

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA DE
CAMUNDONGOS ÀS ENDOTELINAS E DA CONTRIBUIÇÃO
DESTES PEPTÍDEOS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA
DEFLAGRADA POR ANTÍGENO**

ANNA PAULA PIOVEZAN

Florianópolis – SC

Fevereiro/2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA DE
CAMUNDONGOS ÀS ENDOTELINAS E DA CONTRIBUIÇÃO
DESTES PEPTÍDEOS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA
DEFLAGRADA POR ANTÍGENO**

ANNA PAULA PIOVEZAN

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Florianópolis – SC

Fevereiro/2002

PIOVEZAN, Anna Paula. Caracterização da resposta nociceptiva de camundongos às endotelinas e da contribuição destes peptídeos na resposta nociceptiva deflagrada por antígeno. Florianópolis, 2002, 87 pp. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Giles Alexander Rae

Defesa: 28/02/2002

O presente estudo investigou os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico de [endotelinas] (ETs) injetadas por via intraplantar na pata de camundongos. Além disso, avaliou a contribuição das ETs endógenas para a [nocicepção] (NOCI) e a [hiperalgesia] (HIPER) desencadeadas por ovoalbumina (OVA) em animais sensibilizados ao antígeno. A HIPER foi avaliada como a potencialização da NOCI induzida por capsaicina. A ET-1 causou efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico dependentes de dose. Estas respostas foram bloqueadas por A-127722.5 ou BQ-123 (antagonistas ET_A), mas não por BQ-788 (antagonista ET_B). Além disso, sarafotoxina S6c (S6c) e IRL 1620 (agonistas ET_B) não deflagram nenhum dos efeitos da ET-1. Porém, o BQ-788 revelou um efeito hiperalgésico à ET-3, e a S6c inibiu a HIPER à ET-1 sem alterar suas ações nociceptiva ou edematogênica. Em outros experimentos, a NOCI induzida por OVA em animais sensibilizados foi reduzida por bosentan (antagonista ET_A/ET_B), BQ-123 ou A-127722.5, e aumentada por A-192621.1 (antagonista ET_B). Finalmente, a HIPER à capsaicina induzida por OVA foi bloqueada por bosentan, A-127722.5 ou A-192621.1. Estes resultados demonstram que as ETs contribuem para efeitos pró-nociceptivos (inclusive alérgico) e edematogênico mediados por receptores ET_A em camundongos, enquanto os receptores ET_B modulam distintamente estas respostas ao peptídeo.

Palavras-chave: [endotelinas], [nocicepção], [hiperalgesia], [ovalbumina].

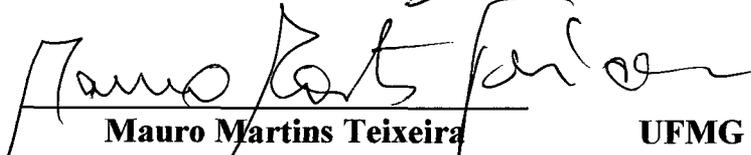
**“CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA DE CAMUNDONGOS
ÀS ENDOTELINAS E DA CONTRIBUIÇÃO DESTES PEPTÍDEOS NA
RESPOSTA NOCICEPTIVA DEFLAGRADA POR ANTÍGENO”**

POR

ANNA PAULA PIOVEZAN

**Tese julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:

 _____	Giles Alexander Rae	FMC/UFSC - Presidente
 _____	Fernando Queiróz Cunha	FMRP/USP
 _____	Mauro Martins Teixeira	UFMG
 _____	Jamil Assreuy Filho	FMC/UFSC
 _____	Reinaldo Naoto Takahashi Membro e Coordenador do Programa	FMC/UFSC

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2002.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Esta Tese foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina com o auxílio financeiro do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, porque ao lado do orientador, sempre encontramos nele também um amigo ouvinte e encorajador;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, pela contribuição ao meu aprendizado;

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial ao Pedro, à Rosane e à Rita;

A todos os colegas do curso pelo excelente relacionamento;

Aos amigos do laboratório que compartilharam seus momentos comigo num clima de companheirismo;

À Biba e ao Cláudio pela amizade e pelo auxílio no momento de confecção da tese;

Para a minha família.

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	i
Lista de figuras e tabelas.....	ii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Conceito de dor.....	1
1.2. Vias neuronais envolvidas na percepção da dor.....	1
1.3. Vias descendentes modulatórias da dor.....	3
1.4. Tipos de dor e mediadores envolvidos.....	5
1.5. A família das endotelinas.....	8
1.6. As endotelinas na inflamação.....	11
1.7. As endotelinas na dor.....	16
1.8. Mecanismos de hipersensibilidade tipo I ou “alérgica”.....	17
1.9. Participação das endotelinas em processos alérgicos.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23

3.1. Animais.....	23
3.2. Protocolos experimentais.....	23
3.2.1. Estudos com administração de endotelinas.....	23
3.2.2. Possível participação das endotelinas endógenas nos efeitos nociceptivo e hiperalgésico de antígeno.....	28
3.3. Análise estatística.....	31
3.4. Drogas e soluções.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Estudos com administração de endotelinas.....	33
4.2. Possível participação das endotelinas endógenas nos efeitos nociceptivo e hiperalgésico de antígeno.....	48
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

ABREVIACÕES

AMPc= monofostato de adenosina cíclico
APC= célula apresentadora de antígeno
CDME= corno dorsal da medula espinhal
DLF= funículo dorso-lateral
ECE= enzima conversora de endotelina
ENC= encefalinérgico
GLU= glutamato
i.d.= intradérmica
i.pl. = intraplantar
i.v.= intravenosa
ICAM= molécula de adesão intercelular
Ig= imunoglobulina
iL= interleucina
INF= interferon
LPS= lipopolissacarídeo
MCP-1= proteína quimiotática de monócito-1
mRNA= ácido ribonucléico (mensageiro)
NF-κB= fator nuclear-κB
NMDA= ácido n-metil-d-aspartato
NMR= núcleo magno da rafe
OVA= ovoalbumina
PG= prostaglandina
s.c.= subcutânea
SCP= substância cinzenta periaquedutal
SG= substância gelatinosa
SNC= sistema nervoso central
TGF-β= fator de transformação de crescimento-β
TNF-α = fator de necrose tumoral – alfa
TXA₂= tromboxano A₂

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 01** – Diagrama esquemático, ilustrando as principais estruturas envolvidas na transmissão da informação dolorosa da periferia para o sistema nervoso central, bem como da modulação descendente desta resposta02
- Figura 02** – Estruturas dos peptídeos da família das endotelinas.....10
- Figura 03** – Vias de síntese das endotelinas e afinidade relativa destes peptídeos, e seus antagonistas, por receptores endotelinérgicos.....12
- Figura 04** – Efeito nociceptivo induzido pela endotelina-1 na pata de camundongos.....35
- Figura 05** – Efeito hiperalgésico da endotelina-1 sobre a nocicepção induzida por capsaicina na pata de camundongos.....38
- Figura 06** – Efeito edematogênico induzida pela endotelina-1 na pata de camundongos41
- Figura 07** - Influência da endotelina-1 no decurso temporal do tempo de lambida da pata induzido por capsaicina.....43
- Figura 08** – Influência do tratamento prévio com BQ-788 ou sarafotoxina S6c sobre os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da endotelina-1 na pata de camundongos.....46

- Figura 09** - Influência do tratamento prévio com FK-888, MK-801 ou Calfostin C sobre os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da endotelina-1 na pata de camundongos.....47
- Figura 10** – Curva dose-resposta para o efeito nociceptivo induzido por ovoalbumina na pata de camundongos..... 49
- Figura 11** – Influência do tratamento prévio com morfina sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos.....50
- Figura 12** - Influência da dessensibilização com Composto 48/80 sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos.....51
- Figura 13** – Influência do tratamento prévio sistêmico com antagonistas endotelinérgicos sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos..... 53
- Figura 14** - Influência do tratamento prévio local com antagonistas endotelinérgicos sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos.....54
- Figura 15** - Influência do tratamento prévio sistêmico com antagonistas endotelinérgicos sobre o efeito hiperalgésico à capsaicina, induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos..... 56
- Figura 16** – Influência da sarafotoxina S6c sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos..... 57
- Figura 17** – Diagrama ilustrativo dos efeitos induzidos pela endotelina-1 na pata de camundongos, e dos respectivos receptores envolvidos nestas ações..... 64

Figura 18 – Representação esquemática da proposta sobre a contribuição das endotelinas endógenas para os efeitos observados em estágios iniciais da resposta imune à OVA em animais sensibilizados.....68

Figura 19 – Representação esquemática da proposta sobre a contribuição das endotelinas endógenas para os efeitos observados em estágios mais tardios da resposta imune à OVA em animais sensibilizados.....71

Tabela 1 – Efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da endotelina-3 na pata de camundongos.....36

Tabela 2 – Ausência de efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico dos agonistas seletivos de receptores ET_B37

Tabela 3 – Efeito vasoconstritor de agonistas dos receptores endotelinéricos no dorso de camundongos..... 44

RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da injeção intraplantar (i.pl.) de endotelinas (ETs) em camundongos. Além disso, avaliou-se também a contribuição das ETs para a nocicepção e a hiperalgesia desencadeadas por ovoalbumina (OVA) em animais previamente sensibilizados a este antígeno. A ocorrência de hiperalgesia foi avaliada como uma potencialização da resposta nociceptiva à injeção i.pl. ipsilateral de capsaicina.

A administração de ET-1 (0,3 a 30 pmol, i.pl.) causou efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico dependentes de dose. Estas respostas parecem ser mediadas por receptores ET_A, pois são bloqueados pelo tratamento prévio com antagonistas seletivos deste receptor (A-127722.5, 6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, i.v.; BQ-123, 1 nmol, i.pl.) mas não de receptores ET_B (BQ-788, 10 nmol, i.pl.). Além disso, agonistas seletivos de receptores ET_B (sarafotoxina S6c ou IRL 1620, até 30 ou 100 pmol, respectivamente) não deflagram quaisquer dos três efeitos da ET-1. Por sua vez, diferentes evidências sugerem que os receptores ET_B medeiam um efeito anti-hiperalgésico seletivo para a ET-1. Na presença de um antagonista seletivo deste tipo de receptores, tanto a ET-3 (30 pmol) quanto a ET-1 (10 pmol) potencializaram a nocicepção à capsaicina, em doses que não causaram tal efeito na ausência do mesmo. Além disso, o agonista seletivo de receptores ET_B, sarafotoxina S6c (30 pmol), inibiu a hiperalgesia induzida pela ET-1 (10 pmol) sem modificar seus efeitos nociceptivo ou edematogênico. Em outra série de experimentos, observou-se que injeção i.pl. de ovoalbumina (OVA,

0,3 $\mu\text{g/pata}$), em camundongos sensibilizados previamente ao antígeno, acarreta uma resposta nociceptiva associada a hiperalgesia à capsaicina. O efeito nociceptivo da OVA foi reduzido pelo tratamento prévio dos animais com um antagonista misto ET_A/ET_B (bosentan, 3 ou 10 mg Kg^{-1} , i.v.) ou com antagonistas seletivos ET_A (A-127722.5, 6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, i.v.; BQ-123, 3 nmol , i.pl.). Interessantemente, a resposta à OVA foi aumentada, sobremaneira, nos animais previamente tratados com o antagonista seletivo de receptores ET_B , A-192621.1 (25 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$; i.v.). Por sua vez, a resposta hiperalgésica é bloqueada pelo tratamento prévio dos animais com A-127722.5 (6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$; i.v.) ou A-192621.1 (50 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$; i.v.). Este conjunto de resultados sugere que ETs endógenas contribuem, importante, para a resposta nociceptiva e hiperalgésica deflagrada por antígeno em camundongos. Embora exista claramente um componente destas respostas que é mediado por receptores ET_A , o papel de receptores ET_B parece modificar-se no transcorrer da reação imune, na qual uma influência anti-hiperalgésica inicial é convertida em hiperalgésica numa fase mais tardia da resposta. O fato da sarafotoxina S6c (10 ou 30 pmol) potencializar a nocicepção causada por OVA em animais previamente sensibilizados ao antígeno reforça esta hipótese de alteração funcional do receptor ET_B durante a inflamação imune.

ABSTRACT

The present study investigates the nociceptive, hyperalgesic and edematogenic effects of intraplantar (i.pl.) injection of endothelins (ETs) in mice, as well as the possible contribution of endogenous ETs to the nociception and hyperalgesia triggered by ovalbumin (OVA) in paws of animals previously sensitized to this antigen. Occurrence of hyperalgesia was evaluated as the potentiation of nociceptive response to ipsilateral i.pl. injection of capsaicin. ET-1 (0.3 - 30 pmol) administration caused dose-dependent nociceptive, hyperalgesic and edematogenic effects. These responses seemed to be mediated through ET_A receptors, since they were blocked by previous treatment with selective ET_A receptor antagonists (A-127722.5, 6 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, i.v.; BQ-123 nmol, i.pl.) but not by a ET_B selective receptor antagonist (BQ-788, 10 nmol, i.pl.). Still, ET_B selective agonists (sarafotoxin S6c ou IRL 1620, up to 30 or 100 pmol, respectively) did not induce any of three effects of ET-1. On the other hand, evidence suggests that ET_B receptors mediate an ET-1 selective anti-hyperalgesic effect. In the presence of a selective antagonist of these receptors, either ET-3 (30 pmol) or ET-1 (10 pmol) increased the potentiation of capsaicin-induced nociception, in doses which have not caused such effect in the absence of antagonist. Moreover, the selective ET_B receptor agonist, sarafotoxin S6c (30 pmol), inhibited ET-1 (10 pmol) induced hyperalgesia, without altering either nociceptive or edematogenic effects.

In another set of experiments, i.pl. injection of OVA (0,3 μg) in sensitized mice caused nociception and associated hyperalgesia to capsaicin. The nociceptive effect of OVA was reduced by previous treatment of the animals with mixed ET_A/ET_B

receptor antagonist (bosentan, 3 ou 10 mg kg⁻¹, i.v.) or with ET_A selective receptor antagonists (A-127722.5, 6 μmol Kg⁻¹, i.v.; BQ-123 nmol, i.pl.). Interestingly, the response to OVA was augmented, in great fashion, in animals previously treated with an ET_B selective receptor antagonist (A-192621.1, 25 μmol Kg⁻¹, i.v.). On the other hand, the hyperalgesic response was blocked by treatment with either ET_A (A-127722.5, 6 μmol kg⁻¹, i.v.) or ET_B (A-192621.1, 50 μmol kg⁻¹, i.v.) selective receptor antagonists. This group of results suggests that endogenous ETs are important mediators implicated in nociceptive and hyperalgesic responses triggered by antigen in mice. Although there is an ET_A receptor-mediated endothelinergic component in these responses, the function of the ET_B receptor seems to be converted from an anti-hyperalgesic to an hyperalgesic role during development of the immune response. The finding that sarafotoxin S6c (10 ou 30 pmol) potentiated OVA-induced nociception in sensitized animals, reinforces the view of a relevant functional shift in the role of ET_B receptors during inflammation.

1. Introdução

1.1 - Conceito de Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1997), como “uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nestes termos”. Observa-se, a partir deste conceito, que a interpretação de estímulos dolorosos pelo indivíduo envolve não apenas os aspectos neurobiológicos associados à geração da informação nociceptiva e sua transmissão através de vias sensoriais apropriadas, mas também aspectos sócio-culturais relacionados aos indivíduos e do contexto em que o fenômeno ocorre. Essas influências individuais são tão relevantes, que tornam até mesmo difícil estabelecer uma relação constante e previsível entre a dor e a lesão orgânica (para revisão ver LOESER e MELZACK, 1999).

1.2 - Vias Neuronais Envolvidas na Percepção da Dor

Para uma melhor compreensão do texto a seguir, a Figura 1 demonstra um diagrama esquemático sobre o que se entende atualmente sobre a neurobiologia das vias ascendentes e modulatórias da dor. Normalmente a sensação dolorosa é iniciada com a detecção de um estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, de natureza mecânica, térmica ou química por sensores periféricos chamados nociceptores. Apesar do termo sugerir uma estrutura especializada, os nociceptores são terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias finas não-mielinizadas (Fibras C) ou pouco mielinizadas (Fibras A δ). A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, fazem sinapses com neurônios secundários do corno medular dorsal, principalmente nas lâminas de Rexed I, II e V, (para revisão ver BESSON, 1999; SNIDER e McMAHON, 1998). Por sua vez, estes últimos dão

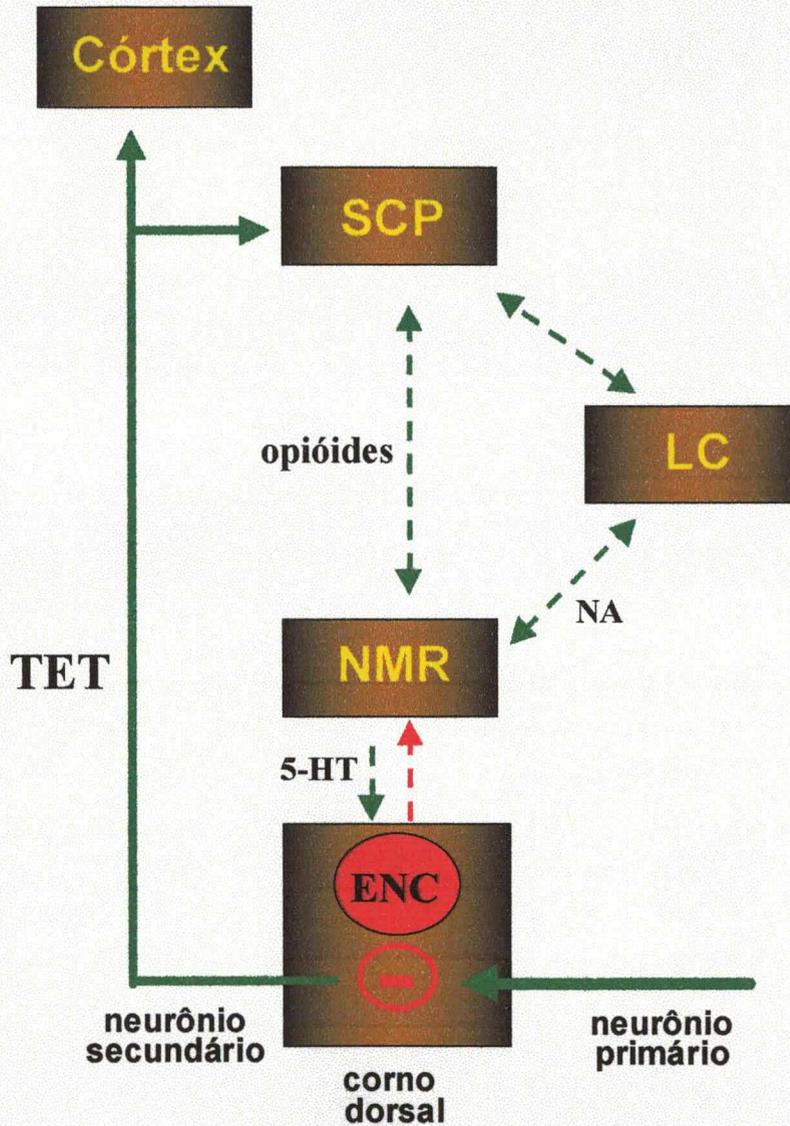


FIGURA 1: Diagrama esquemático ilustrando as principais estruturas envolvidas na transmissão da informação dolorosa da periferia para o sistema nervoso central, bem como na modulação descendente desta resposta. Ver texto para explicações. **TET**= trato espinotalâmico; **SCP**= substância cinzenta periaquedutal; **LC**= *locus coeruleus*; **NMR**= núcleo magno da rafe; **5-HT**= serotonina; **NA**= noradrenalina; **ENC**= interneurônio inibitório encefalinérgico. Adaptado de: **FIELDS e BASBAUM, 1999.**

origem às vias ascendentes da dor, que são responsáveis pela transmissão do impulso às estruturas centrais supra-espinhais.

As principais vias ascendentes nociceptivas são as vias espinotalâmicas ventrais e dorsais. As ventrais incluem os tratos neoespinotalâmico e espinocervicotalâmico e o sistema pós-sináptico da coluna dorsal, que terminam em núcleos talâmicos (predominantemente no núcleo ventrocaudal), de onde partem as radiações talâmicas para o córtex somestésico. Tais vias e núcleos estão envolvidas com o aspecto sensitivo-discriminativo da dor. Por outro lado, as vias do grupo espinotalâmico dorsal incluem os tratos paleoespinotalâmico e paleotrigeminotalâmico, que terminam diretamente nos núcleos mediais e intralaminares do tálamo, bem como os tratos espinorreticular e espinomesencefálico e o sistema ascendente multissináptico proprioespinal. As vias neurais espinotalâmicas dorsais terminam, ainda que indiretamente, nos mesmos núcleos talâmicos inervados pelas vias ventrais, depois de fazerem sinapse na formação reticular do tronco cerebral e na substância cinzenta periaquedutal (SCP), de onde partem também as vias reticulotalâmicas, que constituem projeções para diversas regiões do sistema límbico e substância cinzenta periventricular. Por essas razões, acredita-se que as vias espinotalâmicas dorsais, ao inervarem núcleos como o sistema límbico, estariam relacionadas aos aspectos afetivo-motivacionais da dor (para revisão ler MILLAN, 1999).

1.3 - Vias Descendentes Modulatórias da Dor

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da sensação dolorosa, o organismo humano dispõe de sistemas moduladores da dor. Isto significa que o sistema nervoso central (SNC) não serve apenas como um centro receptor destes estímulos, mas que ele também modula a transmissão desta

informação e, desta forma, permite-nos selecionar determinadas informações sensoriais como o que ocorre, por exemplo, em circunstâncias de alto estresse para o indivíduo (assalto, acidente...). A descoberta destas vias regulatórias da dor iniciou-se em 1965, quando MELLZACK e WALL publicaram um importante trabalho no qual propuseram a existência de um sistema de controle da dor por comporta, pelo qual a entrada dos impulsos nociceptivos no SNC seria regulada pela atividade de interneurônios inibitórios presentes no corno dorsal da medula espinhal, mais especificamente na área denominada de substância gelatinosa (SG, lâmina II de Rexed). Posteriormente, ocorreram descobertas que demonstraram que a eficácia da comporta também poderia ser regulada por estruturas supra-espinhais. Em 1969, REYNOLDS obteve analgesia suficiente para realizar procedimentos cirúrgicos no abdômen de ratos ao estimular eletricamente a SCP, uma estrutura do mesencéfalo. Pesquisas subseqüentes comprovaram que a SCP faz parte de um circuito central que controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (CDME) (para revisão ver FIELDS e BASBAUM, 1999).

Atualmente é bem aceita a idéia de que a analgesia obtida nestes casos, por estimulação de vias descendentes modulatórias da dor, depende da via que liga a SCP ao núcleo magno da rafe (NMR), de onde partem fibras serotoninérgicas, que seguem pelo funículo dorso-lateral (DLF) até alcançarem a SG (lâmina II de Rexed) da medula espinhal. Neste local, são ativados os interneurônios inibitórios, que bloqueiam a passagem do impulso doloroso proveniente da periferia através da liberação de encefalinas, peptídeos com atividade opióide (para revisão ver FIELDS e BASBAUM, 1999). Sabe-se atualmente que a injeção local de morfina na SCP também causa um efeito analgésico que é bloqueado por naloxona, o antagonista específico da morfina, ou por lesões do NMR ou das vias descendentes para a medula espinhal. Além disso, antagonistas serotoninérgicos

ou inibidores da síntese neuronal deste neurotransmissor, inibem a analgesia obtida através da estimulação elétrica da SCP. Ao nível da medula espinhal, parece que a modulação da sinapse entre neurônios de primeira e segunda ordem também pode envolver, além das encefalinas, outros neurotransmissores como a dopamina e o GABA (para revisão ver SORKIN e WALLACE, 1999).

1.4 - Tipos de Dor e Mediadores Envolvidos

Embora William Morton tenha afirmado em 1846, ao utilizar um anestésico geral pela primeira vez, que *"there will be no more pain"*, a dor continua sendo um dos maiores flagelos que acometem a humanidade (apud MANNION e WOOLF, 2000). Certamente, a inadequação dos tratamentos atuais disponíveis para a dor se deve, em grande parte, à compreensão ainda incompleta desta condição. Porém, já há clareza quanto à existência de pelo menos dois tipos de dor: a dor aguda e a dor crônica. Estas distinguem-se por diferenças nos tipos de células recrutadas, nos mecanismos implicados ao nível intracelular, bem como na plasticidade das sinapses neuronais envolvidas.

Enquanto a dor aguda é efetivamente percebida como uma sensação do tipo "em pontada", durante a dor crônica observa-se principalmente uma sensação do tipo "queimação", que é espontânea (i.e., independe da presença do estímulo nocivo), podendo ainda ser recorrente ou incessante. Além disso, a dor crônica propicia o desenvolvimento de quadros onde ocorrem alterações na percepção dolorosa. Dentre estes podemos citar a hiperalgesia, aumento da sensibilidade a estímulos nocivos, bem como a alodinia, onde observa-se o aparecimento de dor para estímulos que normalmente não são nocivos (para revisão ver MANNION e WOOLF, 2000). Contudo, embora esta classificação da dor tenha contribuído até o momento para a terapia clínica, alguns autores acreditam que esta dicotomia seja

insustentável, sugerindo que a dor aguda deva ser considerada, na verdade, uma fase inicial de um extenso processo desencadeado por uma lesão tecidual (para revisão ver CARR e GOUDAS, 1999).

