

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**RELEVÂNCIA DA FORMAÇÃO DE ENDOTELINA-1(1-31) NA MEDIAÇÃO DO
EFEITO NOCICEPTIVO DA BIG ENDOTELINA-1 EM CAMUNDONGOS**

AMÉLIA REGINA SOMENSI

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis/SC, 28 de Fevereiro de 2008.

SOMENSI, Amélia Regina. **Relevância da formação de Endotelina-1(1-31) na mediação do efeito nociceptivo da Big Endotelina-1 em camundongos.** Florianópolis, 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Giles Alexander Rae

Defesa: 28/02/2008

O presente estudo investigou a relevância de uma via de síntese alternativa de Endotelina-1 (ET-1), a qual envolve a formação do intermediário ET-1(1-31), na nocicepção causada por Big ET-1 em camundongos. A injeção intra-plantar (i.pl) de ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 causou comportamento nociceptivo declarado e hipernocicepção mecânica nos animais. O tratamento prévio local com tiorfano (inibidor da endopeptidase neutra - NEP) ou fosforamidon (inibidor dual da NEP e da enzima conversora de ET, ECE) reduziu a nocicepção induzida pela ET-1(1-31) ou ET-1(1-31) e Big ET-1, respectivamente. Por outro lado, o pré-tratamento com quimostatina (inibidor das enzimas quimases) não alterou as respostas nociceptivas induzidas pela ET-1 e Big ET-1. A associação de Big ET-1 com doses não álgicas dos ativadores de mastócitos, composto 48/80 (C.48/80) ou ovoalbumina (OVA), resultou em potencialização da resposta nociceptiva, quando comparada àquelas causadas pela administração isolada dos compostos. O tratamento prévio local dos animais com tiorfano, fosforamidon ou quimostatina diminuiu significativamente a nocicepção induzida pela associação dos ativadores de mastócitos com Big ET-1. As respostas nociceptivas causadas por injeção de doses álgicas de C.48/80 e OVA também foram inibidas pelo pré-tratamento dos animais com os inibidores enzimáticos tiorfano, fosforamidon e quimostatina. Além disso, o pré-tratamento local dos animais com o antagonista de receptores de endotelina ET_A, BQ-123, reduziu a nocicepção induzida por OVA e C.48/80, enquanto o antagonista de receptores de endotelina ET_B, BQ-788, influenciou apenas a nocicepção induzida por OVA. O conjunto destes resultados sugere que as respostas nociceptivas causadas pela Big ET-1 e ET-1(1-31) sejam decorrentes da formação de ET-1 em camundongos. Contudo, a via de síntese alternativa de ET-1 a partir da Big ET-1, na qual esta última é convertida inicialmente no intermediário ET-1(1-31), somente contribui de maneira significativa para a nocicepção quando ocorre ativação de mastócitos.

Palavras chave: [nocicepção], [endotelina-1], [endotelina-1(1-31)], [mastócitos], [vias de síntese].

Aos meus pais, Udecir e Neura , primeiros mestres da vida, pelo apoio incessante e pelo exemplo de integridade!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela confiança depositada desde o início do meu mestrado, pela sua valiosa orientação e pelo seu companheirismo, atributos indispensáveis para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Pedro D'Orleans Juste por ceder gentilmente várias drogas utilizadas neste estudo;

Aos meus amigos que fizeram ou fazem parte do laboratório do prof. Giles: Ana Paula Luiz, Emmerson Motta, Juliana Chichorro, Kathryn Bortolini, Leandro Ono, Maria Fernanda Werner e Rafaela Claudino, pela paciência, ajuda científica e pela convivência enriquecedora, sem as quais, esta dissertação não teria se concretizado;

Aos novos amigos do departamento de farmacologia que me proporcionaram agradáveis momentos de descontração e bate-papo científico;

Aos amigos, Carlos Eduardo Vitor, pela inestimável ajuda na edição do esquema final e Allison Freire pela sua ajuda em diferentes momentos do meu mestrado;

Aos funcionários do biotério, especialmente ao Pedro, por sua solicitude;

Aos professores do departamento de farmacologia pelos ensinamentos transmitidos durante esse período que em muito contribuíram para a minha formação;

Aos meus amigos extra-farmacologia que me proporcionaram infindáveis momentos especiais;

Aos meus pais, Udecir e Neura, pelo irrestrito apoio e confiança depositada ao longo da minha vida;

A minha irmã, Estela, pela amizade;

Ao meu namorado, Rodrigo, por todo apoio, paciência, carinho, amizade e compreensão durante esse período;

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

SUMÁRIO

Lista de abreviações	i
Lista de figuras e esquemas	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	01
1.1. Mecanismos sensoriais da dor.....	02
1.2. As endotelinas e o seu papel na dor.....	06
1.3. Síntese e degradação da Endotelina-1(1-21).....	10
1.4. Relevância biológica da Endotelina-1(1-31).....	14
1.5. Os mastócitos e a sua relação com a família das endotelinas.....	16
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Materiais e métodos	24
3.1. Animais.....	25
3.2. Nocicepção induzida pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1.....	25
3.3. Hipernocicepção mecânica induzida pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1.....	26
3.4. Influência das enzimas NEP, ECE e quimases sobre os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1.....	27
3.5. Contribuição dos mastócitos à síntese de ET-1(1-31) através do uso do Composto 48/80.....	28

3.6. Contribuição dos Mastócitos à síntese de ET-1(1-31) desencadeada por antígeno.....	29
3.7. Influência de ETs endógenas na nocicepção induzida por ativação dos mastócitos	30
3.8. Drogas.....	31
3.9. Análise Estatística.....	32
4. Resultados.....	34
4.1. Efeitos nociceptivo e hipernociceptivo induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1.....	35
4.2. Influência das enzimas NEP, ECE e quimases sobre os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1.....	38
4.3. Influência da ativação dos mastócitos na formação de ET-1(1-31).....	41
4.4. Participação das ETs endógenas na nocicepção decorrente da ativação de mastócitos	51
5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	76
7. Referências Bibliográficas.....	78

Lista de Abreviações

ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Fator de crescimento básico do fibroblasto
Big ET-1	Big Endotelina-1(1-38)
BMMC	Mastócitos derivados da medula óssea
C.48/80	Composto 48/80
CCL	Ligante de quimiocina CC
CCX	Ligante de quimiocina CX
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CPA	Carboxipeptidase A
CTMC	Mastócito do tecido conectivo
E.P.M.	Erro padrão da média
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECE	Enzima Conversora de Endotelina
ELISA	Ensaio por enzimas imuno-adsorvidas
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina-1
FSMC	Mastócitos derivados de pele de feto
GDNF	Fator neurotrófico derivado das células gliais
GM-CSF	Fator estimulador de colônia do macrófago e granulócito
i.p.	Intra-peritoneal
i.pl.	Intra-plantar

IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IB ₄	Isolectina B ₄
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol trifosfato
MC _{CC}	Mastócito do tipo quimase
MCP-1	Proteína quimiotáctil de monócito-1
MC _T	Mastócito do tipo triptase
MC _{TC}	Mastócito do tipo triptase e quimase
MIP-1 α	Proteína inflamatória do macrófago 1- α
MMC	Mastócito da mucosa
NEP	Neuro endopeptidase-24.11
NGF	Fator de crescimento do nervo
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PLC	Fosfolipase C
RANTES	Regulador da ativação normal de célula T expressa e secretada
SRTX	Sarafotoxina
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TLR	Receptores <i>toll-like</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral- α
trkA	Receptor tirosina quinase A
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Figuras e Esquemas

