividade biológica destes peptídeos (Escher e Regoli *et al.*, 1989). O primeiro membro da família das taquicininas a ser descoberto em 1931 por Von Euler e Gaddum foi a substância P, obtida do intestino e cérebro de cavalos por

extração alcoólica, causando vasodilatação periférica e contração intestinal em coelhos atropinizados (von Euler e Gaddum, 1931). Quase 50 anos depois da descoberta da substância P, duas outras taquicininas foram descritas quase que simultaneamente por diferentes grupos e se tornaram conhecidas como neurocinina A e neurocinina B (Kimura *et al.*, 1983; Maggio *et al.*, 1983).

1.1.2. - Síntese

Estes neuropeptídeos são derivados de proteínas precursoras, as pré-pró-taquicininas, as quais são codificadas por dois genes diferentes. O gene codificador da pré-pró-taquicinina-A, contém a seqüência codificadora para a substância P e neurocinina A, por outro lado a pré-pró-taquicinina B que codifica somente a neurocinina B (Holzer e Holzer-Petsche, 1997). A expressão desta proteínas precursoras são espécie e tecidos dependentes. Uma vez sintetizadas, as taquicininas são estocadas em vesículas nas terminações nervosas, aguardando o estímulo apropriado (Floor *et al.*, 1982).

1.1.3. – Distribuição das taquicininas e receptores

O sistema taquicininas é largamente distribuído no sistema nervoso periférico (Bartho e Holzer, 1985) e central (Maggi *et al.*, 1993) de mamíferos. No sistema nervoso periférico, as taquicininas são liberadas das terminações dos nervos sensoriais e são responsáveis pelo fenômeno da inflamação neurogênica observada em vários tecidos tais como, sistema respiratório (Lundberg e Saria, 1982; Emanuelli *et al.*, 1998), sistema genitourinário (Lu *et al.*, 1997), pele (Kenins *et al.*, 1984) e parte do sistema digestivo (Saria *et al.*, 1983; Berthiaume *et al.*, 1995). Na medula espinhal e no sistema nervoso central as taquicininas tem um papel importante na transmissão da dor e percepção (Moskowitz *et al.*, 1987), em alguns reflexos autônomos e no comportamento (Maggi *et al.*, 1993). Nos últimos anos, alguns autores tem observado a inflamação neurogênica na dura-máter de ratos (Moussaoui *et al.*, 1993a; Ebersberger *et al.*, 1999).

No sistema nervoso central, as taquicininas tem um papel neuromodulador causado por uma despolarização da membrana neuronal provavelmente por via de redução do influxo de

potássio no momento da retificação das correntes (Stanfield *et al.*, 1995).

Neurônios contendo substância P em ratos podem fazer sinapse com neurônios dopaminérgicos da *substância nigra*s (Mahalilik, 1988), neurônios colinérgicos nos núcleos basais (Beach *et al.*, 1987), neurônios nor-adrenérgicos no *locus ceruleous* (Guyenet e Aghajanian, 1977) e neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe (Ljungdahl *et al.*, 1978). A administração da substância P nessas áreas induz a liberação de neurotransmissores em ratos (Reid *et al.*, 1990). Como alterações de concentrações de neurotransmissores no sistema nervoso central parecem estar na base de muitas doenças neurológicas como por exemplo a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, ansiedade e depressão, estes estudos indicam que as taquicinas podem ter um papel importante na etiologia das doenças neurodegenerativas.

A descoberta da neurocinina A e neurocinina B tem levado à intensa investigação de suas propriedades farmacológicas em comparação à substância P (Kimura *et al.*, 1983). Tem sido demonstrado que elas participam de atividades biológicas comuns com a substância P, por exemplo na indução de dor, vasodilatação (Maggi *et al.*, 1987) e extravasamento de

proteínas plasmáticas em vênulas pós-capilares (Hua *et al.*, 1984), três eventos relacionados com o processo inflamatório.

A neurocinina A está localizada conjuntamente com a substância P em muitas áreas mas, comparativamente encontra-se, em menor quantidade e com baixa ou nenhuma expressão dos receptores NK-2 (Tsuchida *et al.*, 1990). Os receptores NK-3 são encontrados em certas áreas incluindo o córtex cerebral, o núcleo do trato solitário e a raiz dorsal da medula espinhal. Conseqüentemente a maioria dos efeitos das taquicininas estão relacionados com a ação da substância P. (Stanfield *et al.*, 1995).

Como comentado anteriormente, as taquicininas exercem seus efeitos biológicos através da estimulação de receptores específicos denominados de NK-1, NK-2 e NK-3. Apesar do fato das taquicininas mostrarem alta afinidade para seus próprios receptores, as taquicininas de ocorrência exógena não são seletivas. Assim, os receptores foram inicialmente caracterizados pelas suas afinidades preferenciais em se ligar com as taquicininas endógenas seguindo o critério da ordem de potência dos agonistas conforme o seguinte esquema, SP > NKA > NKB para receptores NK-1; NKA > NKB > SP para receptores NK-2 e NKB > NKA > SP para receptor NK-3 (Maggi *et al.*, 1993).

Todos receptores compartilham de uma estrutura global similar que apresenta uma estrutura amina terminal extra celular e uma estrutura carboxi-terminal intracelular. Ambas apresentam uma ligação por uma sequência de aminoácidos com 7 domínios que atravessam a membrana celular na espécie humana (Fig 1).

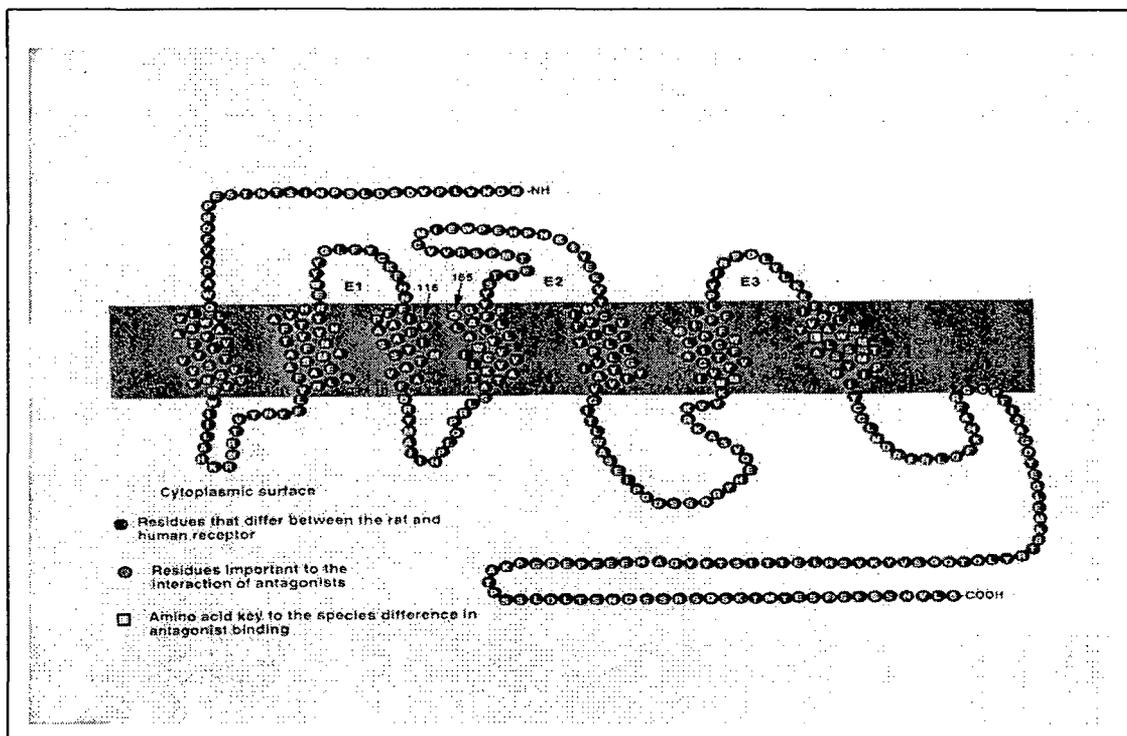


Fig 1 – Estrutura e seqüência de aminoácidos que compõem o receptor NK-1. Extraído de McLean, S., 1996

Os receptores de taquicininas tem aproximadamente 40% de seqüências idênticas entre os receptores de NK-1, NK-2 e NK-3 (Gerard *et al.*, 1993). Há grande identidade, por volta de 75%, encontrada nas seqüências citoplasmática e

aproximadamente 70% de identidade nos domínios transmembrânicos. Sequências homólogas entre espécies é em geral maior para o receptor NK-1, tendo o receptor do rato e do homem por volta de 95% de homologia, diferindo somente em 22 dos 407 aminoácidos (Fong *et al.*, 1992). Entretanto a homologia dos receptores NK-2 e NK-3 é também alta, sendo aproximadamente de 85 e 88% respectivamente.

A distribuição dos receptores de taquicininas tem sido elucidada usando-se tanto aspectos tradicionais da farmacologia como substâncias radiomarcadas e biologia molecular. Essas ferramentas tem promovido uma investigação valiosa não somente para diferenciar a densidade de receptores em diferentes tecidos, mas também para desenvolver antagonistas novos. Com o uso dessas técnicas, foi possível mapear a distribuição dos receptores de taquicininas, em diversos órgãos.

Experimentos com agonistas e antagonistas seletivos para receptores, tem indicado que o receptor NK-1 é o maior, ou o único mediador do extravasamento de proteínas plasmáticas produzido tanto por taquicininas exógenas como endógenas liberadas pela capsaicina ou estimulação nervosa (Maggi, 1996). Os receptores NK-1 são encontrados tanto no sistema nervoso (medula e estriato) quanto nos órgãos periféricos

(aparelho digestório e urinário) do rato (Mantyh *et al.*, 1988), e também no epitélio de vias aéreas e nas glândulas submucosas de ferrett (Meini *et al.*, 1993).

Os receptores NK-2 são encontrados principalmente em órgãos periféricos incluindo o aparelho gastrointestinal de ratos e em alta densidade nas células musculares lisas nas vias aéreas de ferret, facilitando a neurotransmissão pulmonar colinérgica (Tsuchida *et al.*, 1990., Meini *et al.*, 1993; Piedimonte, 1995; McLean, 1996). Entretanto um papel para os receptores NK-2 no extravasamento plasmático não pode ser totalmente excluído, desde que a neurocinina A induziu o extravasamento de proteínas plasmáticas em brônquios secundários de cobaias através da estimulação de receptores NK-2 (Tousignant *et al.*, 1993). A presença de receptores NK-2 tem sido claramente demonstrada em várias áreas do cérebro (Hagan *et al.*, 1993). Com o uso de antagonistas seletivos para receptores NK-2, pode-se especular que estes receptores estão envolvidos nos processos de ansiedade assim como na transmissão e percepção do estímulo doloroso (Urban *et al.*, 1992; Hagan e McLean, 1993).

Os sítios de ligação nos receptores NK-3 estão confinados principalmente ao sistema nervoso central, primariamente ao córtex cerebral e na coluna dorsal da medula (Dam *et al.*,

1990), embora níveis detectáveis são também encontrados em vários tecidos periféricos de ratos incluindo a bexiga e o intestino (Tsuchida *et al.*, 1990).

Assim, diferenças entre receptores NK-1 periféricos e centrais tem sido observados em cobaias e ratos, surgindo assim uma possibilidade de degradação diferencial dos peptídeos (Lew *et al.*, 1990; Fardin e Garret, 1991; Clerk, *et al.*, 1992) .

1.1.4. – Agonistas e antagonistas

Devido a presença de tipos de receptores em concentrações variáveis em diferentes tecidos foram desenvolvidos agonistas seletivos tais como (β -Ala⁸) NKA (4-10) para receptores NK-2 e (Me Phe⁷(NKB)) para receptores NK-3 (Regoli *et al.*, 1987). Estes compostos foram usados com sucesso *in vitro*, mas sendo peptídeos eles são rapidamente metabolizados e como consequência tem curta atividade *in vivo*.

Os receptores das taquicininas tem sido caracterizados através do uso de antagonistas, especialmente por alguns compostos novos identificados nos últimos anos. De fato, novos

antagonistas seletivos não peptídicos para os receptores NK-1 (RP 67580) (Garret *et al.*, 1991) e CP 96345 (Snider *et al.*, 1991) e para receptores NK-2 (SR 48968) (Emonds-Alt *et al.*, 1992) tem sido descobertos, e apresentam maior estabilidade que os peptídeos anteriores. O uso destes compostos novos tem contribuído para um melhor entendimento do papel específico das taquicininas na fisiologia e fisiopatologia (Walting, 1992; Maggi *et al.*, 1993) (Fig 2).

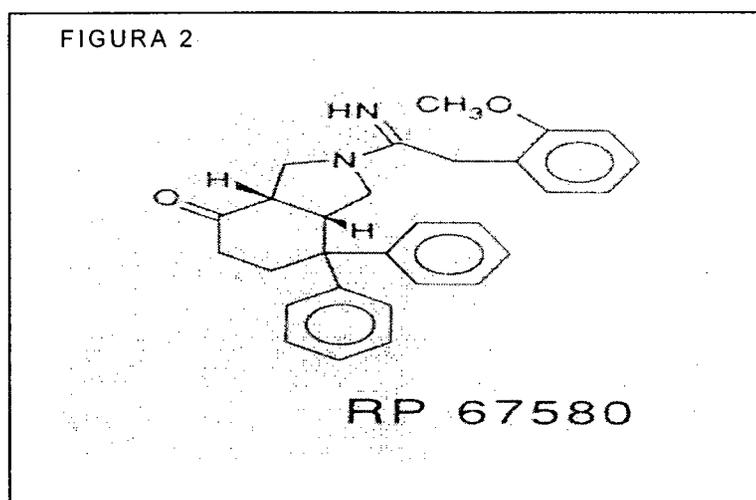


Fig.2 - Estrutura química do antagonista não peptídico do receptor NK-1. Extraído de Patacchini e Maggi, 1995

Estudos realizados anteriormente usando, antagonistas seletivos não peptídicos do receptor NK-1 como RP 67580 (Shepherd *et al.*, 1993) e CP-99,994 (Shepherd *et al.*, 1995), inibiram o extravasamento plasmático induzido pela substância P em diversos tecidos. Estes estudos, mostraram que RP 67580

tem maior afinidade para receptores NK-1 de roedores enquanto que o antagonista CP-99,994 tem maior afinidade para receptores NK-1 de humanos (Shepherd *et al.*, 1995).

1.1.5. – Mecanismos intracelulares

Os receptores de taquicinas foram clonados e contém 7 segmentos transmembrânicos. Estes receptores estão acoplados à proteína G. A interação das taquicinas com os receptores ativam a proteína G α_q , a qual por sua vez ativa a fosfolipase C que irá quebrar a substância fosfatidilinositol bifosfato em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Tanto o IP3 como o DAG agem em locais específicos na célula. O IP3 age na membrana do retículo endoplasmático para liberar o cálcio armazenado para o citosol, enquanto que o DAG age via proteína quinase C para abrir os canais de cálcio tipo L possibilitando a entrada de cálcio via membrana plasmática. O aumento do cálcio intra-celular induz a uma resposta tecidual (Khawaja e Rogers, 1996) (Fig 3).

Atualmente busca-se o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para cada receptor podendo com isso desenvolver e elucidar os papéis desses mediadores sobre o

sistema nervoso central e periférico e o desenvolvimento das respostas inflamatórias.

1.1.6. – Enzimas e metabolização

A magnitude e a duração da ação das taquicininas é regulada pela degradação realizada por duas enzimas principais chamadas enzimas conversora da angiotensina e a endopeptidase neutra (Skidgel *et al.*, 1984; Borson, 1991). Na molécula da substância P existem dois sítios de clivagem pela enzima conversora da angiotensina, os quais estão entre os aminoácidos fenilalanina e glicina e entre a glicina e a leucina. Por outro lado, a endopeptidase neutra cliva a substância P entre os aminoácidos glicina e fenilalanina, glicina e leucina e fenilalanina e fenilalanina. Ambas as enzimas estão também relacionadas com a metabolização de outras substâncias tais como a bradicinina (Fig 3).

angiotensina tem sido encontrada no fluido cérebro espinhal (Lantz *et al.*, 1991).

A presença da endopeptidase neutra no sistema nervoso central, tem também sido demonstrado pelo uso dos inibidores destas enzimas incluindo o fosforamidon e o thiorfan (Matsas *et al.*, 1985). Na presença do fosforamidon, um aumento na atividade da substância P nas porções estriatais em porcos e ratos é observada (Matsas *et al.*, 1983; Mauborgne *et al.*, 1987). Nas estruturas periféricas a endopeptidase neutra parece estar envolvida na degradação das taquicininas em vários órgãos, incluindo sistema digestivo e outros músculos lisos (Roques *et al.*, 1993). Nas vias aéreas em contraste com a enzima conversora da angiotensina, a endopeptidase neutra está localizada predominantemente no epitélio e glândulas submucosas de um número de espécies animais incluindo humanos (Borson, 1991). Além disso, inibidores da endopeptidase neutra potenciam a resposta secretória da substância P *in vitro*, em ferrets e vias aéreas humanas (Rogers *et al.*, 1989). O efeito dos inibidores da endopeptidase neutra pode também ser demonstrado *in vivo*, por exemplo na regulação da magnitude do extravasamento plasmático em vias aéreas de cobaias induzido por fumaça de cigarro, uma

resposta mediada via ativação dos nervos sensoriais e liberação de taquicininas (Lei *et al.*, 1995).

As células vasculares endoteliais, possuem em sua superfície as enzimas endopeptidase neutra, e a enzima conversora da angiotensina que hidrolisa a substância P. A localização das enzimas endopeptidase neutra e enzima conversora angiotensina nas proximidades anatômicas dos receptores da substância P nas células endoteliais pós-capilares das vênulas, sugerem que elas tenham um papel importante na modulação da resposta da inflamação neurogênica (Inoue *et al.*, 1996). A degradação enzimática das taquicininas em tecidos periféricos é realizada por várias enzimas das quais a mais importante é a endopeptidase neutra (Nadei, 1991). Em traquéias de ratos, a combinação do captopril e fosforamidon, inibidores da enzima conversora da angiotensina e endopeptidase neutra respectivamente, tem sido relacionadas com o aumento do extravasamento plasmático (Brokaw e White, 1994). Inibição da endopeptidase neutra ou da enzima conversora da angiotensina potencia o aumento do extravasamento plasmático produzido pela injeção exógena de substância P no pulmão (Piedimonte, 1995).