Com relação às diferenças celulares entre os dois tipos de dor, muitos estudos evidenciam a ocorrência de mecanismos neurofisiológicos diferentes para a percepção de estímulos nocivos de baixa ou alta intensidade, bem como durante estímulos transitórios (dor aguda) ou persistentes (dor crônica). Enquanto os estímulos nocivos transitórios parecem envolver apenas a liberação do aminoácido excitatório glutamato (GLU) pelos neurônios aferentes primários, que atua em seus receptores ionotrópicos do tipo AMPA nos neurônios de segunda ordem, estímulos nocivos repetitivos ou de alta-intensidade podem promover um fenômeno do tipo *wind up*. Este último fenômeno é mediado pela ativação de receptores NMDA, com conseqüente aumento da sensibilidade dos neurônios centrais a estímulos nocivos ou não-nocivos, que poderiam explicar o aparecimento de hiperalgesia e alodinia, respectivamente (para revisão ver MANNION e WOOLF, 2000).

Além disso, sabe-se há bastante tempo que a instalação de um processo inflamatório, local ou disseminado, determina modificações profundas nas condições de processamento da informação dolorosa, tanto em nível periférico quanto central. Tais alterações resultam em mudanças qualitativas importantes da dor, tais como os citados anteriormente (alodinia, hiperalgesia ou neuropatias) (para revisão ver GRUB, 1998; KUMAZAWA, 1998; WOOLF & MANNION, 1999; BENNET, 2000). Assim, além das diferentes substâncias que podem atuar como agentes nociceptivos diretos, gerando atividade nas fibras aferentes primárias, muitos mediadores inflamatórios possuem a propriedade de sensibilizar neurônios periféricos ou centrais, tornando-os mais propensos a serem ativados por estímulos térmicos, químicos ou mecânicos (para revisão ver CARSTENS, 1995; MILLAN,

1999).

Dentre as substâncias endógenas capazes de ativar diretamente os neurônios podemos destacar a bradicinina, a serotonina, íons hidrogênio e íons potássio. Por sua vez, mediadores inflamatórios que contribuem para a hiperalgesia podem ser liberados por células residentes, incluindo histamina e serotonina de mastócitos, prostaglandinas de fibroblastos e de terminações simpáticas, bem como a bradicinina a partir do cininogênio tecidual ou do sangue. Outros mediadores ainda, são liberados por células do sistema imune, que são atraídos para o local da lesão. Estes incluem citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina(IL)-1, IL-6 e quimiocinas, como a IL-8, entre outros (para revisão ver WATKINS *et al.*, 1995a; MILLAN, 1999).

A bradicinina é capaz de ativar e de sensibilizar as fibras aferentes primárias, enquanto a serotonina e as prostaglandinas são capazes de sensibilizar estas fibras para a ação de outros agentes químicos (para revisões, ver HANDWERKER e REEH, 1991; CALIXTO *et al.*, 2000). As citocinas parecem estar envolvidas também na hiperalgesia desencadeada por carragenina, envolvendo liberação consecutiva de TNF- α , IL-1 β , IL-6, eicosanóides da via da ciclooxigenase, IL-8 e substâncias simpatomiméticas (CUNHA *et al.* 1992). Outros trabalhos também demonstram a capacidade destes agentes promoverem hiperalgesia. A IL-6, quando injetada intratecalmente, induz hiperalgesia térmica em modelo de dor neuropática em ratos (DeLEO *et al.*, 1996). O TNF- α (intraperitonealmente) produz hiperalgesia térmica, de forma dependente de dose, no teste do "tail-flick" (WATKINS *et al.*, 1995b). Além disso, a IL-1 β pode ser responsável pelo aumento dos níveis plasmáticos de neurotrofinas (ex.: fator de crescimento de nervo) que, por sua vez, estaria relacionada ao desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória

(SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995).

Com relação aos produtos da ciclooxigenase, já há bastante tempo tem-se registrado que as prostaglandinas são capazes de causar hiperalgesia, potencializando as sensações dolorosas provocadas por agentes como a bradicinina e a histamina (CRUNKHORN e WILLIS, 1971; FERREIRA, 1972), além de aumentarem a incidência de comportamento doloroso em vários modelos animais de dor (WILLIS e CORNELESSEN, 1973; FERREIRA *et al.*, 1978). Uma das hipóteses que poderia justificar tais efeitos seria a capacidade das mesmas em aumentar a liberação de neuropeptídeos pró-nociceptivos a partir dos neurônios sensoriais (VASKO *et al.*, 1994).

Para finalizar, cabe salientar ainda que o efeito hiperalgésico desencadeado por cada um dos agentes acima citados, geralmente ocorre simultaneamente à ação de outros compostos e, sendo assim, diferentes interações ainda podem ocorrer, até mesmo no sentido de controlar processos relacionados ao fenômeno nociceptivo (para revisão ver MILLAN, 1998). Utilizando-se um modelo de hiperalgesia mecânica em ratos, observou-se que citocinas como a IL-4, IL-10 e IL-13 são capazes de reduzir a hiperalgesia induzida por diferentes agentes, tais como carragenina, bradicina e LPS (POOLE *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 1999; Lorenzetti, *et al.*, 2001). Estes estudos demonstraram ainda que os mecanismos envolvidos na ação anti-hiperalgésica destas citocinas parece envolver a inibição da produção de citocinas, bem como a produção de prostanóides induzida por citocinas.

1.5 - A Família das Endotelinas

As endotelinas constituem uma família de peptídeos estruturalmente relacionados contendo 21 resíduos de aminoácidos, sendo eles a endotelina-1, a

endotelina-2 e a endotelina-3 (YANAGISAWA *et al.*, 1988; INOUE *et al.*, 1989). Esses peptídeos apresentam, ainda, grande homologia estrutural com as sarafotoxinas presentes no veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (FIGURA 2, para revisão ver HAYNES e WEBB, 1993; KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001).

As endotelinas -1, -2 e -3 são codificadas por três genes distintos, encontrados nos cromossomos 6, 1 e 20, respectivamente. A formação da endotelina-1 é precedida pela síntese de big-endotelina-1, um peptídeo com 38 resíduos de amino ácidos que é clivado a partir de um peptídeo precursor (212 amino ácidos), conhecido como pré-pró-endotelina-1, pela ação de endopeptidases. Finalmente, a síntese da endotelina-1 “madura”, a partir da big-endotelina-1, ocorre por atividade de enzimas conversoras de endotelinas (ECE), que são sensíveis ao fosforamidon. As endotelinas exercem suas ações através da interação com receptores específicos pertencentes à família de receptores acoplados a proteínas G, os quais possuem sete domínios transmembrana (para revisão ver KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001). Em mamíferos, esses receptores podem ser de dois tipos: o receptor ET_A, que possui maior afinidade pela endotelina-1 do que pela endotelina-3 (ARAI *et al.*, endotelina-3 (ARAI *et al.*, 1990); e o receptor ET_B, que apresenta afinidade semelhante a ambos os peptídeos (SAKURAI *et al.*, 1990). Os efeitos mediados pelos dois tipos de receptores podem ser diferenciados pelo uso de agonistas e antagonistas seletivos. O receptor ET_A é seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos como BQ-123, ou não-peptídicos tais como o BMS 182874 e o A-127722.5. Já o receptor ET_B é seletivamente estimulado por agonistas como a sarafotoxina S6c e o IRL 1620, e é seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos como BQ-788 e RES-701-1, ou pelo composto não-peptídico A-192621.1. Existem também diferentes antagonistas não-seletivos (ou mistos) para receptores ET_A/ET_B, tais como o

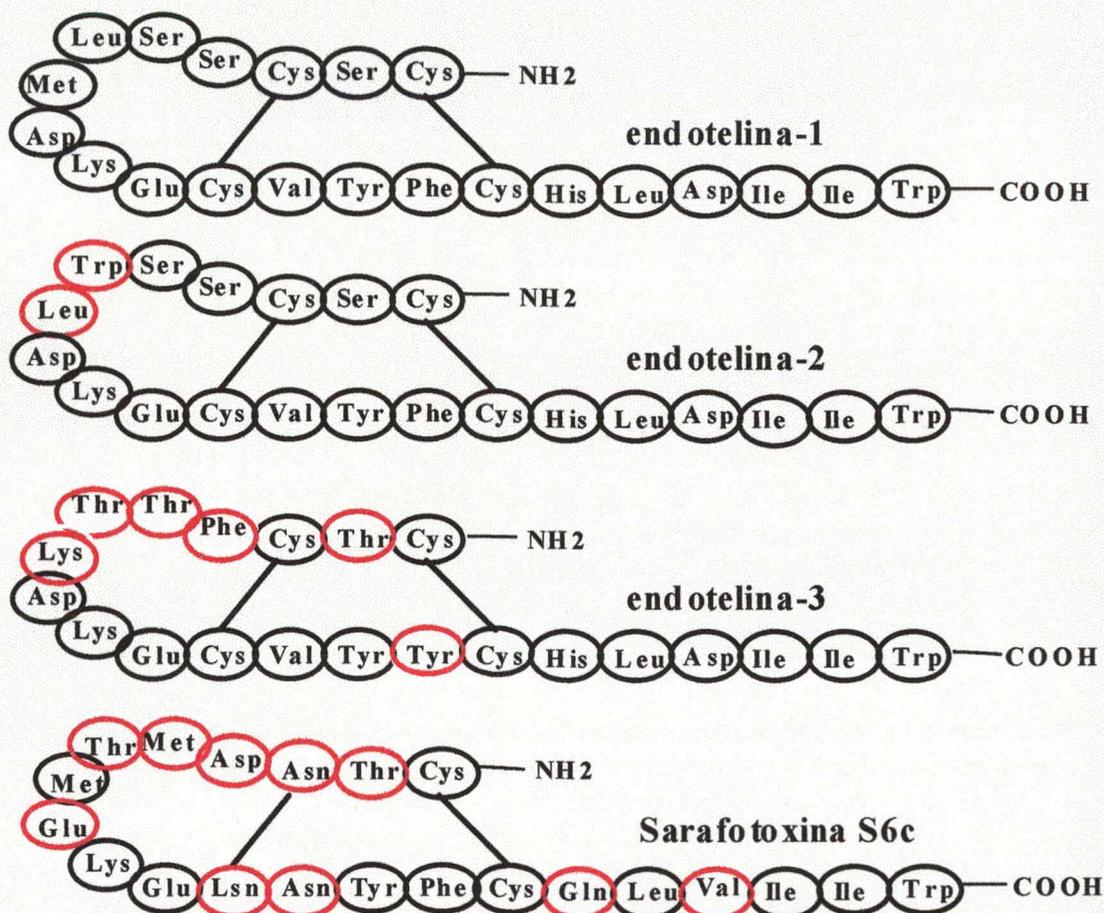


FIGURA 2: Família das endotelinas. Comparação entre a seqüência de resíduos de aminoácidos que compõem os três peptídeos endotelinérgicos (endotelinas-1, -2 e -3) e a sarafotoxina S6c, toxina presente no veneno das serpentes do gênero *Actractaspis enganddensis*. Símbolos vermelhos representam os pontos onde ocorrem as diferenças de aminoácidos. Adaptado de: HAYNES e WEBB, 1993.

bosentan, o SB 217242 e o TAK-044 (FIGURA 3, para revisões ver MASAKI *et al.*, 1994; SOKOLOVSKY, 1995; OPGENORTH *et al.*, 1996).

1.6 - As Endotelinas na Inflamação

Diversos estímulos ou mediadores inflamatórios que possuem propriedades nociceptiva e/ou hiperalgésica podem agir como liberadores de endotelinas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo que as mesmas poderiam estar diretamente relacionadas a estes processos. O lipopolissacarídeo de membrana de bactérias gram-negativas (LPS; geralmente de *Escherichia coli*) aumenta a liberação de endotelinas em cultura de células endoteliais de vasos como a aorta (SUGIURA *et al.*, 1989) ou a artéria pulmonar (OHLSTEIN *et al.*, 1991), bem como a partir de células das vias aéreas respiratórias (NINOMYIA *et al.*, 1991; NAKANO *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1997; SAMRANSAMRUJKIT *et al.*, 2000), células hepáticas (GANDHI *et al.*, 2000) ou a partir de células fagocíticas, como os macrófagos e os monócitos (EHRENREICH *et al.*, 1990; CUNNINGHAM *et al.*, 1991; EHRENREICH *et al.*, 1993; LUO & SUN, 1998; SALH, *et al.*, 1998). Alguns estudos também demonstraram que o LPS, além de aumentar a liberação celular de endotelinas, pode aumentar a síntese do RNA mensageiro (mRNA) responsável pela transcrição de endotelinas ou de alguns de seus precursores, a pre-pró-endotelina-1 e a pré-pró-endotelina-3, em hepatócitos (EAKES *et al.*, 1997) ou na musculatura esquelética do diafragma (GUO *et al.*, 1998) de ratos e, ainda, sinergicamente com outras citocinas, a partir de células de músculo liso vascular de humanos em cultura (WOODS *et al.*, 1999).

Com relação às citocinas e quimiocinas, recentemente observou-se que substâncias destas classes, principalmente a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) ou uma mistura de citocinas contendo TNF- α , IL-1- β e interferon- γ , induzem

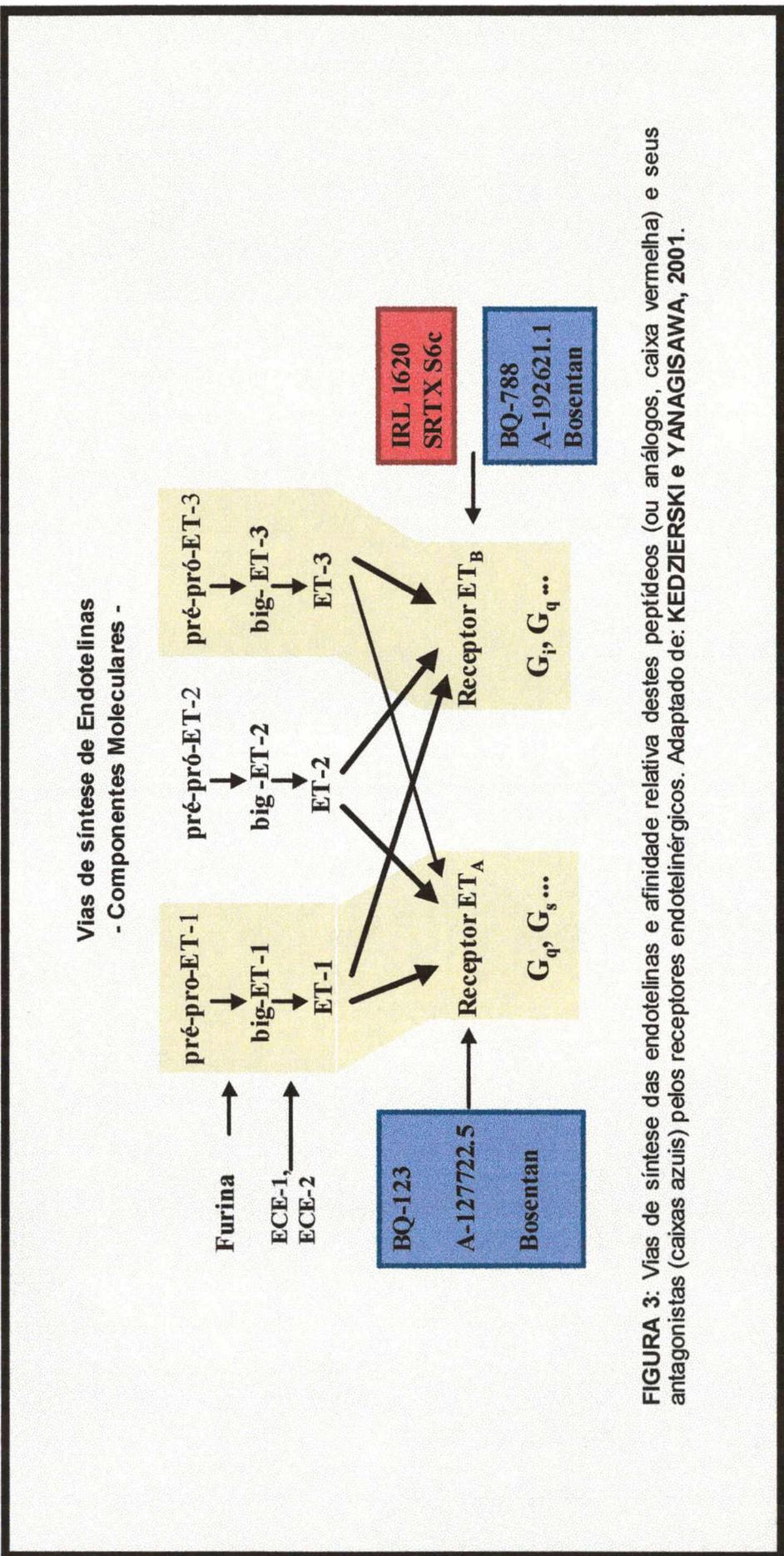


FIGURA 3: Vias de síntese das endotelinas e afinidade relativa destes peptídeos (ou análogos, caixa vermelha) e seus antagonistas (caixas azuis) pelos receptores endotelinêrgicos. Adaptado de: KEDZERSKI e YANAGISAWA, 2001.

um significativo aumento na expressão de mRNA para endotelina-1 a partir do endotélio de veias umbilicais humanas (MOLET *et al.*, 2000). Sabe-se também que IL-1, IL-2, IL-6 e o TNF- α , bem como a quimiocina IL-8, são capazes de aumentar os níveis de endotelinas no sobrenadante de células epiteliais de traquéia de cobaia em cultura (ENDO *et al.*, 1992). Além disso, o TNF- α estimula a secreção de endotelina-1 a partir de células endoteliais da microvasculatura de bovinos (OKUDA *et al.*, 1999); enquanto o tratamento *ex vivo* com IL-2, em ratos, aumenta a liberação de endotelinas pelo mesentério isolado perfundido (MIYAMORI *et al.*, 1991), e a IL-6 é capaz de promover sua liberação a partir de células amnióticas cultivadas humanas (MITCHELL *et al.*, 1991). Já o interferon- β estimula a produção de endotelinas em fibroblastos de pele humana (ZEBALOS *et al.*, 1991), e o interferon(INF)- γ é um estímulo efetivo para sua liberação a partir de células endoteliais pulmonares bovinas (KANSE *et al.*, 1991) e de monócitos humanos (SALH *et al.*, 1998). Segundo alguns estudos recentes, o aumento na produção de endotelina-1 induzida por diferentes citocinas em células do músculo liso vascular de humanos parece envolver processos intracelulares como a elevação dos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B)(WOODS *et al.*, 2000a; 2000b).

Além das citocinas, parece que diferentes fatores de crescimento podem aumentar a produção de endotelinas em diferentes tecidos. O fator de crescimento e transformação(TGF)- β -2 aumenta a expressão de mRNA para endotelina-1 em células endoteliais e do músculo liso vascular de ratos em cultura (GONZALES *et al.*, 2001); já o TGF- β -1 aumenta sua expressão a partir de células do endotélio de artérias pulmonares (LEE *et al.*, 2000) e parece estimular diretamente a liberação de endotelina-1 tanto em células do endotélio (KITA *et al.*, 1997) quanto em células do músculo liso vascular (SUGO *et al.*, 2001) nesta mesma espécie.

Falamos até agora sobre a capacidade de diversos mediadores em induzir a liberação de endotelinas a partir de diferentes tipos de células. Porém, por sua vez, as endotelinas também são capazes de induzir a liberação de agentes que têm sido envolvidos com os processos dolorosos, sendo que desta forma elas poderiam estar indiretamente envolvidas em tais processos. Dentre estes agentes podemos destacar as citocinas, os eicosanóides e a histamina.

A endotelina-1 estimula a produção das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1 e de fator estimulador de colônia de macrófago/granulócito (GM-CSF) em humanos (HURIBAL *et al.*, 1992; CUNNINGHAM *et al.*, 1993; HELSET *et al.*, 1993), libera IL-6 a partir de células endoteliais de ratos (XIN *et al.*, 1995) ou de células do músculo liso vascular de humanos (BROWATZKI, *et al.*, 2000), libera IL-1, IL-6 e TNF- α a partir de células endoteliais humanas (STANKOVA *et al.*, 1996) e a quimiocina IL-8 a partir de células endoteliais derivadas de vasos cerebrais de humanos (HOFMAN, *et al.*, 1998). Ainda o TNF- α , juntamente com as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 têm sua expressão (mRNA) aumentada pela endotelina-1 em células mesangiais humanas (CHEN *et al.*, 1997).

Quanto aos eicosanóides, recentemente observou-se que tanto a endotelina-1 quanto a endotelina-3 são estímulos capazes de promover a liberação de prostaglandina(PG)-F_{2 α} e de PGE₂ a partir de células lúteas humanas em cultura (MICELI *et al.*, 2001). A endotelina-1 também é um potente liberador de prostanóides em pulmão perfundido isolado de ratos ou cobaias, entre outros tecidos (TOUVAY *et al.*, 1990; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1992; De NUCCI *et al.*, 1988). Também libera PGD₂, PGE₂, PGI₂ e PGF_{2 α} a partir de brônquio humano (HAY *et al.*, 1993), além das PGE₂ e PGF_{2 α} a partir de células epiteliais das vias aéreas de gato (WU *et al.*, 1993), PGE₂ e PGI₂ de baço e fígado perfundidos de coelho (RAE *et al.*, 1989) e PGI₂ de

células do endotélio aórtico de ratos (ORIJ, 1999). Já a endotelina-3 é capaz de estimular a produção de PGE₂ em astrócitos de ratos cultivados (KOYAMA *et al.*, 1999). Além disso, a endotelina-1 é capaz de liberar tromboxano A₂ (TXA₂) a partir de células das vias aéreas de cobaias (FILEP *et al.*, 1991a), do brônquio humano (HAY *et al.*, 1993) e de macrófagos das vias aéreas de cão (NINOMIYA *et al.*, 1992).

Além dos efeitos já mencionados, as endotelinas possuem outras atividades pró-inflamatórias que dizem respeito ao aumento da permeabilidade vascular, o aumento da expressão de moléculas de adesão e a promoção da migração de leucócitos. Quando administrada sistemicamente, a endotelina-1 aumenta o extravazamento de proteínas plasmáticas a partir da microvasculatura de estômago, duodeno, baço, coração, diafragma, traquéia e brônquio de ratos (FILEP, *et al.*, 1991b; SIROIS *et al.*, 1992; KUROSE, *et al.*, 1993; FILEP *et al.*, 1994; LOPEZ-BELMONTE, *et al.*, 1995). A infusão de endotelina-1 na artéria braquial induz edema no antebraço humano (DAHLOF *et al.*, 1990). Além disso, as endotelinas endógenas parecem contribuir para o desenvolvimento do edema induzido por injeção local de ovoalbumina (OVA) na pata de camundongos previamente sensibilizados a este antígeno (SAMPAIO, *et al.*, 1995) e para o aumento da permeabilidade vascular induzida por glicose em ratos diabéticos (CHEN *et al.*, 2000). Com relação à expressão de moléculas de adesão, sabe-se que a endotelina-1 aumenta de maneira pronunciada a expressão de ICAM-1 nas mucosas gástrica (WATANABE *et al.*, 2000) e de intestino delgado de ratos (OKTAR *et al.*, 2000) e também de VCAM e E-selectina em células endoteliais da microvasculatura humana cultivadas (DUPERRAY, *et al.*, 1995). Além disso, é capaz de aumentar a adesão de leucócitos às células endoteliais pulmonares (HELSET *et al.*, 1994) e coronárias (LOPES-FARRÉ *et al.*, 1993; LEFER *et al.*, 1994) e de neutrófilos às células endoteliais humanas em cultura (McGRECOR, *et al.*, 1994).

Por último, as endotelinas também podem atuar sobre a migração de leucócitos. A endotelina-1 induz agregação de neutrófilos via liberação de PAF (GOMEZ-GARRE *et al.*, 1992), mas os outros peptídeos da família também possuem atividade quimiotática sobre neutrófilos humanos (WRIGHT *et al.*, 1994). Ainda, a endotelina-1 pode servir como fator quimiotático para monócitos e macrófagos (ACHMAD e RAO, 1992), que interessantemente são capazes de gerar endotelina-1 na presença de estímulos inflamatórios tais como o LPS (EHRENREICH *et al.*, 1990; CUNNINGHAM *et al.*, 1991).