Figura 1. Nocicepção declarada induzida pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 em camundongos.....	36
Figura 2. Hipernocicepção mecânica induzida por ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 em camundongos.....	37
Figura 3. Influência do Tiorfano e do Fosforamidon na nocicepção causada pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1.....	39
Figura 4. Influência da quimase na nocicepção induzida por ET-1 ou Big ET-1.....	40
Figura 5. Efeito nociceptivo e hipernociceptivo causado pelo Composto 48/80.....	43
Figura 6. Efeito nociceptivo causado pela co-injeção de Composto 48/80 e Big ET-1.....	44
Figura 7. Influência dos inibidores das enzimas NEP, ECE e quimase na nocicepção induzida pelo Composto 48/80 e Big ET-1.....	45
Figura 8. Efeitos nociceptivo e hipernociceptivo causados pela OVA.....	48
Figura 9. Efeito nociceptivo causado pela administração de OVA e Big ET-1.....	49
Figura 10. Influência dos inibidores das enzimas NEP, ECE e quimase na nocicepção induzida pela OVA e Big ET-1.....	50
Figura 11: Participação das ETs endógenas na nocicepção induzida pelo composto 48/80.....	52

Figura 12: Participação das ETs endógenas na nocicepção induzida pela OVA.....	53
Esquema 1. Diagrama ilustrando as vias de síntese de ET-1.....	21
Esquema 2. Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na nocicepção induzida pelas ETs e mastócitos na pata de camundongos.	75

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar, farmacologicamente, a relevância da endotelina-1(1-31) [ET-1(1-31)] em causar nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica na pata de camundongos e comparar seus efeitos com as respostas induzidas pela ET-1 e Big ET-1. A ET-1(1-31) é sintetizada a partir da clivagem da Big ET-1 por quimases provenientes de mastócitos. Uma vez sintetizada, pode ainda ser convertida em ET-1 por ação da enzima endopeptidase neutra (NEP). A injeção intra-plantar (i.pl.) de ET-1 (3 a 30 pmol), ET-1(1-31) (3 a 100 pmol) ou Big ET-1 (30 a 100 pmol) induziu nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica de maneira dose-dependente. O pré-tratamento local dos animais com tiorfano (inibidor da NEP, 300 nmol) ou fosforamidon (inibidor da NEP e da enzima conversora de ET, ECE, 100 nmol) reduziu a nocicepção induzida por ET-1(1-31) (10 pmol), ou por ET-1(1-31) (10 pmol) e Big ET-1 (30 pmol), respectivamente. Já o pré-tratamento com quimostatina (inibidor de quimases, 100 nmol) não alterou a nocicepção declarada induzida por ET-1, ET-1 (1-31) ou Big ET-1. A degranulação de mastócitos por injeção i.pl. de C.48/80 (0,05 a 1 µg) ou OVA (0,05 a 1 µg) também evocou nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica. A associação de Big ET-1 (30 pmol) com doses sub-efetivas de C.48/80 (0,1 µg) ou de OVA (0,05 µg) resultou em uma potencialização da nocicepção induzida pela Big ET-1 de 93,5% e 154%, respectivamente. O pré-tratamento dos camundongos com fosforamidon (100 nmol) ou quimostatina (100 nmol) reduziu a nocicepção induzida pela associação de C.48/80 ou OVA e Big ET-1, enquanto o tiorfano apenas reduziu a nocicepção induzida pela associação de C.48/80 e Big ET-1 na dose de 1000 nmol. A nocicepção induzida por C.48/80 (1,0 µg) ou OVA (0,3 µg) foi diminuída pelo pré-tratamento i.pl. com fosforamidon, quimostatina ou BQ-123 (antagonista seletivo de receptores ET_A, 10 nmol), enquanto o BQ-788 (antagonista seletivo de receptores ET_B, 10 nmol) e o tiorfano (1000 nmol) reduziram apenas a nocicepção declarada evocada por OVA e C.48/80, respectivamente. Estes resultados sugerem que a via de síntese alternativa de ET-1, a qual envolve a participação do intermediário ET-1(1-31), contribui de maneira significativa para a nocicepção induzida pela ativação dos mastócitos.

ABSTRACT

The nociceptive effects of Endothelin-1 (ET) are well-known. This peptide is synthesized by cleavage of Big ET-1 by Endothelin Converting Enzyme (ECE), however, Big ET-1 can be also cleaved by mast cell-derived chymase to ET-1(1-31), which can be converted to ET-1 by the enzyme neutral endopeptidase-24.11 (NEP). The present study aimed to assess, pharmacologically, the ability of ET-1(1-31) to induce nociception and mechanical hypernociception in the hind paw of mice and compare its effects with those evoked by ET-1 and Big ET-1. The intra-plantar (i.pl) injection of ET-1 (3 to 30 pmol), ET-1(1-31) (30 to 100 pmol) or Big ET-1 (30 to 100 pmol) induced dose-dependent nociception and hypernociception. Local pre-treatment of the animals with thiorphan (NEP inhibitor, 300 nmol, i.pl.) or phosphoramidon (NEP and ECE inhibitors, 100 nmol, i.pl.), reduced nociception induced by ET-1(1-31) (10 pmol) or by ET-1(1-31) and Big ET-1 (30 pmol), respectively. On the other hand, pre treatment with chymostatin (chymase inhibitor, 100 nmol) did not alter the nociception induced by ET-1, ET-1 (1-31) or Big ET-1. Mast cell degranulation by i.pl. injection of compound 48/80 (0.05 to 1 µg) or OVA (0.05 to 1 µg) also evoked nociception and mechanical hypernociception. The association of Big ET-1 (30 pmol) with sub-effective doses of compound 48/80 (0.1 µg) or OVA (0.05 µg) resulted in potentiation of Big-ET-1-induced nociception by 93.5% e 154%, respectively. Pre-treatment with phosphoramidon (100 nmol) or chymostatin (100 nmol) reduced the nociception induced by Big ET-1 associated with compound 48/80 or OVA, while thiorphan was only able to reduce the nociception induced by the association of Big ET-1 plus compound 48/80 at 1000 nmol. Nociception induced by compound 48/80 (1.0 µg) and OVA (0.3 µg) was reduced by pretreatment with phosphoramidon or chymostatin or BQ-123 (selective ET_A receptor antagonist, 10 nmol), while BQ-788 (selective ET_B receptor antagonist, 10 nmol) and thiorphan (1000 nmol) reduced only nociception induced by OVA and compound 48/80, respectively. The results of the current study suggest that ET-1, formed via an alternative synthesis pathway, which involves formation of the intermediary peptide ET-1(1-31), contributes significantly to nociception induced by the activation of mast cells.

1. Introdução

1.1. Mecanismos sensoriais da dor

A sensação prazerosa de sentir uma suave brisa ou a experiência dolorosa de tocar em um objeto quente são ambas propagadas por neurônios somatosensoriais que inervam a pele (Lumpkin e Caterina, 2007). Esses neurônios sensoriais cutâneos podem ser classificados de acordo com o seu grau de mielinização, pela velocidade com a qual o potencial de ação trafega ao longo da fibra aferente ou ainda de acordo com as suas características funcionais. Dessa maneira, fibras A α e A β são consideradas proprioceptores ou receptores mecânicos de estímulos inócuos, sendo estas altamente mielinizadas, de grande diâmetro (>10 μ m) e de velocidade de condução rápida (30 a 100 m/s). Em contrapartida, as fibras A δ são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda, possuem diâmetro médio (2 a 6 μ m) e velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s). Por fim, as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa, sendo amielinizadas, de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μ m) e de velocidade de condução lenta (0,5 a 2 m/s) (para revisão ver Millan, 1999; Coutaux *et al.*, 2005). A maioria das fibras C responde a estímulos térmicos, químicos e mecânicos, sendo por essa razão, denominadas de receptores polimodais. As fibras C podem ainda ser divididas em pelo menos dois subgrupos de neurônios de acordo com as suas características neuroquímicas e funcionais. Um desses subgrupos são as fibras C peptidérgicas, as quais sintetizam peptídeos como substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), além de expressarem o receptor tirosina quinase A (trkA), que possui alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF). O outro subgrupo são as fibras C não peptidérgicas, que são identificadas pela expressão de receptores purinérgicos P2X₃ para o trifosfato de adenosina (ATP), sítios de ligação para isolectina B₄ (IB₄) e os receptores para o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF) (para revisão

ver Hunt e Mantyh, 2001; Sawynok e Liu, 2003). As fibras C e A δ são também conhecidas como nociceptores (receptores da dor) e estão amplamente distribuídas na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001).