Sabe-se que a expressão da endopeptidase neutra junto a membrana celular acelera a degradação da substância P, e a

degradação foi reduzida pelos inibidores thiorfan e fosforamidon (Okamoto *et al.*, 1994).

A endopeptidase neutra tem uma importante ação na regulação da permeabilidade basal da microvasculatura por degradar a substância P e a bradicinina, e pode regular a pressão sanguínea a partir de um mecanismo que é independente da substância P, bradicinina e óxido nítrico (Lu *et al.*, 1997).

A endopeptidase neutra regula o sistema circulatório em múltiplos níveis. Substância P e bradicinina são mantidos em níveis basais baixos pela endopeptidase neutra. A ausência desta enzima causa um extravasamento plasmático extenso, que é mediado pelo receptores NK-1 e B₂, gerando uma hipotensão acentuada. A ausência da endopeptidase neutra aumenta a suscetibilidade para o choque endotóxico, podendo contribuir para a hipotensão e processo inflamatório intenso (Lu *et al.*, 1997).

1.1.7. - Aspectos fisiopatológicos

São grandes as quantidades de pesquisas que tem sido feitas para demonstrar papéis fisiológicos para as taquicinininas.

O uso de agonistas e antagonistas seletivos como ferramentas farmacológicas tem nos fornecido informações de grande valia para os efeitos das substâncias endógenas como as taquicininas. Como os receptores NK-1, NK-2, e NK-3 estão largamente distribuídos tanto no sistema nervoso central como no periférico, e com isso a administração dos agonistas de receptores de taquicininas podem produzir uma gama de efeitos fisiológicos. Os estudos mais comuns contudo são aqueles nos quais as funções fisiológicas estão alteradas por antagonistas seletivos. No sistema nervoso central a substância P, é a principal taquicinina neurotransmissora com a prevalência do receptor NK-1 (Tsuchida *et al.*, 1990).

As taquicininas apresentam uma variedade de ações tão diversas e com isto faz surgir um número muito grande de possibilidades terapêuticas. Com o desenvolvimento de drogas antagonistas não peptídicas altamente seletivas, abrem-se as possibilidades para o tratamento para várias condições clínicas incluindo-se a dor crônica, a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, depressão, artrite reumatóide, síndrome do cólon irritável, asma e enxaqueca (Khawaja e Rogers, 1996).

Assim, o uso de inibidores tais como o fosforamidon e captopril os quais atuam sobre a enzima endopeptidase neutra e a enzima conversora da angiotensina respectivamente ou o

uso de antagonistas não peptídico da substância P (RP 67580) (Snider et al., 1991) ou um antagonista seletivo não peptídico da bradicinina (HOE 140) (Wirth et al., 1991), são exemplos de substâncias envolvidas na mediação do extravasamento plasmático em alguns tecidos do sistema nervoso central, deste modo é possível ampliar os conhecimentos já existentes sobre os mecanismos da inflamação neurogênica.

1.2. - Inflamação neurogênica

A inflamação neurogênica é um importante mecanismo endógeno de defesa e promove uma das primeiras respostas locais à injúria tecidual, acelerando e modulando o desenvolvimento do processo inflamatório.

O fenômeno conhecido por inflamação neurogênica, caracteriza-se pela liberação de peptídeos que estão contidos no interior das fibras aferentes e suas concentrações podem ser alteradas a partir de um estímulo elétrico, químico, mecânico ou por um dano no nervo (Levine et al., 1993; Hokfelt et al., 1994). Evidências farmacológicas e neurofisiológicas da inflamação neurogênica tem sido observadas por diversos autores através do uso de agonistas e antagonistas (Bertrand et al., 1993; Nicolau et al., 1993; Donnerer et al., 1993). Estas

evidências indicam que respostas locais inflamatórias causadas pela estimulação dos nervos sensoriais são devidos aos efeitos de neuropeptídeos liberados destas terminações nervosas (Maggi, 1991).

Os neuropeptídeos que formam a família das taquicinininas são a substância P, neurocinina A, neurocinina B e o peptídeo gene relacionado com a calcitonina e estão presentes nas fibras não mielinizadas tipo C, sendo os principais responsáveis pelo fenômeno chamado inflamação neurogênica (Ricciardolo *et al.*, 1994).

O papel da substância P na inflamação neurogênica tem sido claramente demonstrado. Este neuropeptídeo causa a degranulação dos mastócitos, extravasamento plasmático com a subsequente liberação de outros algógenos (bradicinina e serotonina) e ativação de outras células inflamatórias (macrófagos, monócitos e linfócitos). Além do mais, a substância P é capaz de induzir a produção de óxido nítrico, outro vasodilatador da camada endotelial dos vasos sanguíneos (Besson, 1999). A ativação destes diferentes componentes da resposta inflamatória resulta no aumento do fluxo sanguíneo para a área lesada e com aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Bhoola, 1996).

Assim estes neurônios sensoriais aferentes, contendo taquicininas, principalmente a substância P, foram encontrados ligados ao controle da permeabilidade vascular em numerosos tecidos como a pele (Kenins *et al.*, 1984), as vias aéreas e mucosa nasal (Lundberg e Saria, 1982; Emanuelli *et al.*, 1998), bexiga urinária (Lu *et al.*, 1997), olhos e articulações (Moskowitz *et al.*, 1979), aparelho digestório (Saria *et al.*, 1983) e mais recentemente tem-se observado também na dura-máter de ratos (Moussaoui *et al.*, 1993a; Ebersberger *et al.*, 1999).

A inflamação neurogênica na dura-máter tem sido sugerida como um dos mecanismos envolvidos na produção dos quadros de enxaqueca (Moskowitz, 1992; Moussaoui *et al.*, 1993a). A dura-máter e os vasos sangüíneos são inervados pelas fibras aferentes sensoriais do nervo trigêmio, as quais quando ativadas, liberam neuropeptídeos como por exemplo a substância P e o peptídeo gene relacionado com a calcitonina resultando em vasodilatação e extravasamento plasmático. As fibras trigeminais também se projetam para o núcleo caudal trigeminal dentro da medula oblonga onde fazem sinapse com neurônios secundários sensoriais que se projetam para centros superiores do cérebro. A ativação destas vias da dura-máter possivelmente estão relacionadas com as crises de enxaqueca

e provavelmente podem fazer surgir as dores, náuseas e outros sintomas mediados centralmente, associados com esta síndrome (Ferrari, 1998).

Assim, o aumento do extravasamento plasmático como veremos a seguir, é um importante componente da inflamação neurogênica, sendo um fenômeno característico dos tecidos peptidérgicos podendo desencadear mecanismos de dor no sistema nervoso central (Figini *et al.*, 1997).

1.3. - Extravasamento plasmático

Em condições fisiológicas, o balanço dos fluidos é mantido por dois conjuntos de forças que se opõem. A pressão hidrostática que promove no leito vascular o movimento dos fluidos para fora do vaso, enquanto que em contra partida temos a pressão coloidosmótica, que é a pressão osmótica provocada pelas proteínas plasmáticas que causam o movimento dos fluidos para dentro do lumen vascular (Gore e McDonagh, 1980).

Aumento na permeabilidade dos vasos induzido por inflamação conduz à saída de um plasma rico em proteínas para o meio extra vascular (extravasamento plasmático). O extravasamento de macromoléculas plasmáticas para o meio

intersticial aumenta a osmolaridade deste meio e causa maior extravasamento plasmático (Rapoport *et al.*, 1979; Morrison e Ryan, 1987).

O movimento dos fluidos entre os meios intra e extra vasculares é regulado pelo endotélio vascular o qual forma uma barreira com permeabilidade seletiva. Normalmente as trocas são dependentes de um endotélio intacto o qual permite a livre passagem de água, íons, e pequenos solutos, mas limita a passagem de macromoléculas plasmáticas (Goldie e Pedersen, 1995). Junções interendoteliais aparentam ser as regiões aonde a maioria das trocas de solutos e transferências de macromoléculas ocorrem (Svensjo e Grega, 1986). A integridade destas junções é assim o principal determinante da permeabilidade endotelial.

O extravasamento plasmático induzido por mediadores inflamatórios ocorre exclusivamente nas vênulas pós-capilares. A formação de poros induzidos por mediadores inflamatórios nas células endoteliais é provavelmente devido à contrações e modificações da sua forma. Na verdade as células endoteliais contem proteínas contráteis como a actina e a miosina, similares às encontradas nas células da musculatura lisa. Assim, a contração das células endoteliais provocaria o aumento da permeabilidade das macromoléculas

(Drenckhahn e Wagner, 1986; Renkin, 1986).

Os capilares de diferentes tecidos variam consideravelmente, tanto anatômica quanto funcionalmente. Entre células endoteliais adjacentes, os poros e as fendas podem variar de 50 à 90 Å de largura quando as células estão contraídas. Quando relaxadas os poros podem variar entre 30 e 40 Å. O citoplasma das células endoteliais apresentam vesículas pinocíticas que estão relacionadas com o transporte de substâncias através das células. Basicamente três tipos diferentes de estruturas capilares são observadas com a microscopia eletrônica onde podemos distinguir quanto a base de continuidade, diferentes barreiras de filtração (Majno, 1965; Zhao *et al.*, 1998). O primeiro tipo são chamados de capilares descontínuos, que se caracterizam por apresentarem largos poros com grande permeabilidade tanto para proteínas como para células. Encontramos este tipo de capilar principalmente no fígado, medula óssea, e baço. O segundo tipo de capilar se caracteriza por fenestrações, que são poros que se abrem ou fecham conforme as necessidades do tecido. Encontramos principalmente nas células glandulares, nas vilosidades intestinais, glomérulos e na dura-máter. O terceiro tipo são chamados de capilares contínuos, onde não ocorre a formação de aberturas

intercelulares mas o transporte é feito principalmente por pinocitose. Vamos encontrar este tipo principalmente no endotélio cerebral, e nos nódulos linfáticos (Korner, 1974; Tuomanen *et al.*, 1993) (Fig 4).

Alguns corantes como por exemplo o Azul de Evans podem se ligar à proteínas, e com isto podemos detectar e quantificar o extravasamento plasmático (Pettersson *et al.*, 1993) (Fig 4).

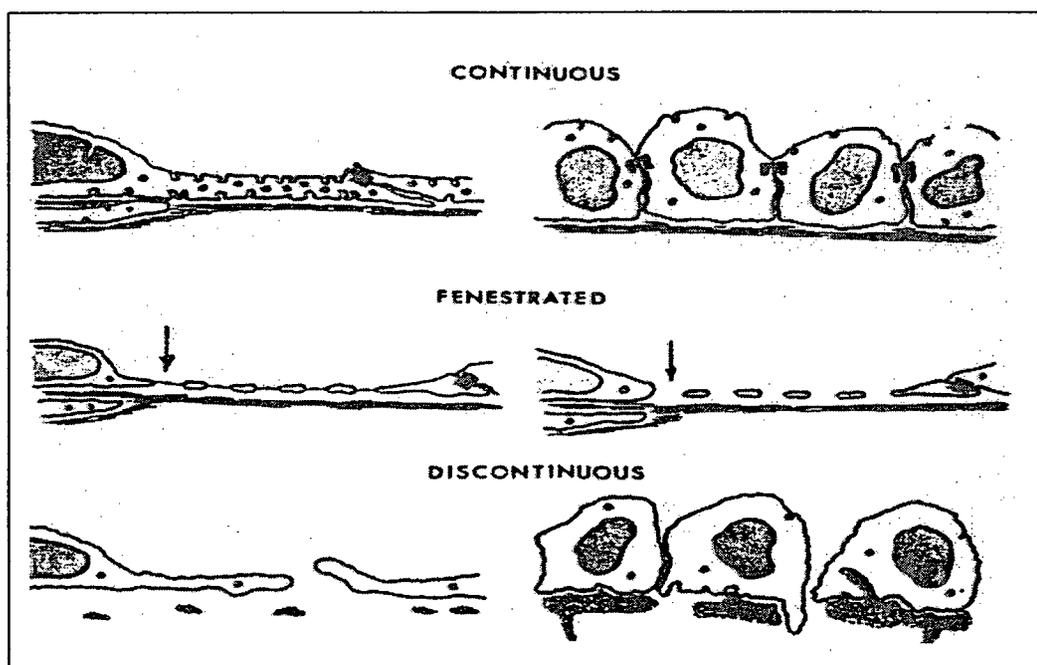


Fig 4 - Diferentes tipos de estruturas capilares em diferentes tecidos. Extraídos de Cooper *et al.*, 1996.

A medida do extravasamento de azul de Evans tem sido usado para avaliar a permeabilidade do cérebro e medula em

modelos animais de isquemia, trauma e hemorragia, e a espectrofotometria é uma das técnicas desenvolvidas para quantificar o extravasamento de azul de Evans no tecido neural. (Warwick *et al*, 1995)

1.4. -Quercetina

Bioflavonóides são compostos polifenólicos naturalmente presentes no reino vegetal. Os bioflavonóides são encontrados em vários produtos alimentares e plantas, incluindo frutas, vegetais chás e vinho tinto (Shoskes, 1998). O consumo diário é estimado de 3 a 8mg, sendo que em mais de 50% dos bioflavonóides encontrados são compostos pela quercetina (Hertog *et al.*, 1995) (Fig 5). Eles são absorvidos através da ingestão de alimentos e lentamente eliminados através do dia (Hollman *et al.*, 1996). Os flavonóides foram considerados inertes e não essenciais a saúde humana durante muito tempo. Entretanto, estudos recentes tem demonstrado que estes compostos afetam vários sistemas biológicos nos mamíferos (Middleton e Kandaswami, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1997). A quercetina é um bioflavonóide componente de vários extratos vegetais como *Achyrocline satureoides* conhecida popularmente como marcela. O extrato hidroalcoólico desta planta

demonstrou atividade anti-inflamatória em ratos (Simões *et al.*, 1988).

Dependendo de suas estruturas moleculares, e em particular a posição do grupo hidroxila no anel fenil, alguns autores tem demonstrado que isto influencia e modula a potente ação inibitória que os flavonóides apresentam sobre inúmeras quinases envolvidas na transdução de sinais, principalmente sobre a proteína quinase C e tirosina quinase (Nd *et al.*, 1987; Geahien *et al.*, 1989; Formica e Regelson, 1995). Muitos destes efeitos são dirigidos no sentido de competir através dos sítios de ligação do ATP sobre o sítio de domínio catalítico do fosfatidilinositol 3 – quinase, embora ainda outros mecanismos possam existir (Ferriola *et al.*, 1989; Cushman *et al.*, 1991; Middleton e Kandaswami, 1993; Agullo *et al.*, 1997).

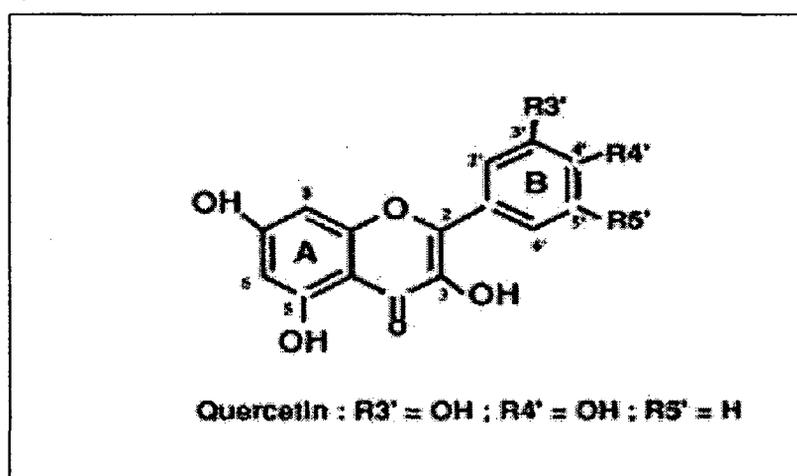


Fig 5 – Estruturas química da molécula de quercetina.
Extraído de Agullo *et al.*, 1997

Dependendo de suas estruturas moleculares, e em particular a posição do grupo hidroxila no anel fenil, alguns autores tem demonstrado que isto influencia e modula a potente ação inibitória que os flavonóides apresentam sobre inúmeras quinases envolvidas na transdução de sinais, principalmente sobre a proteína quinase C e tirosina quinase (Nd *et al.*, 1987; Geahlen *et al.*, 1989; Formica e Regelson, 1995). Muitos destes efeitos são dirigidos no sentido de competir através dos sítios de ligação do ATP sobre o sítio de domínio catalítico do fosfatidilinositol 3 – quinase, embora ainda outros mecanismos possam existir (Ferriola *et al.*, 1989; Cushman *et al.*, 1991; Middleton e Kandaswami, 1993; Agullo *et al.*, 1997).

Vários estudos tem demonstrado que flavonóides e compostos relacionados são eficientes para inibir a síntese e a liberação de mediadores químicos da inflamação como a histamina assim como a fosfolipase A₂, a enzima responsável pela síntese do ácido araquidônico e a subsequente formação de prostanóides e leucotrienos (Lindahl e Tagesson, 1993). A quercetina em particular mostrou significativa atividade pró-inflamatória através da inibição de enzimas do metabolismo das cininas como a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Formica e Regelson, 1995; Hansen *et al.*, 1995).