1.7 - As Endotelinas na Dor

Além dos efeitos pró-inflamatórios mencionados acima, as endotelinas podem exibir propriedades nociceptivas. Quando administrada intraperitonealmente em camundongos, tanto a endotelina-1 quanto a endotelina-2 e a endotelina-3 promovem comportamento de dor (contorção abdominal), de forma dependente de dose (FERREIRA *et al.*, 1989; RAFFA e JACOBY, 1991; RAFFA *et al.*, 1991; RAFFA *et al.*, 1996). Em humanos, a injeção intradérmica de endotelina-1 no antebraço produz uma resposta composta por prurido intenso, sensibilidade aumentada ao toque direto da área injetada e à pressão numa área em torno ao da sua aplicação (FERREIRA *et al.*, 1989). Além disso, voluntários que se submeteram à infusão de endotelina-1 na artéria braquial também reportaram profunda dor muscular no antebraço, que foi aumentada pelo toque ou por contração muscular (DAHLOF *et al.*, 1990). Por outro lado, a injeção i.pl. de endotelina-1 em ratos induz diminuição do limiar de resposta à aplicação de um estímulo mecânico na pata tratada, *i.e.* causa hiperalgesia (FERREIRA *et al.*, 1989). Estes dados sugerem que as endotelinas possuam propriedades nociceptiva

e hiperalgésica, uma idéia fortalecida também pelos achados de DAVAR e cols. (1998), que observaram que a aplicação de endotelina-1 no nervo ciático de ratos, induz sinais comportamentais de dor.

Recentemente foi também demonstrado que o antagonista de receptores endotelinérgicos ET_A, ABT-627, atenua a alodinia a estímulos mecânicos em animais com neuropatia diabética (JARVIS *et al.*, 2000). Este trabalho reforça nossos achados anteriores, onde demonstramos um efeito hiperalgésico para a endotelina-1 administrada à pata de camundongos (PIOVEZAN *et al.*, 1997, 1998). De acordo com nossos resultados, a endotelina-1 injetada intraplantarmente em doses baixas (até 10 pmol) é capaz de potencializar a resposta nociceptiva à capsaicina (hiperalgesia), através da ativação de receptores ET_A. Por outro lado, uma dose maior do peptídeo (30 pmol) foi efetiva em reverter o efeito hiperalgésico induzido pela serotonina, um efeito (anti-hiperalgésico) que parece ser mediado por receptores distintos, possivelmente do tipo ET_B. Apesar disto, este efeito anti-hiperalgésico não foi totalmente caracterizado, enquanto outros aspectos do efeito pró-nociceptivo das endotelinas exógenas podem ser melhor investigados neste modelo. Ainda, embora alguns trabalhos acima citados tenham especulado quanto a uma possível participação destes peptídeos endógenos em processos dolorosos através da utilização de diferentes modelos experimentais, nenhum deles foi realizado com o emprego de modelos de dor induzida por reação alérgica.

1.8 - Mecanismos de Hipersensibilidade Tipo I ou "Alérgica"

O termo hipersensibilidade é utilizado para designar um tipo de resposta imunológica que ocorre de maneira muito amplificada, e que pode causar danos teciduais. Atualmente são descritos quatro tipos de respostas de hipersensibilidade; as três primeiras são mediadas por anticorpos, enquanto a quarta é mediada

primariamente por células T (linfócitos T) e macrófagos. A reação de Hipersensibilidade Tipo I também pode ser designada de “alérgica” e comumente se estabelece imediatamente após a exposição do indivíduo ao alérgeno, que pode incluir o pólen, os ácaros da poeira doméstica ou pêlos de animais (ROITT *et al.*, 1997).

O mecanismo da reação de hipersensibilidade Tipo I envolve o contato inicial do alérgeno com a mucosa, seguido por uma série complexa de eventos que culminam com a síntese de imunoglobulinas(Ig) da série E, específicas ao alérgeno. As células apresentadoras de antígeno (APC) processam os antígenos e os apresentam para linfócitos T_H, desencadeando a secreção de citocinas como IL-4 e IL-13 pelos mesmos. Um ambiente composto por tais proteínas induzirá a proliferação de linfócitos B, favorecendo a produção dos anticorpos (JUTEL *et al.*, 2001). Após este período de sensibilização, as IgE's recém-sintetizadas ligam-se a receptores específicos presentes em células granulares como mastócitos e basófilos. A partir de uma segunda exposição ao alérgeno, os mesmos ligam-se a estas imunoglobulinas causando um influxo de cálcio para o interior destas células, que determinará sua degranulação e conseqüente liberação de mediadores alérgicos (para revisão ver FICK *et al.*, 2000; OLIVER *et al.*, 2000; WEDEMEYER, *et al.*, 2000).

Embora existam muitas semelhanças entre basófilos e mastócitos, é interessante ressaltar que muitas evidências sugerem que estes dois tipos de células expressam diferenças funcionais e estruturais (WARNER e KROEGEL, 1994). Além disso, os mastócitos também constituem uma população heterogênea e, dependendo do tecido/órgão a que estão associados, podem mostrar diferenças em seu conteúdo granular ou na sua responsividade a diferentes estímulos ou inibidores (PEARCE, 1983; LOWMAN *et al.*, 1998).

1.9 - Participação de Endotelinas em Processos Alérgicos

Até o presente momento, a maioria dos trabalhos que investigam os efeitos das endotelinas em processos alérgicos estão relacionados ao quadro de asma. Isto deve-se provavelmente ao fato de que desde o seu descobrimento, no final da década de 80 (YANAGISAWA *et al.*, 1988), estes peptídeos foram bem caracterizados por suas propriedades ativadoras da musculatura lisa brônquica (UCHIDA *et al.*, 1988; HENRY *et al.*, 1990; D'AGOSTINO *et al.*, 1999). Além de causarem broncoconstrição, as endotinas também mimetizam vários aspectos fisiopatológico associados à asma. Estes efeitos, que incluem hipersecreção ou diminuição do *clearance* do muco brônquico, sugerem que as endotelinas possam atuar também como importantes mediadores da asma (para revisão ver GOLDIE e HENRY, 1998; GOLDIE, 1999; HAY *et al.*, 1999).

De acordo com esta visão, vários autores vêm demonstrando que durante episódios de asma ocorre aumento da imunoreatividade para endotelinas no lavado broncoalveolar (SOFIA *et al.*, 1993), no sangue arterial (TRAKADA *et al.*, 2000) e no soro (PASSOWICZ-MUSZYNSKA *et al.*, 1999) de humanos e de cobaias (DU *et al.*, 1998). Estes dados são reforçados pelos achados de HE e cols. (1998), que demonstraram um aumento significativo na expressão de mRNA para a endotelina-1 em biópsias da mucosa brônquica de pacientes asmáticos.

Outros grupos de pesquisadores vêm sugerindo ainda a participação das endotelinas endógenas em diferentes tipos de reações alérgicas. Em modelos de reação anafilática, a imunoreatividade para endotelinas encontrou-se aumentada no plasma (FILEP *et al.*, 1993) e no tecido epitelial das vias aéreas (KIZAWA *et al.*, 1999) de cobaias sensibilizadas á ovoalbumina. Além disso a concentração de endotelinas-1 e -3, bem como a expressão de mRNA para as mesmas

encontraram-se elevadas em células da mucosa intestinal de cobaias desafiadas com este antígeno (SHIGEMATSU *et al.*, 1998).

Recentemente investigou-se também o papel destes peptídeos em um modelo de pneumonite induzida por um tipo de reação de hipersensibilidade Tipo III e num modelo de asma induzida por antígeno em cobaias. No primeiro caso, os autores observaram que um antagonista seletivo de receptores ET_A, reduziu significativamente diferentes sinais de inflamação, tais como acúmulo celular, atividade da mieloperoxidase e níveis de hemoglobina, no lavado broncoalveolar de animais tratados em comparação ao grupo controle (BATTISTINI *et al.*, 1998). Já no modelo de asma, a utilização de anti-soro contra endotelinas protegeu os animais dos sintomas imediatos e tardios da resposta asmática desencadeada pelo antígeno (UCHIDA *et al.*, 1996).

Apesar de todos os resultados apresentados anteriormente fortalecerem a hipótese de que as endotelinas contribuem para o desenvolvimento de sintomas associados a processos alérgicos, nenhum trabalho até o momento investigou sua participação em modelos de dor alérgica. Contudo, resultados obtidos por diferentes grupos apontam a existência de uma relação entre a atividade das endotelinas e a função dos mastócitos, células que exercem um papel-chave em tais quadros. Imunorreatividade para endotelinas foi encontrada em mastócitos peribiliares de humanos (KODA *et al.*, 2000) e do trato gastrintestinal de ratos (LIU *et al.*, 1998) e, durante algumas patologias a expressão de mRNA para endotelina-1 encontrou-se aumentada em diferentes populações de mastócitos (LI *et al.*, 1999; GILBERT *et al.*, 2000). Além disso, em diferentes circunstâncias, a endotelina-1 também é capaz de liberar histamina de mastócitos de cobaia (UCHIDA *et al.*, 1992), de camundongos (YAMAMURA *et al.*, 1994, 1995; EGGER *et al.*, 1995) ou de ratos

(SZALAY *et al.*, 2000). Ainda, embora não degranule diretamente os mastócitos da pele humana, a endotelina-1 pode ativar indiretamente estas células através da estimulação de nervos sensoriais (BRAIN *et al.*, 1992). Sabe-se também, que quimases liberadas de mastócitos humanos possuem a capacidade de converter as big-endotelinas em peptídeos com 31 resíduos de amino ácidos, as denominadas endotelinas-1-31 (NAKANO *et al.*, 1997), que parecem ser biologicamente ativas.

A idéia de que os mastócitos são células extremamente importantes para o desenvolvimento e a manutenção de respostas alérgicas já está bem estabelecida há algum tempo. Além disso, mais recentemente a idéia de que os mastócitos contribuem de maneira efetiva para o aparecimento da dor, até mesmo a dor aguda, vem sendo apontada por diferentes pesquisadores (RIBEIRO *et al.*, 2000; PARADA *et al.*, 2001). Sendo assim, não é impossível especular-se que as endotelinas possam, direta ou indiretamente, contribuir para os efeitos destas células durante quadros de dor desencadeados por respostas imunológicas.

2. Objetivos

2.1. – Objetivo Geral

O presente estudo foi desenvolvido com o propósito de aprofundar os estudos acerca do efeito hiperalgésico da endotelina-1 no modelo da capsaicina, e de comparar seus efeitos aos de outros agonistas endotelinérgicos, bem como de investigar a contribuição das endotelinas endógenas na nocicepção desencadeada por reações imunes em camundongos.

2.2. - Objetivos Específicos

2.2.1. - avaliar a capacidade da endotelina-1 em causar nocicepção e edema na pata de camundongos;

2.2.2. - analisar novos aspectos do efeito hiperalgésico previamente caracterizado para a endotelina-1;

2.2.3. - verificar a capacidade de outros agonistas endotelinérgicos em causar nocicepção, hiperalgesia e edema na pata de camundongos;

2.2.4. - estudar novos aspectos do efeito anti-hiperalgésico das endotelinas em camundongos;

2.2.5. - investigar a contribuição de endotelinas endógenas nos processos nociceptivo e hiperalgésico desencadeados por reações imunes.

3. Material e Métodos

3.1. - Animais

Este estudo fez uso de camundongos suíços machos, criados pelo Biotério Central da UFSC, que, a partir do desmame, foram alojados em gaiolas contendo cerca de 25 animais, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial da Farmacologia, com livre acesso à água e ração e em ambiente controlado quanto às condições de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (luz das 07:00 às 19:00). Os animais foram utilizados após atingirem um peso entre 25-30 g (cerca de 3 meses de idade), exceto quando especificado diferentemente. Todos os experimentos foram conduzidos no período entre as 08:00 e 17:00 horas, e seguiram os princípios éticos para experimentação animal propostos pela IASP - International Association for the Study of Pain - (ZIMMERMANN, 1983).

3.2. - Protocolos Experimentais

No presente estudo, os protocolos experimentais empregados foram divididos em duas partes, visando, desta maneira, estudar-se 1) os efeitos da administração das endotelinas, e de peptídeos relacionados à pata de camundongos, e 2) a contribuição das endotelinas endógenas para a nocicepção induzida por antígeno nestes animais.

3.2.1. Estudos com Administração de Endotelinas

3.2.1.1. *Efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico de agonistas endotelinérgicos:*

Cada animal recebeu injeção i.pl. de endotelina-1 (0,3 a 30 pmol), endotelina-3 (1 a 30 pmol), sarafotoxina S6c (3 - 30 pmol), IRL 1620 (10 a 100 pmol) ou veículo (solução salina tamponada com fosfato – *phosphate buffered*

saline - PBS). Imediatamente após a injeção, cada animal foi colocado individualmente sob um funil de vidro, atrás do qual foi apoiado um espelho (num ângulo de aproximadamente 70^o em relação à bancada para facilitar a completa visualização do animal em todos os tempos), e a quantidade de tempo (em s) que o animal despendeu lambendo a pata injetada foi registrado cumulativamente por um período de 30 min, utilizando-se um cronômetro.

Uma vez completado o período para a observação do efeito nociceptivo (i.e., 30 min após a primeira injeção), uma solução de capsaicina (0,1 µg em 20 µl de salina contendo 1% de DMSO) foi injetada na pata ipsilateral (anteriormente tratada com os peptídeos), e o tempo de lambida da mesma foi novamente cronometrado por outros 5 min. Esta dose de capsaicina foi escolhida porque, em experimentos preliminares, ela induziu uma resposta nociceptiva significativa e claramente submáxima, sem apresentar efeito edematogênico por si só (PIOVEZAN *et al.*, 1998).

Imediatamente após o registro da resposta nociceptiva à capsaicina, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e ambas as patas foram cortadas na altura do tornozelo e o edema da pata injetada foi avaliado como a diferença no peso (em mg) em relação à pata contralateral (não-tratada). Um grupo separado de animais foi utilizado para estabelecer o decurso temporal (*time-course*) do efeito edematogênico da endotelina-1 (1 a 100 pmol) ou veículo, pela medida das alterações do volume da pata em intervalos de 5 a 15 min até 90 min após a injeção, por pletismometria. Em um outro grupo separado de animais, avaliou-se a influência da sarafotoxina S6c (30 pmol) sobre os efeitos nociceptivo, hiperálgico e edematogênico da endotelina-1 (10 pmol). Nestes experimentos,

os animais receberam injeção i.pl. de sarafotoxina S6c ou de PBS, 30 min antes da endotelina-1 e foram observados como discutido anteriormente.

3.2.1.2.. *Influência de antagonistas de receptores endotelinérgicos nos efeitos da endotelina-1 e da endotelina-3:*

Para a identificação dos receptores endotelinérgicos implicados nos vários efeitos induzidos pela endotelina-1, grupos separados de camundongos foram previamente tratados com BQ-123 ou BQ-788 (1 ou 10 nmol em 20 μ l de PBS, por via i.pl.; antagonistas peptídicos seletivos de receptores ET_A ou ET_B, respectivamente) ou com A-127722.5 (6 μ mol Kg⁻¹, por via intravenosa (i.v.); antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_A). Os respectivos grupos controle foram previamente tratados com igual volume de veículo, em condições semelhantes. Decorridos 15 min da injeção i.pl. ou 60 min da injeção i.v., os animais receberam uma injeção i.pl. ipsilateral de endotelina-1 (10 pmol). Em alguns experimentos, avaliou-se a influência do tratamento prévio com BQ-788 (1 ou 10 nmol), sobre os efeitos da endotelina-3 ou da endotelina-1 (ambas na dose de 30 pmol). As doses i.pl. de BQ-123 ou BQ-788 foram selecionadas baseando-se em estudos prévios de nosso grupo (DE-MELO *et al.*, 1998; PIOVEZAN *et al.*, 1998). Contudo, dada a baixa taxa de dissociação entre as endotelinas e seus receptores (WU-WONG *et al.*, 1994), bem como a aparente falta de dados farmacocinéticos objetivos sobre estes antagonistas peptídicos na literatura (pelo menos quando administrados pelas vias intradérmica, s.c. ou i.pl.), o tempo de pré-tratamento de 15 min foi escolhido para minimizar possíveis influências decorrentes de degradação enzimática local dos antagonistas, bem como para permitir seu acesso aos receptores antes da exposição dos agonistas

endotelinérgicos. A dose e o tempo de pré-tratamento do A-127722.5 foi selecionado baseando-se nos estudos de OPGENORTH *et al.* (1996).

3.2.1.3. Influência do efeito vasoconstritor da endotelina-1 sobre a nocicepção induzida por capsaicina:

Tendo em vista a potente atividade vasoconstritora da endotelina-1, avaliamos se esta ação poderia estar influenciando a resposta nociceptiva induzida por capsaicina, i.e., até que ponto poderia promover alterações farmacocinéticas na distribuição local da capsaicina. Para isto, dois experimentos foram realizados. No primeiro, camundongos foram tratados com endotelina-1 (10 pmol) ou PBS (controle) 30 min antes da injeção de capsaicina e, o tempo que os animais despenderam lambendo a pata tratada foi registrado por 10 min em períodos consecutivos de 1 min, ao invés do protocolo de 5 min cumulativos descrito anteriormente.

No segundo experimento, removeu-se os pêlos do dorso dos camundongos por tricotomia e aplicou-se creme Nudit[®] (Helena Rubenstein, Rio de Janeiro, Brasil) por 3 min à região para completa depilação da superfície. Posteriormente, os animais receberam injeção intravenosa (i.v.) de corante Azul de Evans (30 mg Kg⁻¹). Uma hora depois, administrou-se intradermicamente (i.d.) no dorso (4 sítios por animal) endotelina-1 (0,3 a 10 pmol/sítio), sarafotoxina S6c (10 ou 30 pmol/sítio), IRL 1620 (10 ou 30 pmol/sítio) ou veículo (PBS) e mediu-se o diâmetro do halo formado ao redor do sítio de injeção (região mais pálida do que a pele circundante) a partir dos 15 min até 1 h após a injeção dos agonistas, com o auxílio de um paquímetro.

3.2.1.4. *Possíveis Mecanismos de Ação Envolvidos nos Efeitos da Endotelina-1:*

Na tentativa de elucidarmos alguns aspectos do mecanismo de ação envolvido nos efeitos da endotelina-1 na pata de camundongos, testou-se os efeitos de algumas drogas. Os animais receberam injeção i.pl. de FK 888 (antagonista seletivo de receptores NK₁ para substância P; 0,03 a 0,3 nmol/pata), MK 801 (antagonista seletivo de receptores NMDA para glutamato; 1 ou 3 nmol/pata), Calfostin C (inibidor de proteína quinase C; 0,1 ou 0,3 nmol/pata) ou de veículo (PBS) 30 min antes da injeção i.pl. de endotelina-1. Após a administração do peptídeo, registrou-se os efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico nestes animais, conforme descrito anteriormente.

3.2.2 – Possível Participação das Endotelinas Endógenas nos Efeitos Nociceptivo e Hiperálgico de Antígeno

3.2.2.1. Sensibilização:

Camundongos pesando entre 18 a 20 g receberam injeção subcutânea (s.c.) de uma solução contendo 50 μg de ovoalbumina (OVA) + 5 mg de hidróxido de alumínio, num volume total de 200 μl , para sensibilizá-los a este antígeno. Os animais controle (não-sensibilizados) foram similarmente tratados com salina.

3.2.2.2. Nocicepção e Hiperálgia Induzidas por Ovoalbumina em Animais Sensibilizados:

Decorridos 14 dias da primeira exposição ao antígeno, os animais foram testados para o aparecimento de um possível efeito nociceptivo da OVA. Para isso, grupos de animais sensibilizados receberam injeção i.pl. de diferentes concentrações de OVA (0,3 - 3,0 $\mu\text{g/pata}$). Imediatamente após a injeção da mesma, os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro, e observados conforme descrito anteriormente, registrando-se o tempo (em s) que cada animal despendeu lambendo a pata injetada por períodos consecutivos de 5 min até 60 min após a injeção. Um grupo separado de animais, não-sensibilizados, foi utilizado como grupo controle e recebeu uma injeção i.pl. de solução de OVA 3,0 $\mu\text{g/pata}$ (maior concentração utilizada nos estudos com animais sensibilizados).

Em outros animais, avaliou-se a capacidade da sarafotoxina S6c em potencializar a resposta nociceptiva induzida por uma dose maior de OVA. Grupos de animais sensibilizados ou não-sensibilizados receberam injeção i.pl. de OVA (3,0 $\mu\text{g/pata}$) e foram observados quanto ao aparecimento de resposta

nociceptiva por um período de 30 min. Decorrido este tempo da primeira injeção, os animais receberam injeção i.pl. ipsilateral de sarafotoxina S6c (10 ou 30 pmol) ou veículo (PBS) e observou-se os mesmos para a ocorrência de nocicepção por mais 30 min (i.e., até completar 60 min).

Com o propósito de verificar a ocorrência de hiperalgesia, avaliou-se a influência da OVA (0,3 µg/pata) sobre a nocicepção à capsaicina (0,1 µg/pata). Quatorze dias após a sensibilização, grupos separados de animais receberam injeção i.pl. de OVA previamente (15, 30 60 ou 120 min antes) à injeção ipsilateral de capsaicina e foram observados quanto ao aparecimento de nocicepção à mesma por um período de 5 min, conforme já descrito. Estudos preliminares demonstraram uma eficácia máxima da OVA em potencializar a nocicepção à capsaicina (aumento de 47% da resposta) quando injetada 30 min antes da mesma (dados não mostrados), estabelecendo-se este tempo para os experimentos seguintes.

3.2.2.3. Influência de antagonistas endotelinérgicos sobre a nocicepção e a hiperalgesia induzidas por ovoalbumina:

Para avaliar uma possível contribuição das endotelinas endógenas às respostas nociceptiva e hiperalgésica observadas em camundongos sensibilizados à OVA, grupos separados de animais foram previamente tratados com BQ-123 ou BQ-788 (1 ou 3 nmol em 20 µl de PBS, por via i.pl., antagonistas peptídicos seletivos de receptores ET_A ou ET_B, respectivamente,) ou sistemicamente com Bosentan (3 ou 10 mg Kg⁻¹, por via i.v.; antagonista misto de receptores ET_A/ET_B), A-127722.5 (6 µmol kg⁻¹, por via i.v.; antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_A) ou A-192621.1 (25 ou 50 µmol kg⁻¹, por via

i.v.; antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_B). Os respectivos grupos controle foram tratados com igual volume de veículo, em condições similares. Decorridos 15 min da injeção i.pl. ou 60 min da injeção i.v., os animais receberam injeção i.pl. de OVA (0,3 µg/pata) e foram observados quanto ao aparecimento de resposta nociceptiva e, nos experimentos para observação de hiperalgesia, receberam ainda uma injeção ipsilateral de capsaicina posteriormente (30 min) à mesma.

Por outro lado, com o propósito de verificar se o aumento do tempo de lambida causado pela OVA representava uma resposta nociceptiva, verificamos a susceptibilidade dessa resposta à inibição por tratamento prévio com morfina. Para isso, um grupo de animais recebeu tratamento sistêmico com morfina (3 mg kg⁻¹, por via i.v.) 60 min antes da injeção i.pl. da OVA (0,3 µg/pata). Os animais do grupo controle receberam igual volume de veículo, nas mesmas condições.

3.2.2.4. Avaliação da possível participação de mastócitos na nocicepção induzida por ovoalbumina:

Animais foram sensibilizados à OVA e, a partir do décimo dia após esta exposição ao antígeno receberam uma injeção i.pl. (pata traseira direita) diária de Composto 48/80 por quatro dias consecutivos nas seguintes doses: 1 µg/pata (10° dia) + 3 µg/pata (11° dia) + 10 µg/pata (12° dia) + 10 µg/pata (13° dia). No dia seguinte (14 dias após a sensibilização), avaliou-se a nocicepção induzida por OVA (0,3 µg na pata tratada nos dias anteriores), conforme descrito anteriormente.

3.3. - Análise Estatística

Em todos os experimentos, as respostas dos animais tratados com drogas foram sempre avaliadas em paralelo àqueles tratados com veículo, para minimizar a interferência de possíveis flutuações da responsividade. Assim, respostas em cada grupo tratado com droga foram comparadas àquelas de seu grupo controle correspondente. Todos os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. e foram estatisticamente avaliados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni ou de teste "t" de Student. O nível mínimo de significância em todos os casos foi fixado em $P < 0,05$.

3.4 - Drogas e Soluções

Soluções estoque (0,1 a 1 mM) de endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c, BQ-123 (ciclo[DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]), IRL 1620 (Suc[Glu⁹, Ala^{11,15}]-endotelina-1₁₀₋₂₁) (todos da American Peptide Co., Sunnyvale, U.S.A.), BQ-788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L- γ -metilleucil-D-1-metoxicarboil-D-norleucina; Research Biochemicals International, Natick, U.S.A.) foram preparadas em PBS. Todas as soluções estoque foram mantidas a -18^o C em alíquotas de 50 a 100 μ l e diluídas para a concentração desejada no mesmo veículo utilizado anteriormente. Bosentan, A-127722.5 {[2R-(2 α , 3 β , 4 α)]-4-(1,3-benzodioxol-5-il)-1 e A-192621.1 (ácido 2R-(4-propoxifenil)-4S-(1,3-dibenzodioxol-5-il)-1-(N-(2,6-dietilfenil)aminocarbonil-metil-pirrolidina-3R-carboxílico) (gentilmente cedidos por Laboratórios Abbott, Abbott Park, U.S.A.) foram dissolvidos imediatamente antes do uso, respectivamente, em água bidestilada, etanol 3% em água bidestilada ou em 100 μ l de solução NaOH 0,1N e diluídos até a concentração desejada em água bidestilada. Capsaicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.) foi

inicialmente dissolvida em DMSO a 50% em PBS na concentração de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$, e diluída posteriormente até uma solução final na concentração $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ em DMSO 1% em PBS, que foi mantida em refrigerador por até duas semanas. Soluções de Ovoalbumina Grau V, Composto 48/80 e cloridrato de morfina (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A) foram preparadas em salina imediatamente antes do uso. FK888 e Calfostin C foram diluídos em salina até as concentrações desejadas, imediatamente antes do uso, a partir de soluções estoque (10^{-2} M) preparadas em etanol. Solução estoque de MK 801 (10^{-2} M) foi preparada em etanol 40% e, no dia do experimento, diluído para as concentrações desejadas em salina.