A dor pode ser definida, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos de tal lesão (Merskey, 1979). Do ponto de vista fisiológico, a dor tem o propósito de proteção e sobrevivência, com o intuito de alertar o indivíduo sobre estímulos que possam provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), tais como objetos quentes ou cortantes (Watkins e Maier, 2002). A perda da capacidade de sentir dor produz efeitos desastrosos, como pode ser observado em portadores da insensibilidade congênita à dor, uma doença rara na qual os pacientes afetados pela ausência do caráter protetor da dor freqüentemente tem morte prematura por acidentes graves (Mogil *et al.*, 2000).

No início do século vinte foi introduzido o termo nocicepção (do latim Nocere, "lesar"), o qual se refere apenas ao caráter fisiológico da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. Dessa forma, como em modelos animais de dor esta é avaliada indiretamente, através da observação comportamental, o termo correto a ser empregado é nocicepção (Tjolsen *et al.*, 1992).

Ao detectarem estímulos dolorosos, nociceptores despolarizam, gerando potenciais de ação que se propagam pela fibra, enviando essas informações até as suas conexões sinápticas com neurônios de segunda ordem na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal (CDME) principalmente nas lâminas de Rexed I,

II e V (para revisão ver Besson, 1999). Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, projetam-se para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo, que, através de neurônios terciários, podem remeter a informação nociceptiva ao córtex cerebral (para revisão ver Millan, 1999; Almeida *et al.*, 2004). A informação nociceptiva é transmitida por vários tratos, sendo os mais importantes os espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (Craig e Dostrovsky, 1999). Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, duração e localização do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção consciente do estímulo doloroso (para revisão ver Millan, 1999; Hunt e Mantyh, 2001).

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da dor, existem vias de modulação e integração descendentes da informação dolorosa. As vias descendentes mais importantes e estudadas são aquelas de caráter inibitório. Essas vias originam-se na substância cinzenta periaquedutal ventral e no núcleo magno da rafe, entre outras estruturas. Os mecanismos descendentes modulam, geralmente através de interneurônios, as características da informação nociceptiva transmitida entre as fibras sensoriais primária e secundária no CDME. A modulação descendente da informação nociceptiva envolve a liberação de uma série de neurotransmissores, como os dos sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, além dos canabinóides endógenos, entre outras substâncias (para revisão ver Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

A dor pode ser classificada de diversas maneiras. Sob o ponto de vista de duração, a sensação dolorosa pode ser do tipo aguda ou crônica. A dor aguda é

caracterizada como uma resposta normal causada por um estímulo lesivo ao tecido, com conseqüente despolarização da fibra nervosa, sendo que a sensação de dor pode desaparecer até mesmo antes do local lesionado ter sido reparado. Já a dor crônica é caracterizada pela incapacidade do organismo de resolver a lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. (para revisão ver Loeser e Melzack, 1999). Alguns exemplos de dor crônica incluem a neuralgia do trigêmio, a fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (para revisão ver Ashburn e Staats, 1999). Durante essas síndromes, o processamento sensorial está alterado. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, fenômeno esse conhecido por alodínia. Outro estado muito comum em dores neuropáticas ou de origem inflamatória é a percepção exacerbada da dor, o que caracteriza a hiperalgesia (para revisão ver Besson, 1999). Ambos os fenômenos, alodínia e hiperalgesia, são decorrentes da redução do limiar de ativação dos nociceptores e podem ser coletivamente chamados de hipernocicepção, quando estes fenômenos são avaliados em animais de experimentação (Parada *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2004).

Os nociceptores também podem ser ativados e/ou sensibilizados por substâncias endógenas, tais como bradicinina, serotonina, íons hidrogênio, ATP e prostaglandinas, além de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina (IL)-1, IL-6 e quimiocinas, como a IL-8, entre outros (para revisão ver Millan, 1999; Coutaux *et al.*, 2005).

1.2. As endotelinas e o seu papel na dor

Uma família de peptídeos que tem sido extensivamente estudada pelas suas propriedades nociceptivas, desde sua descoberta em 1988, são as endotelinas (ETs). As ETs foram inicialmente descritas como potentes peptídeos vasoconstritores derivados de células endoteliais (Yanagisawa *et al.*, 1988). Atualmente sabe-se que esses peptídeos podem agir como citocinas e assim atuam sobre um grande número de diferentes tipos celulares, apresentando diversas implicações fisiológicas e patológicas, como por exemplo, na hipertensão, câncer, inflamação e dor (para revisão ver Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

As ETs são peptídeos que produzem efeitos diversos em vários órgãos e sistemas. A ET-1 é o representante mais importante dessa família, a qual também inclui a ET-2 e a ET-3, sendo que todas essas isoformas são constituídas por 21 aminoácidos. Esses três peptídeos apresentam distribuição tissular bastante heterogênea. A ET-1 é expressa principalmente pelas células endoteliais, enquanto a ET-2 é mais expressa no intestino e a ET-3 no intestino, olhos, rim e cérebro. As três isoformas são codificadas por três genes distintos que, em humanos, estão localizados nos cromossomos 6, 1 e 20, respectivamente (para revisão ver Levin, 1995; Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

A ET-1 atua através de dois receptores diferentes, chamados de ET_A e ET_B, os quais estão acoplados, através das proteínas G_i e G_q, a diversas vias de sinalização celular, sendo que a via da fosfolipase C (PLC) é a mais predominante (Aramori e Nakanishi, 1992; Kasuya *et al.*, 1994; Griswold *et al.*, 1999). O receptor ET_A apresenta uma afinidade pela ET-1 e ET-2 de 70 a 100 vezes maior do que pela ET-3, enquanto que o receptor ET_B exibe afinidade semelhante pelas três isoformas

(Arai *et al.*, 1990; 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 pelo antagonista peptídico BQ-123, ou pelo não peptídico atrasentan. Já o receptor ET_B é seletivamente estimulado por agonistas como a sarafotoxina S6c (SRTX S6c) e o IRL 1620, sendo seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos como o BQ-788, ou pelo composto não peptídico A-192621. Existem ainda diferentes antagonistas não seletivos, ou duais, para ambos os receptores como, por exemplo, o bosentan (Masaki *et al.*, 1994; Sokolovsky, 1995; Webb e Meek, 1997).

A primeira evidência da participação das ETs na dor foi apresentada por Ferreira e colaboradores em 1989, os quais demonstraram que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hipernocicepção mecânica em ratos, incapacitação articular em cães e sensação de prurido e queimação no antebraço de humanos. Esses autores sugeriram que a dor causada pela ET-1 poderia ser atribuída às suas propriedades vasoconstritoras e indutora da síntese de prostaglandinas (PGs), embora a indometacina não tenha sido capaz de bloquear a nocicepção nesse estudo.

Em 2001, Pomonis e colaboradores mostraram, através de estudos imunohistoquímicos, a presença de receptores ET_A em 75% dos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro presentes em gânglios da raiz dorsal lombares, enquanto que esses receptores não foram encontrados em neurônios de grande diâmetro. Ainda em 2001, o grupo de Gokin demonstrou através de experimentos eletrofisiológicos, que a atividade elétrica de fibras C e A δ era aumentada após injeção subcutânea de ET-1, e que esse efeito era dependente da dose e sensível ao bloqueio de receptores ET_A, através da administração de BQ-123. Esses

resultados puderam confirmar as suspeitas de que as ETs estariam ativando e/ou sensibilizando diretamente os nociceptores.

Atualmente sabe-se que as ETs estão diretamente relacionadas com a dor em diversas patologias, tanto em humanos quanto em modelos animais para o estudo da dor aguda e crônica. Os níveis de ET-1 estão aumentados em diversos tipos de câncer em humanos, como nos tumores de próstata (Kurbel *et al.*, 1999), mama (Alanen *et al.*, 2000), pulmão (Ahmed *et al.*, 2000) e cólon (Asham *et al.*, 2001). Paralelamente, modelos experimentais têm demonstrado que camundongos fêmeas, inoculadas com células cancerosas, manifestam uma hipernocicepção acentuada, a qual coincide com o aumento dos níveis de ET-1 no tecido canceroso. Esse quadro hipernociceptivo pode ser aliviado tratando os animais com um antagonista de receptores ET_A (Pickering *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2007). Em um outro modelo experimental, dessa vez utilizando um método de indução de osteosarcoma em camundongos, também se verificou aumento da expressão de ET-1 nas células cancerosas, bem como a redução da nocicepção observada neste modelo com o uso de atrasentan (Peters *et al.*, 2004).