Os bioflavonóides também diminuem a injúria tecidual pós reperfusão em um tecido isquêmico e apresentam características imunossupressoras (Shoskes, 1998). Assim a quercetina funciona como um poderoso antioxidante, atuando desse modo como um fator de proteção cardiovascular por diminuir a oxidação do LDL que é uma das etapas da formação das placas ateroscleróticas (Hertog *et al.*, 1995; Manach *et al.*, 1998; Van Acker *et al.*, 1998). Além disso, exibe efeitos anti-tumorais *in vitro*, inibindo o desenvolvimento do câncer em modelos experimentais em animais (Morand *et al.*, 1998), apresentando também a propriedade de proteger as células da apoptose (Yokoo e Kitamura, 1997). Também inibe a indução de interleucina-8 e liberação de lactato pelas células gliais C6, bem como a expressão da proteína-1 de quimioatração de monócitos pelo fator alfa de necrose tumoral (Sato *et al.*, 1997; Volk *et al.*, 1997). Além disso, a quercetina tem demonstrado possuir atividade antiviral e carcinostática e efeitos antioxidantes (Morel *et al.*, 1993; Formica e Regelson, 1995; Kostyuk *et al.*, 1996; Skaper *et al.*, 1997). Recentes estudos relacionados a resposta celular ao choque térmico tem demonstrado que a quercetina suprime tal resposta por regulação inibitória do fator de choque térmico (HSF), sendo que as células expostas a situações de estresse causada pelo

calor não sintetizaram esta proteína (Nagai *et al.*, 1995). Finalmente a expressão do RNAm da metalotioneína em culturas de astrócitos primários em ratos neonatal foi inibida pela quercetina (Conklin *et al.*, 1998).

Certos flavonóides são conhecidos por interferirem com inúmeras enzimas implicadas em processos patológicos tais como adenosina deaminase (Koch *et al.*, 1992); AMPc fosfodiesterase e HIV-1 proteinase. (Middleton e Kandaswami, 1993; Capasso *et al.*, 1998). Na inibição da leucina aminopeptidase pelos flavonóides, somente aqueles compostos com uma dupla ligação no segundo e terceiro carbono demonstraram atividade. Estas duplas ligações conferem aos flavonóides certas propriedades conformacionais que os capacitam para interagir com as membranas celulares. Desta forma uma determinada conformação parece ser necessária para poder inibir as metalopeptidases de membrana (Price e Middleton, 1986; Parellada e Guinea, 1995). Alguns bioflavonóides são inibidores específicos de proteínas tirosina quinases (Akiyama *et al.*, 1987), ao passo que para a quercetina suas propriedades inibitórias não são seletivas, extendendo-se a várias proteínas serina/treonina quinases e lipídios quinases (Geschwendt *et al.*, 1983; Levy *et al.*, 1984; End *et al.*, 1987). Estes inibidores podem ser ferramentas úteis

para a elucidação de processos celulares que são mediados pelos fatores de crescimento ou fosforilação da tirosina ou serina/treonina hormônio-dependente (Chang e Geahlen, 1992).

Pela característica química da quercetina de não ser hidrossolúvel, utilizamos em nosso estudo o dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% para solubilizá-la. O DMSO é um solvente miscível em água que apresenta amplas aplicações na biologia celular (Quinn e Yu, 1994). Por causa de sua ação sobre a estabilidade da matriz líquida das membranas celulares ele é largamente usado como um agente crioprotetor em uma variedade de células e tecidos permitindo um prolongado armazenamento a temperaturas abaixo de zero. DMSO é também conhecido por atuar como um indutor da diferenciação celular e como um varredor de radicais livres e radioprotetor. Aplicações tópicas de DMSO tem também demonstrado ser efetiva na prevenção de lesões leves de tecidos após contato com drogas citotóxicas (Bertelli *et al.*, 1995).

1.5. - Meninges e barreira hematoencefálica

O sistema nervoso central é sustentado e protegido pelas meninges, três membranas de tecido conjuntivo situadas entre o encéfalo e os ossos do crânio e entre a medula espinhal e

coluna vertebral. São elas de fora para dentro: 1) dura-máter 2) aracnóide e 3) pia-máter (Helmer, 1995).

A dura-máter é uma forte membrana fibrosa, formada por duas camadas, as quais se encontram fundidas e se aderem à superfície interna dos ossos cranianos, exceto nas regiões onde essas camadas se separam para formar os seios venosos que levam o sangue para as veias do pescoço (Carpenter e Sutin, 1983).

A aracnóide é uma membrana fina e delicada que reveste levemente o encéfalo e a medula espinhal. A parede externa da aracnóide está aderida à dura-máter. Estendendo-se para dentro à partir dessa parte externa, existem numerosas projeções semelhantes a teias de aranha ou trabéculas que se prendem à pia-máter. A pia-máter é a delgada membrana que reveste intimamente o encéfalo e a medula espinhal. É muito vascularizada contendo finos vasos sanguíneos que suprem o encéfalo e a medula espinhal (Brodal, 1992).

Os espaços meníngeos, são basicamente três. O primeiro é o espaço epidural que fica situado entre o osso e a dura-máter, enquanto que o espaço subdural fica situado entre a dura-máter e a aracnóide. Ambos podem tornar-se espaços reais se neles ocorrer acúmulo de sangue, devido à hemorragias epidurais ou subdurais, causadas pelo rompimento

traumático dos vasos sanguíneos que passam por esses espaços (Martin, 1996) (Fig 6).

O terceiro espaço é o espaço subaracnóide. Este fica situado na área entre a aracnóide e a pia-máter e contém o líquido cefalorraquidiano. O espaço subaracnóideo se comunica com as cavidades ou ventrículos do encéfalo onde é formado o líquido cefalorraquidiano. Também estão localizados nos espaços subaracnóides os trechos iniciais dos nervos cranianos e espinhais bem como numerosos vasos sanguíneos na superfície do encéfalo e da medula espinhal. Acidentes vasculares envolvendo esses vasos resultam em hemorragia subaracnoidea (Young e Young, 1997) (Fig 6).

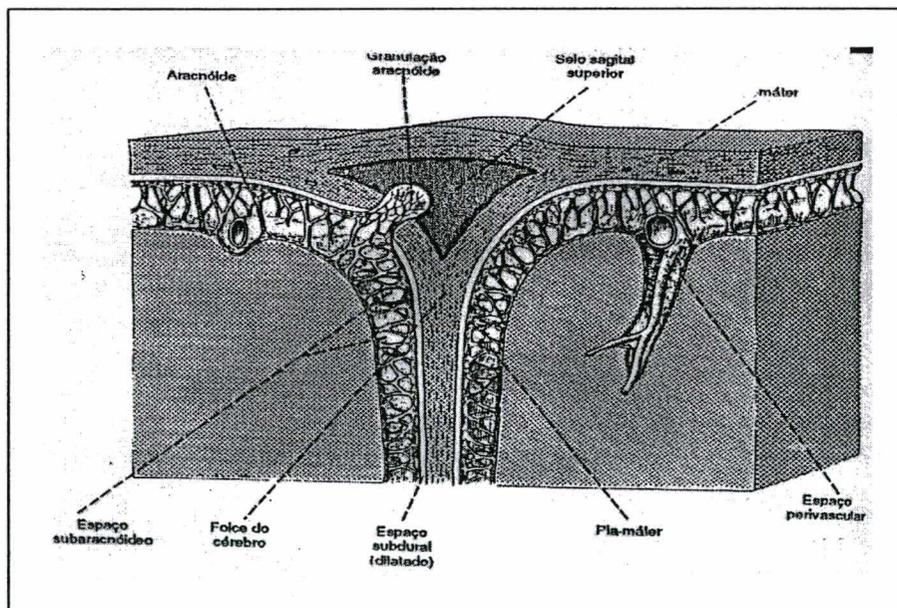


Fig 6 – Corte coronal das meninges cranianas mostrando um seio venoso e as pregas durais. Extraído de Young e Young, 1997.

A dura-máter é irrigada por várias artérias, onde a principal é a artéria meníngea média, ramo da artéria maxilar. Um ramo frontal irriga a porção anterior da dura-máter e um ramo vai para a porção parietal. Os vasos meníngeos também são nutridores dos ossos do crânio (Haines, 1995) (Fig 7, Fig 8). O encéfalo está irrigado por duas artérias carótidas internas e por duas artérias vertebrais. As primeiras irrigam principalmente os lobos frontais, parietais e temporais e as últimas, os lobos temporais e occipitais.

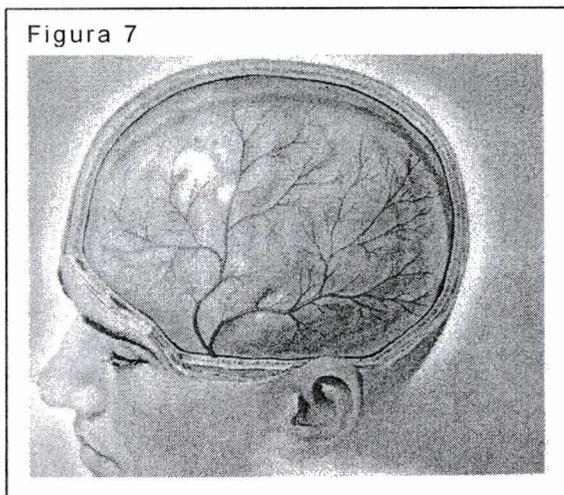


Fig 7 – Artéria meníngea média irrigando a dura-máter.

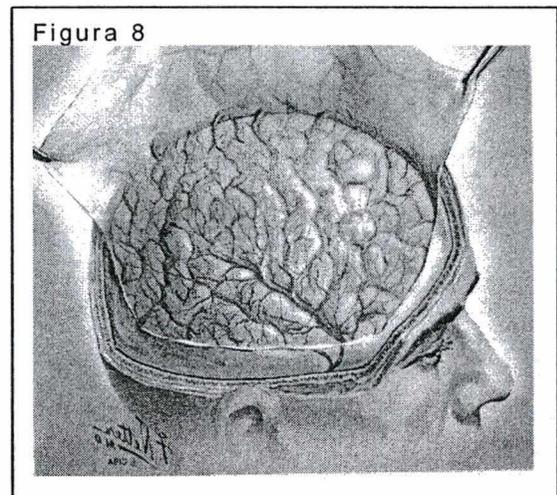


Fig 8 – Abertura da dura-máter e presença das artérias cerebrais.

A dura-máter como o couro cabeludo é inervado pelos nervos trigêminos e cervicais, sendo que as fibras autônomas vão sobretudo para os vasos. A dura-máter da fossa anterior do crânio é inervada pelo nervo oftálmico. A fossa média é

inervada por ramos meníngeos dos nervos maxilares e mandibulares. E a fossa posterior recebe ramos do vago e do hipoglosso e ambos contém fibras espinhais (primeiro e segundo nervos cervicais). O encéfalo normalmente é insensível a estímulos dolorosos e as cefaléias são em geral de origem vascular (intra ou extra cranianas) ou devido a alterações ocorridas nas meninges (Martin, 1996).

Os tecidos que se interpõem entre o sangue e o sistema nervoso incluem (1) uma parede vascular (2) uma lâmina interna e (3) outra externa de uma bainha perivascular que se encontra provavelmente em continuidade com o espaço subaracnóideo (Reese e Karnovsky, 1967) (Fig 5).

As lâminas internas e externas da bainha peri-vascular fundem-se ao nível das arteríolas e vênulas. A bainha gradualmente desaparece e ao nível de capilar é substituída por uma bainha constituída por projeções dos prolongamentos dos astrócitos os quais apresentam pés terminais vasculares que revestem os capilares. As células endoteliais dos capilares formam uma camada contínua e se unem formando as junções íntimas (Ramon e Cajal., 1984). A regulação e a formação destas junções íntimas não estão totalmente elucidadas. Recentes estudos tem demonstrado que as superfícies luminal e abiuminal das células endoteliais possuem uma variedade de

receptores peptídicos os quais estão ligados a segundos mensageiros intracelulares. Isto implica que a complexa transdução de sinais ocorre dentro e entre as células endoteliais que compõem uma barreira entre o sangue e o sistema nervoso (Betz, 1992).

Estas duas características formam o que chamamos de barreira hematoencefálica, que de modo seletivo controla a passagem de substâncias químicas do sangue circulante para o sistema nervoso central. Assim somente compostos que apresentem apreciável solubilidade aos componentes lipídicos das células endoteliais são capazes de atravessarem a barreira hemato-encefálica por difusão (Goldstein e Betz, 1986; Tuomanem et al., 1993; Bartus et al., 1996) (Fig 9).

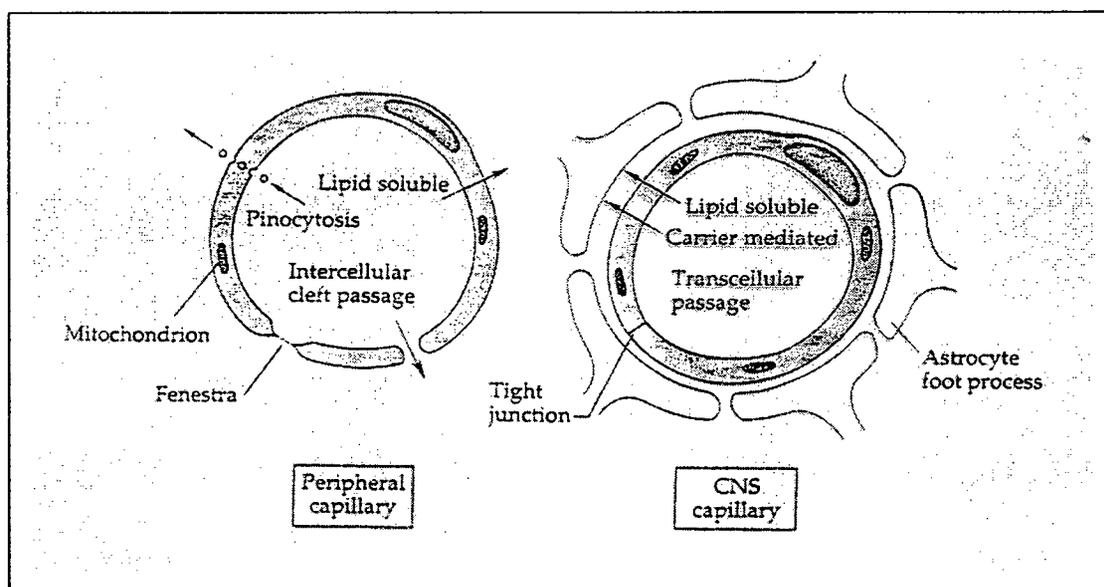


Fig 9 - Representação esquemática das características

morfológicas de capilares neuronais e não neuronais. Extraído de Vries et al., 1997.

Os astrócitos são as células mais numerosas do sistema nervoso e têm como funções a manutenção do balanço eletrolítico, produção de fatores neutróficos necessários à sobrevivência neuronal, bem como remover determinados transmissores das fendas sinápticas (Carpenter e Sutin, 1983). Os astrócitos são as primeiras células a apresentarem alterações em resposta a insultos do sistema nervoso central como a isquemia, traumas, irradiações e infecção (Andersson et al., 1992; Meneses, 1999).

2 - OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O extravasamento plasmático neurogênico, parte do fenômeno conhecido como inflamação neurogênica, tem sido bem caracterizado em ratos. Neste estudo procuramos avaliar o efeito da quercetina no extravasamento plasmático, induzido pela substância P em diferentes tecidos do sistema nervoso central.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o extravasamento plasmático induzido pela substância P em diferentes tecidos do sistema nervoso central de rato (cerebelo, bulbo olfatório e córtex), bem como na dura-máter e caracterizar o receptor envolvido neste efeito.

2. Investigar através do uso de inibidores enzimáticos específicos o papel da endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina uma vez que estas enzimas inativam a substância P.

3. Estudar o mecanismo de ação através do qual a quercetina potencia o extravasamento plasmático induzido pela substância P.

4. Identificar o mediador inflamatório responsável pelo extravasamento plasmático provocado pela quercetina através do uso de antagonistas específicos dos prováveis mediadores envolvidos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 200 e 300 g, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os experimentos seguiram os regulamentos oficiais de cuidado e tratamento com os animais que foram mantidos em gaiolas de 6 elementos cada, com água e ração sólida peletizada, ambos *ad libitum*. A sala de manutenção tinha temperatura ambiente climatizada e mantida entre 22° e 24° C em um ciclo claro e escuro de 12 horas (luz das 7 às 19 horas). As administrações das substâncias foram realizadas através da veia peniana dorsal utilizando agulhas 13 x 4,5. Em todos os grupos experimentais utilizamos 10 animais.

3.2. - Estudo do extravasamento plasmático.

3.2.1 – Azul de Evans como marcador.

O corante de azul de Evans foi usado como marcador para a quantificação do extravasamento plasmático, pois quando injetado intravenosamente, este se liga a uma

proteína plasmática, a albumina, e assim permanece dentro do sistema vascular. Somente irá ocorrer extravasamento plasmático deste corante fluindo para os tecidos, na presença de mediadores químicos que promovam a formação de poros ao longo do endotélio das vênulas pós-capilares. O extravasamento plasmático foi avaliado pela medida do conteúdo de azul de Evans nos tecidos selecionados.

3.2.2 – Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso através da via intraperitoneal. As veias jugulares foram dissecadas através de incisão na região cervical anterior e isoladas com fio de algodão para posterior perfusão e secção. Após anestesia e dissecação das veias, os animais foram submetidos a diversos tratamentos conforme protocolo experimental adiante. Subsequentemente o extravasamento plasmático dos diversos órgãos em estudo, era avaliado como descrito a seguir.

Foi administrado intravenosamente, na dose de 20mg/Kg, uma solução do corante de azul de Evans na concentração de 25 mg/ml em salina 0,9%. Depois de 15 minutos o tórax foi

aberto e uma cânula foi colocada no interior da aorta através do ventrículo esquerdo para perfusão de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) para a circulação cerebral sendo as veias jugulares cortadas (Mossauoui *et al.*, 1993b). Os animais foram perfundidos com 60 ml dessa solução por 3 minutos para a remoção do corante da circulação cerebral. Subsequentemente ocorreu a decapitação com posterior incisão no couro cabeludo e calota óssea na altura da sutura sagital, desde o focinho até a base do crânio. Após craniotomia na sutura sagital com posterior afastamento das porções cranianas, o encéfalo foi retirado. Cuidadosamente fez-se o descolamento da dura-máter da estrutura óssea craniana e em seguida foram separados dois fragmentos de tamanhos e pesos semelhantes. Também foram removidos e separados dois fragmentos dos seguintes tecidos: cerebelo, bulbo olfatório e córtex. Os tecidos foram lavados em salina e em seguida rapidamente colocados em papel filtro e imediatamente pesados. Um fragmento de cada tecido foi seco em estufa a 50° C por 24 horas e repesados. O azul de Evans foi extraído dos tecidos remanecentes por incubação em formamida na concentração de 4 ml/mg de tecido na temperatura ambiente por 24 horas. Para a medida de densidade óptica da solução de azul de Evans foram retiradas

alíquotas de 75µl de cada tecido incubado em formamida e colocadas em placas de 96 poços apropriadas para a leitura em um Leitor de Elisa (Titertek Multiskan). Um filtro que permitia a leitura de comprimento de onda de 620 nm foi utilizado. O conteúdo do azul de Evans de cada tecido foi expresso em microgramas de azul de Evans por grama de tecido seco para serem evitados erros decorrentes da possível formação de edema (Nicoiau *et al.*, 1993). O azul de Evans extravasado foi quantificado pela interpolação em uma curva padrão de diluição do corante em uma concentração de 0,5 – 25 µg/ml de azul de Evans em formamida e expresso como µg de corante/g tecido seco (Warwick *et al.*, 1995).