4. Resultados

4.1. – Estudos com Administração de Endotelinas

4.1.1- *Nociceção induzida por agonistas de receptores endotelinérgicos:*

A injeção local i.pl. de endotelina-1 na pata dos animais induziu, em doses maiores do que 3 pmol, um comportamento nociceptivo dependente de dose, levando a aumentos significativos no tempo de lambida da pata injetada (**Figura 4a**). Esta resposta de lambida nas patas tratadas com endotelina-1 (doses de 10 a 30 pmol) foi significativamente maior que aquela causada por injeção semelhante de veículo (PBS). Embora a latência para o início da resposta induzida pela endotelina-1 tenha sido um pouco variável, ela normalmente ocorreu dentro dos 5 primeiros minutos após a injeção, e desenvolveu-se dentro dos 15 min subseqüentes. Numa amostra de 20 animais injetados com 10 pmol de endotelina-1, nos quais observou-se individualmente o tempo de lambida da pata durante 30 minutos divididos em intervalos de 5 min, $88,3 \pm 5,1\%$ do total de resposta nociceptiva ocorreu até 15 minutos após a injeção e, apenas um dos animais não apresentou a totalidade de resposta até os 25 minutos (**Figura 4b**). Por outro lado, em claro contraste com a endotelina-1, nem a endotelina-3 (até a dose de 30 pmol, **Tabela 1**) nem os agonistas de seletivos de receptores ET_B sarafotoxina S6c ou IRL 1620 (1 a 100 pmol, **Tabela 2**) induziram respostas nociceptivas significantes.

Como mostrado na **Figura 4c**, a nociceção desencadeada pela endotelina-1 (10 pmol) foi totalmente prevenida pelo tratamento prévio com os antagonistas seletivos de receptores ET_A BQ-123 (1 nmol, i.pl.) ou A-127722-5 (6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, i.v.), mas não foi afetada pelo antagonista seletivo de receptores ET_B BQ-788 (1 ou 10 nmol, i.pl.). Além disso, o antagonista BQ-788 (10 nmol) também não modificou a nociceção induzida pela endotelina-3 e nenhum dos

antagonistas sozinhos alterou a resposta nociceptiva basal dos animais dos grupos controle tratados com PBS.

4.1.2. Hiperalgisia induzida por agonistas de receptores endotelinérgicos:

Confirmando resultados anteriores (PIOVEZAN *et al.*, 1998), a endotelina-1 potencializou significativamente a resposta à capsaicina (0,1 µg/pata, i.pl.), ou seja, causou hiperalgisia, quando administrada intraplantarmente nas doses entre 1 e 20 pmol, 30 min antes da capsaicina (**Figura 5a**). A curva dose-resposta para este efeito da endotelina-1 apresentou-se em forma de sino, alcançando um efeito máximo com 10 pmol e nenhum efeito significativo com uma dose apenas 3 vezes maior que esta (30 pmol). Diferentemente da endotelina-1, nem a endotelina-3 (até 30 pmol; **Tabela 1**) nem os agonistas seletivos de receptores ET_B sarafotoxina S6c (1, 3, 10 ou 30 pmol) ou IRL 1620 (10, 30 ou 100 pmol) modificaram a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina (**Tabela 2**).

Como demonstrado na **Figura 5b**, a hiperalgisia induzida pela endotelina-1 (10 pmol) foi totalmente bloqueada pelo tratamento prévio com BQ-123 (1 nmol, i.pl.) ou A-127722.5 (6 µmol Kg⁻¹, i.v.), mas não foi alterada pelo antagonista seletivo de receptores ET_B BQ-788 (1 ou 10 nmol, i.pl.). Por outro lado, o tratamento prévio com BQ-788 (10 nmol) revelou um efeito hiperalgésico significativo para a endotelina-3 (30 pmol; **Tabela 1**). Nenhum dos antagonistas afetou a resposta nociceptiva de animais controle à capsaicina (resultados não mostrados, *n*= 6-9 animais).

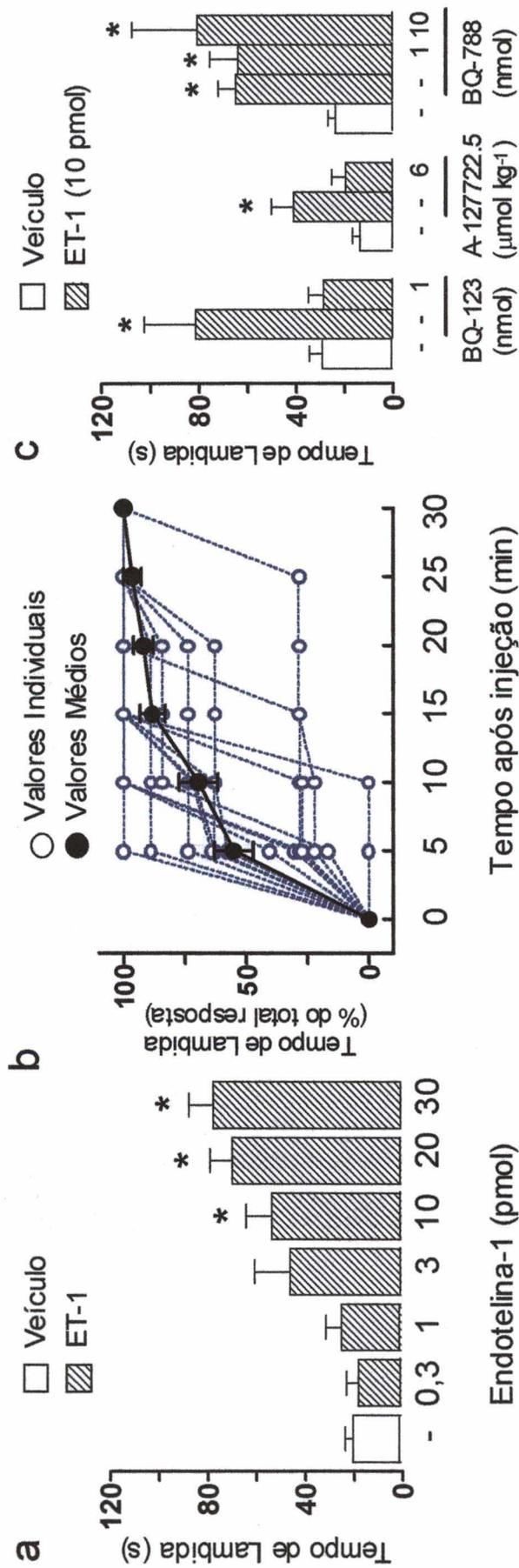


FIGURA 4: Efeito nociceptivo da endotelina-1 na pata de camundongos, avaliado pelo tempo de lambida da pata tratada (em s). Painel **a:** tempo acumulado de lambida nos primeiros 30 min seguintes à injeção i.pl. de veículo (PBS) ou endotelina-1 (ET-1). Painel **b:** decurso temporal do efeito nociceptivo induzido pela endotelina-1, apresentado como percentagem acumulada (em intervalos de 5 min) do tempo total de lambida observado num período de 30 min. Valores representam respostas médias (\pm E.P.M.) ou individuais de 20 camundongos que receberam endotelina-1 (10 pmol, i.pl.). Painel **c:** influência do tratamento prévio com BQ-123 (i.pl.), A-127722-5 (i.v.), BQ-788 (i.pl.) ou veículo sobre a nociceção induzida por endotelina-1(10 pmol, i.pl.). Média \pm E.P.M. de 6-12 animais (**a, c**). * $P < 0.05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

TABELA 1 – Efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico da endotelina-3 injetada intraplantarmente na pata de camundongos. Nocicepção e hiperalgesia foram quantificadas como o tempo total de lambida (em s) medidos por 30 min após a injeção do agonista ou dos primeiros 5 min após a injeção de capsaicina (0,1 µg, i.pl.), respectivamente. O edema foi avaliado como a diferença de peso entre as patas injetadas e não-injetadas (Δ , em mg), imediatamente após a medida da hiperalgesia. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais.

Tratamento		Pré-tratamento		Nocicepção	Hiperalgesia	Edema
Agonista	pmol	Antagonista	Dose	Lambida (s)	Lambida (s)	Δ (mg)
PBS (controle)	-	-	-	20,5 \pm 3,3	40,2 \pm 2,6	46,3 \pm 2,3
Endotelina-1				53,9 \pm 10,5*	98,4 \pm 5,8*	87,1 \pm 4,8*
PBS (controle)				17,3 \pm 3,9	47,6 \pm 4,0	50,5 \pm 1,5
Endotelina-3	1	-	-	19,3 \pm 4,8	56,8 \pm 5,8	52,3 \pm 2,1
	10	-	-	18,8 \pm 3,2	59,0 \pm 3,4	60,1 \pm 1,8*
	30	-	-	27,0 \pm 3,3	58,7 \pm 7,2	62,3 \pm 1,9*
PBS (controle)	-	PBS	-	-	-	45,7 \pm 0,9
Endotelina-3	30	PBS	-	-	-	59,8 \pm 1,6*
	30	BQ-123	1 nmol	-	-	42,7 \pm 1,8
PBS (controle)	-	Veículo [#]	-	-	-	45,8 \pm 2,1
Endotelina-3	30	Veículo [#]	-	-	-	58,7 \pm ,2*
	30	A-127722-5 [#]	6 µmol kg ⁻¹	-	-	41,5 \pm 3,4
PBS (controle)	-	PBS	-	13,1 \pm 3,9	40,1 \pm 5,8	50,7 \pm 2,1
Endotelina-3	30	PBS	-	24,4 \pm 4,3	54,5 \pm 10,0	62,2 \pm 1,5*
	30	BQ-788	10 nmol	34,7 \pm 12,6	76,1 \pm 11,2*	74,2 \pm 6,3*
PBS (controle)	-	PBS	-	14,1 \pm 3,5	44,0 \pm 6,0	53,7 \pm 1,9
PBS	-	BQ-123	1 nmol	19,7 \pm 8,7	41,3 \pm 6,2	54,4 \pm 2,7
PBS	-	A-127722-5 [#]	6 µmol kg ⁻¹	26,0 \pm 1,1	47,8 \pm 13,2	50,0 \pm 3,5
PBS	-	BQ-788	10 nmol	29,6 \pm 7,2	58,4 \pm 7,3	71,7 \pm 3,8*

[#] Administração endovenosa. Todos os outros tratamentos foram dados por injeção i.pl.

* $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

TABELA 2 – Ausência de efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico dos agonistas seletivos de receptores ET_B Sarafotoxina S6c e IRL 1620 na pata de camundongos. Nocicepção e hiperalgésia foram quantificadas como o tempo total de lambida (em s) medidos nos primeiros 30 min após a injeção i.pl. dos agonistas ou os primeiros 5 min após a injeção de capsaicina (0,1 µg, i.pl.), respectivamente. O edema foi avaliado como a diferença de peso entre as patas tratada e não-tratada (Δ, em mg), imediatamente após a medida de hiperalgésia. Média ± E.P.M. de 6-8 experimentos. Os valores dos animais tratados com agonistas não foram estatisticamente diferentes dos respectivos controles tratados com PBS. ($P < 0,05$; ANOVA seguido de Bonferroni).

Tratamento		Nocicepção	Hiperalgésia	Edema
Agonista	pmol	Lambida (s)	Lambida (s)	Δ (mg)
PBS (controle)	-	22,5 ± 5,9	43,5 ± 5,9	44,7 ± 2,4
Sarafotoxina S6c	3	31,9 ± 4,3	52,5 ± 4,7	46,4 ± 3,5
	10	15,2 ± 2,2	51,8 ± 4,8	41,9 ± 4,0
	30	15,4 ± 4,5	55,4 ± 6,4	45,3 ± 3,2
PBS (controle)	-	21,9 ± 5,2	50,9 ± 8,8	44,8 ± 2,5
IRL 1620	10	17,6 ± 6,4	39,1 ± 4,5	44,8 ± 5,6
	30	29,4 ± 7,1	39,0 ± 3,7	41,2 ± 1,9
	100	12,9 ± 8,1	41,9 ± 10,6	44,8 ± 1,9

$P < 0,05$; ANOVA seguido de Bonferroni.

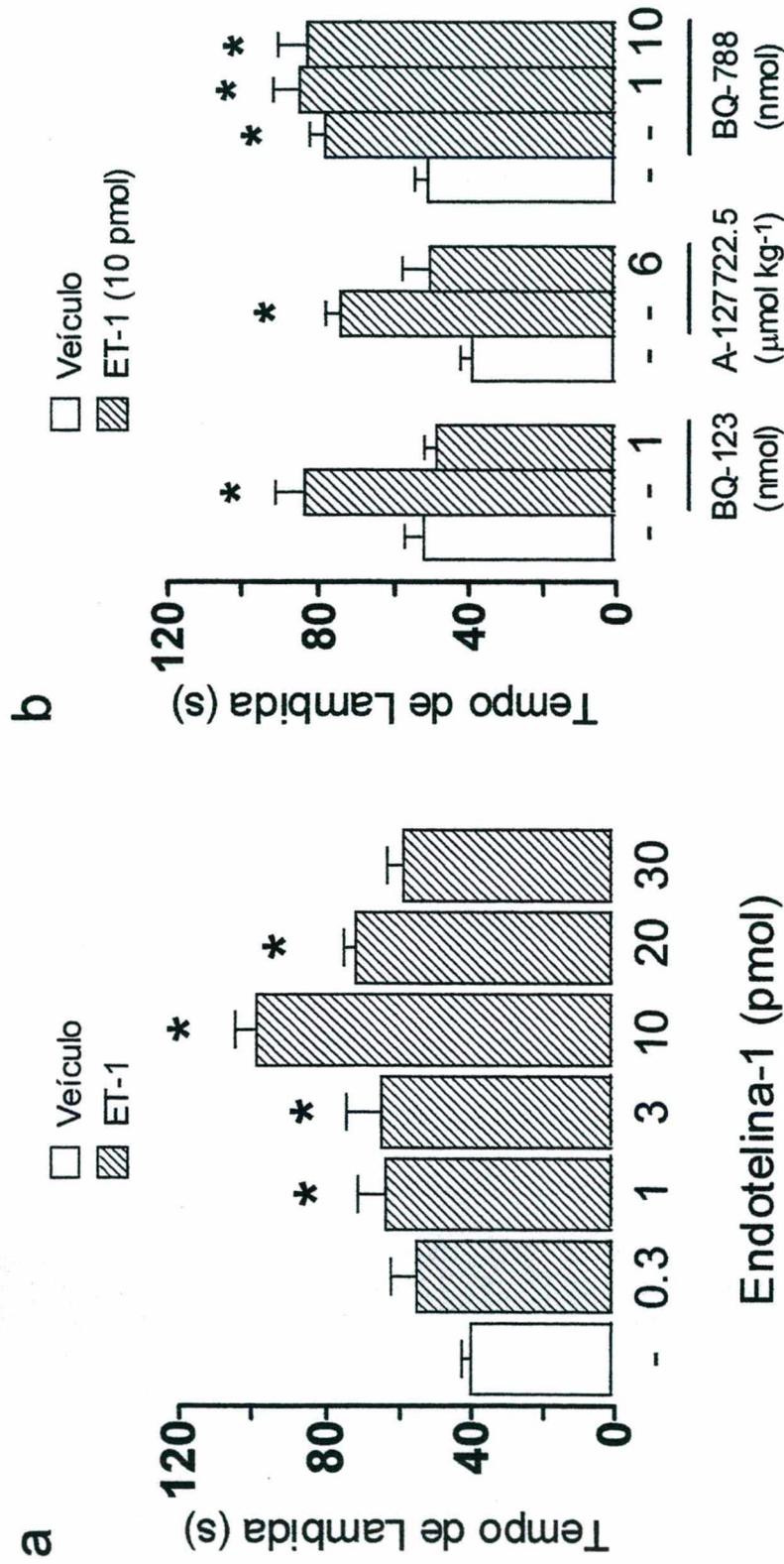


FIGURA 5: Efeito hiperalgésico da endotelina-1 (ET-1) sobre a nociceção induzida pela capsaicina na pata de camundongos. Painel **a:** tempo de lambida acumulado medido nos primeiros 5 min após a injeção de capsaicina (0,1 μg, i.pl.), 30 min após a injeção ipsilateral de endotelina-1 (ET-1) ou veículo (PBS). Painel **b:** influência do tratamento prévio com BQ-123 (i.pl.), A-127722-5 (i.v.), BQ-788 (i.pl.) ou veículo sobre a hiperalgisia induzida por endotelina-1 (10 pmol, i.pl.). Média ± E.P.M. de 6-12 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.1.3. Edema induzido por agonistas de receptores endotelinérgicos:

A injeção local de endotelina-1 na pata de camundongos, em doses maiores do que 3 pmol, induziu um efeito edematogênico dependente de dose, levando a aumentos significativamente maiores do peso da pata tratada com o peptídeo, quando comparados às variações induzidas por veículo em animais controle. A FIGURA 6a ilustra este efeito à endotelina-1, aos 35 min após sua injeção (i.e., 5 min após a injeção de capsaicina 0,1 µg/pata). A capsaicina sozinha, nesta pequena dose, não aumentou o peso da pata dos animais mais do que o PBS (dados não mostrados). O decurso temporal do efeito edematogênico à endotelina-1 pode ser visto na FIGURA 6b, que ilustra as variações dos volumes das patas registradas por pletismometria, induzidas por diferentes doses de endotelina-1 (3, 10, 30 ou 100 pmol). Em geral, esse peptídeo induziu um edema de rápido aparecimento, iniciando 5 min após a injeção, alcançando valores máximos entre 15 a 30 min e diminuindo em seguida. A injeção de igual volume de PBS induziu um aumento de volume da pata muito mais discreto e transitório, estando completamente ausente já aos 15 min. Com relação a isso, deve-se notar que o aumento do volume da pata detectado nos animais tratados com PBS aos 35 min (Figura 6a) deve ser atribuído ao volume da injeção de capsaicina (20 µl), dada 5 min antes do sacrifício. A endotelina-3, nas doses de 10 ou 30 pmol, também causou edema de pata, mas este efeito foi muito mais modesto do que o observado com a endotelina-1 (Tabela 1). Por outro lado, a sarafotoxina S6c (1, 3, 10 ou 30 pmol) ou o IRL 1620 (10, 30 ou 100 pmol) falharam em causar efeito edematogênico significativo (Tabela 2). O edema desencadeado pela endotelina-1 (10 pmol) foi totalmente prevenido pelo tratamento prévio com os antagonistas seletivos de receptores ET_A BQ-123 (1

nmol, i.pl.) ou A-127722.5 (6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, i.v.), mas não foi afetado pelo antagonista seletivo de receptores ET_B BQ-788 (1 ou 10 nmol, i.pl.; **Figura 6c**). Da mesma forma, o BQ-788 (10 nmol) também não alterou o efeito edematogênico da endotelina-3 (30 pmol, **Tabela 1**). Nenhum dos antagonistas de receptores ET_A influenciou o peso das patas dos camundongos tratados com PBS, mas a maior dose de BQ-788 apresentou um efeito edematogênico modesto, mas significativo (**Tabela 1**).

4.1.4. Efeito vasoconstritor de agonistas endotelinérgicos:

Como pode ser observado na FIGURA 7a, quando a resposta nociceptiva à capsaicina foi registrada em períodos de 1 min por um total de 10 min (ao invés do procedimento usual de 5 min cumulativos), observou-se que o decurso temporal da resposta de lambida da pata tratada foi apenas ligeiramente mais rápida nos animais tratados previamente com PBS do que nos animais tratados com endotelina-1. O tempo acumulado de lambida medido nos tempos de 1, 2, 3, 4, e 5 min (expressos como porcentagem do total de lambida apresentado por cada animal) foi de $69,2 \pm 5,5$; $87,9 \pm 4,5$; $90,5 \pm 4,2$; $96,2 \pm 2,2$ e $96,9 \pm 2,2\%$ nos animais tratados previamente com PBS (tempo total de lambida $34,8 \pm 3,4$ s em 10 min), e de $41,5 \pm 4,0$; $60,5 \pm 6,0$; $73,9 \pm 6,7$; $85,5 \pm 4,9$ e $90,3 \pm 4,6\%$ nos animais previamente tratados com endotelina-1 ($P < 0,05$ apenas para os três primeiros valores, teste “t” de Student; tempo total de lambida $72,6 \pm 6,0$ s) (n=12 animais em cada grupo). Dez dos 12 camundongos previamente tratados com PBS apresentaram a totalidade de resposta à capsaicina dentro dos 5 primeiros min após a injeção da mesma, enquanto que 4 dos 12 camundongos previamente tratados com endotelina-1 apresentaram pequena resposta ao

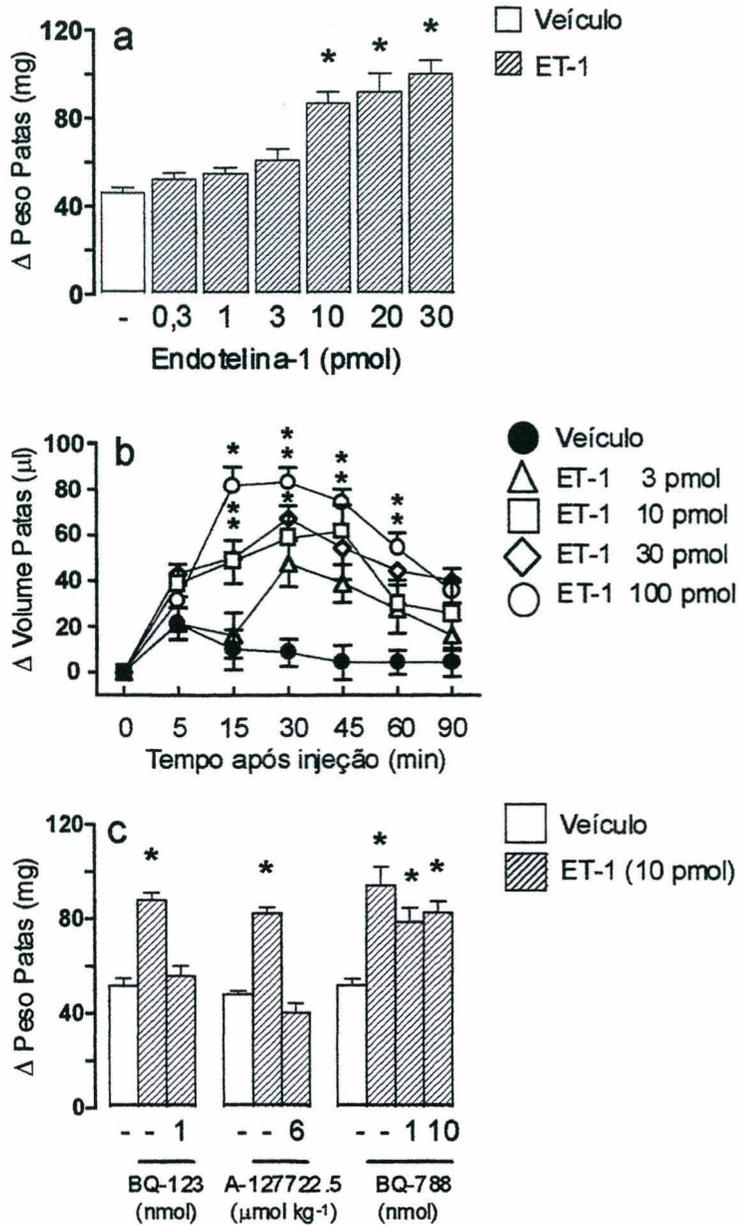


FIGURA 6: Efeito edematogênico da endotelina-1 (ET-1) na pata de camundongos. O edema é expresso como o aumento no peso (em **a** e **c**, em mg) ou no volume (em **b**, em μl) das patas, em relação à pata contralateral não-injetada. Painel **a**: aumentos no peso das patas 35 min após veículo (PBS) ou endotelina-1. Painel **b**: decurso temporal do aumento no volume das patas nos primeiros 90 min após a injeção de veículo ou endotelina-1 (3, 10, 30 ou 100 pmol, i.pl.). Painel **c**: influência do tratamento prévio com BQ-123 (i.pl.), A-127722-5 (i.v.), BQ-788 (i.pl.) ou veículo sobre o edema induzido pela endotelina-1 (10 pmol, i.pl.). Todos os camundongos em "a" e "c", mas não em "b", receberam capsaicina (0,1 μg , i.pl.) 5 min antes do sacrifício. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

composto até os 8-9 min após a injeção de capsaicina (**Figura 7b**). É interessante salientar, ainda, que o tempo de lambida apresentado pelo grupo previamente tratado com endotelina-1 em cada período foi significativamente maior do que aqueles do grupo controle apenas nos 3 primeiros min após a administração de capsaicina (**Figura 7a**), enquanto o tempo acumulado de lambida medido no primeiro grupo estava aumentado em todos os períodos (**Figura 7b**, $P < 0,05$).