Outra patologia dolorosa que envolve a participação das ETs é a neuropatia diabética. A neuropatia diabética é uma das complicações mais relevantes do diabetes mellitus. Esse quadro leva a alterações funcionais nas fibras nociceptivas que variam de hiperalgesia, insensibilidade à dor e alterações na sensação de temperatura. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares para essa percepção sensorial anormal no diabetes, ainda não foram identificados (Berti-Mattera *et al.*, 2006). Já foi reportado que os níveis de ET-1 estão aumentados nos tecidos e no plasma de pacientes e animais diabéticos (para revisão ver Hopfner e Gopalakrishnan, 1999; Khan e Chakrabarti, 2003). Experimentalmente, foi

constatado que a administração sistêmica do antagonista do receptor ET_A foi capaz de atenuar a hipernocicepção em ratos diabéticos (Jarvis *et al.*, 2000). Berti-Mattera e colaboradores (2006) também verificaram que ratos diabéticos apresentavam hipernocicepção em relação ao grupo controle, a qual estava associada a expressão reduzida de receptores ET_B no nervo ciático.

Diversos trabalhos do nosso laboratório também têm demonstrado uma importante participação das ETs na nocicepção. Quando injetada na pata de camundongos, a ET-1 demonstrou ser capaz de potencializar as duas fases da resposta nociceptiva à formalina, bem como o edema provocado por essa substância álgica, sendo que as ações pró nociceptivas da ET-1 eram mediadas tanto via receptores ET_A quanto ET_B (Piovezan *et al.*, 1997). A injeção de ET-1 na pata traseira de camundongos também foi capaz de causar uma resposta nociceptiva *per se*, caracterizada pelo ato de lamber a pata, bem como de potencializar as ações nociceptivas da capsaicina, através de mecanismos operados por receptores ET_A (Piovezan *et al.*, 1998; Piovezan *et al.*, 2000). Quando injetada na pata traseira de ratos, a ET-1 também foi capaz de causar hipernocicepção mecânica, a qual perdurou por até 8 h, onde se verificou uma importante participação de vias de sinalização envolvendo PLC, proteína quinase C, Map quinase p38, quinase reguladora de sinal extra celular e Janus quinase. (Motta *et al.*, 2006).

Embora o papel pró-nociceptivo da ET-1 esteja cada vez mais documentado na literatura, alguns trabalhos têm demonstrado que esse peptídeo pode apresentar ações analgésicas dependendo da via de sinalização e do estímulo nociceptivo envolvido (Piovezan *et al.*, 2000; Nicol, 2004). Khodorova e colaboradores (2003) demonstraram que a ET-1, ao mesmo tempo em que ativa receptores ET_A nos

neurônios sensoriais, pode também estimular receptores ET_B em queratinócitos, resultando na liberação do opióide β-endorfina, o qual possui um efeito analgésico.

Em vista dessas considerações e pelo fato do nível plasmático e/ou tecidual de ET-1 estar aumentado em diversas patologias, uma terapia farmacológica que vise diminuir a síntese de ET-1 pode vir a ter benefícios terapêuticos.

1.3. Síntese e degradação da endotelina-1(1-21)

A síntese de ET-1 ocorre a partir de um polipeptídeo com aproximadamente 212 aminoácidos denominado pré-pró-endotelina-1, o qual é clivado por uma enzima da família da subtilisina chamada furina, em um peptídeo de 38 aminoácidos, a Big Endotelina-1 (1-38) (Big ET-1) (Blais *et al.*, 2002). A ET-1 madura é obtida pela clivagem proteolítica da Big ET-1, entre os resíduos Triptofano²¹ e Valina²², pela Enzima Conversora de Endotelina (ECE) (Haynes e Webb, 1994).

A clonagem molecular da ECE revelou que esta enzima pertence à família das metalopeptidases, da mesma forma que a neutro endopeptidase-24.11 (NEP ou E-24.11), a termolisina, a enzima conversora de angiotensina (ECA) e as peptidases “órfãs” KELL e PEX. As metalopeptidases geralmente estão associadas à membrana plasmática, são dependentes de zinco, atuam principalmente em pH neutro e desempenham um papel chave no processamento e metabolismo de peptídeos vasoativos. Essas enzimas estão relacionadas com uma série de patologias, tais como doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer, artrite, inflamação e câncer (para revisão ver Turner e Murphy, 1996; Turner e Tanzawa, 1997; D'Orleans-Juste *et al.*, 2003; Turner, 2003).

A ECE foi identificada em 1994 pelos grupos de Xu *et al.* (1994) e Shimada *et al.* (1994). Após a sua descoberta, houve muita especulação sobre a sua natureza. Alguns trabalhos apontavam a ECE como uma isoforma da NEP, visto que ambas tinham a sua atividade inibida pelo uso do fosforamidon. Porém, o uso do inibidor tiorfano não era capaz de reduzir a atividade da ECE, ao contrário da NEP. Dessa maneira, ficou claro que se tratavam de enzimas com atividades diferenciadas (para revisão ver Turner e Tanzawa, 1997).

Desde então, avançou-se consideravelmente em relação aos conhecimentos acerca da ECE. Sabe-se que há três isoformas distintas de ECE denominadas ECE-1, ECE-2 e ECE-3. A ECE-1 é a mais amplamente expressa e a que apresenta maior atividade fisiológica. Essa enzima é principalmente encontrada em células endoteliais, mas também já foi observada na musculatura lisa e em células neuronais (para revisão ver D'Orleans-Juste *et al.*, 2003). A afinidade da ECE-1 pelas isoformas de Big ET é diferenciada, sendo que a sua atividade catalítica é preferencial pela Big ET-1, seguida pela Big ET-2 e por último pela Big ET-3. A ECE-1 pode hidrolisar outros peptídeos, tais como bradicinina, substância P, angiotensina I e insulina, mas com uma eficácia muito menor (Hoang e Turner, 1997; Krishnaswamy *et al.*, 2001). Já foram descobertas quatro isoformas da ECE-1: ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c e ECE-1d, as quais diferem na sua porção N-terminal, o que resulta em diferente localização celular. Dessa maneira, ECE-1a, ECE-1c e ECE-1d são encontradas em humanos na membrana celular com o seu domínio catalítico voltado para fora da célula, enquanto a ECE-1b é encontrada intracelularmente (para revisão ver D'Orleans-Juste *et al.*, 2003).

Os outros subtipos da ECE são bem menos estudados. A ECE-2, ao contrário da ECE-1, apresenta melhor atividade em pH ácido e parece estar

envolvida no processamento intravesicular da ET-1 (Emoto e Yanagisawa, 1995). Atualmente quatro isoformas da ECE-2 já foram identificadas (ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1 e ECE-2b-2) (Ikeda *et al.*, 2002). Uma terceira isoforma da ECE, a ECE-3, foi encontrada em microssomos de íris bovina, e essa enzima parece ser específica para a Big-ET-3 (Hasegawa *et al.*, 1998).

A deleção gênica de ECE-1 em camundongos resulta em fenótipos gravemente mal formados, enquanto a deleção de ECE-2 resulta em fenótipos que se desenvolvem normalmente, são férteis e têm longevidade normal. Contudo, os animais nocautes tanto para ECE-1 quanto para ECE-2 apresentam fenótipo mais problemático do que aqueles que não expressam apenas a ECE-1 (Yanagisawa *et al.*, 2000). Além disso, animais nocautes para as ECE-1 e ECE-2 apresentam acúmulo de β -amilóide no sistema nervoso central, sendo que a deleção de ECE-2 acarreta ainda em deficiências de aprendizado e memória, fatores sugestivos de mal de Alzheimer (Eckman *et al.*, 2003; Rodriguiz *et al.*, 2007).