Assim, os resultados foram expressos em µg de azul de Evans/g de tecido seco, onde o produto de Abs x K é dividido pela relação do peso seco/peso úmido.

Abs = leitura espectrométrica da absorbância em 620 nm.

K = constante calculada a partir da curva padrão de azul de Evans.

3.3. – Grupos experimentais

3.3.1 – Avaliação do extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex

Em uma série de experimentos os ratos receberam inibidores seletivos enzimáticos, antagonistas seletivos e substância P. O primeiro grupo realizado foi o grupo controle administrando-se azul de Evans mais solução salina a 0,9%. No segundo e terceiro grupo o extravasamento plasmático foi induzido pelo agonista dos receptores NK-1, substância P (10 e 30 nmol/Kg, i.v.), associado com azul de Evans. No quarto grupo o antagonista do receptor NK-1, RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.), foi dado 15 minutos antes da injeção intravenosa da associação da substância P e azul de Evans.

3.3.2 – Investigação da participação da enzima endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina através do uso de inibidores enzimáticos específicos

Nestes grupos, dois inibidores, captopril (10 nmol/kg, i.v.) e fosforamidon (2,5 µmol/Kg, i.v.), da enzima conversora da angiotensina (ECA) e da enzima endopeptidase neutra (NEP),

respectivamente, foram injetados 15 minutos antes da administração da combinação do azul de Evans e substância P

3.3.3 – Avaliação do papel da quercetina no extravasamento plasmático.

No grupo seguinte, a quercetina (30 mg/Kg, v.o.) foi administrada uma hora antes da injeção intravenosa da associação de azul de Evans e da substância P. A quercetina foi dissolvida em solução de dimetilsufóxido (DMSO) a 10 %.

3.3.4. – Identificação do mediador inflamatório envolvido no extravasamento plasmático através do uso de antagonistas seletivos

Os antagonistas RP 67580 (10 nmol/Kg) e HOE 140 que é um antagonista do receptor BK B₂ (10 nmol/kg) foram administrados intravenosamente e de forma simultânea com a quercetina via oral e 1 hora após foi administrado o azul de Evans. Em todos os grupos 15 minutos após a injeção de azul

de Evans os animais foram perfundidos conforme descrito anteriormente.

3.4. - Análise Estatística

Os resultados foram expressos sob a forma de média \pm erro padrão da média (\pm EPM) e os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via) seguido pelo teste de pos-Hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Como nível de significância para todos os métodos estatísticos, foi adotado um valor de $p < 0,05$. Esses procedimentos foram realizados através de um programa estatístico (Statistica versão 5.0 – Statsoft Inc.).

3.5. – Drogas

O corante azul de Evans, a formamida, o captopril e a quercetina foram obtidos do laboratório Sigma Chemicals Co (St Louis, Mo); a substância P e o RP 67580 foram gentilmente doados pelo Dr Regoli, (University of Sherbrooke, Quebec, Canadá). O DMSO foi obtido do laboratório Merck. O HOE 140 (D-Arg-[Hyp3,thi5,D-tic7,Oic8]-bradicinina) e o Fosforamidon-

N-(Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-leu-trp foram obtidos do laboratório RBI e o pentobarbital sódico (Hypnol®) foi obtido do laboratório Cristália, Brasil.

3.6. - Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: 1- Espectrofotômetro Titertek Multiskan (Flow Laboratories, McLean, Va.) equipado com filtro de leitura em 620 nm de comprimento de onda para 96 poços. 2- Bomba Dosadora Peristáltica Milan modelo 202. 3- Balança de precisão (0 - 0,1mg) marca Sartorius.

4 - RESULTADOS

A administração intravenosa da substância P (10 nmol/Kg) induziu um aumento significativo de 52% no extravasamento plasmático de azul de Evans na dura-máter em relação ao grupo controle (Fig. 1, Tab I). Contudo, este neuropeptídeo não afetou o extravasamento do corante nos demais tecidos (cerebelo, bulbo olfatório e córtex). O aumento da dose da substância P para 30 nmol/Kg, i.v., induziu um aumento do extravasamento plasmático na dura-máter em 102% em relação ao grupo controle, portanto uma resposta dose relacionada, não modificando contudo o extravasamento plasmático dos outros tecidos (Fig. 1, Tab. I).

A administração isolada do antagonista seletivo para o receptor NK-1, RP 67580 (10 nmol/Kg i.v.), não modificou o extravasamento plasmático de nenhum dos tecidos analisados (Fig. 2). Entretanto, o pré-tratamento com este antagonista na mesma dose, 15 minutos antes da administração da substância P, reduziu significativamente em 22% o extravasamento plasmático na dura-máter comparado ao efeito da substância P administrada isoladamente. (Fig. 2, Tab. II).

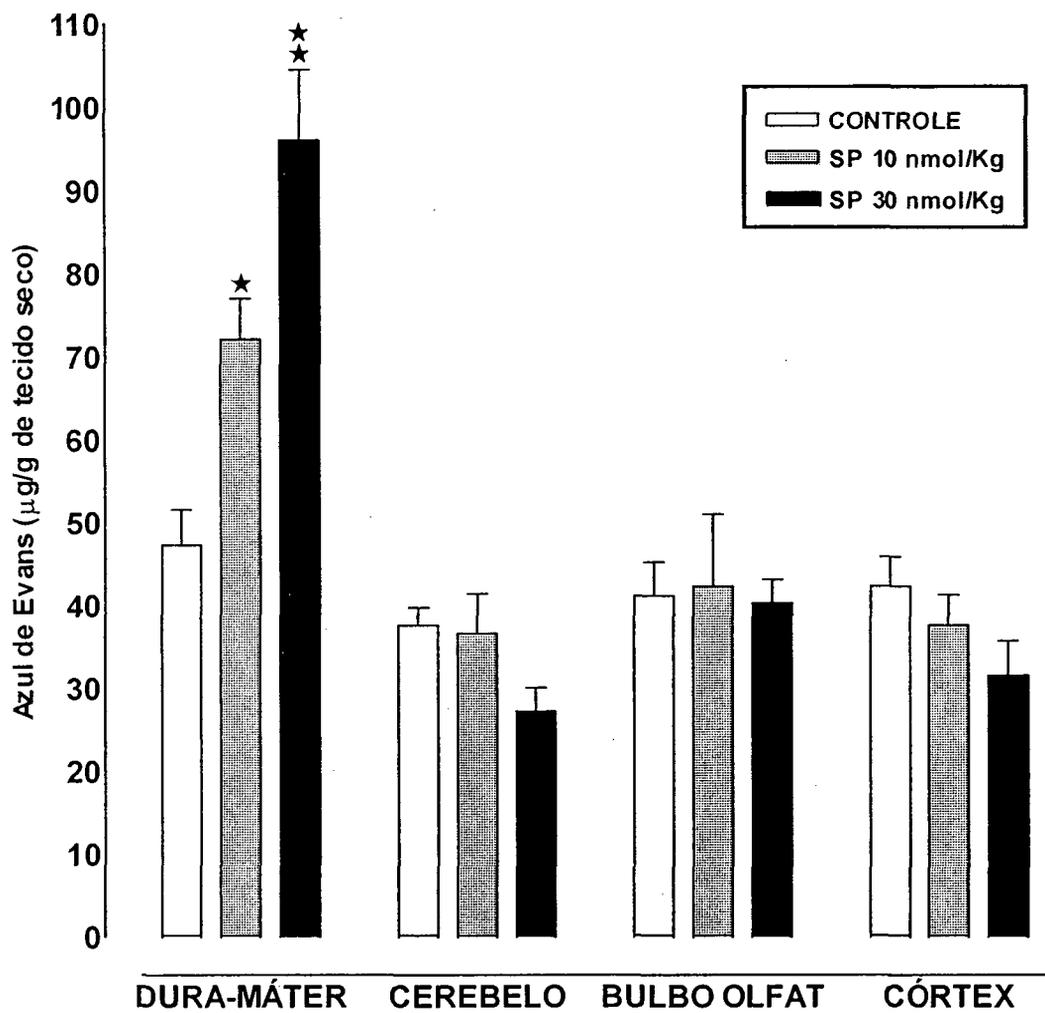


FIGURA 1 - Efeito da substância P (SP, 10 e 30 nmol/Kg i.v.; n = 10) no extravasamento plasmático na dura mãe, cerebello , bulbo olfatório e córtex de rato. A concentração de azul de Evans de cada tecido foi usado como um índice quantitativo do extravasamento plasmático. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

* p < 0,05 e ** p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P em relação ao grupo controle.

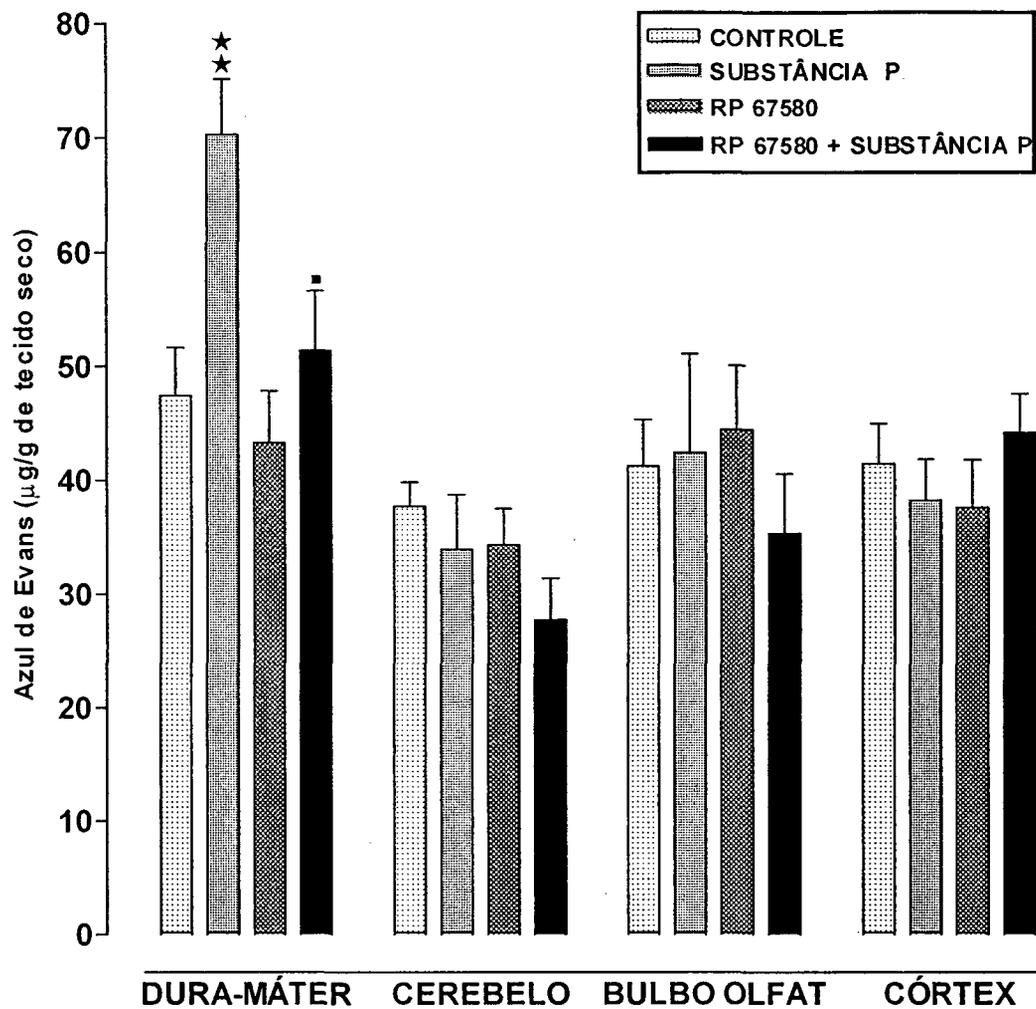


FIGURA 2 – Efeito da Substância P (SP, 10 nmol/Kg i.v.; n = 10) isolado ou em presença do antagonista RP 67580 (10 nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ $p < 0,05$ e ★ ★ $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P em relação ao grupo controle.

■ $p < 0,05$ e ■ ■ $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do antagonista NK-1 RP 67580 comparado com o extravasamento plasmático induzido pela substância P.

TABELA I – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração da substância P (10 e 30 nmol/Kg , i.v.; $n = 10$ por grupo). Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pos-Hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	BULBO OLFATÓRIO	CÓRTEX
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
SUBSTÂNCIA P 10 nmol/Kg	72,2 \pm 4,89 *	36,7 \pm 4,82	42,4 \pm 8,66	37,7 \pm 3,66
SUBSTÂNCIA P 30 nmol/Kg	96,1 \pm 8,43 **	27,3 \pm 2,80	40,4 \pm 2,80	31,6 \pm 4,20

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P em relação ao grupo controle.

TABELA II – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebello, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração da substância P (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10) isoladamente ou em presença de RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10). Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pós-Hoc e Newman Keuls para múltiplas comparações.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	BULBO OLFATÓRIO	CÓRTEX
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
SUBSTÂNCIA P	72,2 \pm 4,87 ★	36,7 \pm 4,82	42,4 \pm 8,66	37,7 \pm 3,66
RP 67580	43,3 \pm 4,53	34,3 \pm 3,21	44,4 \pm 5,62	37,6 \pm 4,18
SUBSTÂNCIA P + RP 67580	56,7 \pm 5,22 ■	26,7 \pm 3,68	38,0 \pm 5,23	44,2 \pm 3,38

★ $p < 0,05$ e **★** $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P em relação ao grupo controle.
■ $p < 0,05$ e **■** $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do antagonista NK-1 RP 67580 comparado com o extravasamento plasmático induzido pela substância P.

A administração intravenosa de captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina (10 nmol/Kg), 15 minutos antes da injeção de azul de Evans, induziu um aumento significativo no extravasamento plasmático em 43% na dura-máter em relação ao controle (Fig 3). Contudo observou-se uma significativa redução no extravasamento plasmático no cerebelo, bulbo olfatório e córtex em 28%, 41% e 36%, respectivamente, em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com captopril (10 nmol/kg i.v.) 15 minutos antes, potencializou significativamente o extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter em 61%, mas não afetou a quantidade de azul de Evans extravasado nos outros tecidos (Fig. 3, Tab. III).

A administração intravenosa de fosforamidon (2,5 μ mol/Kg), um inibidor da endopeptidase neutra, 15 minutos antes do azul de Evans, induziu um aumento significativo no extravasamento plasmático na dura-máter em 48% e no cerebelo em 34%, enquanto que foi observado uma tendência no aumento do extravasamento plasmático em bulbo olfatório e córtex. (Fig 4). O pré-tratamento com fosforamidon na mesma dose provocou aumento significativo do extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter em 30%, no cerebelo em 49%, no bulbo olfatório em 44% e no córtex em 40% (Fig. 4, Tab. III).

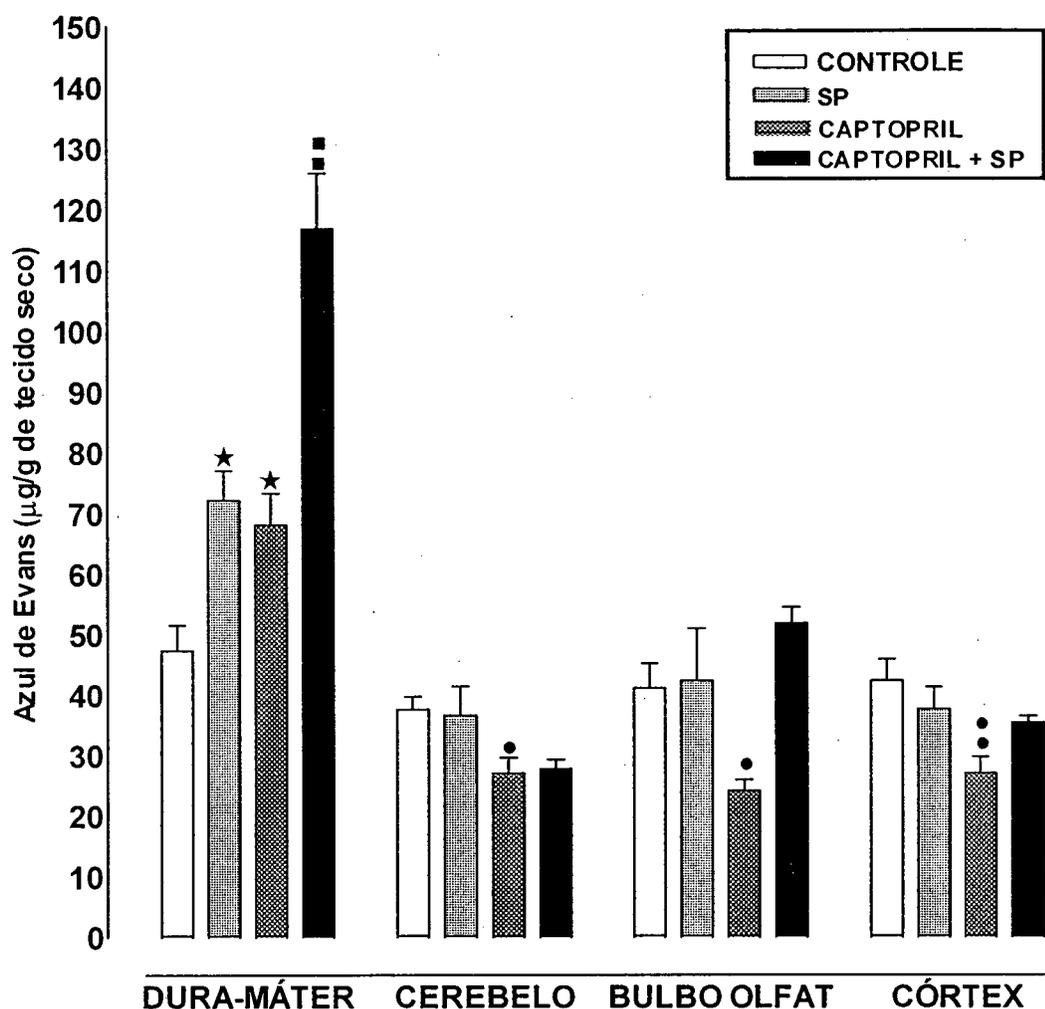


FIGURA 3 - Efeito do captopril (10 nmol/Kg i.v.; n = 10) e da sua associação com a substância P (SP, 10 nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P e captopril em relação ao grupo controle.