A injeção i.d. de solução de PBS no dorso dos animais induziu um halo (mais pálido que o tecido circundante) de dimensões modestas. Este efeito perdurou até os 30 min após a injeção (**Tabela 3**). Diferentemente do veículo, a endotelina-1 induziu o surgimento de halos muito maiores e mais duradouros. Aos 30 min, este efeito vasoconstritor foi claramente dependente de dose, alcançando um máximo com a dose de 3 pmol/sítio. Além disso, embora os halos maiores induzidos pelas doses de 1, 3 e 10 pmol/sítio de endotelina-1 tenham permanecido estáveis por todo o período de observação (1 h), o efeito causado pela dose de 30 pmol/sítio (que foi similar aos 15 e 30 min) diminuiu significativa e progressivamente nos tempos de 45 e 60 min (resultados não mostrados; $n=11$; $P < 0,05$). É importante ressaltar, ainda, que a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 também apresentaram efeito vasoconstritor significativo na dose de 30 pmol/sítio (**Tabela 3**).

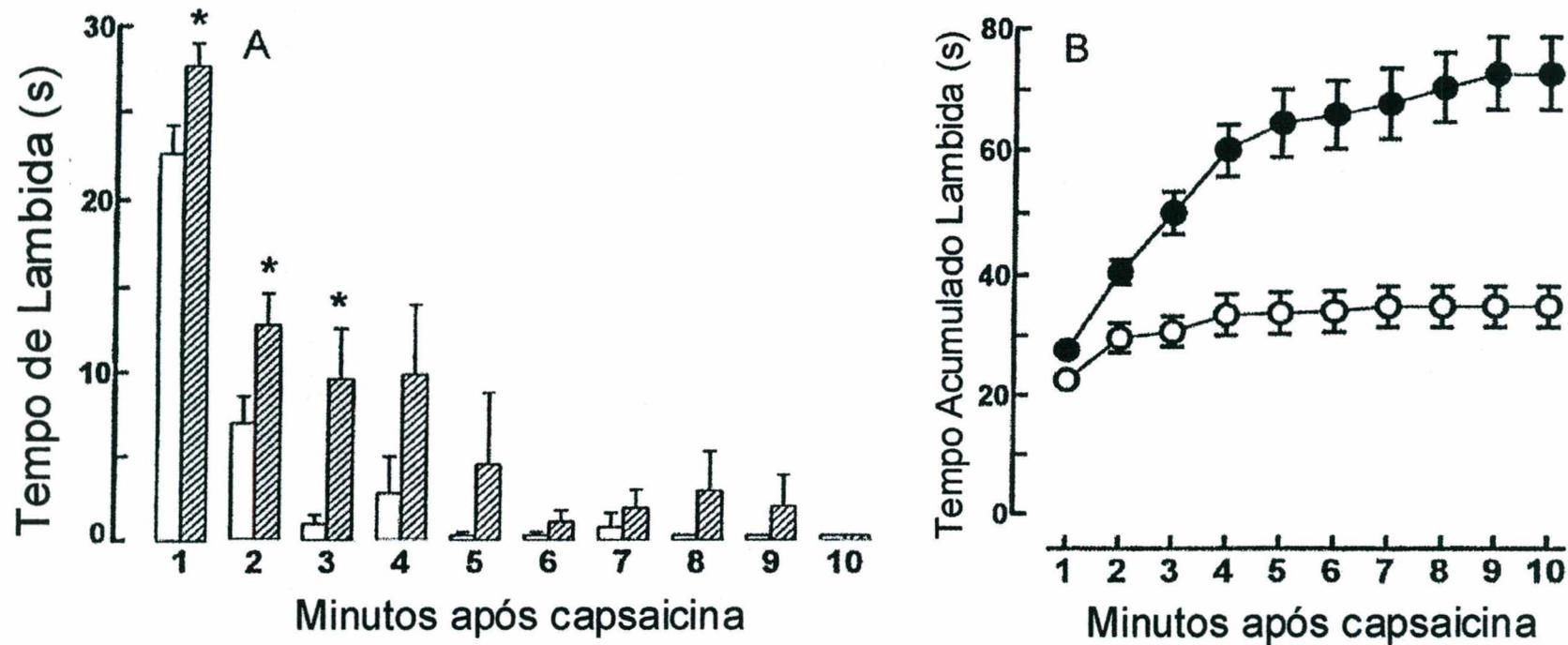


Figura 7: Influência da endotelina-1 no decurso temporal do tempo de lambida da pata induzido por capsaicina. Camundongos foram tratados com endotelina-1 (10 pmol/pata, barras achuradas ou círculos fechados) ou com veículo (barras e círculos abertos) 30 min antes da injeção ipsilateral de capsaicina (0,1 μ g/pata). Painel A, tempo de lambida (em s) apresentado no transcorrer de 10 min, divididos em períodos de 1 min, após a injeção de capsaicina. Painel B, tempo de lambida acumulado registrado no transcorrer da mesma sessão. Resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. de 12 animais. Asteriscos no **Painel A** denotam $P < 0,05$ quando comparado aos respectivos valores do grupo controle (tratado com veículo, ANOVA seguido de teste "t" de Student). Todos os valores para animais tratados com endotelina-1 no **Painel B** diferem do valor controle ($P < 0,05$).

TABELA 3: Efeito vasoconstritor de agonistas dos receptores endotelinérgicos na pele do dorso de camundongos. Veículo (PBS) ou agonistas foram injetados intradermicamente 1 h após a administração de corante Azul de Evans (30 mg Kg^{-1} , i.v.). Valores se referem ao maior diâmetro (em mm) do halo (região mais pálida observada ao redor do sítio de injeção) observado 30 min após injeção dos agonistas. Média \pm E.P.M. de 9-12 animais.

Agonista	Dose (pmol/sítio)	Diâmetro do Halo (aos 30 min, em mm)
Veículo (controle)	-	$0,4 \pm 0,3$
Endotelina-1	0,3	$3,6 \pm 0,4^a$
	1	$4,3 \pm 0,4^a$
	3	$5,3 \pm 0,5^a$
	10	$5,1 \pm 0,2^a$
	30	$5,4 \pm 0,1^a$
Sarafotoxina S6c	10	$0,4 \pm 0,4$
	30	$3,3 \pm 0,^a$
IRL 1620	10	$0,9 \pm 0,6$
	30	$3,0 \pm 0,7^a$

^a Diferente do grupo controle. ANOVA seguido de Bonferroni ($P < 0,05$).

4.1.5. *Papel modulatório dos receptores ET_B sobre o efeito hiperalgésico da endotelina-1:*

O tratamento prévio com o antagonista seletivo de receptores ET_B BQ-788 (10 nmol, i.pl.) revelou uma resposta hiperalgésica significativa para uma dose de endotelina-1 anteriormente inefetiva (30 pmol), sem contudo modificar os efeitos nociceptivo ou edematogênico da mesma (**Figura 8**). Por outro lado, como também mostrado na FIGURA 9, o tratamento i.pl. prévio com o agonista seletivo de receptores ET_B sarafotoxina S6c (30 pmol) inibiu seletivamente a hiperalgesia, mas não o edema ou a nocicepção causados pela endotelina-1 (10 pmol).

4.1.6. *Investigação do mecanismo de ação envolvido nos efeitos da endotelina-1 na pata de camundongos:*

Como pode ser visto na FIGURA 9a, o efeito nociceptivo da endotelina-1 não é alterado por FK 888 (antagonista seletivo de receptores NK₁ para Substância P), MK 801 (antagonista seletivo de receptores NMDA para glutamato) nem por Calfostin C (inibidor de proteína quinase C), nas doses empregadas neste estudo; Por outro lado, o efeito edematogênico é reduzido significativamente por Calfostin C (0,1 ou 0,3 nmol/pata) e completamente inibido por MK 801 (1 ou 3 nmol/pata) , mas não é alterado por FK 888 (0,03 a 1 nmol, **Figura 9c**). Finalmente, o efeito hiperalgésico foi completamente bloqueado pelo tratamento prévio com quaisquer dos três compostos (**Figura 9b**).

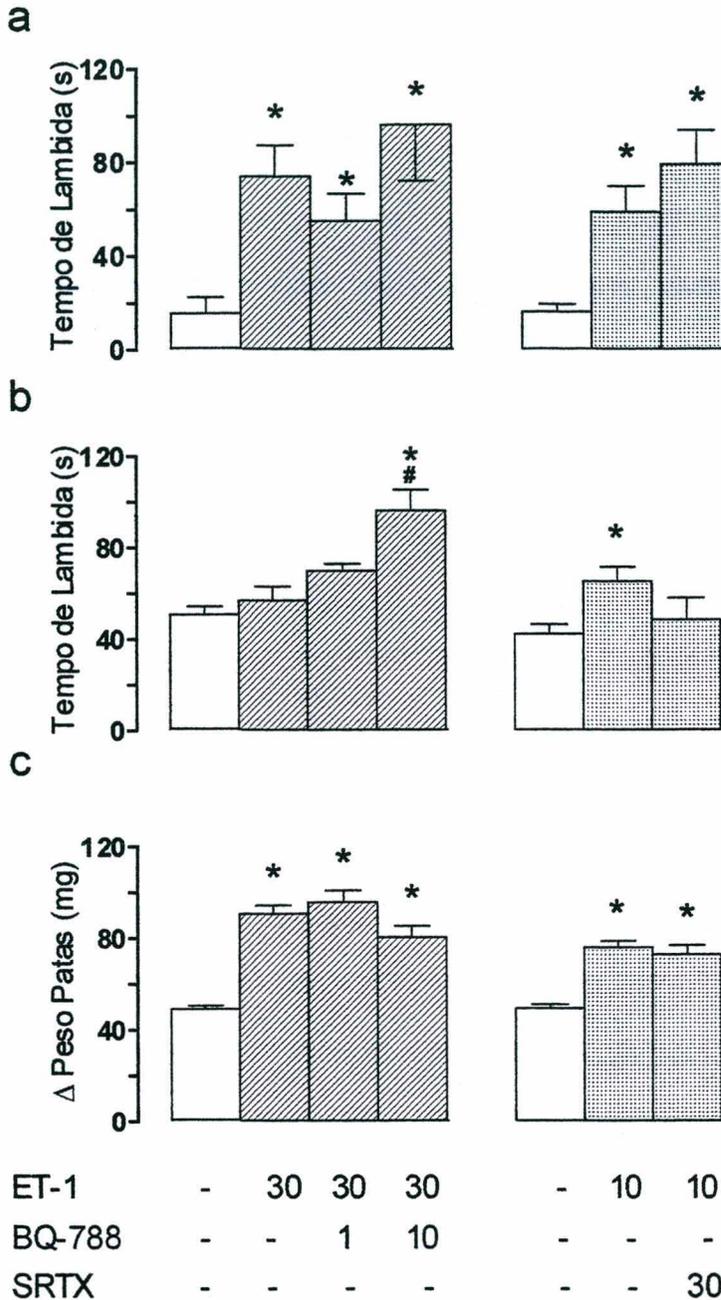
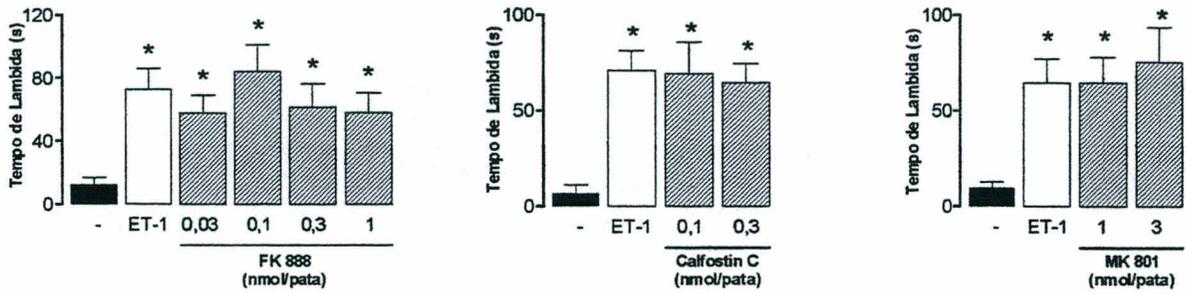
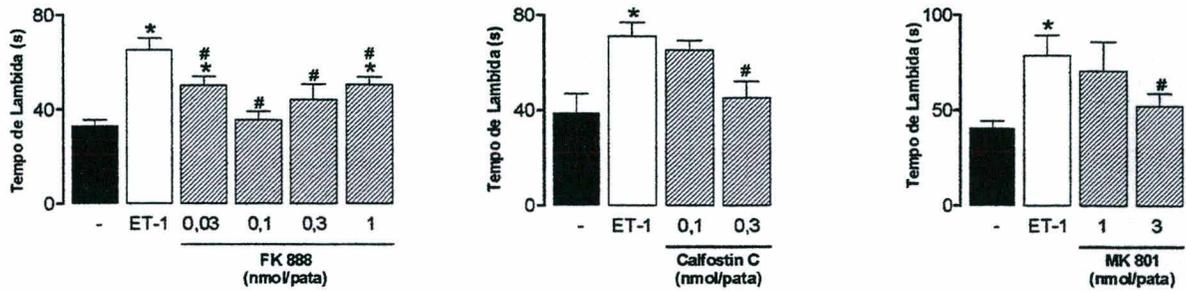


FIGURA 8: Influência do tratamento prévio com BQ-788 (1 ou 10 nmol, i.pl.) ou sarafotoxina S6c (30 pmol, i.pl.) sobre os efeitos nociceptivo (a), hiperalgésico (b) e edematogênico (c) da injeção ipsilateral de endotelina-1 (ET-1; 30 pmol barras achuradas; 10 pmol barras pontilhadas; i.pl.) na pata de camundongos. BQ-788, sarafotoxina S6c ou veículo (PBS) foram injetados 15 min antes da endotelina-1. Média \pm E.P.M. de 6-10 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparados ao grupo controle: veículo+ veículo ou veículo + endotelina-1, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

a



b



c

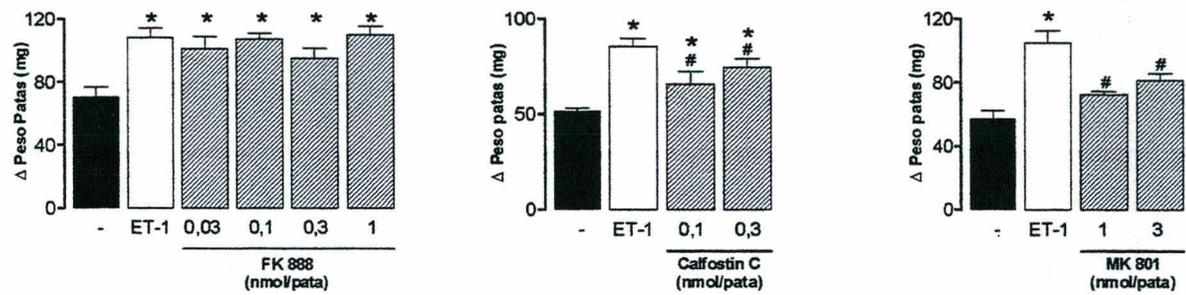


FIGURA 9: Influência do tratamento prévio com FK 888 (0,03 a 1 nmol, i.pl.), Calfostin C (0,1 ou 0,3 nmol; i.pl.) ou MK 801 (1 ou 3 nmol, i.pl.) sobre os efeitos nociceptivo (a), hiperalgésico (b) e edematogênico (c) da injeção de endotelina-1 (ET-1; 10 pmol barras brancas) na pata de camundongos. Os tratamentos prévios (ou respectivos veículos, barras achuradas) foram administrados ipsilateralmente 30 min antes da endotelina-1. Média \pm E.P.M. de 6-9 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparados ao grupo controle: veículo+veículo ou veículo+endotelina-1, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.2. - Possível Participação das Endotelinas Endógenas nos Efeitos Nociceptivo e Hiperalgésico de Antígeno

4.2.1 *Nocicepção e Hiperalgesia Induzidas por Ovoalbumina em Animais Sensibilizados:*

A injeção i.pl. de diferentes doses de OVA (0,1 a 3,0 $\mu\text{g/pata}$) causou um comportamento nociceptivo (lambida da pata injetada) em animais previamente sensibilizados com o antígeno. Esta resposta foi estatisticamente maior (0,3 a 3,0 $\mu\text{g/pata}$) que aquela apresentada por animais que não foram sensibilizados, ou seja, que receberam apenas veículo como tratamento (por via s.c.) quatorze dias antes. Esta resposta nociceptiva de animais sensibilizados apresentou uma latência curta, iniciando-se nos primeiros minutos após sua injeção, e duração de 30 a 45 min (**Figura 10**).

O tratamento dos animais com morfina (3 mg Kg^{-1} ; i.p.) 1 h antes da injeção i.pl. de OVA (0,3 $\mu\text{g/pata}$) bloqueou completamente (89% de inibição) a resposta nociceptiva induzida pelo antígeno (**Figura 11**). Por outro lado, o tratamento repetido da pata com injeções diárias de Composto 48/80 por 4 dias consecutivos causou uma redução de 59% da resposta de animais previamente sensibilizados ao novo desafio com a OVA (**Figura 12**). Este protocolo de dessensibilização com Composto 48/80 foi escolhido por ser capaz de abolir o efeito nociceptivo do próprio composto (tratamento único, 10 $\mu\text{g/pata}$), sem contudo afetar a nocicepção à capsaicina (resultados não mostrados).

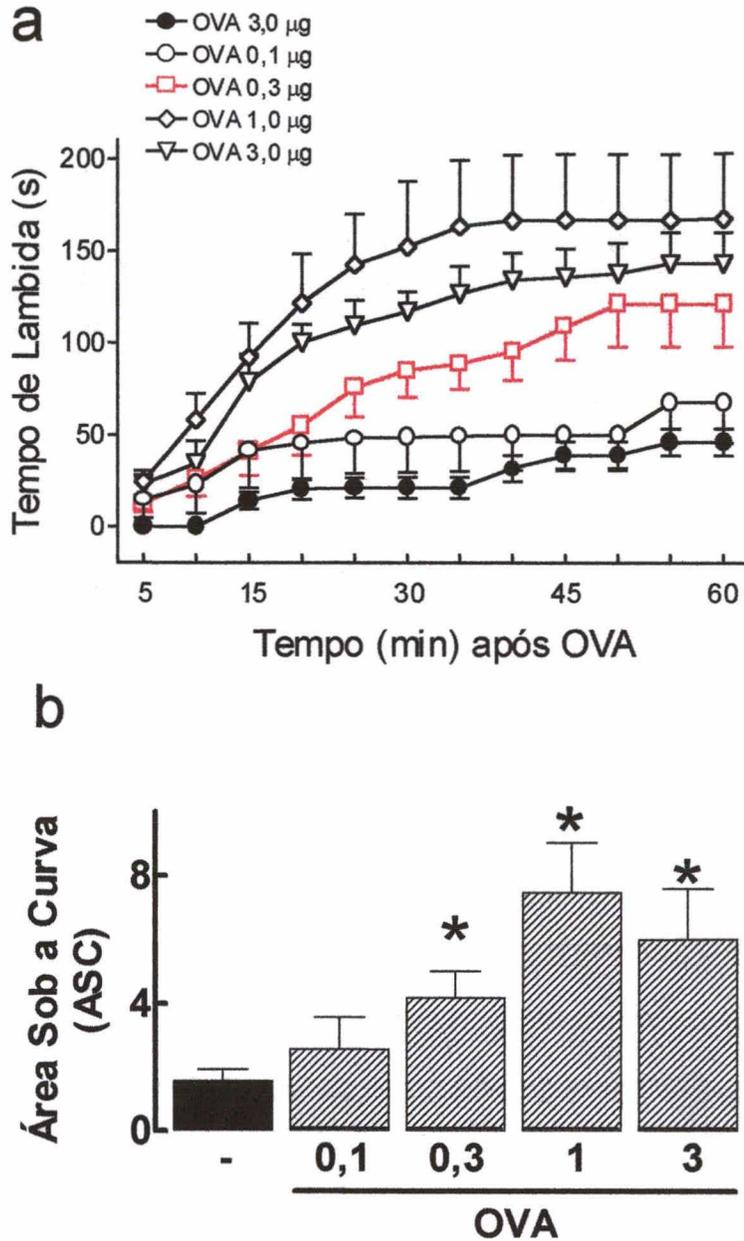


FIGURA 10: Curva dose-resposta para o efeito nociceptivo induzido por diferentes doses de ovoalbumina na pata de camundongos. Painel a: nocicepção expressa como tempo acumulado (em s) de lambida da pata tratada com ovoalbumina de animais sensibilizados (símbolos abertos) ou não-sensibilizados (símbolos fechados). Painel b: área sob a curva para a resposta nociceptiva apresentada pelos mesmos grupos acima. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

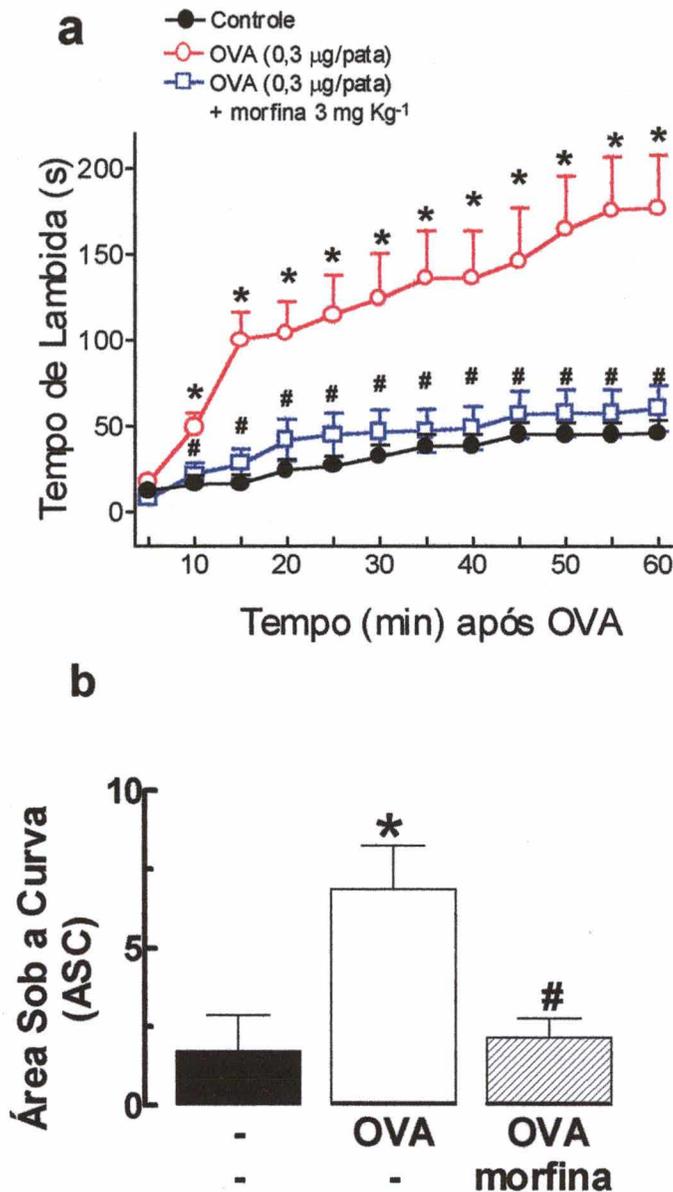


FIGURA 11: Influência do tratamento prévio com morfina sobre o efeito nociceptivo induzido por ovoalbumina na pata de camundongos. Painei a: nocicepção expressa como tempo acumulado (em s) de lambida da pata tratada com ovoalbumina de animais sensibilizados (símbolos abertos) ou não-sensibilizados (símbolos fechados). Painei b: área sob a curva para a resposta nociceptiva apresentada pelos mesmos grupo acima. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle: sensibilização + veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

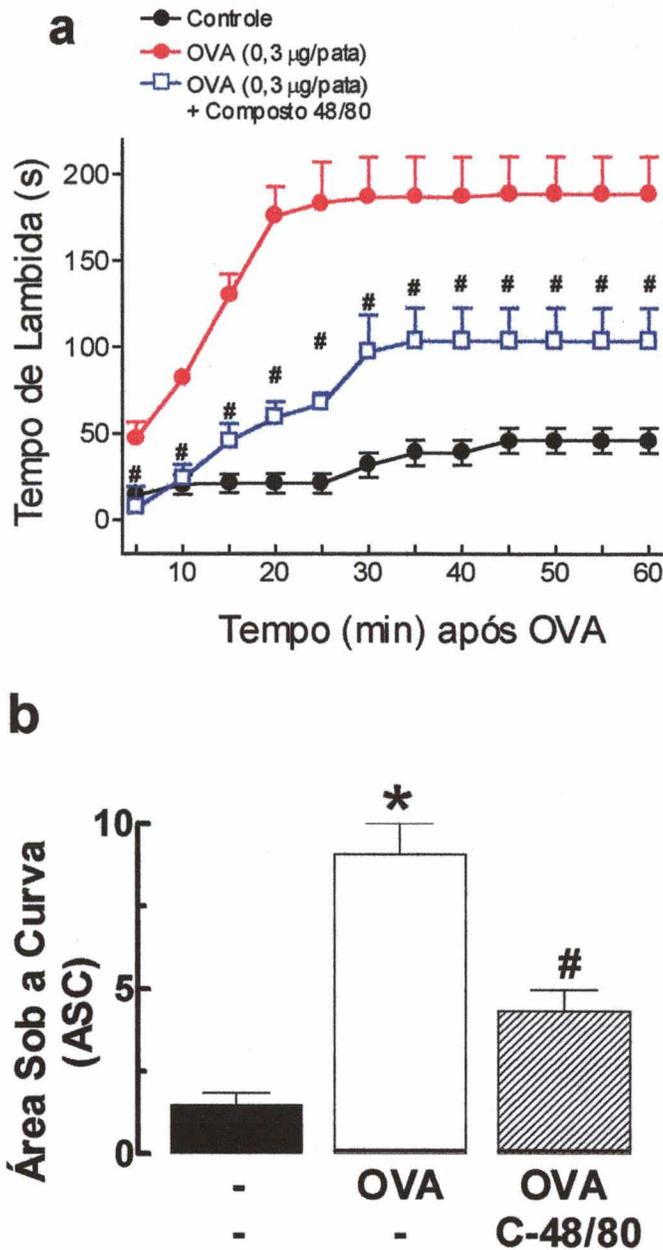


FIGURA 12: Influência da dessensibilização com Composto 48/80 sobre o efeito nociceptivo induzido por ovoalbumina na pata de camundongos. Paineis a: nocicepção expressa como tempo acumulado (em s) de lambida da pata tratada com ovoalbumina de animais sensibilizados (símbolos abertos) ou não-sensibilizados (símbolos fechados). Paineis b: área sob a curva para a resposta nociceptiva apresentada pelos mesmos grupo a cima. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle: sensibilização + veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

4.2.2. *Papel das endotelinas endógenas na nocicepção induzida por ovoalbumina:*

Com o propósito de investigar se as endotelinas poderiam participar da mediação da resposta nociceptiva à OVA, avaliamos a influência do tratamento prévio com diversos antagonistas de receptores endotelinérgicos sobre a mesma.