As ETs são principalmente formadas sob demanda, ou seja, não é comum encontrar estoques intracelulares de ET-1. Assim, a produção é controlada por transcrição gênica. Além disso, existem níveis de Big ET-1 significativos no plasma, que chegam a ser 2 vezes maiores do que os de ET-1 (para revisão ver Kedzierski e Yanagisawa, 2001; D'Orleans-Juste *et al.*, 2003). Após ser sintetizada, a ET-1 tem um tempo de meia-vida plasmático curto, entre 90 segundos a 7 minutos (Anggard *et al.*, 1989; Rubin e Levin, 1994), sendo que a principal enzima envolvida na sua degradação é a NEP (Abassi *et al.*, 1992).

A NEP, como já mencionado anteriormente, também pertence à família das metalopeptidases, tendo sua ação diminuída tanto pelo fosforamidon quanto pelo tiorfano. Essa enzima é encontrada principalmente nas células renais, mas as

primeiras evidências do seu papel fisiológico vêm de estudos no sistema nervoso central, onde apresenta ações catabólicas sobre neuropeptídeos, especialmente substância P e encefalinas (para revisão ver Turner, 2003). Esta enzima também já foi identificada em células vasculares endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (Olerud *et al.*, 1999; Steinhoff *et al.*, 2003). A NEP é responsável por finalizar a sinalização emitida pelas encefalinas nas sinapses nervosas de uma maneira análoga à acetilcolinesterase, a qual hidrolisa a acetilcolina nas sinapses colinérgicas (para revisão ver Turner, 2003). Além dessas ações, a NEP renal também está envolvida na inativação do vasodilatador peptídeo natriurético atrial (Kenny e Stephenson, 1988); na remoção do peptídeo β -amilóide, considerado fundamental para a doença de Alzheimer; além de estar dramaticamente diminuída em doenças como o câncer de próstata, permitindo uma maior concentração e ação de peptídeos como a ET-1 (Papandreou *et al.*, 1998).

Embora a NEP seja a principal enzima responsável pela clivagem da ET-1, existem evidências apontando para uma via alternativa de síntese da ET-1, na qual a NEP também estaria envolvida. Essa rota alternativa envolve a clivagem da Big ET-1 na ligação Tirosina³¹ – Glicina³², por ação de quimases oriundas de mastócitos, originando um peptídeo bioativo de 31 aminoácidos, a ET-1(1-31) (Nakano *et al.*, 1997; Kishi *et al.*, 1998). A ET-1(1-31), por sua vez, pode sofrer ação da NEP dando origem a ET-1, conforme pode ser visto no Esquema 1 na página 21 (Hayasaki-Kajiwara *et al.*, 1999; Fecteau *et al.*, 2005).

Por fim, merece ser comentado que a Big ET-1 pode ainda ser clivada entre os resíduos de Glicina³² e Leucina³³ pela metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) em ET-1(1-32), que também exibe potente ação vasoconstritora (Fernandez-Patron *et al.*, 1999).

1.4. Relevância biológica da endotelina-1 (1-31)

Uma via alternativa para a síntese de ETs foi primeiramente sugerida por Patterson e colaboradores (1990), os quais demonstraram que a Catepsina G, um tipo de quimase derivada de mastócitos, era capaz de clivar a Big ET-1 em um peptídeo constritor formado por 27 a 31 aminoácidos. Em 1997, o grupo de Hanson demonstrou que, ao se incubar Big ET-1 com porções de pulmão humano, ocorria a formação de ET-1(1-31), sendo que esse era o produto mais abundante desta hidrólise. Nessa mesma época, dois outros laboratórios demonstraram que a incubação de Big ET-1 com quimases purificadas provindas do tecido conectivo humano, levavam à formação de ET-1(1-31) (Nakano *et al.*, 1997; Kido *et al.*, 1998). Alguns estudos reportavam que a ET-1(1-31) era tão potente quanto a ET-1 em causar contração de vasos (Nakano *et al.*, 1997; Kishi *et al.*, 1998) e especulava-se que as ações da ET-1(1-31) ocorriam por ação seletiva dos receptores ET_A (Mazzocchi *et al.*, 2000; Rebuffat *et al.*, 2001). Verificou-se ainda que a ET-1(1-31) e a ET-1 eram equipotentes em causar proliferação de células musculares lisas vasculares de coronária em cobaias (Nagata *et al.*, 2000). Além disso, foi apurado que a atividade quimiotática para leucócitos da ET-1(1-31) era maior do que a da ET-1 (Cui *et al.*, 2001). Kakui e colaboradores (2004), através da técnica de imunohistoquímica, verificaram a presença da ET-1 e da ET-1(1-31) em diversos tipos de tecidos de hamsters. Os autores constataram que, embora o coração, pulmão, e glândulas adrenais, apresentassem níveis expressivos de ET-1(1-31) imunoreativa, esta foi detectada de maneira especialmente pronunciada nas células de Kupffer do fígado e em células renais. Os pesquisadores sugeriram que ambas ETs podiam apresentar atividades distintas no mesmo sistema, e que estas poderiam ser tanto fisiológicas quanto patológicas.

Por outro lado, foi verificado que o aumento de cálcio (Ca^{+2}) provocado pela ET-1(1-31) em cultura de células musculares bronquiais humanas era drasticamente alterado pelos inibidores de metaloproteases fosforamidon e tiorfano, sugerindo que a ET-1(1-31) deveria ser convertida em ET-1 para exercer as suas ações (Hayasaki-Kajiwara *et al.*, 1999). Honoré *et al.* (2002) e Plante *et al.* (2002) demonstraram que a enzima NEP estava envolvida na bioatividade da ET-1(1-31), provavelmente clivando-a em ET-1 e provocando assim os efeitos observados na vasculatura sistêmica e pulmonar de cobaias. Resultado semelhante foi obtido por um estudo *in vitro* em artérias mamárias e coronárias humanas, o qual concluiu que a conversão da ET-1(1-31) em ET-1 era pré-requisito para manifestação de seu efeito vasoconstritor (Maguire *et al.*, 2001). Outros estudos demonstraram, tanto *in vivo* ao se analisar a resposta pressórica de coelhos, quanto *in vitro* ao avaliar a contratilidade da artéria isolada de coelhos, que embora a ET-1(1-31) fosse sintetizada a partir da adição de Big ET-1, ambas as respostas causadas pelo peptídeo eram dependentes da clivagem da ET-1(1-31) em ET-1 pela NEP (Fecteau *et al.*, 2005; Tirapelli *et al.*, 2006).

Conforme exposto acima, embora existam divergências na literatura sobre a maneira através da qual a ET-1(1-31) estaria exercendo os seus efeitos, sejam esses de maneira direta ou indireta, ou até mesmo de ambas as maneiras, é de grande importância procurar desvendar a relevância dessa via alternativa nas ações nociceptivas das ETs. O esclarecimento desses mecanismos pode ser de grande valor, principalmente em patologias associadas com a presença de mastócitos, visto que as enzimas quimases provenientes da sua degranulação podem ser relevantes para a síntese desse peptídeo em determinadas condições.

1.5. Os mastócitos e a sua relação com a família das endotelinas

Os mastócitos foram descritos pela primeira vez em 1878 quando Paul Ehrlich, ainda estudante de Medicina, descobriu que algumas células denominadas de plasmócitos pelos histologistas, apresentavam grânulos que se coravam de vermelho quando adicionado o corante azul de anilina. Essas células foram batizadas como "mastzellen", termo alemão que significa células "bem alimentadas" (para revisão ver Mota, 1995). Após sua descoberta, sucessivos trabalhos apontavam os mastócitos como sendo células que exerciam apenas ações deletérias ao organismo, estando intimamente associados a desordens alérgicas, devido à sua habilidade de liberar uma série de mediadores pró-inflamatórios. Dessa maneira, os mastócitos eram vistos como células dispensáveis, sem nenhuma utilidade benéfica. Essa mudança de paradigma só ocorreu na década de 80, quando se desenvolveu um modelo genético de animais deficientes em mastócitos (Hatanaka *et al.*, 1982). Essa nova ferramenta permitiu testar *in vivo* a contribuição dessas células em diferentes modelos experimentais de patologias em animais. Os conhecimentos advindos desse novo modelo foram fundamentais para que se conhecesse um outro papel crucial exercido pelos mastócitos: o de sentinelas indispensáveis contra infecções bacterianas (para revisão ver Hultner e Ehrenreich, 2005; Maurer e Metz, 2005; Sur *et al.*, 2007).