■ p < 0,05 e ■■ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do captopril associado à substância P em relação ao efeito da substância P isolada.

● p < 0,05 e ●● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do captopril comparada com o controle.

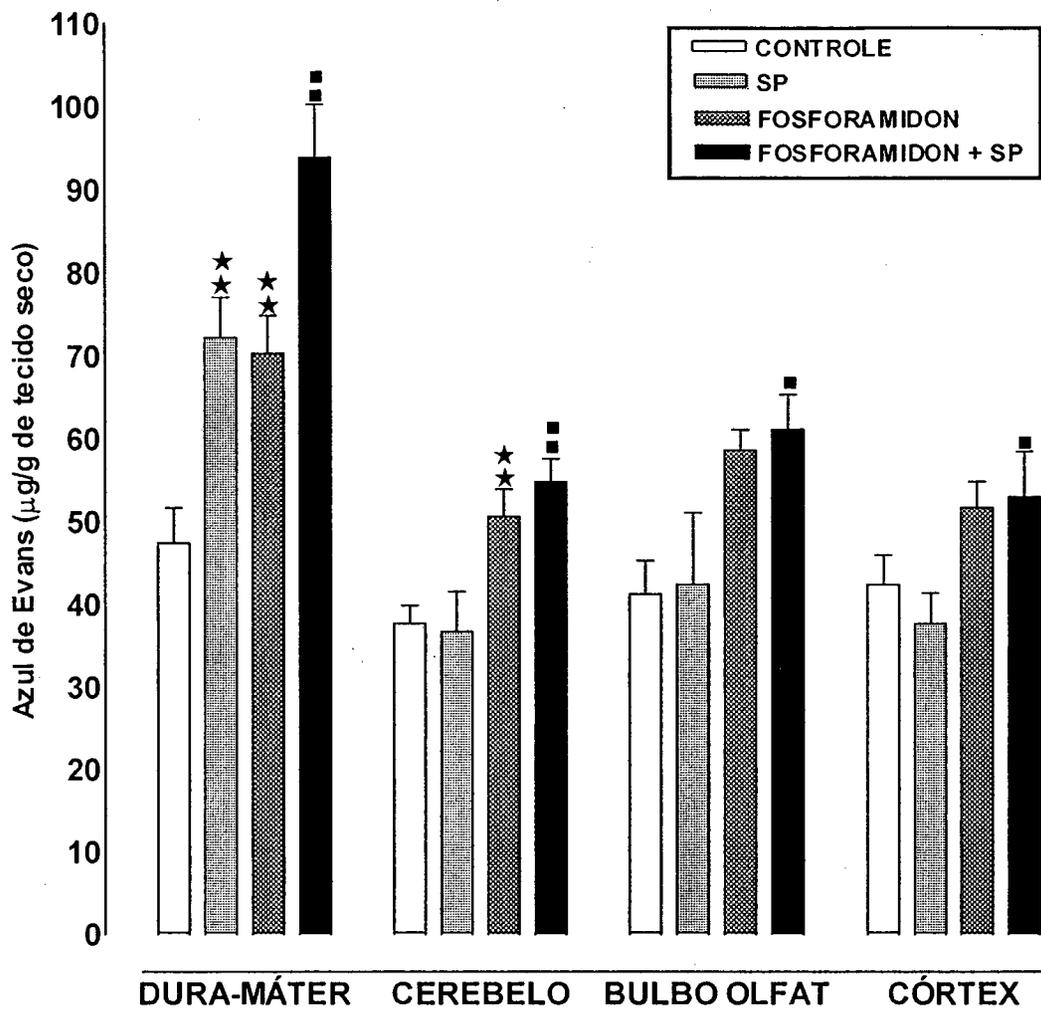


FIGURA 4 - Efeito do fosforamidon (2,5 µmol/Kg i.v.; n = 10) e da sua associação com a substância P (SP, 10nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P e do fosforamidon em relação ao controle.

■ p < 0,05 e ■■ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da associação do fosforamidon e da substância P em relação a substância P isolada.

TABELA III – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebello, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração de captopril (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10) e fosforamidon (2,5 $\mu\text{mol/Kg}$, i.v.; n = 10) isolados ou associado com a substância P (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10). Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pós-Hoc e Newman Keuls para múltiplas comparações.

	DURA- MÁTER	CEREBELO	BULBO OLFATÓRIO	CÓRTEX
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
SUBSTÂNCIA P	72,2 \pm 4,87 *	36,7 \pm 4,82	42,4 \pm 8,66	37,7 \pm 3,66
CAPTOPRIL	68,2 \pm 5,22 *	27,1 \pm 2,65 ●	24,2 \pm 1,86 ●	27,1 \pm 2,72 ●
CAPTOPRIL + SUBSTÂNCIA P	116,9 \pm 9,08 ■	27,9 \pm 1,51	51,9 \pm 2,68	35,5 \pm 1,04
FOSFORAMIDON	70,3 \pm 4,54 **	50,6 \pm 3,32 **	58,6 \pm 2,46	51,7 \pm 3,16
FOSFORAMIDON +SUBSTÂNCIA P	93,9 \pm 6,43 ■■	54,8 \pm 2,76 ■■	61,1 \pm 4,20 ■■	53,0 \pm 5,50 ■■

★ p < 0,05 e * p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P, captopril e fosforamidon em relação ao grupo controle.

■ p < 0,05 e ■■ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do captopril e do fosforamidon associados com a substância P comparados com o efeito da substância P isolada.

● p < 0,05 e ●● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do captopril comparada com o controle.

A administração oral do flavonóide quercetina (30 mg/Kg), 60 minutos antes do azul de Evans, induziu um aumento significativo no extravasamento plasmático na dura máter em 86%, no cerebelo em 31%, no bulbo olfatório em 37% e no córtex em 55%, comparado com os valores controle (Fig 5, Tab IV). O veículo da quercetina foi DMSO a 10% e este não afetou o extravasamento plasmático na dura-máter, no bulbo olfatório e córtex, mas foi observado uma significativa redução do extravasamento plasmático basal no cerebelo em 51% (Fig. 5, Tab. IV). O pré-tratamento com quercetina (30 mg/Kg, v.o.), 60 minutos antes, potencializou o extravasamento plasmático induzido pela substância P (10 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter em 39%. Contudo não afetou o extravasamento plasmático induzido pela substância P no cerebelo, bulbo e córtex (Fig. 6).

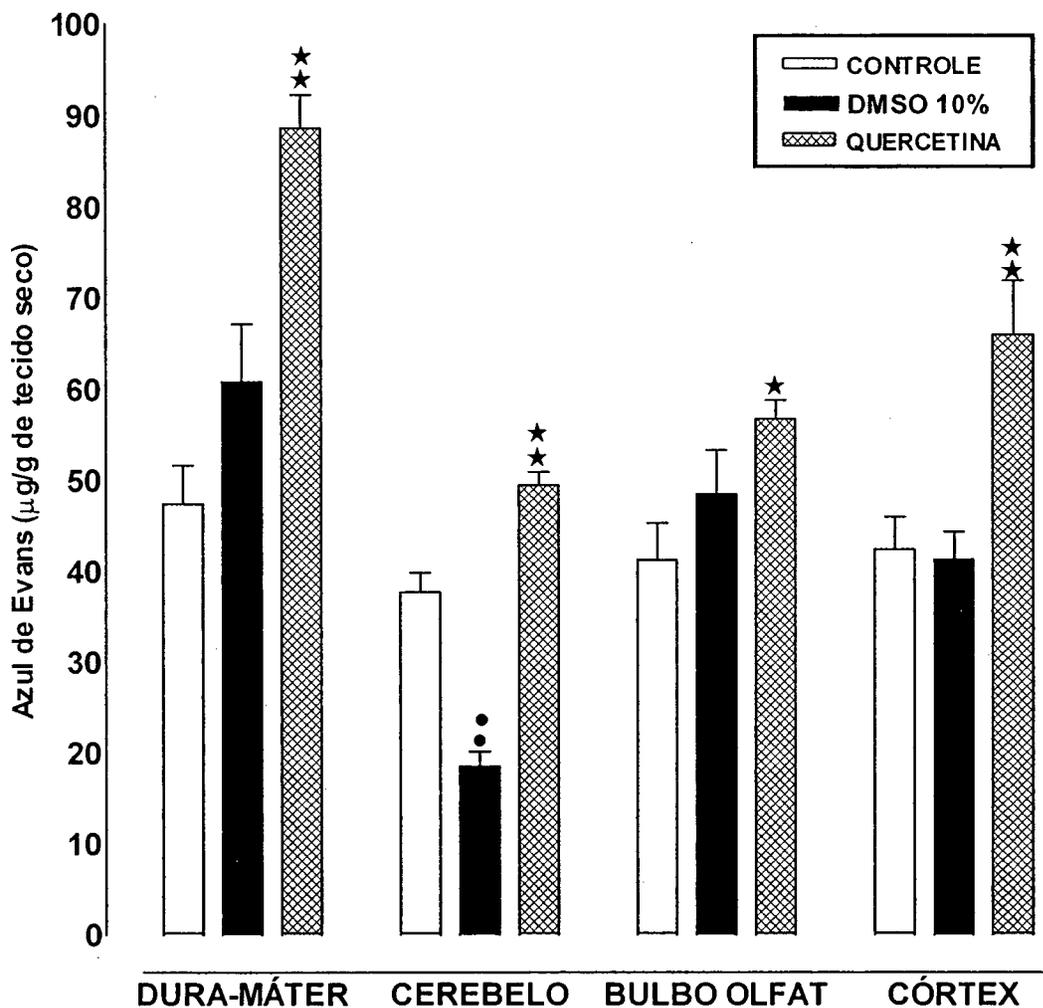


FIGURA 5 - Efeito da quercetina (30 mg/Kg v.o.; n = 10) ou seu veículo (DMSO 10%; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★ ★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina em relação ao controle.

● p < 0,05 e ● ● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do DMSO em relação ao controle.

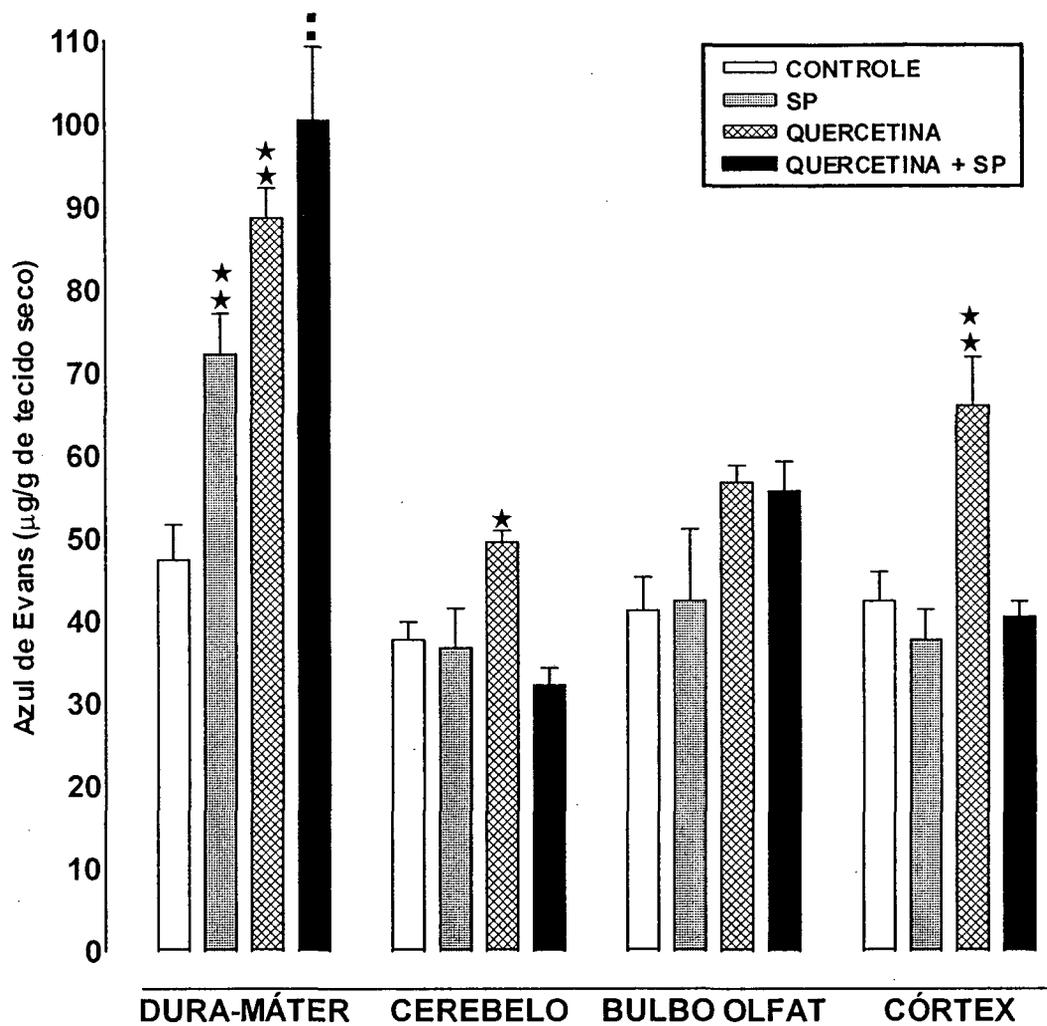


FIGURA 6 – Efeito da quercetina (30 mg/kg v.o.; n = 10) e da sua associação com a substância P (SP, 10 nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P e quercetina em relação ao controle.

■ p < 0,05 e ■■ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina associada à substância P em relação a substância P isolada.

TABELA IV – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração da quercetina (30 mg/Kg v.o.; n = 10) e seu veículo (DMSO 10%; n = 10) isoladamente. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pós-Hoc e Newmann Keuls para múltiplas comparações.

	<i>DURA- MÁTER</i>	<i>CEREBELO</i>	<i>BULBO OLFATÓRIO</i>	<i>CÓRTEX</i>
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
DMSO	60,8 \pm 6,34	18,5 \pm 1,63 ●●	48,5 \pm 4,85	41,3 \pm 3,03
QUERCETINA	88,6 \pm 3,66 ★★	49,5 \pm 1,42 ★★	56,7 \pm 2,09 ★	66,0 \pm 5,90 ★★

★ $p < 0,05$ e ★★ $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina em relação ao controle.

●● $p < 0,05$ e ●●● $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do DMSO em relação ao controle.

Procuramos comparar o efeito da quercetina com dois inibidores do metabolismo da substância P, captopril e fosforamidon (Tab V). Nestes experimentos não foram utilizadas doses equimoleculares da quercetina, captopril e fosforamidon, portanto não poderemos comparar as potências destes inibidores. Como pode ser observado, a quercetina, o captopril e o fosforamidon potencializaram o aumento do extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter em 39%, 61% e 30% respectivamente. O fosforamidon potencializou significativamente também o aumento do extravasamento plasmático induzido pela substância P no cerebelo, bulbo olfatório e córtex (Tab V).

Com o propósito de entender melhor o efeito da quercetina no aumento do extravasamento plasmático induzido pela sua administração isolada ou em associação com a substância P, utilizamos neste grupo experimental antagonistas seletivos da bradicinina e da substância P.

A quercetina (30 mg/Kg, v.o.) aumentou o extravasamento plasmático significativamente na dura-máter em 86%, no cerebelo em 31%, no bulbo olfatório em 37% e no córtex em 55%. O pré-tratamento com o antagonista do receptor BK B2, HOE 140 (10 nmol/Kg i.v.), 5 minutos depois da administração da quercetina por via oral, não alterou o extravasamento do

corante de azul de Evans induzido pela quercetina na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório ou córtex (Fig. 7, Tab. VI). O pré-tratamento com o antagonista dos receptores NK1 da substância P, RP 67580 (10 nmol/Kg i.v.), reduziu marcadamente o aumento do extravasamento plasmático induzido pela quercetina na dura-máter em 41%, no cerebelo em 17%, bulbo olfatório em 42%, e córtex em 38% (Fig. 8, Tab. VI).

TABELA V – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração da quercetina (30 mg/Kg, v.o.; n = 10) induzida pela substância P (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10), e dos inibidores da endopeptidase neutra (fosforamidon 2,5 $\mu\text{mol/Kg}$, i.v.; n = 10) e da enzima conversora da angiotensina (captopril 10 nmol/Kg, i.v.; n = 10) induzido pela substância P (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10). Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pós-Hoc e Newmann Keuls para múltiplas comparações.

	BULBO			
	DURA-MÁTER	CEREBELO	OLFATÓRIO	CÓRTEX
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
SUBSTÂNCIA P	72,2 \pm 4,87 *	36,7 \pm 4,82	42,4 \pm 8,66	37,7 \pm 3,66
QUERCETINA + SUBSTÂNCIA P	100,4 \pm 8,84 ■	32,2 \pm 2,04	55,7 \pm 3,55	40,5 \pm 1,83
CAPTOPRIL + SUBSTÂNCIA P	116,9 \pm 9,08 ■	27,9 \pm 1,51	51,9 \pm 2,68	35,5 \pm 1,04
FOSFORAMIDON +SUBSTÂNCIA P	93,9 \pm 6,43 ■	54,8 \pm 2,76 ■	61,1 \pm 4,20 ■	53,0 \pm 5,50 ■

* $p < 0,05$ e * * $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P em relação ao controle.