Como pode ser visto nas **Figuras 13** e **14**, o tratamento prévio com o Bosentan (3 ou 10 mg Kg⁻¹, por via i.v.), um antagonista não-seletivo de receptores ET_A/ET_B reduziu a nocicepção induzida pela OVA de modo dependente de dose (**Figura 13a**). Ao avaliar-se a área sob a curva (ASC) e descontando-se a ASC correspondente ao grupo controle (não-sensibilizado), verificamos que este antagonista inibiu a resposta nociceptiva à OVA em 47% e 92%, nas doses de 3 ou 10 mg Kg⁻¹, respectivamente. Por outro lado, os antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos influenciaram de maneiras distintas a resposta à mesma. Enquanto o A-127722.5 e o BQ-123 reduziram a resposta induzida pela OVA respectivamente em cerca de 72% e 62% (inibição máxima, **Figura 13b** e **14b**), o A-192621.1 causou um aumento significativo, de cerca de 65%, do tempo de lambda induzido pelo antígeno (**Figura 13c**). Por sua vez, o tratamento prévio dos animais com BQ-788 (até a dose de 3 nmol), não alterou esta resposta ao antígeno (**Figura 14b**).

4.2.3. *Papel das endotelinas endógenas na hiperalgesia química induzida por ovoalbumina:*

Pode-se observar na **Figura 15** que, em animais sensibilizados, a OVA também foi capaz de induzir um aumento de 46% na resposta de lambda da pata tratada com capsaicina, quando comparado àquela induzida pelo composto em animais não-sensibilizados. Este efeito hiperalgésico foi praticamente abolido em

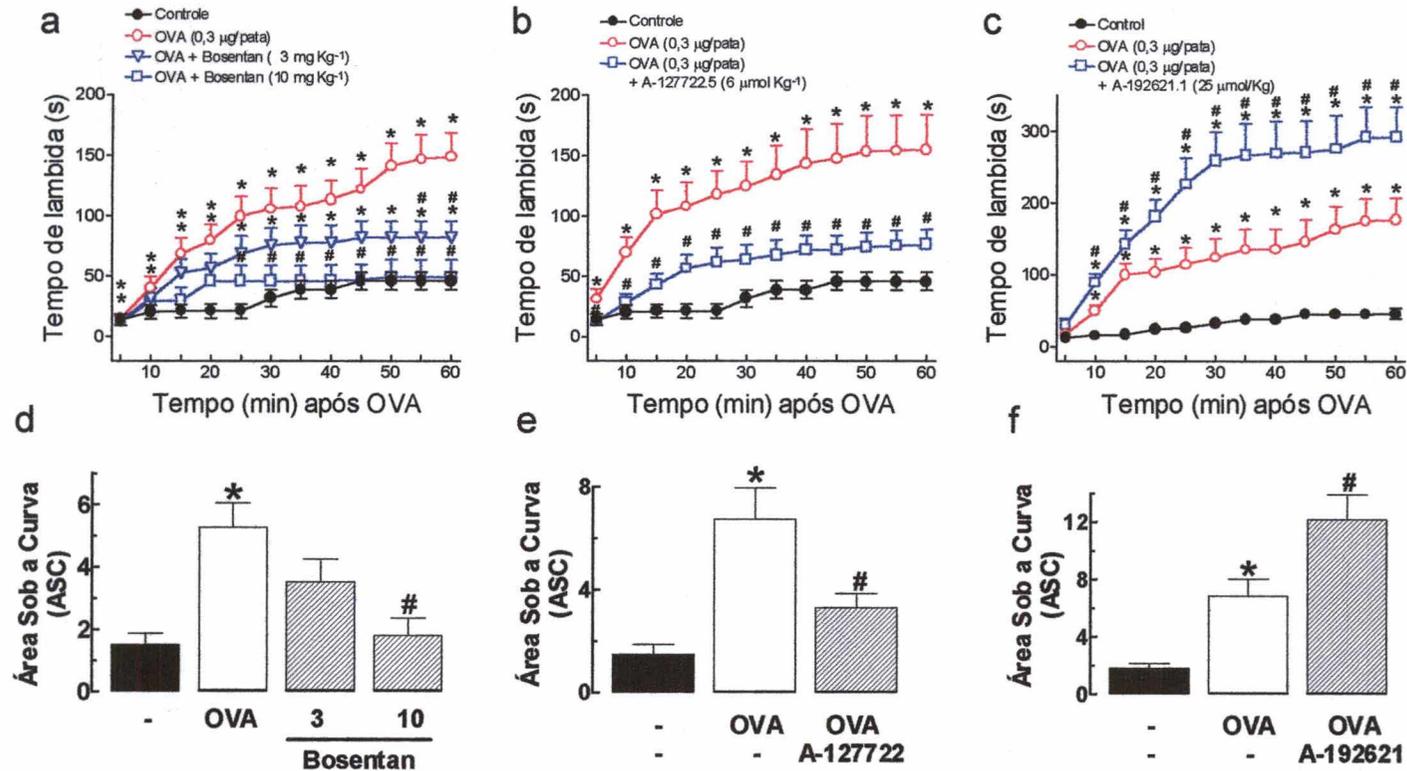


FIGURA 13: Influência do tratamento sistêmico com antagonistas misto de receptores ET_A/ET_B, bosentan (a e d) ou dos antagonistas seletivos de receptores ET_A, A-127722.5 (b e e) ou ET_B, A-192621.1 (c e f) sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos. **a**, **b** e **c**: nocicepção expressa como tempo acumulado (em s) de lambida da pata tratada com ovoalbumina de animais sensibilizados (símbolos abertos) ou não-sensibilizados (símbolos fechados). **d**, **e** e **f**: Área sob a curva para a resposta nociceptiva apresentada pelos mesmos grupo a cima. Média ± E.P.M. de 6-12 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle: sensibilização+veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

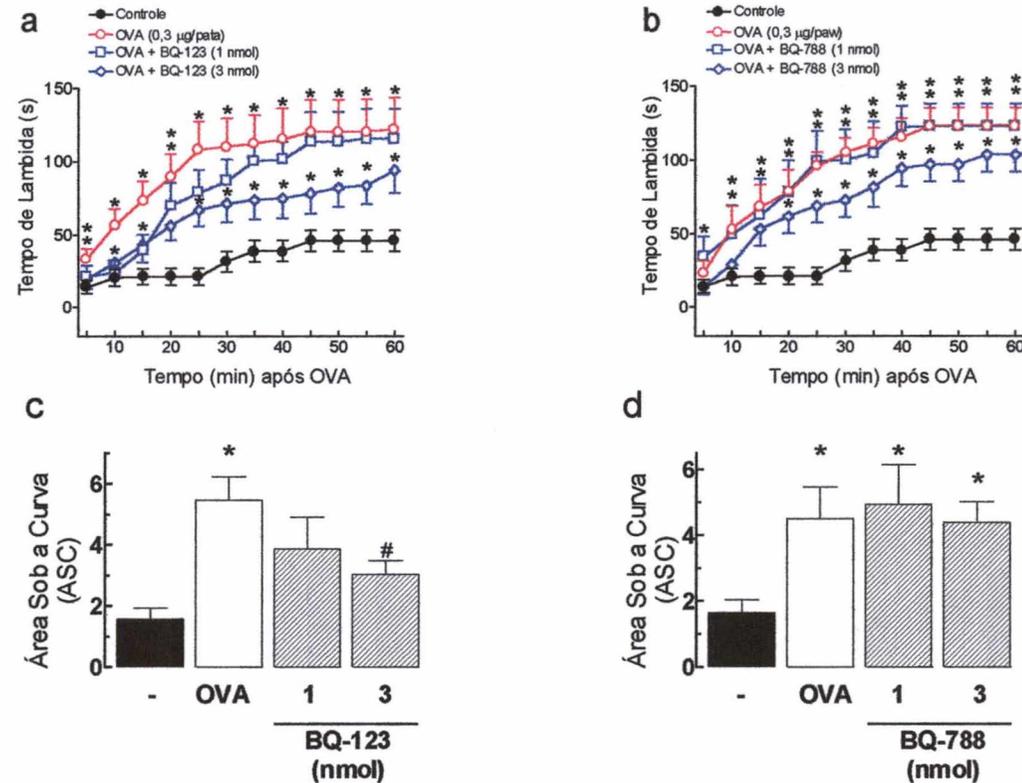


FIGURA 14: Influência do tratamento prévio local antagonistas seletivos de receptores ET_A BQ-123 (a e c) ou ET_B , BQ-788 (b e d) sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos. a e b: nocicepção expressa como tempo acumulado (em s) de lambida da pata tratada com ovoalbumina de animais sensibilizados (símbolos abertos) ou não-sensibilizados (símbolos fechados). Em c e d: área sob a curva para a resposta nociceptiva apresentada pelos respectivos grupos. Média \pm E.P.M. de 6-12 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle: sensibilização+veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

animais previamente tratados com Bosentan (30 mg Kg^{-1} , i.v., 72% de redução, **Figura 15a**) ou com A-127722.5 ($6 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$; i.v., 78% de inibição, **Figura 15b**) 1h antes do composto algésico. Por outro lado, e surpreendentemente, observou-se que o antagonista seletivo de receptores ET_B também causou redução dependente de dose da hiperalgesia à capsaicina, sendo que a maior dose empregada ($50 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$; por via i.v.) aboliu por completo o fenômeno.

4.2.4. Efeito nociceptivo da sarafotoxina S6c em animais sensibilizados com ovoalbumina e re-expostos ao antígeno:

Considerando que o bloqueio da hiperalgesia à capsaicina pelo antagonista ET_B contrasta, de forma marcante, com o efeito potencializador do mesmo frente à nocicepção causada por OVA, investigamos se a re-exposição ao antígeno seria capaz de alterar o perfil de ação da sarafotoxina S6c. Confirmando resultados anteriores, a sarafotoxina S6c não induziu comportamento nociceptivo em animais sensibilizados que não foram re-expostos ao antígeno (**Figura 16a**). Por outro lado, em animais sensibilizados que receberam uma segunda injeção de OVA na pata, este agonista induziu um claro efeito nociceptivo. Estes

resultados podem ser melhor observados na FIGURA 16b onde observa-se que a injeção da sarafotoxina S6c (10 ou 30 pmol ; por via i.pl.) 30 min depois da OVA, aumentou significativamente a resposta nociceptiva a este antígeno. Nesta figura, tomou-se o momento da injeção de sarafotoxina S6c (30 min) como o "tempo zero" e, a partir dele, calculou-se a diferença (Δ) do tempo de lambida (em s) em relação ao grupo controle (animais sensibilizados que receberam veículo 30 min após a injeção de OVA). Estas diferenças também podem

ser vistas na FIGURA 16c, com as representações das respectivas áreas sob a curva para cada grupo.

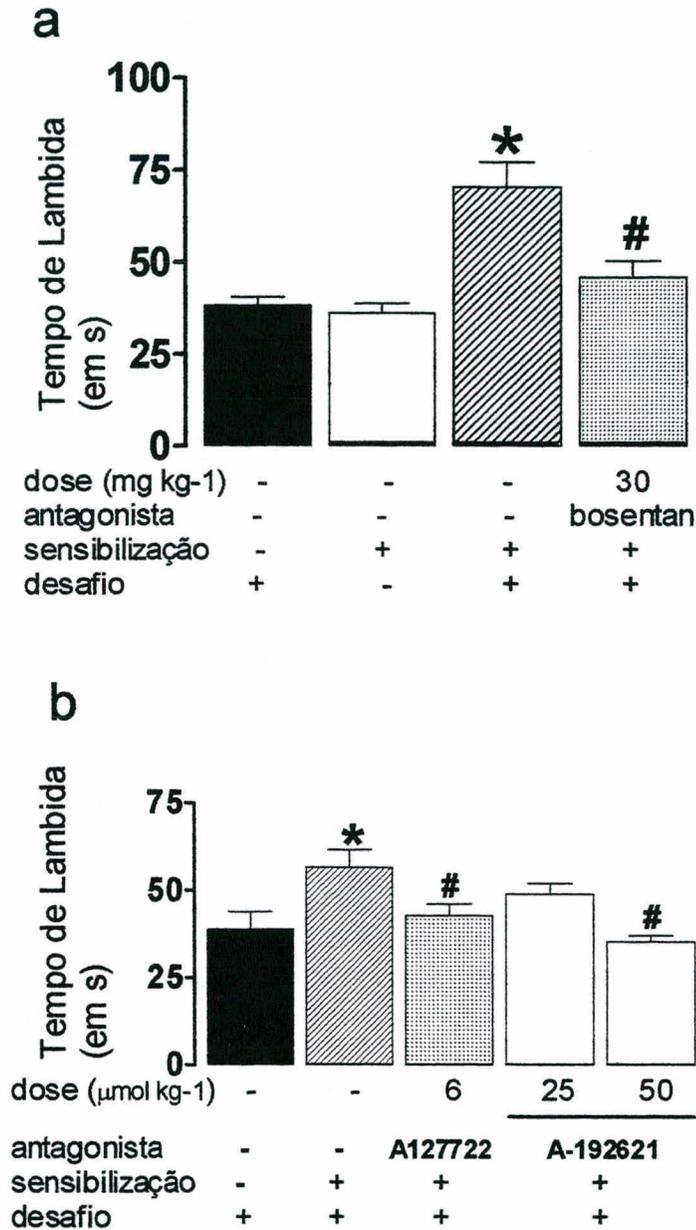


FIGURA 15: Influência do tratamento sistêmico com antagonista misto de receptores ET_A/ET_B, bosentan (painel a, barra pontilhada) ou dos antagonistas seletivos de receptores ET_A ou ET_B A-127722.1 e A-192621.1 (painel b, barras pontilhadas ou vazias, respectivamente), sobre o efeito hiperalgésico induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos. Hiperalgesia é expressa como o tempo lambida da pata tratada (em s) observado nos primeiros 5 min após a injeção i.pl. de capsaicina (0,1 μg/pata) na pata de animais sensibilizados (barras achuradas) ou não-sensibilizados (barras pretas) que receberam ovoalbumina ipsilateral 30 min antes da capsaicina. Média ± E.P.M. de 6-12 animais. * e # *P* < 0,05 quando comparado ao grupo controle: sensibilização + veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

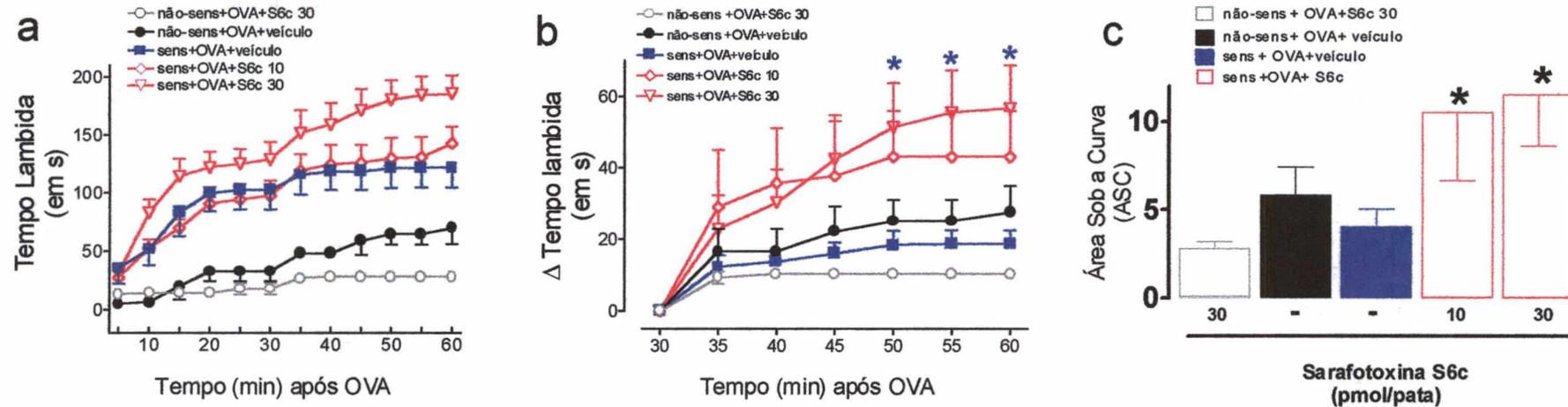


FIGURA 16: Influência da sarafotoxina S6c sobre o efeito nociceptivo induzido pela ovoalbumina (3,0 µg/pata) em camundongos. Sarafotoxina S6c 10 pmol (a e b: losângos abertos) ou 30 pmol (a e b: triângulos abertos) foi administrada 30 min após injeção de ovoalbumina e registrou-se o tempo de lambida da pata tratada de maneira cumulativa (**painel a**) a partir da injeção do antígeno, ou como a diferença de tempo de lambida a partir do momento da injeção da sarafotoxina S6c (**painel b**). **Painel c:** área sob a curva para a resposta dos mesmos grupos do painel “b”. Média ± E.P.M. de 6-12 animais. * e # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle: sensibilização+veículo ou sensibilização + OVA, respectivamente (ANOVA seguido de Bonferroni).

5. Discussão

O conjunto de resultados do presente estudo confirma e aprofunda as evidências acerca dos efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico das endotelinas. Além disso, o estudo fornece evidências da contribuição de endotelinas endógenas no desenvolvimento de fenômenos nociceptivos associados à resposta imune mediada por antígeno.

A capacidade da endotelina-1 em promover hiperalgesia já havia sido registrada anteriormente por nosso grupo (PIOVEZAN *et al.*, 1997; PIOVEZAN *et al.*, 1998). No entanto, este estudo agora demonstra que este peptídeo também induz dois outros efeitos pró-inflamatórios importantes no modelo da capsaicina, que são a nocicepção e o edema. Todos estes três efeitos são dependentes de dose e parecem refletir ações locais das endotelinas, uma vez que seus efeitos são restritos à pata injetada, ou seja, nenhuma alteração foi observada na pata contralateral à tratada (dados não mostrados).

A magnitude do efeito nociceptivo máximo induzido pela endotelina-1 (na dose de 10 pmol/pata) na pata de camundongos foi bastante semelhante àquele induzido pela capsaicina (0,1 µg/pata), droga que ativa diretamente receptores vanilóides do tipo VR₁ presentes em fibras sensitivas primárias (CATERINA *et al.*, 1997). Embora esse achado pudesse sugerir que a endotelina-1 fosse mais potente que a capsaicina, deve-se salientar que a dose do agonista vanilóide por nós utilizada causa um efeito nociceptivo claramente sub-máximo (SAKURADA *et al.*, 1992; PIOVEZAN *et al.*, 1998). Além disso, o aparecimento da nocicepção à endotelina-1 foi mais variável do que aquele observado à capsaicina. Enquanto esta última induziu um comportamento nociceptivo que foi consistentemente restrito aos 5 primeiros minutos após sua administração, a resposta induzida pela

endotelina-1 apresentou um desenvolvimento um pouco mais lento e duradouro, mas geralmente restrito aos 15 primeiros minutos após a injeção.

Diferentemente da endotelina-1, a endotelina-3 e os agonistas seletivos de receptores ET_B sarafotoxina S6c e IRL 1620 não causaram efeito nociceptivo. Ainda, demonstramos que o desenvolvimento da resposta nociceptiva à endotelina-1 foi bloqueada pelo tratamento prévio local com BQ-123 ou sistêmico com A-127722.5, ambos antagonistas seletivos de receptores ET_A, enquanto o tratamento semelhante com BQ-788, que bloqueia seletivamente os receptores ET_B, não modificou o aumento do tempo de lambida causado pela endotelina-1. Este conjunto de dados constitui argumento forte para uma participação exclusiva dos receptores ET_A na mediação do efeito nociceptivo da endotelina-1 neste modelo.

Grande parte dos trabalhos acerca dos potentes efeitos vasoconstritores da endotelina-1 têm apontado um papel preponderante para receptores ET_A nesta ação, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (para revisão ver KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001; KAYASHIMA et al., 1999; SPRATT et al., 2001). Diante disso, poderia ser aventado que o efeito nociceptivo da endotelina-1 seria consequência de uma isquemia local decorrente do efeito vasoconstritor deste peptídeo. Porém, corroborando vários outros relatos da literatura (STRACHAN et al., 2000; MARSHALL e JOHNS, 1999), demonstramos que, a exemplo da endotelina-1, a endotelina-3, a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 foram todos capazes de induzir halos de vasoconstrição quando injetados intradermicamente no dorso de camundongos, em doses inefetivas para causar efeito nociceptivo (30 pmol/sítio). A capacidade da endotelina-1 em evocar comportamento nociceptivo através de receptores ET_A alinha-se a outros relatos. Neste sentido, DE-MELO e colaboradores (1998) demonstraram anteriormente que este subtipo de

receptores medeia a nocicepção articular desencadeada pela endotelina-1 na articulação de ratos. Na mesma espécie, este peptídeo foi capaz de promover um comportamento de "retirada da pata" relacionado à dor, quando aplicado à superfície epineural do nervo ciático (DAVAR *et al.*, 1998;). Este parece ser um fenômeno dependente da ativação de canais de Ca^{2+} (ZHOU *et al.*, 2001). Ainda, GOKIN e colaboradores (2001) demonstraram recentemente que a injeção i.pl. de endotelina-1 em ratos causa ativação seletiva de fibras nociceptivas (Fibras C e A δ) por estimulação de receptores ET_A.

Com relação ao efeito potencializador da nocicepção à capsaicina, i.e. hiperalgisia, observou-se neste estudo que apenas a endotelina-1 foi capaz de promover tal efeito. Diferentemente, os agonistas sarafotoxina S6c ou IRL 1620, seletivos para receptores ET_B, bem como endotelina-3, que possui menor afinidade por receptores ET_A do que a endotelina-1, foram ineficazes em induzir resposta hiperalgésica. Assim como para o efeito nociceptivo, a hiperalgisia mediada por endotelina-1 é um fenômeno sensível ao bloqueio pelos antagonistas BQ-123 (1 nmol; i.pl.) ou A-127722.5 (25 μ mol Kg⁻¹; i.v.), mas não por BQ-788 (1 ou 10 nmol; i.pl.). Estes dados, que sugerem o envolvimento de receptores ET_A no processo hiperalgésico, correlacionam-se com os achados de que endotelina-1 ou endotelina-3, mas não a sarafotoxina S6c (agonista seletivo de receptores ET_B), potencializam a primeira fase (fase neurogênica) da nocicepção induzida por formalina (PIOVEZAN *et al.*, 1997).