Os mastócitos estão presentes em todos os tecidos do corpo, mas encontram-se em maiores quantidades nas áreas expostas ao ambiente externo, como pele, vias aéreas e intestinos. Essa localização estratégica dos mastócitos faz com que essas células sejam indispensáveis na resposta imune inata (Galli *et al.*, 1999). Os mastócitos originam-se na medula óssea, provenientes de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺, as quais também são responsáveis pela

síntese de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (Krishnaswamy *et al.*, 2001). Embora sejam derivados de células hematopoiéticas, os mastócitos são encontrados em pequeno número na circulação sanguínea, visto que, depois de sintetizados, eles se dirigem como células ainda imaturas para os mais diversos tipos de tecido, onde passam pelos estágios finais de maturação e diferenciação. O desenvolvimento final dos mastócitos depende do microambiente onde eles se encontram. A presença de alguns fatores de crescimento para mastócitos como a IL-3, bem como o fator de célula tronco (também conhecido como ligante dos receptores c-Kit), são indispensáveis para a proliferação de mastócitos em roedores (para revisão ver Welle, 1997; Marshall, 2004).

Os mastócitos são caracterizados por suas habilidades de sintetizar, estocar e liberar numerosas moléculas bioativas. Em humanos, estas substâncias incluem aminas biogênicas (histamina), proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina), proteases neutras (triptase, quimase e carboxipeptidase) e hidrolases ácidas. Outros mediadores, como o fator ativador de plaquetas (PAF) e produtos do metabolismo do ácido araquidônico, são produzidos apenas após a estimulação destas células. Os mastócitos humanos também sintetizam e liberam diversas citocinas, tais como a IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TNF α , Fator Estimulador de Colônia do Macrófago e Granulócito (GM-CSF) e também alguns dos mais potentes fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto (bFGF), o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF β), além de quimiocinas como a Proteína Inflamatória do Macrófago 1 α (MIP-1 α), Proteína Quimiotática do Monócito 1 (MCP-1) e Regulador da Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada (RANTES) (para revisão ver Marshall, 2004).

Os mastócitos são células heterogêneas, desse modo tecidos distintos possuem subpopulações específicas de mastócitos, as quais diferem entre si tanto pelos mediadores químicos que contém, bem como pelas suas propriedades funcionais (Bienenstock *et al.*, 1985). Um dos critérios utilizados para distinguir diferentes subpopulações de mastócitos é através da expressão das serinas proteases específicas de mastócitos, tais como triptase e quimase (para revisão ver Welle, 1997).

As enzimas quimase e triptase são as proteínas armazenadas e secretadas pelos mastócitos em maior quantidade. O tipo, a quantidade e as propriedades dessas serinas proteases variam de acordo com o subtipo de mastócito, tecido e espécie animal. Tanto triptases quanto quimases são capazes de promover inflamação, destruição da matriz celular e remodelação de tecidos por diversos mecanismos. Essas enzimas também modulam a resposta imune através da hidrólise de quimiocinas e citocinas e podem frear a resposta inflamatória pela inativação de substâncias alérgicas e neuropeptídeos que causam inflamação e broncoconstrição (para revisão ver Caughey, 2007).

Em humanos, a presença dessas neutroproteases permitiu classificar os mastócitos em três subtipos. Os mastócitos do tipo triptase e quimase (MC_{TC}) contém ambas as enzimas, além de carboxipeptidase G e carboxipeptidase A, e localizam-se principalmente na pele e na submucosa do intestino. O outro subgrupo de mastócitos é do tipo triptase (MC_T), os quais contém apenas esta enzima em seus grânulos, e que se encontram principalmente na mucosa e na parede alveolar. Recentemente foi descoberto um terceiro subtipo, que é rico em quimases, mas deficiente em triptases (MC_{CC}), e que localiza-se principalmente na pele, nódulos

linfáticos, alvéolos pulmonares e na mucosa do intestino (para revisão ver Sur *et al.*, 2007).

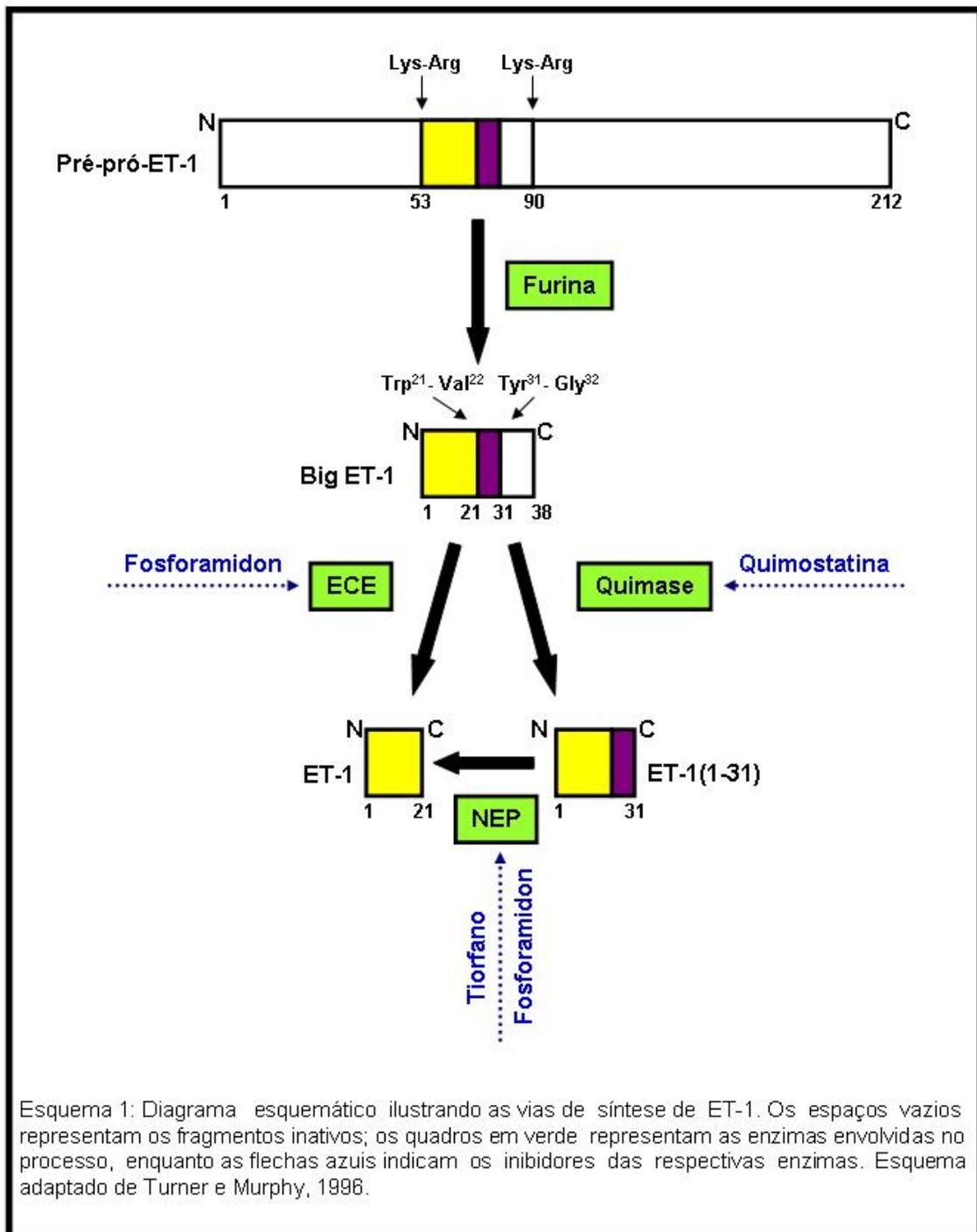
Em roedores, a classificação dos mastócitos é baseada na sua localização. Dessa maneira, têm-se os mastócitos de tecido conectivo (CTMC) e os mastócitos da mucosa (MMC). Os CTMC contém grânulos de heparina, vasta quantidade de histamina e de TNF α . Esse subtipo de mastócito é encontrado principalmente na pele, na cavidade peritoneal e na camada muscular própria e serosa do intestino. Já os MMC, localizados principalmente na mucosa do pulmão e intestino, têm como principal proteoglicana o sulfato de condroitina e também expressam quantidades menores de histamina e TNF α (para revisão ver Malaviya e Abraham, 1995).