■ $p < 0,05$ e ■■ $p < 0,01$ indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina associado à substância P, do captopril associado à substância P e do fosforamidon associado à substância P com relação a substância P isolada.

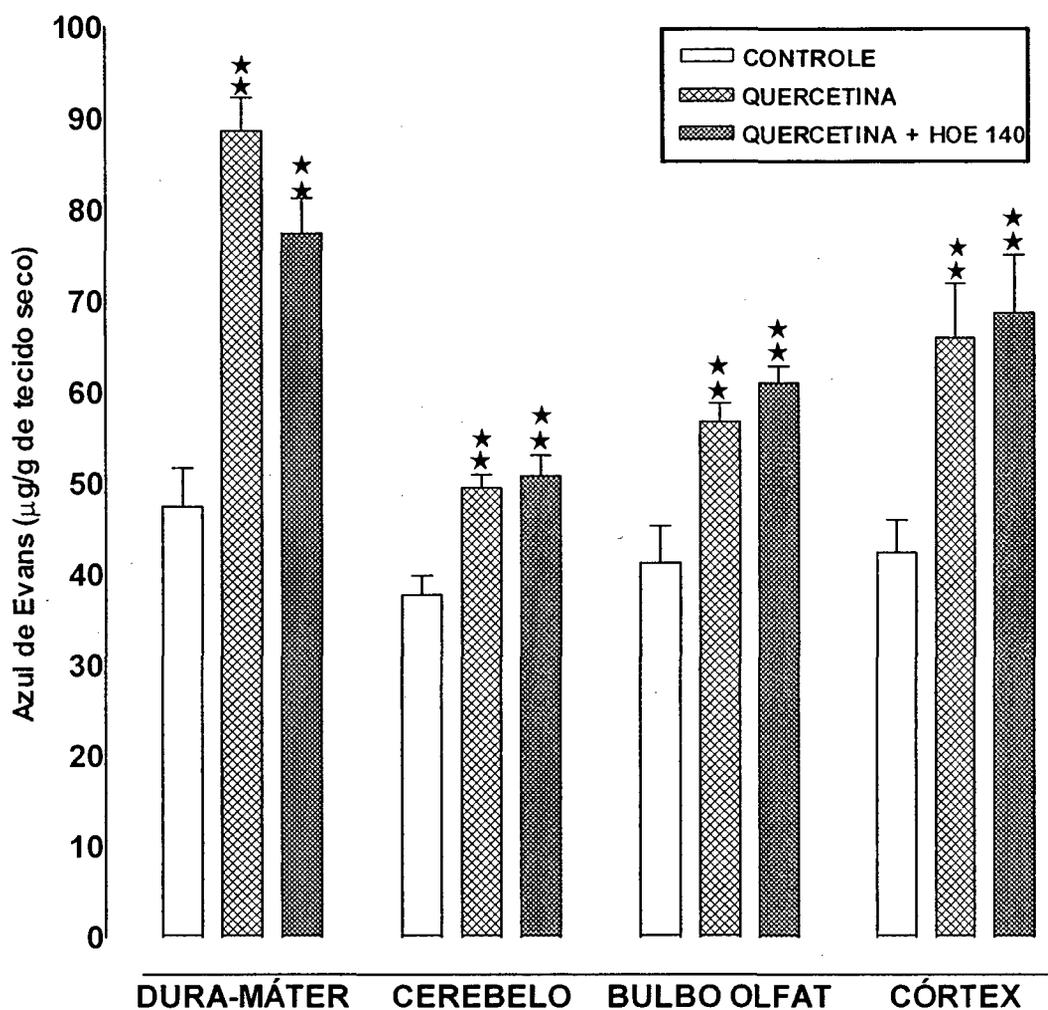


FIGURA 7 – Efeito da quercetina (30 mg/kg v.o.; n = 10) isolada ou em presença do antagonista HOE 140 (10 nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina isolada e da quercetina na presença do antagonista HOE 140 em relação ao controle.

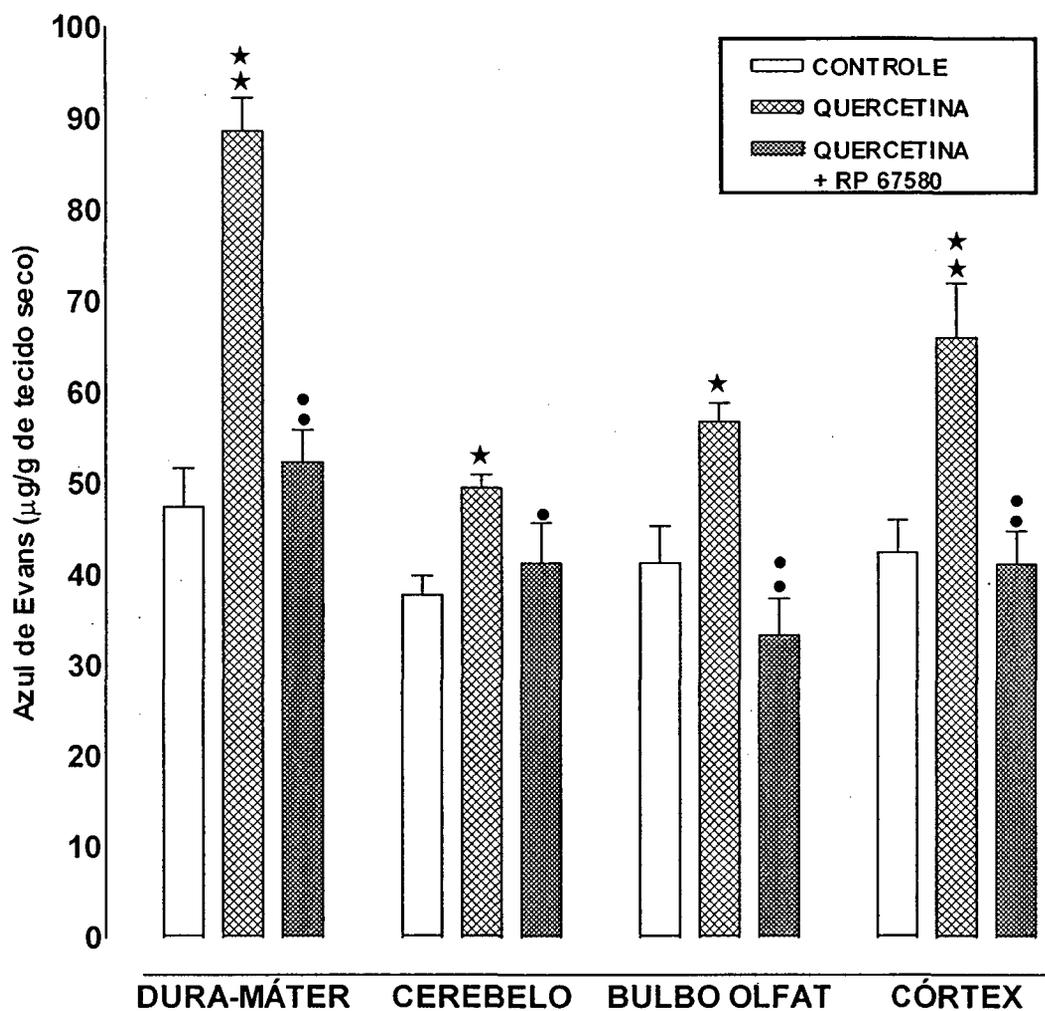


FIGURA 8 – Efeito da quercetina (30 mg/kg v.o.; n = 10) isolada ou em presença do antagonista RP 67580 (10 nmol/Kg i.v.; n = 10) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

★ p < 0,05 e ★★ p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina em relação ao controle.

● p < 0,05 e ●● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do antagonista RP 67580 em relação a quercetina isolada.

TABELA VI – Valores médios \pm erro padrão da média do extravasamento plasmático de azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido seco na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex de rato após a administração da quercetina (30 mg/Kg, v.o.; n = 10) isolada ou associada à substância P (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10), e na presença dos antagonistas HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.; n = 10) e RP 67580 (10nmol/Kg, i.v.; n = 10). Os grupos experimentais foram comparados com o controle e analisados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de pós-Hoc e Newmann Keuls para múltiplas comparações.

	BULBO			
	DURA-MÁTER	CEREBELO	OLFATÓRIO	CÓRTEX
CONTROLE	47,4 \pm 4,27	37,7 \pm 2,13	41,2 \pm 4,08	42,4 \pm 3,56
SUBSTÂNCIA P	72,2 \pm 4,87 *	36,7 \pm 4,82	42,4 \pm 8,66	37,7 \pm 3,66
QUERCETINA	88,6 \pm 3,66 **	49,5 \pm 1,42 *	56,7 \pm 2,09	66,0 \pm 5,90 **
QUERCETINA + SUBSTÂNCIA P	100,4 \pm 8,84 ■	32,2 \pm 2,04	55,7 \pm 3,55	40,5 \pm 1,83
QUERCETINA +HOE 140	77,4 \pm 3,83 **	50,8 \pm 2,24 **	61,0 \pm 1,83 **	68,7 \pm 6,35 **
QUERCETINA +RP 67580	52,3 \pm 3,54 ●	41,2 \pm 4,42 ●	33,3 \pm 4,03 ●	41,1 \pm 3,65 ●

* p < 0,05 e ** p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da substância P, da quercetina e da quercetina +HOE 140 em relação ao controle.

■ p < 0,05 e ● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito da quercetina associada à substância P em relação a substância P isolada.

● p < 0,05 e ● p < 0,01 indicam a diferença estatisticamente significativa do efeito do antagonista RP 67580 associado à quercetina em relação a quercetina isolada.

5 - DISCUSSÃO

Conforme inúmeros estudos já realizados por diferentes grupos, a inflamação neurogênica é mediada pela liberação de taquicininas das fibras sensoriais tipo C, estimulando o extravasamento plasmático nas vênulas pós-capilares da lâmina própria das vias aéreas de cobaias (McDonald, 1988), bexiga urinária e pele de ratos e cobaias (Figini *et al.*, 1997). O extravasamento plasmático neurogênico é restrito a certos tecidos, não sendo observado no coração e nos rins de ratos (Figini *et al.*, 1997). As taquicininas liberadas das terminações dos nervos sensoriais se ligam a receptores NK-1 na superfície das células endoteliais dos vasos, e com isso induz a formação de espaços intercelulares no endotélio vascular permitindo assim o extravasamento plasmático (Egiezos *et al.*, 1991; Bowden *et al.*, 1994). Este extravasamento varia em diferentes tecidos sendo que no sistema nervoso central e na dura-máter, objetos de nosso estudo, eles apresentam características próprias. Assim podemos observar que nos capilares das meninges existe uma estrutura vascular diferenciada em relação a estrutura presente no parênquima. Neste último, as células são unidas por junções íntimas que impedem a penetração e passagem de macromoléculas para o meio extravascular, não havendo

espaços intercelulares entre as células endoteliais adjacentes, com a ausência de fenestrações (poros). Também existem poucas vesículas pinocíticas e as células não são contráteis, possuindo poucas proteínas de actina e miosina. Os astrócitos por sua vez possuem os pés vasculares que contatam com os capilares cerebrais, corpos celulares, dendritos e axônios dos neurônios com função de sustentação e isolamento. Já nas meninges em particular na dura-máter encontramos uma estrutura capilar que se caracteriza por fenestrações, que são poros que se abrem ou fecham conforme as necessidades do tecido permitindo a passagem de macromoléculas com maior facilidade. Isto provoca uma resposta diferenciada com relação as taquicininas e a inflamação neurogênica. (Vries *et al.*, 1997).

Muitas respostas da inflamação neurogênica são moduladas por duas peptidases ligadas a membrana celular, a endopeptidase neutra e a enzima conversora da angiotensina. A inibição pelos bloqueadores seletivos, tais como fosforamidon e captopril, respectivamente, tem sido bem documentada, demonstrando alterar as respostas inflamatórias neurogênicas através do aumento da permeabilidade vascular induzido pela substância P endógena ou exógena (Piedimonte, 1995).

Desse modo, alguns trabalhos tem evidenciado que a endopeptidase neutra na presença de inibidor específico, como o fosforamidon por exemplo, gera um aumento no extravasamento plasmático na traquéia e mucosa nasal de ratos, permitindo deste modo um maior efeito no extravasamento plasmático produzido pela substância P e neurocinina A (Umeno *et al.*, 1989; Lindell *et al.*, 1994; Piedimonte, 1995). Assim, as taquicininas, seus receptores, e suas peptidases estão extensamente localizados no trato respiratório, aonde eles tem demonstrado evocar respostas biológicas que são típicas de doenças inflamatórias. A inibição da endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina potencia o aumento da permeabilidade vascular produzida pela injeção exógena da substância P nas vias aéreas de rato (Piedimonte, 1995), e na traquéia e bexiga urinária de camundongo (Baluk, *et al.*, 1999)

De forma semelhante, alguns autores demonstraram inflamação neurogênica na dura-máter e tem sido sugerido ser este um dos mecanismos na produção de enxaquecas (Moskowitz, 1992; Shepherd *et al.*, 1993). Como descrito anteriormente, a dura-máter é uma estrutura no qual podemos também encontrar alterações vasculares que provocam extravasamento plasmático similares a aqueles encontrados em outros tecidos periféricos. Contudo, alguns

estudos demonstraram que em regiões do parênquima cerebral a inflamação neurogênica é menor ou ausente (Hall e Geppetti, 1995).

A endopeptidase neutra é amplamente expressa no cérebro, e portanto ela pode influenciar peptídeos que atuam como neurotransmissores centrais assim como peptídeos ligados a mecanismos inflamatórios (Lu, et al., 1997). De acordo com outros estudos (Turner *et al.*, 1985; Bertrand e Geppetti, 1996), a substância P tem 1000 vezes mais afinidade para a endopeptidase neutra do que para a enzima conversora da angiotensina,

Através do nosso experimento pudemos observar que a administração de fosforamidon isoladamente induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático na dura-máter e no cerebelo e apenas um ligeiro aumento não significante no bulbo olfatório e córtex. Este resultado parece sugerir que o fosforamidon atuaria na dura-máter inibindo a endopeptidase neutra potenciando o efeito da substância P endógena ou exógena. Nos outros tecidos onde a barreira hematoencefálica está presente constitutivamente, também foi possível evidenciar o acesso do fosforamidon através desta estrutura devido ao aumento do extravasamento plasmático de forma significativa no cerebelo. Estes dados são reforçados pela ausência de

somação de efeito quando o fosforamidon foi associado com a substância P exógena. Provavelmente o fosforamidon atravessou a barreira hematoencefálica aumentando a concentração da substância P endógena e esta se ligou a receptores NK-1 localizados na região abluminal do endotélio.

O captopril administrado isoladamente aumentou o extravasamento plasmático na dura-máter e quando associado com a substância P potenciou o efeito desta taquicinina. Estes dados sugerem que a enzima conversora da angiotensina também participa do metabolismo da substância P neste tecido.

Pudemos observar também uma diminuição significativa do extravasamento plasmático no cerebelo, bulbo olfatório e córtex após a administração do captopril, isso ocorreu possivelmente pela ação do captopril no metabolismo de outros mediadores inflamatórios provocando este efeito.

Por outro lado, o tratamento com captopril em pacientes diabéticos e hipertensos que desenvolveram microalbuminúria provocou redução da excreção da albumina, seguido de uma redução do extravasamento proteico à nível glomerular (Casado *et al.*, 1988; Wiegman *et al.*, 1992).

Contudo, não temos evidências suficientes para esclarecer o mecanismo de ação pelo qual o captopril reduziu o extravasamento plasmático nos tecidos onde existe a barreira hematoencefálica. Também devemos salientar que a enzima conversora da angiotensina tem menor afinidade pela substância P quando comparada com a bradicinina (Damas et al., 1996).

Bioflavonóides são encontrados em vários alimentos e plantas, incluindo frutas, sementes, verduras, chá e vinho (Shoskes, 1998). Estes compostos afetam uma larga variedade de sistemas biológicos em mamíferos, exibindo efeitos anti-oxidante, antiinflamatório, anti-viral, anti-proliferativo e anticarcinogênico (Morand et al., 1998). Flavonóides tem também demonstrado propriedades inibitórias enzimáticas envolvidas no metabolismo das cininas tal como a enzima conversora da angiotensina através de análises realizadas *in vitro* (Hansen et al., 1995). Assim estudos, tem demonstrado que a quercetina em particular é um potente antioxidante o qual pode afetar a atividade de inúmeras enzimas (Manach et al., 1998).

Como pudemos observar a administração da quercetina induziu um aumento do extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo, bulbo olfatório e córtex, e o pré-tratamento com este flavonóide aumentou o extravasamento plasmático

na dura-máter induzido pela substância P. entretanto não modificou o extravasamento plasmático nos outros tecidos.

Curiosamente, o efeito observado com a quercetina associada à substância P não apresenta a mesma intensidade quando comparamos com o efeito da quercetina administrada isoladamente. Esta redução do efeito não pode ser justificada apenas com os resultados obtidos neste estudo.

Para esclarecer estes resultados somente a realização de uma curva dose resposta com a quercetina na presença e ausência da substância P poderia fornecer subsídios para esclarecer o mecanismo de ação através do qual houve redução do extravasamento plasmático.

Vários experimentos com agonistas e antagonistas seletivos têm evidenciado que o receptor NK-1 é o principal se não o único mediador do extravasamento plasmático, induzido tanto pela substância P exógena bem como pela substância P endógena liberada pela capsaicina ou pela estimulação nervosa (Maggi, 1996). Somente em brônquios secundários de cobaia, os receptores NK-2 foram identificados como mediadores do extravasamento plasmático (Tousignant, 1993).