Poderia-se perguntar sobre a efetividade e a especificidade do BQ-788 em bloquear receptores ET_B locais nas doses utilizadas neste estudo. Esta, no entanto, é atestada pela capacidade do mesmo (dose de 10 nmol) em revelar um efeito potencializador da nocicepção à capsaicina induzido pela endotelina-3 ou

por uma dose maior de endotelina-1 (30 pmol), sem contudo modificar a resposta induzida por capsaicina sozinha em animais controle tratados com PBS. Este fato ainda revela a importância deste subtipo de receptores na mediação de um efeito anti-hiperalgésico.

Poderia ser argumentado ainda que o fato de o BQ-788 não potencializar a nocicepção induzida por endotelina-1 mediada por receptores ET_A poderia estar simplesmente refletindo o aparecimento tardio de um mecanismo analgésico mediado por receptores ET_B . Contudo, isto não parece ser verdadeiro por três razões. A injeção local de sarafotoxina S6c não influenciou a intensidade de nocicepção (ou edema, ver abaixo) desencadeado pela injeção subsequente de endotelina-1, embora tenha inibido seu efeito hiperalgésico. Como já mencionado, a sarafotoxina S6c e o IRL 1620 não inibiram a nocicepção induzida pela capsaicina, indicando que os receptores ET_B são na verdade anti-hiperalgésicos, não analgésicos. Finalmente, a endotelina-3, que, em certas doses, poderia ativar uma proporção maior de receptores ET_B do que ET_A quando comparada à proporção obtida com endotelina-1, apenas causou uma hiperalgisia significativa quando os animais foram tratados previamente com BQ-788.

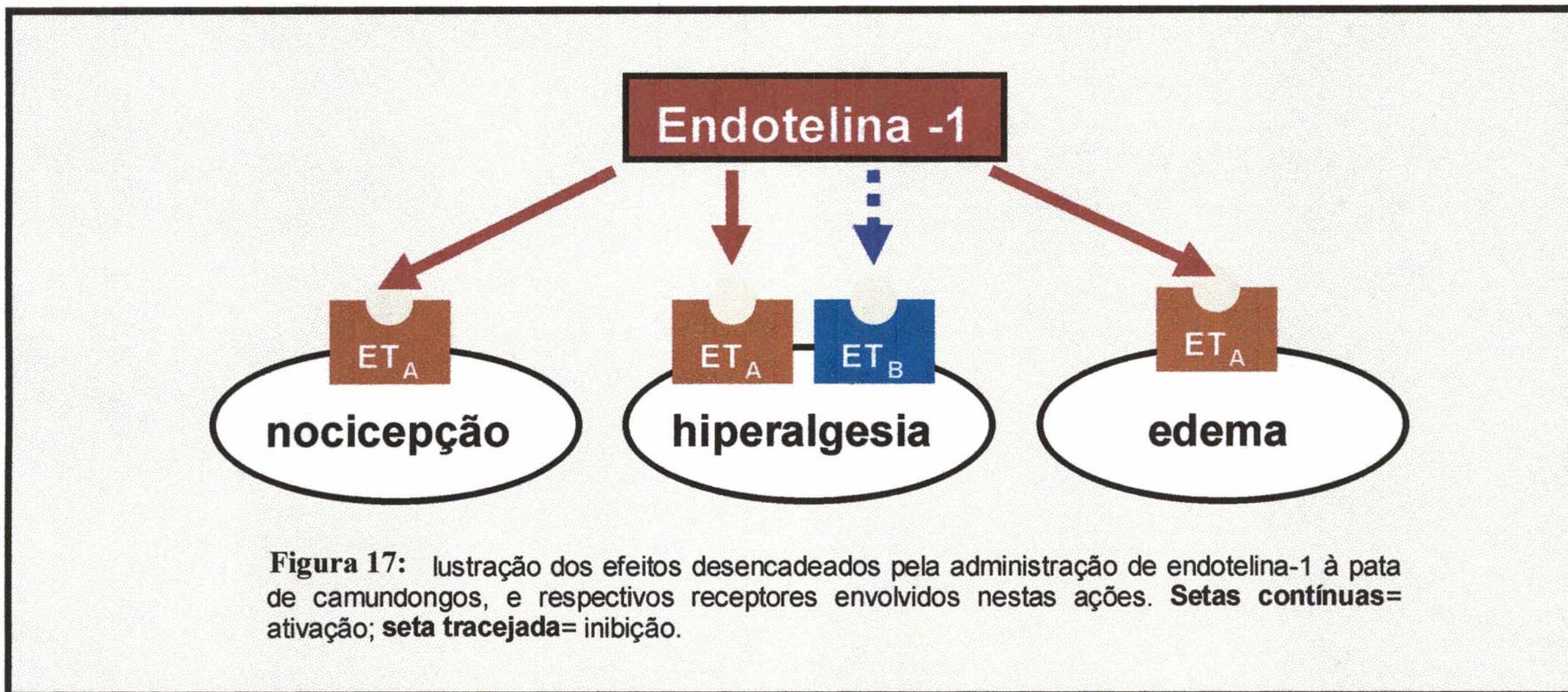
Uma outra atividade que foi registrada para as endotelinas no presente estudo diz respeito à sua capacidade em causar edema quando administradas à pata de camundongos. Tanto a endotelina-1 quanto a endotelina-3 promoveram, de maneira dependente de dose, aumentos significativos nos pesos das patas dos animais em relação aos grupos controle, ainda que o efeito do primeiro tenha sido mais pronunciado. Por outro lado, agonistas seletivos de receptores ET_B falharam em causar tal resposta, sugerindo que este seja um fenômeno mediado por receptores ET_A . Ainda, embora a endotelina-3 também tenha promovido

resposta edematogênica, antagonistas seletivos de receptores ET_A foram capazes de bloquear tal efeito. Estudos anteriores também haviam demonstrado a capacidade de agonistas exógenos de receptores endotelinérgicos em aumentar a permeabilidade vascular, e conseqüentemente o extravasamento plasmático *in vivo*. Estes trabalhos revelaram que esta ação endotelinérgica parece ser distintamente mediada por receptores ET_A (FILEP *et al.*, 1992, 1993; HAQUE *et al.*, 1996) e/ou ET_B (KUROSE *et al.*, 1993; FILEP *et al.*, 1995), dependendo do leito vascular examinado ou da espécie estudada. Em outros trabalhos, observou-se também que antagonistas seletivos de receptores ET_B inibem o extravasamento plasmático da dura-mater induzido por capsaicina intravenosa ou por estimulação elétrica unilateral do gânglio trigeminal (BRÄNDI *et al.*, 1996), além de reduzirem o edema de orelha induzido por ácido-araquidônico em camundongos (GRISWOLD *et al.*, 1999), apontando para uma participação de endotelinas endógenas na mediação das respostas edematogênicas associadas a esses modelos. Do ponto de vista deste estudo, ainda é importante comentar o relato de SAMPAIO e colaboradores (1995) de que o antagonista seletivo de receptores ET_A, BQ-123, inibiu o edema de pata decorrente da ativação de reações imunológicas à OVA. Tal estudo sugere, portanto, que os peptídeos endógenos, mobilizados em tais circunstâncias, possam também estar participando da mediação da resposta inflamatória desencadeada por reações imunes.

A **Figura 17** ilustra, esquematicamente, um resumo dos resultados obtidos e discutidos até o presente momento. Pode-se notar que a ativação de receptores ET_A, após a injeção i.pl. de endotelina-1 na pata de camundongos causa efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico. Contudo, apesar de os três efeitos

serem fenômenos mediados por receptores ET_A , uma análise de regressão linear dos resultados por nós obtidos falhou em detectar uma correlação significativa entre o efeito hiperalgésico e os efeitos nociceptivo ou edematogênico, embora uma correlação positiva e significativa tenha sido estabelecida entre estes dois últimos efeitos (resultados não apresentados).

Anteriormente nós havíamos demonstrado (PIOVEZAN *et al.*, 1998) que a endotelina-1 (em altas doses) ou o IRL 1620, apresentam um efeito anti-hiperalgésico. Enquanto a endotelina-1, na dose de 30 pmol, foi inefetiva em potencializar a nocicepção à capsaicina, o agonista seletivo de receptores ET_B , IRL 1620, reduziu a hiperalgésia induzida por serotonina. Este parece ser verdadeiramente um efeito anti-hiperalgésico, e não analgésico, uma vez que nenhum dos dois compostos afetou a nocicepção à capsacina sozinha. No presente trabalho, o efeito anti-hiperalgésico mediado por receptores ET_B se confirma pelos resultados a seguir. Primeiro, a sarafotoxina S6c, agonista seletivo de receptores ET_B , apresentou um efeito anti-hiperalgésico, reduzindo o tempo de lambida da pata induzido pela endotelina-1 (10 pmol) a valores semelhantes àqueles induzidos pela capsaicina sozinha. Em segundo lugar, o antagonista seletivo de receptores ET_B , BQ-788 (10 nmol), revelou um efeito hiperalgésico para a endotelina-1 na dose de 30 pmol, bem como permitiu a demonstração de um efeito hiperalgésico para a endotelina-3. Esses últimos resultados sugerem que a ativação de receptores ET_B poderia modular seletivamente a resposta



hiperalgésica às endotelinas em tais circunstâncias. A promoção deste efeito anti-hiperalgésico poderia ainda ser responsável pelo formato “em sino” da curva dose-resposta ao efeito hiperalgésico à endotelina-1.

Assim, diante do exposto até o momento, sugerimos que além de causar nocicepção, hiperalgesia e edema pela ativação de receptores ET_A, em concentrações locais mais elevadas, a endotelina-1 poderia ainda ativar receptores ET_B, que seriam responsáveis pela mediação de um efeito seletivo anti-hiperalgésico, a exemplo do que fazem os agonistas seletivos desse subtipo de receptor. Esta hipótese também está incluída na **Figura 17**.

É possível correlacionarmos os estudos envolvendo administração de endotelinas exógenas, com uma possível participação dos peptídeos endógenos em respostas inflamatórias que envolvam nocicepção? Nesse sentido, um trabalho recente apontou um importante papel das endotelinas endógenas na alodinia mecânica associada à neuropatia diabética, que foi reduzida em ratos tratados com antagonista seletivo de receptores ET_A (JARVIS *et al.*, 2001). Em outro trabalho recente, WARNICK e colaboradores (2001) demonstraram, utilizando um novo modelo de dor, que a hiperalgesia decorrente do implante de células tumorais ao osso calcâneo de camundongos, é reduzida pelo tratamento dos animais com antagonistas de receptores ET_A. Além disso, o líquido de perfusão obtido dos sítios hiperalgésicos continham níveis significativamente maiores de endotelinas do que os sítios não hiperalgésicos. Por fim, este mesmo estudo também evidenciou efeitos nociceptivos da injeção i.pl. de endotelina-1 em camundongos, que foram ainda mais evidentes em animais que receberam implante de células tumorais. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que reações imunes mediadas por antígeno são capazes de ativar um componente

endotelinérgico em diferentes modelos. Neste sentido, a imunorreatividade para endotelinas encontrou-se aumentada no plasma (FILEP *et al.*, 1993), no lavado broncoalveolar (ANDERSSON *et al.*, 1995) e nas vias aéreas (KIZAWA *et al.*, 1999) em resposta ao desafio com OVA em cobaias previamente sensibilizadas a este antígeno. Ainda, num modelo de inflamação alérgica observou-se que antagonistas misto ET_A/ET_B ou seletivo para receptores ET_A reduziram significativamente o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e a infiltração de neutrófilos nos pulmões de camundongos (FUJITANI *et al.*, 1997).

Resultados semelhantes foram obtidos por SAMPAIO e colaboradores (2001), que demonstraram que o influxo de leucócitos, predominantemente de células mononucleares e eosinófilos induzido por administração de OVA na pleura destes animais é bloqueado por antagonistas de receptores ET_A , mas não por antagonistas de receptores ET_B . O mesmo estudo comprovou que pelo menos parte deste influxo de células mononucleares deveu-se a acúmulo de linfócitos CD_4^+ e, em menor quantidade, CD_8^+ , sendo que ambos foram inibidos pelo tratamento dos animais com BQ-123. Além disso, observou-se um aumento dos níveis de IL-5 no fluido pleural e no plasma de animais sensibilizados, bem como a secreção desta citocina (e de IL-4 e de $INF-\gamma$) por linfócitos CD_4^+ re-expostos ao antígeno *in vitro*. Estes últimos efeitos também foram inibidos pelo tratamento prévio dos animais ou das células isoladas com o antagonista seletivo de receptores ET_A . Diante do exposto, não é impossível cogitar-se a possibilidade de que as endotelinas endógenas, liberadas em resposta a reações imunes, possam também influenciar os processos nociceptivos.

Havíamos mencionado num parágrafo anterior que o edema causado por OVA na pata de camundongos previamente sensibilizados a este antígeno evoca

um efeito edematogênico que é inibido por antagonista de receptores ET_A (SAMPAIO et al., 1995). Diante disso, e também da evidência de que mastócitos produzem endotelina-1 (EHRENREICH et al., 1990), nós decidimos investigar, ao que parece pela primeira vez, se as endotelinas endógenas poderiam também estar implicadas na manifestação do componente nociceptivo da inflamação imune deflagrada por antígeno na pata de camundongos. De fato, nosso presente estudo revelou que a injeção i.pl. de OVA induziu um aumento do tempo de lambida da pata de animais previamente sensibilizados a este antígeno, quando comparado aos animais controle (não-sensibilizados). Esta resposta nociceptiva foi bloqueada pelo tratamento prévio dos animais com antagonistas misto ET_A/ET_B , Bosentan (10 ou 30 mg Kg^{-1} ; i.v.), ou seletivos para receptores ET_A , A-127722.5 (6 μmol Kg^{-1} ; i.v.) ou BQ-123 (3 nmol; i.pl.). Por outro lado, resultados variáveis foram encontrados quando os animais foram tratados previamente antagonistas seletivos de receptores ET_B . O antagonista não-peptídico A-192621.1 (25 μmol Kg^{-1} ; i.v.) aumentou significativamente o tempo de lambida da pata nos animais sensibilizados. Conforme ilustrado esquematicamente na **Figura 18**, este resultado sugere que, pelo menos nos primeiros momentos da inflamação induzida por antígeno, há um componente nociceptivo endotelinérgico importante que parece ser mediado por ativação de receptores ET_A e modulado, negativamente, pela ativação simultânea de receptores ET_B . Porém, o antagonista peptídico BQ-788 (1 ou 3 nmol; i.pl.) não alterou a resposta nociceptiva de camundongos ao antígeno. Talvez esta ausência de efeito deste antagonista seletivo ET_B peptídico sobre a nocicepção induzida pela OVA esteja relacionada à sua susceptibilidade a degradação por enzimas proteolíticas liberadas de mastócitos no momento de sua degranulação em resposta ao antígeno (para

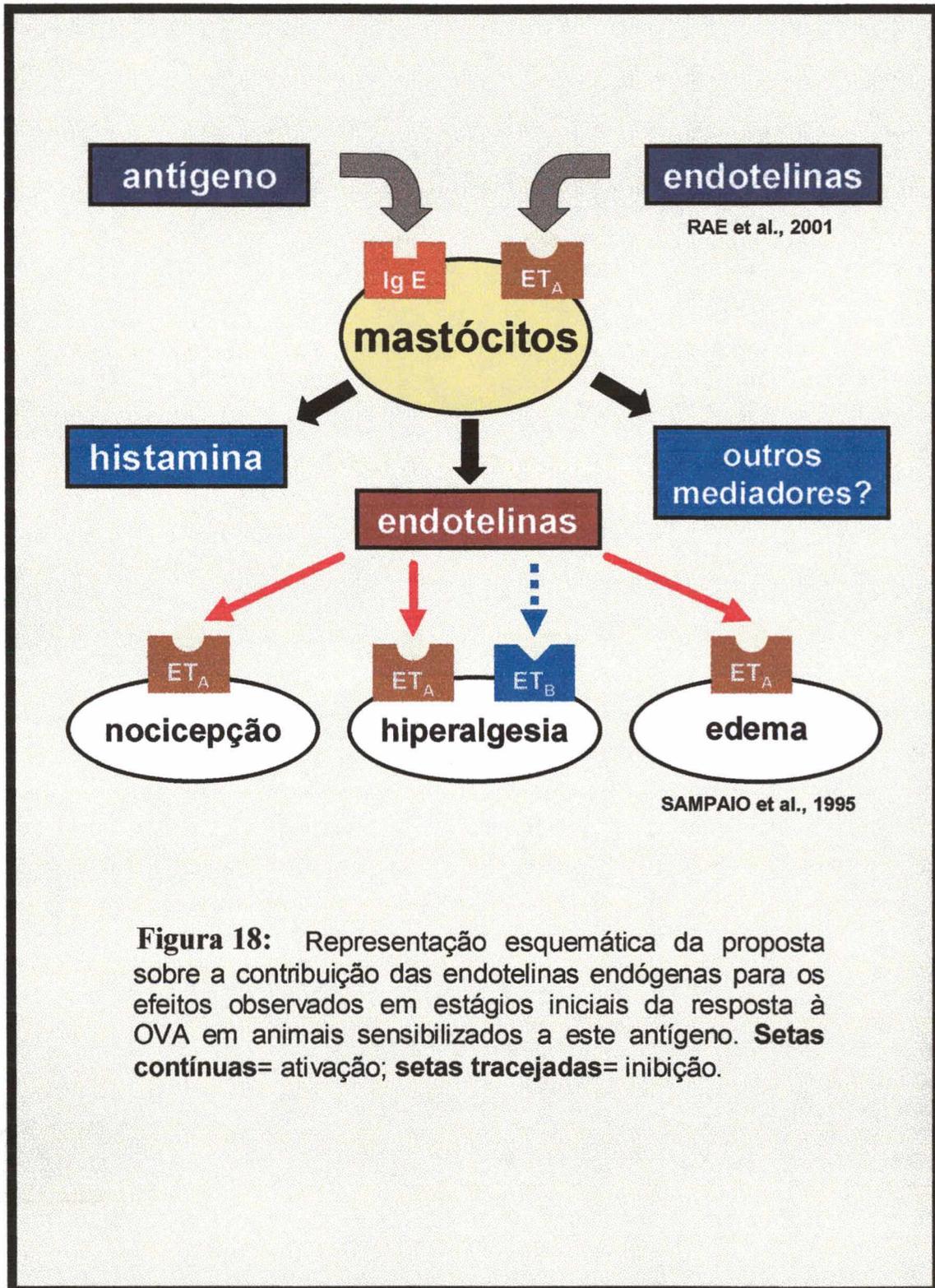


Figura 18: Representação esquemática da proposta sobre a contribuição das endotelinas endógenas para os efeitos observados em estágios iniciais da resposta à OVA em animais sensibilizados a este antígeno. **Setas contínuas**= ativação; **setas tracejadas**= inibição.

revisão, ver GURISH e AUSTEN, 2001). Embora esta seja a primeira demonstração do envolvimento de endotelinas na nocicepção associada à inflamação imune, as evidências funcionais da participação de receptores ET_A nesse processo contrastam com outros dois relatos quanto à natureza do receptor endotelinérgico ativado por endotelinas endógenas em outros modelos de dor inflamatória. DE-MELO e colaboradores (1998) demonstraram um importante papel da ativação de receptores ET_B na nocicepção articular desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* em articulações de ratos previamente sensibilizadas com carragenina, enquanto que a nocicepção articular desencadeada pelo peptídeo na articulação não-sensibilizada com carragenina pareceu ser mediada apenas por receptores ET_A. Mais recentemente, outro estudo demonstrou que camundongos com o gene para receptor ET_B inativado são muito menos sensíveis à estimulação nociceptiva inflamatória (i.e. por injeção intraperitoneal de fenilbenzoquinona), embora mantenham a sensibilidade para estímulos nociceptivos agudos no modelo da placa quente (GRISWOLD *et al.*, 1999).

Em adição ao papel nociceptivo induzido pelas endotelinas endógenas mobilizadas por reações a antígeno, demonstramos também que estes peptídeos possuem ação hiperalgésica sobre a resposta nociceptiva desencadeada por capsaicina. Inesperadamente, esta influência hiperalgésica mostrou-se sensível a bloqueio por tratamento sistêmico prévio não só com antagonista de receptores ET_A, A-127722.5 (6 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$; i.v.) como também com o antagonista de receptores ET_B, A-192621.1 (50 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$; i.v.). Este resultado difere bastante daquele obtido frente ao efeito hiperalgésico da endotelina-1 exógena, que pareceu ser puramente mediado por receptores ET_A. Isto sugere que, por ocasião

da administração de capsaicina, 30 min após a injeção de OVA, o receptor ET_B presente na pata dos animais sofre uma alteração funcional, passando a mediar uma ação hiperalgésica ao invés de anti-hiperalgésica. Esta hipótese é fortalecida pela nossa demonstração de que o agonista seletivo dos receptores ET_B, sarafotoxina S6c, induziu um nítido aumento da resposta nociceptiva à OVA quando injetada 30 min depois da mesma. Além desta possibilidade de uma alteração funcional do receptor ET_B, poder-se-ia aventar a hipótese de que o processo inflamatório estaria promovendo um recrutamento de células contendo receptores ET_B no transcorrer dos primeiros 30 min após o desafio imune. Estas células, por sua vez, facilitariam a ocorrência de processos nociceptivos e/ou hiperalgésicos. A **Figura 19** ilustra, esquematicamente, nossa hipótese quanto aos papéis dos receptores ET_A e ET_B ativados por endotelinas endógenas em fases mais tardias da inflamação alérgica. Finalmente, a possível conversão funcional de receptores ET_B, passando de uma atividade anti-hiperalgésica para hiperalgésica, talvez explique porque a endotelina-1, a endotelina-3 e a sarafotoxina S6c potencializam apenas a segunda fase (inflamatória) da nocicepção causada por formalina (PIOVEZAN et al., 1997). Ainda, esta idéia correlaciona-se com os achados de que a endotelina-1 e a sarafotoxina S6c passam a aumentar o tempo de incapacitação em articulações de rato previamente tratadas com carragenina (DE-MELO et al., 1998).

Com relação aos possíveis mecanismos intracelulares e/ou mediadores envolvidos na nocicepção induzida por endotelina-1, poucos estudos investigaram este aspecto e, ainda assim, algumas evidências obtidas foram conflitantes. Sobre a possível participação dos prostanóides na mediação da contorção

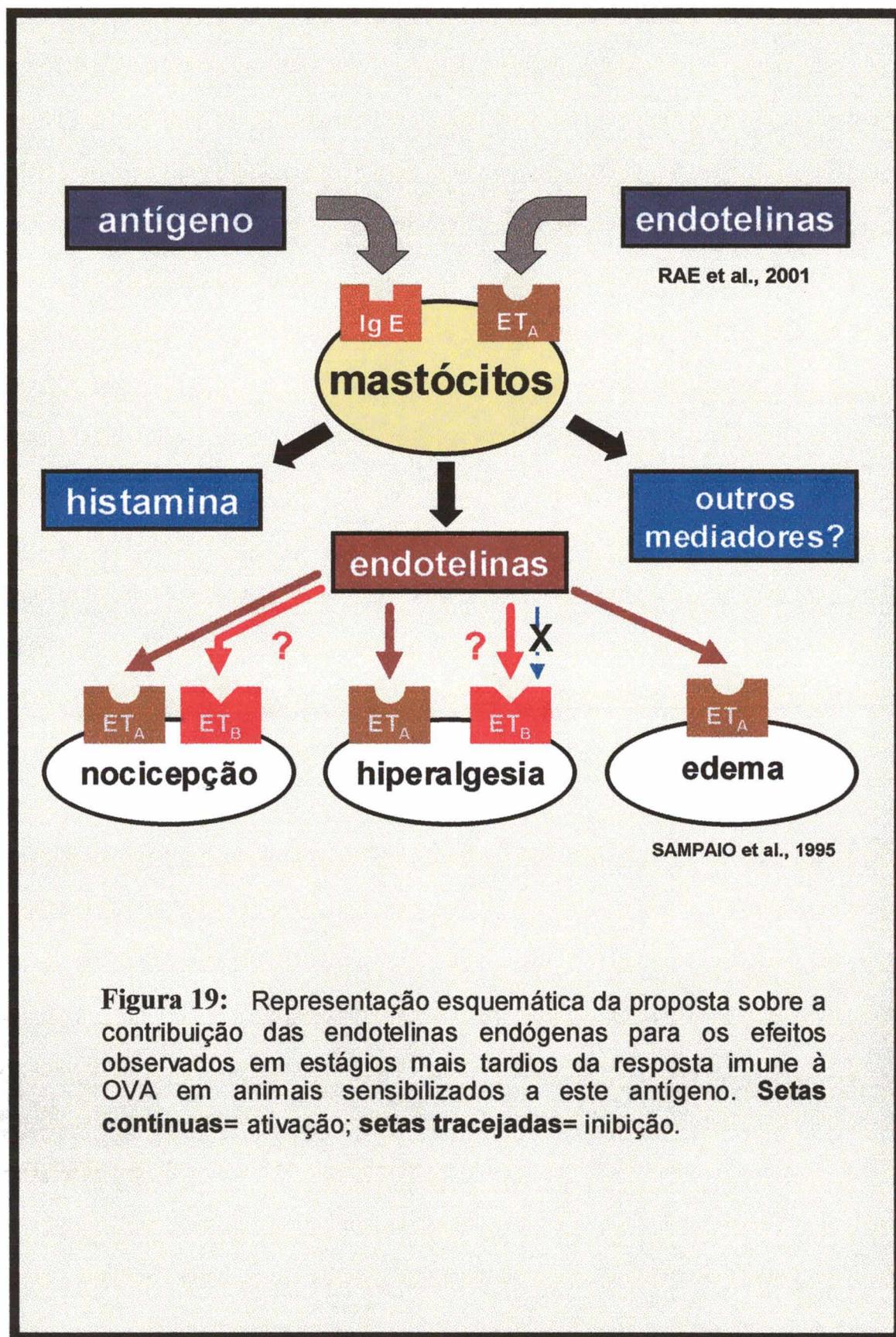


Figura 19: Representação esquemática da proposta sobre a contribuição das endotelinas endógenas para os efeitos observados em estágios mais tardios da resposta imune à OVA em animais sensibilizados a este antígeno. **Setas contínuas= ativação; setas tracejadas= inibição.**

abdominal induzida pela endotelina-1 em camundongos, enquanto FERREIRA e colaboradores (1989) encontraram que a resposta produzida por $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de endotelina-1 foi abolida por indometacina, RAFFA e JACOBY (1991) demonstraram que as contorções abdominais desencadeadas por uma dose de $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ do peptídeo foram totalmente resistentes à inibição por este e outros dois bloqueadores de ciclo-oxigenases.