Tanto os mastócitos, quanto as suas proteases, possuem uma intrínseca e complexa relação com a família das ETs. A ET-1 pode induzir a degranulação de mastócitos e a liberação de seus mediadores por ativação de receptores ET_A e ET_B (Stassen *et al.*, 2002). Já foi verificado que algumas subpopulações de mastócitos também sintetizam ET-1, sugerindo interações autócrinas e parácrinas entre mastócitos e ETs (Ehrenreich *et al.*, 1992).

Como mencionado anteriormente, a ET-1 também pode ser sintetizada por uma via alternativa, através da conversão da Big ET-1 em ET-1(1-31), pelas quimases de mastócitos. Em um modelo de sepse utilizando animais nocautes para mastócitos, Maurer e colaboradores (2004) demonstraram convincentemente que os mastócitos eram capazes de limitar o efeito tóxico induzido pela ET-1 e que essa ação dependia da estimulação de receptores ET_A presentes nestas células. Por outro lado, em um modelo de inflamação da pele, provocada por irradiação ultravioleta, tanto as ETs quanto os mastócitos mostraram contribuir para o agravamento da inflamação, de maneira dose-dependente e sinérgica (Metz *et al.*,

2006). Dados do nosso laboratório também já demonstraram que, em animais pré-sensibilizados com o antígeno ovalbumina (OVA), a injeção intra-plantar (i.pl.) do antígeno causa um efeito nociceptivo que é reduzido pelo pré-tratamento com o antagonista de receptores ET_A, BQ-123. (Piovezan *et al.*, 2004). Tais achados indicam que as ETs são mediadores que podem participar significativamente na nocicepção evocada por ativação de mastócitos.

Pelo exposto, fica claro que a camada dérmica da pele possui os requisitos funcionais necessários para a síntese das ETs, seja pelas células endoteliais e/ou pelos mastócitos. Dessa maneira, surge a hipótese de que a ET-1(1-31) possa ser sintetizada no tecido cutâneo, como um metabólito intermediário na formação de ET-1, e assim contribuir para a nocicepção causada por ativação local do sistema de ETs. O presente estudo pretende elucidar essa hipótese com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a ação das ETs na nocicepção, bem como, contribuir para o esclarecimento da intrincada interação entre mastócitos e ETs.



2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a contribuição da ET-1(1-31), como tal ou como peptídeo intermediário na formação de ET-1, em induzir comportamento nociceptivo declarado e/ou hipernocicepção mecânica em camundongos, utilizando-se de técnicas farmacológicas comportamentais em modelos de dor aguda.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade da ET-1(1-31) em causar nocicepção e hipernocicepção na pata posterior de camundongos e comparar esses efeitos com as respostas induzidas pela Big ET-1 e ET-1;
- Determinar se o possível efeito nociceptivo provocado pela injeção i.pl. de ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 ocorrem de maneira direta ou indireta;
- Investigar se a ativação de mastócitos promoveria a formação de ET-1(1-31) a partir de Big ET-1, pela via da quimase;
- Avaliar o envolvimento do sistema endógeno de ETs, bem como o da via de síntese alternativa de ET-1, na nocicepção desencadeada por ativação de mastócitos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos *Swiss* machos pesando entre 25-35 g, criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos, a partir do desmame, no biotério do Laboratório de Peptídeos do Departamento de Farmacologia da UFSC em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso a ração e água. Os animais utilizados para os experimentos de nocicepção foram ambientados no laboratório por pelo menos uma hora antes da realização dos testes comportamentais, enquanto aqueles utilizados para os experimentos de hipernocicepção mecânica foram aclimatados na sala de experimentação por pelo menos dois dias consecutivos, durante 2 h antes dos testes. Todos os experimentos foram conduzidos em sala silenciosa, sob temperatura controlada e durante a fase clara do ciclo. Os procedimentos experimentais deste estudo foram conduzidos de acordo com as considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.

3.2. Nocicepção induzida pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1

Para verificar os possíveis efeitos nociceptivos induzidos por esses peptídeos da família das ETs, os animais receberam, em uma das patas posteriores, uma injeção i.pl. de ET-1 (3, 10 ou 30 pmol), ET-1(1-31) (3, 10, 30 ou 100 pmol), Big ET-1 (10, 30 ou 100 pmol) ou de seus respectivos veículos. O volume final de qualquer umas das injeções foi de 20 μl . Imediatamente após as injeções, os

animais foram alojados em uma caixa de observação de acrílico, conforme o método descrito por Hunskaar e colaboradores (1985), com algumas modificações. A caixa de observação continha 6 compartimentos (7 x 9 x 11 cm) e estava apoiada sobre uma tela de metal com fenestrações quadradas (0,5 x 0,5 cm). A tela era sustentada por uma plataforma de madeira, atrás da qual apoiou-se um espelho, num ângulo de aproximadamente 70° em relação à bancada, para facilitar a visualização do comportamento do animal. A nocicepção foi registrada, com auxílio de um cronômetro, como o tempo que o animal despendeu lambendo a pata que recebeu a injeção, em períodos consecutivos de 5 min, até totalizar 30 min.

3.3. Hipernocicepção mecânica induzida pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1

Com o intuito de avaliar se a ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1 seriam capazes de causar hipernocicepção, verificou-se o limiar mecânico de retirada da pata dos animais. Para tal, imediatamente após a avaliação do comportamento nociceptivo (item 3.2.), os animais permaneceram na caixa de observação e avaliou-se, repetidamente, o limiar mecânico aos 30 min, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção dos peptídeos através do método descrito por Chaplan e colaboradores (1994). Para isso, uma série de filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stöelting, EUA) calibrados para exercer forças de 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1,0; 1,4 e 2,0 g foram aplicados, através das fenestrações da tela de metal, perpendicularmente à superfície plantar da pata injetada por um período de no máximo 8 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta hipernociceptiva de retirada da pata. O teste teve início com o filamento de 0,6 g. Na ausência de resposta, o filamento subsequentemente maior foi aplicado e, assim por diante até

que ocorresse a retirada da pata. Caso o animal retirasse a pata, aguardava-se cerca de 2 min e o filamento subsequentemente menor era aplicado. Foram realizados um total de 6 estimulações. Os dados coletados através desse método, denominado de *up and down* e proposto por Dixon (1980), foram utilizados para calcular a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata, em g.

O mesmo procedimento também foi aplicado um dia antes da realização dos experimentos, com o intuito de avaliar o limiar mecânico basal dos animais, de modo que cada grupo experimental apresentasse um valor de 50% do limiar de retirada da pata em torno de 1,0 g. A hipernocicepção foi caracterizada pela diferença de limiar mecânico produzido pela aplicação dos filamentos entre os animais tratados com veículo ou com ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1.

3.4. Influência das enzimas NEP, ECE e quimases sobre os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1

Para avaliar a influência das enzimas NEP e ECE na nocicepção evocada pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1, os animais receberam uma injeção i.pl. (de 30 µl) de tiorfano (inibidor da NEP; Turner e Tanzawa, 1997; 300 nmol), fosforamidon (inibidor da NEP e ECE; Turner e Tanzawa, 1997; 100 nmol) ou veículo (salina). Os camundongos foram alocados individualmente na caixa de observação e após 15 min receberam uma segunda injeção i.pl. ipsilateral (de 20 µl) de ET-1 (10 pmol), ET-1(1-31) (10 pmol), Big ET-1 (30 pmol) ou dos seus respectivos veículos. Após essa segunda injeção observou-se o comportamento nociceptivo dos animais durante os 30 min seguintes, conforme descrito no item 3.2.