Alguns peptídeos biologicamente ativos e que regulam o extravasamento plasmático em diversos tecidos, são

metabolizados pela endopeptidase neutra. Entre eles podemos incluir a bradicinina, substância P e as endotelinas. Por essa razão em nosso trabalho foram utilizados antagonistas seletivos dos receptores NK-1 e B₂ para identificar os mediadores do aumento do extravasamento plasmático induzido pela quercetina. O pré-tratamento com HOE 140 não reduziu o extravasamento plasmático induzido pela quercetina em nenhum tecido. Estes resultados estão de acordo com trabalhos recentes que observaram que a bradicinina não aumenta o extravasamento plasmático na dura-máter de ratos (Matsukado *et al.*, 1998). Por outro lado, o antagonista para receptores NK-1 (RP 67580) inibiu o aumento no extravasamento plasmático evocado pela quercetina, sugerindo que a substância P é o mediador endógeno neste efeito. Estes resultados estão de acordo com os dados de outros autores, mostrando que a administração prévia de um antagonista NK-1, previne o extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter (Moussaoui *et al.*, 1993b; Shepherd *et al.*, 1993).

Portanto, o efeito observado com a quercetina nestes tecidos está possivelmente relacionado com a inibição da endopeptidase neutra, e conseqüente acúmulo da substância P endógena uma vez que o antagonista do receptor NK-1

bloqueou este efeito. Estes resultados sugerem que a substância P é mantida em níveis basais pela endopeptidase neutra e a ausência desta enzima é a causa do extravasamento plasmático que é mediado pelo receptor NK-1.

A administração da substância P exógena não aumentou o extravasamento plasmático no córtex, cerebelo e bulbo olfatório. Estes dados estão de acordo com alguns autoores que não verificaram a presença de extravasamento plasmático neurogênico no parênquima cerebral (Hall e Geppetti, 1995). Por outro lado podemos supor que um outro motivo que justificaria a ausência do efeito da substância P exógena é a dificuldade desta substância em atravessar a barreira hematoencefálica e por isso não teria acesso aos receptores localizados nas células endoteliais na região abluminal. Contudo nossos resultados mostram um aumento do extravasamento plasmático no parênquima induzido pela quercetina. A associação de substância P e quercetina não aumentou o efeito basal deste flavonóide sugerindo que a substância P administrada exógenamente é metabolizada ou ainda sua distribuição vascular nestes tecidos é restrita ou limitada. Portanto pode ser sugerido um acúmulo de substância P endógena, para explicar o efeito da quercetina, uma vez que o RP 67580 bloqueou este efeito.

Possivelmente a quercetina atravessaria a barreira hematoencefálica inibindo a endopeptidase neutra e aumentando assim os níveis de substância P endógena.

O efeito do fosforamidon nestes tecidos deve ser atribuído a concentração insuficiente deste inibidor que permitiu um aumento do extravasamento plasmático somente na dura-máter e cerebelo. Contudo podemos verificar que apesar de não ter ocorrido um aumento significativo no bulbo olfatório e córtex houve um aumento do extravasamento plasmático em todos os tecidos.

A ausência de efeitos da substância P exógena no parênquima provavelmente foi devido a alta concentração da endopeptidase neutra nestes tecidos. O fosformidon administrado isoladamente aumentou o extravasamento plasmático no parênquima sendo significante apenas no cerebelo. Entretanto o pré-tratamento com fosforamidon aumentou significativamente o extravasamento plasmático induzido pela substância P em todas as regiões.

No presente estudo, nossos dados mostraram que a inibição farmacológica seletiva da endopeptidase neutra, e da enzima conversora da angiotensina aumentaram o extravasamento plasmático induzido pela substância P na dura-máter de ratos, muito provavelmente pela inibição da degradação do neuropeptídeo. Além disso, a associação da

quercetina com a substância P aumentou o extravasamento plasmático induzido pela substância P administrada isoladamente, sugerindo que o efeito deste flavonóide tenha provocado uma redução no metabolismo da substância P comparável a atividade dos inibidores da endopeptidase neutra e da enzima conversora da angiotensina na dura-máter. Além do mais, o pré-tratamento com o antagonista dos receptores NK-1 e B₂ foi usado para identificar os mediadores do extravasamento plasmático induzido pela quercetina. Os resultados mostraram que somente os antagonistas dos receptores NK-1 bloquearam este efeito, sugerindo que a redução na degradação da substância P causou o aumento no extravasamento plasmático induzido pela quercetina na dura-máter.

Os flavonóides são naturalmente encontrados em abundância em frutas, vegetais e bebidas derivados de plantas tais como, chás e vinho. Considerando que a quercetina é o mais abundante flavonóide o qual é encontrado na alimentação, e a ingestão de quercetina é uma parte integral da dieta humana, é possível associar o consumo de quercetina como um dos possíveis mecanismos de desencadeamento de dores de cabeça uma vez que. Assim podemos concluir que a inflamação neurogênica tem

side proposta como um dos principais mecanismos envolvidos nas enxaquecas e dores de cabeças correlatas.

6 - BIBLIOGRAFIA

AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., VIALA, C., RÉMÉSY, C., CHAP, H. & PAYRASTRE, B. **Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C inhibition.** *Biochem. Pharmacol.* 53: 1649-1657, 1997.

AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABE, S., ITHO, N., MASABUMI, S. & FUCAMI, Y. **Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase.** *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595, 1987.

ANDERSSON, P.B., PERRY, V.H. & GORDON, S. **The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in central nervous system parenchyma differs from that in other body tissues.** *Neuroscience.* 48: 169-186, 1992.

BALUK, P., THURSTON, G., MURPHY, T.J., BURNNETT, N.W. & McDONALD, D.M. **Neurogenic plasma leakage in mouse airways.** *British Journal of Pharmacology,* 126: 522-528, 1999.

BARTHO, L. & HOLZER, P. **Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility.** *Neuroscience (Oxford).* 16: 1-32, 1985.

BARTUS, R.T., ELLIOT, P., HAIARD, N., DEAN, R., McEWEN, E.L. & FISHER, S.K. **Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto-regulated, receptor-mediated system.** *Immunopharmacology*. 33: 270-278, 1996.

BEACH, T.G., TAGO, H. & McGEER, E.G. **Light microscopic evidence for a substance P-containing innervation off the human nucleus basalis of Meinert.** *Brain Res*. 408: 251-257, 1987.

BESSON, J.M. **The neurobiology of pain.** *Lancet*. 353: 1610-1615, 1999.

BERTELLI, G., GOZZA, A., FORNO, G.B., VIDILI, M.G., SILVESTRO, S., VENTURINI, M., DEL MASTRO, L., GARRONE, O., ROSSO, R. & DINI, D. **Topical dimethylsulfoxide for the preventions of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drugs: a prospective clinical study.** *J. Clin. Oncol*. 13: 2851-2855, 1995.

BERTHIAUME, N., CLAING, A., REGOLI, D., WARNER, T.D. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. **Characterization of receptors for kinins and neurokinins in the arterial and venous mesenteric vasculatures of the guinea-pig.** *J. Pharmacol.* 115: 1319-1325, 1995.

BERTRAND, C. & GEPPETTI, P. **Tachykinin and kinin receptor antagonists: therapeutic perspectives in allergic airway disease.** *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 225-259, 1996.

BERTRAND, C., GEPPETTI, P., BAKER, J., YAMAWAKI, I. & NADEL, J.A. **Role of neurogenic inflammation in antigen-induced vascular extravasation in guinea pig trachea.** *J. Immunol.* 150: 1479-1485, 1993.

BETZ, A.L. **An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier.** In : Frankeinhem, J. and Brown, R., eds., *Bioavailability of Drugs to the Brain and the BBB.* 120: 54-72, 1992.

BHOOLA, K.D. **Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation.** *Immunopharmacol.* 33: 247-256, 1996.

BORSON, D.B. Roles of neutral endopeptidase in airways.

Am. J. Physiol. 260: 212-225, 1991.

BOWDEN, J.J., GARLAND, A.M. & BALUK, P. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 8964-8968, 1994.

BRODAL, P. The Central Nervous System: structure and function. *New York: Oxford University Press.* 1992.

BROKAW, J.J. & WHITE, G.W. Differential effects of phosphoramidon and captopril on NK1 receptor-mediated plasma extravasation in rat trachea. *Agents Actions* 42: 34-39, 1994.

CAPASSO, A., PIACENTE, S., PIZZA, C. & SORRENTINO, L.

Flavonoids reduce morphine withdrawal *in-vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 561-564, 1998.

CARPENTER, M. B. & SUTIN, J. Human Neuroanatomy. 8th

Ed. Baltimore: Williams and Wilkin. 1983.

- CASADO, S., CARRASCO, M. A., ARRIETA, F.J. & HERRERA, J.L. **Effect of captopril in diabetic patients with arterial pression and proteinúria.** *Postgrad. Med. J.* 64: 85, 1988.
- CHANG, C.J. & GEAHLEN, R.L. **Protein-tyrosine kinase inhibition: Mechanism-based discovery of antitumor agents.** *J. Nat. Products.* 55: 1529-1560, 1992.
- CLERK, F., FOUCAULT, F., RIDOUX-SILLY, L. & FARDIN, V. **Affinity and stability of some substance P agonists in rat and guinea-pig a comparative study in central and peripheral tissues.** *Neuropeptides.* 22: 14, 1992.
- CONKLIN, D.R., TAN, K.H. & ASCHNER, M. **Dimethyl sulfoxide, but not acidosis-induced metallothionein mRNA expression in neonatal rat primary astrocyte cultures is inhibited by the bioflavonoid, quercetin.** *Brain Research.* 794: 304-308, 1998.
- CUSHMAN, M., NAGARATHMAN, D., BURG, D.L. & GEAHLEN, R.L. **Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues.** *J. Med. Chem.* 34: 798-806, 1991.

DAM, T.V., ESCHER, E. & QUIRON, R. Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [³H] senktide. *Brain Res.* 506: 175-179, 1990.

DAMAS, J., BOURDON, V., LIÉGEOIS, J-F. & SIMMONS, W.H. Influence of several peptidase inhibitores on the pro-inflammatory effects of substance P, capsaicin and collagenase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 354: 662-669, 1996.

DONNERER, J. & AMANN, R. The inhibition of neurogenic inflammation. *Gen. Pharmacol.* 24: 519-529, 1993.

DRENCKHAHN, D.& WAGNER, J. Stress fibres in the splenic endothelium in situ: Molecular structure, relationship to the extracellular matrix and contractility. *Journal of Cell Biology* 102: 1738-1747, 1986.

EBERSBERGER, A., AVERBECK, B., MESSLINGER, K. & REEH, P.W. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E₂ from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience* 89(3): 901-907, 1999.

EGLEZOS, A., GIULIANI, S., VITI, G. & MAGGI, C.A. **Direct evidence that capsaicin-induced plasma protein extravasation is mediated through tachykinin NK1 receptors.** *Eur. J. Pharmacol.* 209: 277-279, 1991.

EMANUELI, C., GRADY, E.F., MADEDDU, P., FIGINI, M., BUNNETT, N.W., PARISI, D., REGOLI, D. & GEPPETTI, P. **Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P.** *Hypertension.* 31: 1299-1304, 1998.

EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LE FUR, G. & BRELIERE, J.C. **A potent and selective nonpeptide antagonist of the neurokinin A (NK-2) receptor.** *Life Sci. Pharmacol. Lett.* 50: P1101-PL106, 1992.

END, D.W., LOOK, R.A., SHAFFER, N.L., BALLEES, E.A. & PERSISCO, F.J. **Non-selective inhibitor of mammalian protein kinases by flavonoids in vitro.** *Res. commun. chem. pathol. pharmacol.* 56: 75-86, 1987.

ESCHER, E. & REGOLI, D. **Substance P and related peptides. In peptide hormones as prohormones. Edited by J. Martinez. E. Horwood, London. 26-52, 1989.**

FARDIN, V. & GARRET, C. **Species differences between [³H] substance P binding in rat and guinea pig shown by the use of peptide agonists and antagonists. Eur. J. Pharmacol. 201: 231, 1991.**

FERRARI, M.D. **Migraine. Lancet. 351: 1043-51, 1998.**

FERRIOLA, P.C., CODY, V. & MIDDLETON, E. **Protein kinase C inhibition by plants flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. Biochem. Pharmacol. 38: 1617-1624, 1989.**

FIGINI, M., EMANUELI, C., GRADY, E.F., KIRKWOOD, K., PAYAN, D.G., 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. 272: G785-G793, 1997.**

- FLOOR, E., GRAD, O. & LEEMAN, S.E. **Synaptic vesicles containing substance P purified by chromatography on controlled pore glass.** *Neuroscience*. 7: 1647-1655, 1982.
- FONG, T.M., YU, H. & STRADER, C.D. **Molecular bases for the species selectivity of the NK-1 receptor antagonist CP 96,345 and RP 67,580.** *J. Biol. Chem.* 267: 25668-25671, 1992.
- FORMICA, J.V. & REGELSON, W. **Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids.** *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061-1080, 1995.
- GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C. & LADURON, P.M. **Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10208-10211, 1991.
- GEAHLEN, R.L., KOONCHANOK, M.N. & MCLAUGHLIN, J.L. **Inhibition of protein kinase C activity by flavonoids and related compounds.** *J. Nat. Products* 52: 982-986, 1989.

GERARD, N.P., BAO, L., PING, H. X. & GERARD, C. **Molecular aspects of the tachykinin receptors.** *Regul. Pept.* 43: 21-35, 1993.

GESCHWENDT, M., HORN, F., KITTSTEIN, W. & MARKS, F. **Inhibition of the calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 444-447, 1983.

GOLDIE, R.G. & PEDERSEN, K.E. **Mechanisms of increased airway microvascular permeability: role in airway inflammation and obstruction.** *Clinical and Experimental Pharamacology and Physiology.* 22: 387-396, 1995.

GOLDSTEIN, G.W. & BETZ, A.L. **Recent advances in understanding brain capillary function.** *Ann. Neurol.* 14: 389-395, 1986.

GORE, R.W. & McDONAGH, P.F. **Fluid exchange across single capilarles.** *Annu Rev Physiol* 42: 337-357, 1980.

GUYENET, P.G. & AGHAJANIAN G.K. **Excitation of neurons in de nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides.** *Brain Res.* 136: 178-184, 1977.

HAGAN, R.M., BERESFORD, I.J.M., STABLES, J., DUPERE, J., STUBBS, C.M., ELLIOTT, P.J., SHELDRIK, R.L.G., CHOLLET, A., KAWASHIMA, E., Mc ELROY, A.B. & WARD, P. **Characterisation, CNS distribution and function of NK-2 receptors studied using potent NK-2 receptor antagonists.** *Regul .Pep.* 46: 9-19, 1993.

HAGAN, R.M. & McLEAN, S. **Vineyard peptide conference bears fruit.** *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 315-318, 1993.

HAINES, D. E. **Neuroanatomy: An Atlas of Structures, Sections an Systems, 2nd Ed.** Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1995.

HALL, I.M. & GEPPETTI, P. **Kinins and kinin receptors in the nervous system.** *Neurochem. Int.* 26(1): 17-26, 1995.

HANSEN, K., NYMAN, U., SMITT, U.W., ADSERSEN, A., GUDI KSEN, L., RAJASEKHARAN, S. & PUSH PANGADAN, P. **In vitro screening of traditional medicines for anti-**

- hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). *J. Ethnopharmacol.* 48: 43-51, 1995.
- HEIMER, L. The human brain and spinal cord. 3: 43-56, 1995.
- HERTOG, M.G.L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B. S., TOSHIMA, H., FESKENS, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H. & KATAN, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155: 381-386, 1995.
- HOKFELT, T., ZHANG, X. & WIESENFELD-HALLIN, Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implication. *Trends Neurosci.* 17: 22-30, 1994.
- HOLLMAN, P.C.H., GAAG, M.V.D., MENGELERS, M.J.B., VAN TRIJP, J.M.P., DEVRIES, J.H.M. & KATAN, M.B. Absorption

- and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radi. Biol. Med.* 21: 703-707, 1996.
- HOLZER, P. & HOLZER-PETSCHE, U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol. Ther.* 73: 173-217, 1997.
- HUA, X., LUNDBERG, J.M., THEODORSSON-NORHEIM, E. & BRODIN, E. Comparison of cardiovascular and bronchoconstrictor effects of substance P, substance K and other tachykinins. *Naunyn-Schmeideberg'a Arch. Pharmacol.* 328: 196-201, 1984.
- INOUE, H., NAGATA, N. & KOSHIHARA, Y. Involvement of tachykinin receptors in oedema formation and plasma extravasation induced by substance P, neurokinin A, and neurokinin B in mouse ear. *Inflamm. Res.* 45: 316-323, 1996.
- JACKSON, B.; MENDELSON, F.A. & JOHNSTON, C.I. Angiotensin-converting enzyme inhibition: Prospects for the future. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18: 4-8, 1991.

KENINS, P., HURLEY, J.V. & BELL, C. **The role of substance P in the axon reflex in the rat.** *Br. J. Dermatol.* 111: 551-55, 1984.

KHAWAJA, A.M. & ROGERS, D.F. **Tachykinins: receptor to effector.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 721-738, 1996.

KIMURA, S., OKADA, M., SUGITA, Y., KANAZAWA, I. & MUNEKATA, E. **Novel neuropeptides, neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord.** *Proc. Jpn. Acad. Sci. Ser. B.* 59: 101-104, 1983.

KOCH, H.P., JAGUER, W., GROH, U. & PLANK, G. **Meth. Find. Exp. Clim. Pharmacol.** 14: 413, 1992.

KORNER, P. I. **Control of blood flow to special vascular areas: brain, kidney, muscle, skin, liver and intestine.** *Cardiovascular Physiology, MTP International Review of Science, edited by A.C Guyton and C.E Jones. Baltimore: University Park Press, 1974.*

KOSTYUK, V.A., POTAPOVICH, A.I., SPERANSKY, S.D. & MASLOVA, G.T. **Protective effect of natural flavonoids on**

rat peritoneal macrophages injury caused by asbestos fibers. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 487-493, 1996.

LANTZ, I., NYBERG, F. & TERENIUS, L. **Molecular heterogeneity angiotensin converting enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem. Int.* 23: 941-948, 1991.**

LEI, Y.H., BARNERS, B.J. & ROGERS, D.F. **Mechanisms and modulation of airway plasma exudation after direct inhalation of cigarette smoke. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 1752-1762, 1995.**

LEVINE, J.D., FIELDS, H.L. & BASBAUM, A.I. **Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci.* 13: 2273-2286, 1993.**

LEVY, J., TEUERSTEIN, I., MARBACH, M., RADIAN, S. & SHARONI, Y. **Tyrosine protein kinase activity in the DMBA- induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 1227-1233, 1984.**

LEW, R., GERAGHTY, D.P., DRAPEAU, G., REGOLI, D. & BURCHER, E. **Binding characteristics of [¹²⁵I] Bolton**

Hunter [Sar⁹,Met(O₂)¹¹] substance P, a new selective radioligand for the NK-1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 184: 97-108, 1990.