Além de envolver a formação de prostanóides, o efeito nociceptivo da endotelina-1 poderia estar indiretamente associado à liberação de estoques celulares de histamina. Sabe-se por exemplo, que a endotelina-1 é capaz de produzir uma ação reflexa de “flare” que é mediada por neurônios sensoriais e que depende de histamina (BRAIN *et al.*, 1992; WENZEL *et al.*, 1998). De acordo com esta hipótese, em nosso modelo no camundongo, tanto a nocicepção induzida pela administração i.pl. de endotelina-1, quanto aquela promovida pela ovoalbumina em animais sensibilizados também parecem depender, pelo menos em parte, da atividade histaminérgica. No primeiro caso, tanto o tratamento prévio com um antagonista de receptores histaminérgicos H_1 , quanto a dessensibilização local com Composto 48/80, foram efetivos em bloquear os três efeitos da endotelina-1 exógena (RAE *et al.*, 2001). Em segundo lugar, a nocicepção induzida por ovoalbumina foi grandemente reduzida pela dessensibilização dos animais com Composto 48/80.

A idéia do envolvimento de mastócitos em processos nociceptivos, possivelmente pela liberação de histamina, é reforçada também por outros autores que demonstraram que antagonistas histaminérgicos reduzem a nocicepção induzida por formalina (PARADA *et al.*, 2001). Por outro lado, uma vez que o Composto 48/80 não bloqueou completamente a nocicepção à

ovoalbumina, podemos sugerir que outras células, tais como macrófagos, sejam importantes para o desenvolvimento deste fenômeno, assim como observou-se num estudo de dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético ou zimosan (RIBEIRO et al., 2000).

Finalmente com relação ao mecanismo de ação envolvido nos efeitos observados para as endotelinas, outros resultados preliminares deste trabalho fornecem outras evidências que implicam a participação da substância-P, do glutamato e da proteína quinase C intracelular no efeito hiperalgésico da endotelina-1, sendo que a atividade destes dois últimos parece também contribuir para o edema de pata (em camundongos) causado pela mesma. Por outro lado, nenhum destes agentes inibiu a resposta nociceptiva induzida por endotelina-1, fortalecendo a idéia de que o peptídeo possa causar nocicepção, por uma ação direta em neurônios (DAVAR *et al.*, 1998; GOKIN *et al.*, 2001).

Concluindo, nós demonstramos que a endotelina-1 induz nocicepção, hiperalgesia e edema na pata de camundongos pela ativação de receptores ET_A. Além disso, o peptídeo também pode ativar localmente receptores ET_B, que podem modular diferentemente os estágios iniciais ou tardios da fenômeno nociceptivo. Os mecanismos intrínsecos subjacentes a estes efeitos da endotelina-1 na pata de camundongos dependem, de modo importante, da ativação de mastócitos locais e, a substância P, o glutamato e a proteína-quinase C parecem contribuir diferentemente para os efeitos de nocicepção, hiperalgesia e edema. Se a participação de endotelinas endógenas em quadros nociceptivos vier a ser confirmada também em humanos, os antagonistas de receptores endotelinérgicos poderiam constituir uma estratégia terapêutica interessante e nova no tratamento da dor e da inflamação.

6. Conclusões

Os resultados do presente estudo permitem-nos concluir de modo geral que, na pata de camundongos:

➔ a endotelina-1 causa efeitos nociceptivo, hiperalgésico e edematogênico mediados por receptores ET_A ;

➔ em doses locais mais elevadas a endotelina-1 promove um efeito anti-hiperalgésico mediado por receptores ET_B ;

➔ as endotelinas endógenas contribuem para os efeitos da ovoalbumina em animais sensibilizados, sendo que:

➔ o receptor ET_A participa do efeito nociceptivo à mesma,

➔ o receptor ET_B possui um efeito dual:

- em estágios iniciais apresenta uma função anti-hiperalgésica e,
- em estágios mais tardios apresenta uma função hiperalgésica.

7. Referências Bibliográficas

- ACHMAD, T.H. e RAO, G.S. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin 1 and the influence of calcium channel blockers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189: 944-1000, 1992.
- BATTISTINI, B.; STEIL, A.A.; JANCAR, S.; SIROIS, P. Roles of endothelins and their receptors in immune complex-induced/polymorphonuclear lung injury (reversed passive arthus reaction) in CD-1 mice. **Pulm. Pharmacol., Ther.**, 11:165-172, 1998.
- BESSION, J.M. The Neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.
- BRAIN, S.D.; THOMAS, G.; CROSSMAN, D.C.; FULLER, R.; CHURCH, M.K. Endothelin-1 induces a histamine-dependent flare in vivo, but does not activate human skin mast cell in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 33: 117-120, 1992.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389(6653): 816-824, 1997.
- CHAOUCH, A. e BESSION, J.M. Mécanismes périphériques et médullaires de la nociception. **Rev. Neurol. (Paris)**, 142(3): 173-200, 1986.
- CRUNKHORN, P. e WILLIS, A.L. Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, 41: 49-56, 1971.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, 126(1): 45-50, 1999.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 660-664, 1992.
- CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN, M.A. Endothelin-stimulated monocytes produce IL-1 β , IL-8 and GM-CSF. **Mol. Biol. Cell**, 4: 415A, 1993.
- CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN, M.A. Endotoxin-stimulated monocytes produce endothelin. **FASEB J.**, 8: A214, 1991.

- D'AGOSTINO, B.; GALLELI, L.; FALCIANI, M.; DI PIERRO, P.; ROSSI, F.; FILIPPELLI, A.; ROSSI, F. Endothelin-1 induced bronchial hyperresponsiveness in the rabbit: an ET(A) receptor-mediated phenomenon. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 360:665-669, 1999.
- DAVAR, G.; HANS, G.; FAREED, M.U.; SINNOTT, C.; STRICHARTZ, G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **Neuroreport.**, 9: 2279-2283, 1998.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M. e YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET_A receptors in the rat perfused lung. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 773-775, 1992.
- DeLEO, J.A.; COLBURN, R.W.; NICHOLS, M. e MALHOTRA, A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. **J. Interf. Cytok. Res.**, 16: 695-700, 1996.
- DeNUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T.D. e VANE, J.R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85(24): 9797-9800, 1988.
- DU, J.; CUI, D.; GUO, Y. Detection of ET-1, TNF-alpha, oxidative radicals in sera of asthmatics and in sera and lung tissue of asthmatic guinea pig. **Zhonghua Jie He He Hu Za Zhi**, 21: 293-296, 1998.
- DUPERRAY, A.; MANTOVANI, A.; INTRONA, M. e DEJANA, E. Endothelial cell regulation of leucocyte infiltration in inflammatory tissues. **Mediat. Inflamm.**, 4: 322-330, 1995.
- EGGER, D.; GEUENICH, S.; DENZLINGER, C.; SCHMITT, E.; MAILHAMMER, R.; EHRENREICH, H.; DORMER, P. e HULTNER, L. IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. **J. Immunol.**, 154 (4): 1830-1837, 1995.

- EHRENREICH, H.; RIECKMANN, P.; SINOWATZ, F.; WEIH, K.A.; ARTHUR, L.O.; GOEBEL, F.D.; BURD, P.R.; COLIGAN, J.E. e CLOUSE, K.A. Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J. Immunol.*, 150 (10): 4601-4609, 1993.
- EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E.; KEHRL, J.H. e FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J. Exp. Med.*, 173: 1741-1748, 1990.
- ENDO, T.; UCHIDA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI, N.; NOMURA, A.; HIRATA, F. e HASEGAWA, S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186: 1594-1599, 1992.
- FERREIRA, S.H. NAKAMURA, M. e de ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 16: 31-37, 1978.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature*, 240: 200-203, 1972.
- FICK, R.B.; FOX, J.A.; JARDIEU, P.M. Immunotherapy approach to allergic disease. *Immunopharm.*, 48:307-310, 2000.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: *Textbook of pain*. Patrick Wall e Ronald Melzack., 4a. ed.; Churchill Livingstone, Nova York, 1999.
- FILEP, J.G.; FOURNIER, A. e FOLDES-FILEP, E. Endothelin-1-induced myocardial ischaemia and oedema in the rat: involvement of the ET_A receptor, platelet-activating factor and thromboxane A₂. *Br. J. Pharmacol.*, 112(3): 963-971, 1994.
- FILEP, J.G.; TELEMAQUE, S.; BATTISTINI, S.; SIROIS, P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Increased plasma levels of endothelin during anaphylactic shock in the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.*, 239: 231-236, 1993.

- FILEP, J.G.; BATTISTINI, B. e SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. *Br. J. Pharmacol.*, 103: 1633-1640, 1991.
- GILBERT, R.E.; RUMBLE, J.R.; CAO, Z.; COX, A.J.; van EEDEN, P.; ALLEN, T.J.; KELLY, D.J. COOPER, M.E. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ. Res.*, 86: 158-165, 2000.
- GOKIN, A.P.; FAREED, M.U.; PAN, H.L.; HANS, G.; STRICHARTZ, G.R.; DAVAR, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. *J. Neurosci.*, 21(14): 5358-5366, 2001.
- GOLDIE, R.G. Potential role of the endothelins in airway remodeling in asthma. *Pulm. Pharmacol. Therap.*, 12:79-80, 1999.
- GOLDIE, R.G. e HENRY, P.J. Endothelins and asthma. *Life Sci.*, 65:1-15, 1998.
- GOMEZ-GARRE, D.; GUERRA, M.; GONZALES, E.; LOPEZ-FARRE, A.; RIESCO, A.; CAMELO, C.; ESCANERO, K. e EGIDO, J. Aggregation of human polymorphonuclear leucocytes by endothelin: role of platelet activating factor. *Eur. J. Pharmacol.*, 224: 167-172, 1992.
- HANDWERKER, H.O e REEH, P.W. Pain and Inflammation. *Proceedings of the Vth World Congress on Pain*. Eds. M.R. Bond, J.E. Charlton & C.J. Woolf, p. 59-69, 1991.
- HAY, D.W. Putative mediator role of endothelin-1 in asthma and other lung diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26:168-171, 1999.
- HAY, D.W.; LUTTMANN, M.A.; HUBBARD, W.C. e UNDEM, B.J. Endothelin receptor subtypes in human and guinea pig pulmonary tissues. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1175-1183, 1993.
- HAYNES, W.G. e WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clinical Sci.*, 84: 485-500, 1993.

- HE, W.; XU, J.; ZHONG, N. Effect of inhaled-corticosteroids on the mRNA expressions of endothelin-1 and endothelin converting enzyme in bronchial asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 21:336-339, 1998.
- HELSET, E.; YTREHUS, K.; TVEITA, T.; KJÆVE, T.; JØRGENSEN, L. Endothelin-1 causes accumulation of leucocytes in the pulmonary circulation. *Circ. Shock*, 44: 201-209, 1994.
- HENRY, P.J.; RIGBY, P.J.; SELF, G.J.; PREUSS, J.M.; GOLDIE, R.G. Relationship between endothelin-1 binding site densities and constrictor activities in human and animal airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 786-792, 1990.
- HURIBAL, M.; KUMAR, R.; CUNNINGHAM, M.; SUMPIO, B.E. e McMILLEN, M.A. Endothelin causes production of interleukin 6 but not interleukin 1 by human monocytes. *FASEB J.*, 6: A1613, 1992.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAGUCHI, T.; GOTO, K. e MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptide predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2863-2867, 1989.
- JARVIS, M.F.; WESSALE, J.L.; ZHU, C.Z.; LYNCHILL, J.J.; DAYTON, B.D.; CALZADILLA, S.V.; PADLEY, R.J.; OPGENORTH, T.J.; KOWALUK, E.A. ABT-627, an endothelin ET_A receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. *Eur.J. Pharmacol.*, 388: 29-35, 2000.
- JUTEL, M.; WATANABE, T.; KLUNKER, S.; AKDIS, M.; THOMET, O.A.R.; MALOLEPSZY, J.; ZAK-NEJMARK, T.; KOGA, R.; KOBAYASHI, T.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 413:420-425, 2001.
- KANSE, S.M.; TAKAHASHI, K.; LAM, H.C.; REES, A.; WARREN, J.B.; PORTA, M.; MOLINATTI, P.; GHATEI, M. e BLOOM, S.R. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci.*, 48(14): 1379-1384, 1991.

- KARNE, S.; JAYAWICKEME, C.K. e LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, 269: 19126-19133, 1993.
- KAYASHIMA, K.; DOI, Y.; KUDO, H.; KIYONAGA, H.; FUJIMOTO, S. Effects of endothelin-1 on vasoactivity and its synthesis, storage, and acting sites in the rat superior mesenteric vasculature: an ultrastructural and immunocytochemical study. **Med. Electron. Microsc.**, 32(1): 36-42, 1999.
- KEDZIERSKI, R.M.; YANAGOSAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 41: 851-876, 2001.
- KIZAWA, Y.; KOTAKE, H.; KUSAMA, T.; SAITO, K.; MURAKAMI, H. Antigen-induced elevation of immunoreactive endothelin-1 (ET-1) levels in ovalbumin-sensitized guinea-pig airway tissue. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, 22: 239-243, 1999.
- KODA, W.; HARADA, K.; TSUNEYAMA, K.; KONO, N.; SASAKI, M.; MATSUI, O.; NAKANUMA, Y. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. **Lab. Invest.**, 80: 1007-1017, 2000.
- LEFER, A.M.; ALBERTINE, K.H.; WEYRICH, A.S. e MA, X.L. Polymorphonuclear (PMN) leucocytes accumulate intravascularly but not migrate to the myocardium following ischaemia/reperfusion in the cat. **FASEB J.**, 7: A344, 1994.
- LEWIS, G.P. Mediators of inflammation. Ed. G. P. Lewis. p. 1-10. IOP Publishing Limited, Bristol, 1986.
- LI, Z.; NIWA, Y.; ROKUTAN, K.; NAKAYA, Y. Expression of endothelin-1 in macrophages and mast cells in hyperplastic human tonsils. **FEBS Lett.**, 457: 381-384, 1999.
- LIU, Y. e YAMADA, H. Immunocytochemical studies on the endothelin peptides and their receptors in mast cells of the rat lung and gastrointestinal tract. **Kaibogaku Zasshi.**, 73: 337-344, 1998.

- LOPES-FARRÉ, A.; RIESCO, A.; ESPINOSA, G.; DIGIUNI, E.; CERNADAS, M.R.; ALVAREZ, V. e MONTON, M. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation*, 88: 1166-1171, 1993.
- LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; VEIGA, F.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13. *Eur. Cytoline Netw.*, 12(2): 260-267, 2001.
- LOWMAN, M.A.; REES, P.H.; BENYON, R.C.; CHURCH, M.K. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 81:590-597, 1988.
- MARSHALL, J.L. e JOHNS, E.J. Influence of endothelins and sarafotoxin 6c and L-NAME on renal vasoconstriction in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.*, 128(3): 809-15, 1999.
- MCGREGOR, P.E.; AGERAWAL, D.K.; EDWARDS, J.D. Technique for assessment of leucocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 32: 73-77, 1994.
- MELZACK, R. e WALL, P.D. Pain Mechanisms: a new theory. *Science, Wash.*, 150: 971-979, 1965.
- MILLAN, M.K. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.
- MITCHELL, M.D.; LUNDIN-SCHILLER, S. e EDWIN, S.S. Endothelin production by amnion and its regulation by cytokines. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165: 120-124, 1991.
- MIYAMORI, I.; TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; IKI, K. e TAKEDA, R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. *Life Sci.* 49(18): 1295-1300, 1991.
- NAKANO, A.; KISHI, F.; MINAMI, K.; WAKABAYASHI, H.; NAKKAYA, Y.; KIDO, H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-

- constricting 31-amino acid-length endothelins by chimase from human mast cells. *J. Immunol.*, 159: 1987-1992, 1997.
- NAKANO, J.; TAKIZAWA, H.; OHTOSHI, T.; SHOJI, S.; YAMAGUCHI, M.; ISHII, A.; YANAGISAWA, M. e ITO, K. Endotoxin and pro inflammatory cytokines stimulate endothelin 1 expression and release by airway epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy*, 24: 330-336, 1994.
- NINOMYIA, H.; UCHIDA, Y.; ISHII, Y.; NOMURA, A.; KAMEYAMA, M.; SAOTOME, M.; ENDO, T. e HASEGAWA, S. Endotoxin-stimulates endothelin-1 release from cultured epithelial cells of guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, 203: 299-302, 1991.
- OHLSTEIN, E.H.; STORER, B.L.; BUTCHER, J.A.; DEBOUCK, C. e FEUERSTEIN, G. Platelets stimulates expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ. Res.*, 69: 832-841, 1991.
- OLIVER, J.M.; KEPLEY, C.L.; ORTEGA, E.; WILSON, B.S. Immunologically mediated signaling in basophils and mast cells: finding therapeutic targets for allergic diseases in the human FcεR1 signaling pathway. *Immunopharm.*, 48:269-281, 2000.
- PARADA, C.A.; TAMBELLI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. *Neurosci.*, 102: 937-9444, 2001.
- PASSOWICZ-MUSYNSKA, E.; JANKOWSKA, R.; SZELIGA, W. Endothelin concentration in sera of patients with atopic bronchial asthma. *Pneumonol. Alergol Pol.*, 67:17-21, 1999.
- PEARCE, F.L. Mast cell heterogeneity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4: 165-167, 1983.
- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Endotheiins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. *Can. J. Pharmacol.*, 75: 596-600, 1997.

- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 351: 15-22, 1998.
- POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. J. Pharmacol.**, 115(4): 684-688, 1995.
- RAE, G.A.; Frighetto, M.; Henriques, M.G.M.O., De-Souza, G.E.P.; D'Orléans-Juste, P. and Piovezan, A.P. "Endothelins contribute to antigen-induced nociception and hyperalgesia in mice". *Seventh International Conference on Endothelin*, Edinburgh – Escócia – Reino Unido, O16, 2001.
- RAE, G.A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G. e VANE, J.R. Endothelin-1 release eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13 (Suppl. 5): S89-S92, 1989.
- RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 387: 111-118, 2000.
- ROITT, I.M.; BROSTOFF, J., MALE, D.K. *Imunologia*. Ed. Manole, 4ª. ed., São Paulo, 1997.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J. e WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 115(7):1265-1275, 1995.
- SHIGEMATSU, T.; MIURA, S.; HIROKAWA, M.; HOKARI, R.; HIGUCHI, H.; TSUZUKI, Y.; KIMURA, H.; NAKATSUMI, R.C.; SERIZAWA, H.; SAITO, H.; ISHII, H. Endothelins promote egg albumin-induced intestinal anaphylaxis in rats. **Gastroenterology**, 115: 348-356, 1998.
- SOFIA, M.; MORMILE, M.; FARAONE, S.; ALIFANQ, M.; ZOFRA, S.; ROMANO, L.; CARRATU, L. Increased endothelin-like immunoreactive material on

bronchoalveolar lavage fluid patients with bronchial asthma and patients with interstitial lung disease. *Respiration*, 60:89-95, 1993.

SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmac. Ther.*, 68: 435-471, 1995.

SORKIN, L.S. e WALLACE, M.S. Acute pain mechanisms. *Surgical Clinics of North America*, 79: 213-229, 1999.

SPRATT, J.C.; GODDARD, J.; PATEL, N.; STRACHAN, F.E.; RANKIN, A.J.; WEBB, D.J. Systemic ET_A receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resistance in healthy men. *Br. J. Pharmacol.*, 134(3): 648-54, 2001.

STRACHAN, F.E.; CROCKETT, T.R.; MILLS, N.L.; GRAY, G.A.; WEBB, D.J. Constriction to ET_B receptor agonists, BQ-3020 and sarafotoxin s6c, in human resistance and capacitance vessels in vivo. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 50(1):27-30, 2000.

SZALAY, L.; KASZAKI, J.; NAGY, S. BOROS, M. Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation in the rat small intestine. *Life Sci.*, 67: 1947-1958, 2000.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; PONS, F.; CHABRIER, P.E.; MENCIA-HUERTA, J.M. e BRAQUET, P. Bronchopulmonary and vascular effect of endothelin in the guinea-pig. *Eur.J. Pharmacol.*, 176(1): 23-33, 1990.

TRAKADA, G.; TSOURAPIS, S.; MARANGOS, M.; SPIROPOULOS, K. Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma. *Respir Med.*, 94: 992-996, 2000.

UCHIDA, Y.; JUN, T.; NINOMIYA, H.; OHSE, H.; HASEGAWA, S.; NOMURA, A.; SAKAMOTO, T.; SARDESSAI, M.S.; HIRATA, F. Involvement of endothelins in immediate and late asthmatic responses of guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277: 1622-1629, 1996.

- UCHIDA, Y.; HAMADA, M.; KAMEYAMA, M.; OHSE, H.; NOMURA, A.; HASEGAWA, S. e HIRATA, F. Endothelin-1 induced bronchoconstriction in the early phase but not late phase of anesthetized dogs is inhibited by indomethacin and ICI 198615. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183(3): 1197-12202, 1992.
- UCHIDA, Y.; NINOMIYA, H.; SAOTOME, M.; NOMURA, A.; OHTSUKA, A.; YANAGIZAWA, M.; GOTO, K.; MASAKI, T.; HASEGAWA, S. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur. J. Pharmacol.*, 154: 227-228, 1988.
- VASKO, M.R. CAMPBELL, W.B. e WAITE, K.J. Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J. Neurosci.*, 14: 4987-4997, 1994.
- WARNER, J.A.; KROEGEL, C. Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and pasophils. *Eur. Respir. J.*, 7: 1326-1341, 1994.
- WARNICK, P.W.; EIKMEIER, L.J.; RUGGLES, T.R.; RAMNARAIN, M.L. WALCHECK, B.K.; BEITZ, A.J. e WILCOX, G.L. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogenidentification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J. Neurosci.*, 21(23): 9355-9366, 2001.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. e GOEHLER, L.S. Immune activation: the role of pro-inflammatory cutokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63: 289-302, 1995a.
- WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M.T. e MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res.*, 692(1-2): 244-250, 1995b.
- WEDEMEYER, J.; TSAI, M.; GALLI, S.J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immun.*, 12: 624-631, 2000.

- WILLIS, A.L. e CORNELESEN, M. Repeated injection of prostaglandin E₂ in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. *Prostaglandins*, 3: 353-357, 1973.
- WOODS, M.; BISHOP-BAILEY, D.; PEPPER, J.R.; EVANS, T.W.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31(Suppl 1): S348-50, 1998.
- WRIGHT, C.D.; CODY, W.L.; DUNBAR Jr, J.B.; DOHERTY, A.M.; HINGORANI, G.P. e RAPUNDALO, S.T. Characterization of endothelins as chemoattractants for human neutrophils. *Life Sci.*, 21: 1633-1641, 1994.
- WU, T.; RIEVES, R.D.; LARIVÉE, P.; LOGUN, C.; LAWRENCE, M.G. e SHELHAMER, J.H. Production of eicosanoids in response to endothelin-1 binding sites in airway epithelial cells. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 8: 282-290, 1993.
- XIN, X.; CAI, Y.; MATSUMOTO, K. e AGUI, T. Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells. *Endocrinology*, 136 (1): 132-137, 1995.
- YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S. e OHATA, K. Mechanism of histamine release by endothelin 1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow derived mast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 188: 268-275, 1995.
- YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S.; OHATA, K. Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C4 from mouse bone-marrow-derived mast cells. *Eur.J. Pharmacol.*, 257: 235-242, 1994.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 441-445, 1988.
- ZEBALOS, G.A.; AN, S. e WU, J.M. ET-1 secretion by human fibroblasts in culture: effects of cell density and IFN- β . *Biochem. Int.*, 25: 845-852, 1991.

ZHOU, Q.L.; STRICHARTZ, G. e DAVAR, G. Endothelin-1 activates ET_A receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons. **Neuroreport**, 12(17): 3853-3857, 2001.