LINDAHL, M. & TAGESSON, C. Selective inhibition of group II phospholipase A₂ by quercetin. *Inflammation.* 17: 5, 1993.

LINDELL, E., SVENSJÖ, M.E., MALM, L. & PETERSSON, G. Tachykinin-induced nasal fluid secretion and plasma exudation in rat: effects of peptidase inhibition. *Neuropeptides.* 28: 309-315, 1995.

LJUNGDAHL, A., HOKFELT, T. & NILSSON, G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience.* 3: 861-943, 1978.

LU, B., FIGINI, M., EMANUELI, C., GEPETTI, P., GRADY, E.F., GERARD, N.P., ANSELL, J., PAYAN, D.G., GERARD, C. & BUNNETT, N. The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. *Nature Med.* 3: 904-907, 1997.

LUNDBERG, J.M. & SARIA, A. **Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea.** *Acta physiol. Scand.* 115: 521-523, 1982.

MAGGI, C.A. **The pharmacology of the efferent function of sensory nerves.** *J. Auton. Pharmacol.* 11: 173-208, 1991.

MAGGI, C.A. **Tachykinins in the autonomic nervous system.** *Pharmacological Research.* 33(3): 161-170, 1996.

MAGGI, C.A., GIULIANI, S., SANTICIOLI, P., REGOLI, D. & MELI, A. **Peripheral effects of neurokinins: functional evidence for the existence of multiple receptors.** *J. Auton. Pharmacol.* 7: 11-32, 1987.

MAGGI, C.A., PATACCHINI, R., ROVERO, P. & GIACHETTI, A. **Tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists.** *J. Auton. Pharmacol.* 13: 23-93, 1993.

MAGGIO, J.E., SANDBERG, B.E.B., BRADLEY, C.V., IVERSEN, L., SANTIKAN, S., WILLIAMS, B.H., HUNTER, J.C. & HANLEY, M.R. **Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord.** *In Substance P (Edited by Skrabanek P. and Powell D.).* 20-21, 1983.

MAHALILIK, T.J. **Direct demonstration of interactions between substance P-immunoreactive terminals and tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the substantia nigra of the rat: an ultrastructural study.** *Synapse*. 2: 508-515, 1988.

MAJNO, G. **Ultrastructure of vascular membrane.** *Handbook of Physiology, Section 2: circulation, edited by Hamilton, W.F. and Dow, P. Washington, D.C. : Physiological Society, Vol. III, 1965.*

MANACH, C., MORAND, C., CRESPIY, V., DEMIGNÉ, C., TEXIER, O., RÉGERAT, F. & RÉMÉSY, C. **Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties.** *FEBS Letters*. 426: 331-336, 1998.

MANTYH, P.W., MANTYH, C.R., GATES, T., VIGNA, S.R. & MAGGIO, J.E. **Receptor binding sites for substance P and substance K in the canine gastrointestinal tract and their possible role in inflammatory bowel disease.** *Neuroscience*. 25: 817-837, 1988.

MARTIN, J.H. **Neuroanatomy: Text an Atlas. 22nd Ed.**
Stanford, CT: Appleton & Lange, 1996.

MATSAS, R., FULCHER, I.S., KENNY, A. J. & TURNER, A.J.
**Substance P and [Leu]encephalin are hydrolyzed by an
enzyme in pig caudate synaptic membranes that is
identical with the endopeptidase of kidney microvilli.**
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 3111-3015, 1983.

MATSAS, R., RATTRAY, M., KENNEY, A.J. & TURNER, A.J.
**Endopeptidase 24.11 in human synaptic membranes
preparations hydrolyses substance P. *Biochem. J.* 228:
487-492, 1985.**

MATSUKADO, K., SUGITA, M. & BLACK, K.L. **Intracarotid low
dose bradykinin infusion selectively increases tumor
permeability through activation of bradykinin B₂
receptors in malignant gliomas. *Brain Research.* 792: 10-
15, 1998.**

MAUBORGNE, A., BOURGOIN, S., BENOLIEL, J.J., HIRSCH,
M., BERTHIER, J.L., HAMON, M. & CESSÉLIN, F.
**Enkephallnase is involved in the degradation of
endogenous substance P released from slices of rat**

substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 674-680, 1987.

McDONALD, D.M. Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes and epithelial cells. *J. Neurocytol.* 17: 583-603, 1988.

McLEAN, S. Nonpeptide antagonists of the NK-1 tachykinin receptor *Medical Research Reviews.* 16(4): 297-317, 1996.

MEINI, S., MAK, J.C.W., ROHDE, J.A.J. & ROGERS, D.F. Tachykinin control of guinea pig airways, mucus secretion, bronchoconstriction and receptor mapping. *Neuropeptides.* 24: 81-89, 1993.

MENESES, M.S. Neuroanatomia aplicada. 21: 311-336, 1999.

MIDDLETON, E.JR. & KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, edited by J. B. Harbone. London: Chapman and Hall. 619-652, 1993.

MORAND, C., CRESPIY, V., MANACH, C., BESSON, C.,
DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. Plasma metabolites of
quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol.*
275: R212-R219, 1998.

MOREL, I., LESCOAT, G., COGREL, P., SERGENT, O.,
PASDELOUP, N., BRISSOT, P., CILLARD, P. & CILLARD, J.
Antioxidant and iron-chelating activities of the
flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-
loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45:
13-19, 1993.

MORRISON, D.C. & RYAN, J.L. Endotoxins and disease
mechanism. *Annu Rev Med.* 38: 417-423, 1987.

MOSKOWITZ, M.A. Neurogenic versus vascular mechanisms
of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends*
Pharmacol. Sci. 13: 307-311, 1992.

MOSKOWITZ, M.A., REINHARD, J.F., OTSUKA, M. &
YANAGISAWA, M. Does substance P act as a pain
transmitter? *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 506-510, 1987.

MOSKOWITZ, M.A., REINHARD, J.F., ROMERO, J., MELAMED, E. & PETTIBONE, J. **Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: Is there a relation to the headache phase of migraine?** *Lancet*. 2: 883-885, 1979.

MOUSSAOUI, S.M., MONTIER, F., CARRUETTE, A., BLANCHARD, J.C., LADURON, P.M. & GARRET, C. **A non-peptide NK1-receptor antagonist, RP 67580, inhibits neurogenic inflammation postsynaptically.** *Br. J. Pharmacol.* 109: 259-264, 1993a.

MOUSSAOUI, S.M., PHILIPPE, L., LE PRADO, N. & GARRET, C. **Inhibition of neurogenic inflammation in the meninges by a non-peptide NK1 receptor antagonist, RP 67580.** *Eur. J. Pharmacol.*, 1993b.

NADEL, J.A. **Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation.** *Eur. Respir. J.* 4: 745-754, 1991.

NAGAI, N., NAKAI, A. & NAGATA, K. **Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 1099-1105, 1995.

ND, D.W., LOOK, R.A., SHAFFER, N.L., BALLE, E.A. & PERSISCO, F.J. **Non-selective inhibitor of mammalian protein kinases by flavonoids in vitro.** *Res. commun. chem. pathol. pharmacol.* 56: 75-86, 1987.

NICOLAU, M., SIROIS, M.G., BUI, M., PLANTE, G.E., SIROIS, P. & REGOLI, D. **Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats: receptor characterization with agonists and antagonists.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 217-221, 1993.

OKAMOTO, A., LOVETT, M., PAYAN, D.G. & BUNNETT, N.W. **Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1).** *Biochem. J.* 299: 683-693, 1994.

PARELLADA, J. & GUINEA, M. **Flavonoid inhibitors of trypsin and leucine aminopeptidase: proposed mathematical model for IC₅₀ estimation.** *Journal of Natural Products.* 58: 823-829, 1995.

PATACCHINI, R. & MAGGI, C.A. **Tachykinin receptors and receptor subtypes.** *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie.* 329: 161-184, 1995.

PERNOW, B. Pharmacology of substance P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 10: 393-402, 1963.

PETERSSON, G., BACCI, E., MACDONALD, D.M. & NADEL, J.M. Neurogenic plasma extravasation in the rat nasal mucosa is potentiated by peptidase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 509-514, 1993.

PIEDIMONTE, G. Tachykinin peptides, receptors and peptidases in airway disease. *Experim. Lung Res.* 21: 809-834, 1995.

PRICE, R.M. & MIDDLETON, E. JR. In: "Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships." Ed. by V. Cody, E. Middleton, Jr and J.B. Harborne, Alan R. Liss, New York. 213: 507-510, 1986.

RAMON Y CAJAL, S. The neural and the glial cell. (Transl. By J. De la Torre and W. C. Gibson) Springfield, I.L: Charles C. Thomas, 1984. RAPOPORT, S.I., OHNO, K. & PETTIGREW, K.D. Drug entry into the brain. *Brain Res.* 172: 354-359, 1979.

REESE, T.S. & KARNOVSKY, M.J. **Fine structural localization of a blood-nerve barrier in the mouse.** *Journal of Cell Biology.* 34: 107-217, 1967.

REGOLI D., BOUDON A. & FAUCHÈRE J.L. **Receptors and antagonists for substance P and related peptides.** *Pharmacol. Rev.* 46: 551-599, 1994.

REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. & D'ORLÉANS-JUSTE, P. **Pharmacological receptors for substance P and neurokinins.** *Life Sci.* 40: 109-177, 1987.

REGOLI, D., MARCEAU, F. & LAVIGNE, J. **Induction of B₁-receptors for kinins in the rabbit by bacterial lipopolysaccharide.** *Eur. J. Pharmacol.* 71: 105-115, 1989.

REID, M., HERRERA-MARSCHITZ, M., HOKFELT, T., OHLIN, M., VALENTINO, L. & UNGERTEDT, U. **Effects of intranigral substance P and neurokinin A on striatal dopamine release. Interactions with substance P antagonists.** *Neuroscience.* 36: 643-658, 1990.

RENKIN, E.M. **Some consequences of capillary permeability to macromolecules: Starling hypothesis reconsidered.**

Am J. Physiol. 250: H706-H710, 1986.

RICCIARDOLO, F.L.M., NADEL, A.J., BERTRAND, C., YAMAWAKI, I., CHAN, B. & GEPETTI, P. **Tachykinins and kinins in antigen-evoked plasma extravasation in guinea-pig nasal mucosa.** *Eur. J. Pharmacol.* 261: 127-132, 1994.

RICE-EVANS, C., MILLER, N.J. & PAGANGA, G. **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends Plant Sci.* 2: 152-159, 1997.

ROGERS, D.F., AURSUDKIJ, B. & BARNES, B. J. **Effects of tachykinins on mucus secretion in human bronchi *in vitro*.** *Eur. J. Pharmacol.* 174: 283-286, 1989.

ROQUES, B.P., NOBLE, F., DAUGE, V., FOURNIE-ZALUSKI, M.C. & BEAUMONT, A. **Neutral endopeptidase 24:11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology.** *Pharmacol. Rev.* 45: 87-146, 1993.

ROUISSI, N., NANTEL, F., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., DION, S. & REGOLI, D. **Inhibitors of peptidases: how they**

influence the biological activities of substance P, neurokinins, kinins and angiotensins in isolated vessels.

Pharmacology. 40: 185-195, 1990.

ROUISSI, N., NANTEL, F., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., DION, S. & REGGOLI, D. **Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, bradykinin and angiotensin in ghinea-pig, hamster and rat urinary bladders.** *Pharmacology*. 40: 196-204, 1990.

SARIA, A., LUNDBERG, J.M., SKOFITSCH, G. & LEMBECK, F. **Vascular protein leakage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge.** *Naun-Schmie. Arch. Pharmacol.* 324: 212-218, 1983.

SATO, M., MIYAZAKI, T., KAMBE, F., MAEDA, K. & SEO, H. **Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells.** *J. Rheumatol.* 24: 1680-1684, 1997.

SHEPHEARD, S.L., WILLIAMSON, D.J., HILL, R.G. & HARGREAVES, R.J. **The non-peptide neurokinin 1 receptor antagonist RP 67580 blocks neurogenic plasma extravasation in the dura mater of rats.** *Br. J. Pharmacol.* 108: 11-12, 1993.

SHEPHEARD, S.L., WILLIAMSON, D.J., WILLIAMS, J., HILL, R.G. & HARGREAVES, R.J. **Comparison of the effects of sumatriptan and the NK-1 antagonist CP-99,994 on plasma extravasation in dura mater and C-fos mRNA expression in trigeminal nucleus caudalis of rats.** *Neuropharmacology.* 34: 255-261, 1995.

SHORE, S.A., STIMLER-GERARD, N.P., COATS, S.R. & DRAZEN, J.M. **Substance P induced bronchoconstriction in guinea pig. Enhancement by inhibitors of neutral metalloendopeptidase and angiotensin converting enzyme.** *Am. Ver. Respir. Dis.* 137: 331-337, 1988.

SHOSKES, D.A. **Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury.** *Transplantation.* 66: 147-152, 1998.

SIMÕES, C.O.M., SCHENKEL, E.P., BAUER, L. & LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. *Journal of Ethnopharmacology*. 22: 281-293, 1988.

SKAPER, S.D., FABRIS, M., FERRARI, V., DALLE CARBONARE, M. & LEON, A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 669-678, 1997.

SKIDGEL, R.A., ENGELBRECHT, S., JOHNSOS, A.R. & ERDOS, E.G. Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*. 5: 769-776, 1984.

SNIDER, M.R., CONSTANTINE, J.W., LOWE, J.A., LONGO, K.P., LEBEL, W.S., WOODY, H.A., DROZDA, S.E., DESAI, M.C., VINICK, F.J., SPENCER, R.W. & HESS, H. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK-1) receptor. *Science*. 251: 435-437, 1991.

STANFIELD, P.R., NAKAJIMA, Y. & YAMAGUCHI, K.

Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. *Nature*. 315: 498-501, 1995.

SVENSJO, E. & GREGA, G.J. Evidence for endothelial cell-

mediated regulation of macromolecular permeability by postcapillary venules. *Fed. Proc.* 45: 89-95, 1986.

TOUSIGNANT, C., CHAN, C.C., GUEVREMONT, D. BRIDEAU,

C., HALE, J.J., MACCOSS, M. & RODGER, I.W. **NK-2 receptors mediate plasma extravasation in guinea pig lower airways.** *Br. J. Pharmacol.* 108: 383-386, 1993.

TSUCHIDA, K., SHIGEMOTO, R., YOKOTO, Y. & NAKANISHI,

S. Tissue distribution and quantification of the mRNAs of three tachykinin receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 193: 751-757, 1990.

TUOMANEN, E.I., PRASAD, S.M. & GEORGE, J.S. **Reversible**

opening of the blood brain barrier by anti-bacterial antibodies. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90: 7824-7828, 1993.

TURNER, A.J., MATSAS, R. & KENNY, A.J. **Commentary. Are there neuropeptide-specific peptidases?** *Biochem. Pharmacol.* 34: 1347-1356, 1985.

UMENO, E., NADEL, J.A., HUANG, H.T. & MCDONALD D.M. **Inhibition of neutral endopeptidase potentiates neurogenic inflammation in the rat trachea.** *J. Appl. Physiol.* 66: 2647-2652, 1989.

URBAN, L., MAGGI, C.A. NAGI, I. & DRAY, A. **The selective NK-2 receptor antagonist MEN10376 inhibits synaptic excitation of dorsal horn neurones evoked by C-fibre activation in the in vitro rat spinal cord.** *Neuropeptides.* 22: 68, 1992.

VAN ACKER, S.A.B.E., VAN BALEN, G.P., VAN DEN BERG, D., BAST, A. & VAN DER VIJGH, W.J.F. **Influence of iron chelation on the antioxidant active of flavonoids.** *Biochemical Pharmacology.* 56: 935-943, 1998.

VOLK, C., KEMPSKI, B. & KEMPSKI, O.S. **Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro.** *Neurosci. Lett.* 223: 121-124, 1997.

- VON EULER, U.S. & GADDUM, J.H. **Am unidentified depressor substance in certain tissue extracts.** *J. Physiol.* 72: 74-87, 1931.
- VRIES, H.E., KUIPER, J., BOER, A.G., VANBERKEL, T.J.C. & BREIMER, D. **The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases.** *Pharmacological Reviews.* 49: 143-155, 1997.
- YOKOO, T. & KITAMURA, M. **Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidante-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin.** *Am. J. Physiol.* 273: 206-212, 1997.
- YOUNG, P.A. & YOUNG, P.H. **Basic Clinical Neuroanatomy.** 19: 185-202, 1997.
- YU, Z.W. & QUINN, P.J. **Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology.** *Biosci. Reports* 14: 259-281, 1994.
- WALTING, K.J. **Nonpeptide antagonists herald new era in tachykinin research.** *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 266-269, 1992.

WARWICK, R.E., FIKE, J.R., CHAN, P.H., ANDERSON, D.K., ROSS, G.Y. & GUTIN, P.H. **Measurement of vascular permeability in spinal cord using Evans blue – spectrophotometry and correction for turbidity.** *J. Neurosc. Meth.* 58: 167-171, 1995.

WIEGMAN, T.B., HERRON, K.G., CHONKO, A.M., McDOUGALL, M.L., & MORE, W.V. **Effect of inhibition of angiotensin converting enzyme in renal function and the albuminúria in normal and diabetic patients.** *Diabetes* 41: 62-68, 1992.

WIRTH, K., HOCK, F.J., ALBUS, U., LINZ, W., ALPERMANN, H.G., ANAGNOSTOPOULOS, H., HENKE, S., BREIPOHL, G., KÖNIG, W., KNOLLE, J. & SCHÖLKENS, B.A. **Hoe 140, a new potent and long-acting bradykinin antagonist: in vivo studies.** *Br. J. Pharmacol.* 102: 774-777, 1991.

ZHAO, L., ZHANG, M.M. & NG, K. **Effects of vascular permeability factor on the permeability of cultured endothelial cells from brain capillaries.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 32: 1-4, 1998.