Para avaliar a influência da quimase sobre a nocicepção induzida pela ET-1 ou Big ET-1, procedeu-se de maneira análoga à descrita no parágrafo anterior, sendo que a primeira injeção i.pl. foi de quimostatina (inibidor de quimases; Maurer et al., 2004; 100 pmol) ou veículo (DMSO a 10% em salina) e as doses de ET-1 e Big ET-1 foram de 10 e 100 pmol, respectivamente.

3.5. Contribuição dos mastócitos à síntese de ET-1(1-31) através do uso do Composto 48/80

Para avaliar a possível contribuição dos mastócitos para sintetizar ET-1(1-31), inicialmente realizou-se uma curva dose-resposta da nocicepção declarada causada pelo composto 48/80. Dessa maneira, os animais receberam uma injeção i.pl. (de 20 µl) de composto 48/80 nas doses de 0,05; 0,1; 0,3 ou 1,0 µg ou veículo (salina). Escolheu-se então uma dose que não causasse nocicepção significativa em relação ao controle para os experimentos subseqüentes. No caso, a dose escolhida foi de 0,1 µg. Em seguida, avaliou-se a capacidade desta dose em induzir hipernocicepção mecânica em combinação com outros tratamentos, conforme descrito no item 3.3.

A seguir, procurou-se verificar uma possível potencialização da nocicepção provocada por essa dose de composto 48/80 (0,1 µg) através da co-administração de Big ET-1 (30 pmol). O volume final da injeção foi de 20 µl, sendo que 10 µl continham composto 48/80 e os outros 10 µl continham Big ET-1.

O próximo passo foi avaliar o papel das enzimas ECE, NEP e quimase na nocicepção induzida pela Big ET-1 (30 pmol) associada ao Composto 48/80 (0,1 µg). Para esse fim, os animais foram primeiramente pré-tratados com uma injeção i.pl.

(de 30 μ l) dos inibidores enzimáticos tiorfano (300 nmol), fosforamidon (100 nmol), quimostatina (100 nmol) ou dos veículos correspondentes. Após 15 min, os animais receberam uma segunda injeção i.pl. de Composto 48/80 e Big ET-1 (isoladamente ou em associação) ou veículo (salina).

Em uma série adicional de experimentos, testou-se a influência de uma dose maior de tiorfano (1000 nmol) sobre a nocicepção induzida pela co-administração de composto 48/80 e Big ET-1. Para isso, o tiorfano foi diluído em salina contendo 33% de etanol, e os animais do grupo controle foram pré-tratados com este mesmo veículo. Este experimento foi conduzido conforme descrito no parágrafo acima.

3.6. Contribuição dos mastócitos à síntese de ET-1(1-31) desencadeada por antígeno

Para verificar se os mastócitos são capazes de sintetizar ET-1(1-31) em resposta à sua degranulação deflagrada por antígeno, sensibilizou-se previamente os animais com OVA. Para esse fim, camundongos pesando entre 18 e 20 g receberam uma injeção subcutânea (s.c.) de uma solução contendo 50 μ g de OVA e 5 mg de hidróxido de alumínio, num volume total de 200 μ l. Os animais controle (falso-sensibilizados) foram tratados com salina. Decorridos 14 dias da primeira exposição ao antígeno, os animais foram testados para o aparecimento de um possível efeito nociceptivo provocado pela OVA. Assim, grupos de animais sensibilizados receberam uma injeção i.pl. de diferentes concentrações de OVA (0,05; 0,1; 0,3; 1,0 μ g/ 20 μ l). Imediatamente após esta injeção, os animais foram colocados na caixa de observação, conforme descrito anteriormente, e registrou-se

o tempo (em s) que cada animal despendeu lambendo a pata injetada por períodos consecutivos de 5 min até 40 min após a injeção. Os camundongos falso-sensibilizados foram utilizados como grupo controle e receberam uma injeção i.pl. de OVA (1,0 µg em 20 µl). Com base na curva dose-resposta obtida para a nocicepção causada pela OVA, escolheu-se para o experimento subsequente uma dose inferior àquela necessária para causar nocicepção significativa. Em seguida, avaliou-se o efeito desta dose em induzir hipernocicepção mecânica conforme descrito no item 3.3. Nesse caso optou-se pela dose de OVA de 0,05 µg para verificar se a mesma, co-injetada com a Big ET-1 (30 pmol), seria capaz de evocar nocicepção.

Em seguida, avaliou-se o papel das enzimas quimase, NEP e ECE na nocicepção provocada pela ação combinada de Big ET-1 e OVA. Como referido no item 3.5., os animais foram primeiramente tratados com uma injeção i.pl. (de 30 µl) dos inibidores enzimáticos tiorfano (300 nmol), fosforamidon (100 nmol), quimostatina (100 nmol) ou dos seus veículos correspondentes. Após 15 min, os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (20 µl) contendo OVA (0,05 µg) e Big ET-1 (30 pmol), separados ou em associação. A nocicepção foi avaliada conforme descrito no item 3.2., por períodos consecutivos de 5 min, até 40 min após a segunda injeção.

3.7. Influência de ETs endógenas na nocicepção induzida por ativação dos mastócitos

Com o propósito de investigar se a ET-1 e a ET-1(1-31) endógena, estavam envolvidas na nocicepção induzida pela ativação de mastócitos, os animais

receberam diferentes pré-tratamentos e foram testados nos modelos de degranulação mastocitária desencadeados por composto 48/80 e OVA.

Os animais nos quais administrou-se composto 48/80, receberam primeiramente uma injeção i.pl. de BQ-123 (3 ou 10 nmol em 20 µl), BQ-788 (10 nmol em 20µl), tiorfano (1000 nmol em 30 µl), fosforamidon (100 nmol em 30 µl) ou quimostatina (100 nmol em 30 µl). Quinze minutos depois, os animais receberam uma injeção i.pl. ipsilateral de composto 48/80 (1 µg em 20 µl). Os grupos controle foram primeiramente tratados com o veículo correspondente e 15 min depois receberam injeção i.pl. ipsilateral de salina. Após a segunda injeção, registrou-se o tempo de lambda durante 30 min.

Um segundo grupo de animais foi previamente sensibilizado com OVA, conforme descrito no item 3.6. Quatorze dias após a primeira exposição à OVA, os animais foram pré-tratados com BQ-123 (10 nmol em 20 µl), BQ-788 (10 nmol em 20µl), fosforamidon (100 nmol em 30 µl) ou quimostatina (100 nmol em 30 µl) e 15 min mais tarde receberam uma injeção i.pl. de OVA (0,3 µg em 20 µl). O grupo controle (falso-sensibilizado) foi pré-tratado com o veículo correspondente e recebeu como segundo tratamento uma injeção i.pl. ipsilateral de OVA (0,3 µg/ 20 µl). O tempo de lambda foi registrado durante 40 min após a segunda injeção.

3.8. Drogas

As seguintes substâncias foram empregadas neste estudo: Endotelina-1(1-21) (American Peptide Co., Sunnyvale, USA), Endotelina-1(1-31) (Peptide Institute, INC, Osaka, Japão); Big Endotelina-1 (1-38) (Calbiochem, EMD Biosciences, USA); Tiorfano ([±]-N-[3-Mercapto-2-benzilpropionil]glicina ou DL-3-Mercapto-2-

benzilpropanoilglicina]), Fosforamidon (sal dissódico N-[α -Ramnopiranosiloxihidroxi-fosfinel]-Leu-Trp ou sal dissódico N-[α -Ramnopiranosilfosfono]-L-leucil-L-triptofano), Quimostatina (N-[N α -Carbonil-Cpd-X-Phe-al]-Phe[S,S]- α -[2-Imino-hexahidro-4-pirimidil]glicina]), Composto 48/80, Ovalbumina (todos provenientes da Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA); BQ-123 (ciclo[DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]) e BQ-788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- γ -metileucil-D-1-metoxicarbonil-D-norleucina) (ambos da Research Biochemicals International, Natick, U.S.A).

As soluções estoque de ET-1, Big ET-1, BQ-123, BQ-788, fosforamidon e tiorfano foram preparadas em salina (NaCl 0,9%) e mantidas a uma temperatura de -20 °C, sendo diluídas para as concentrações necessárias momentos antes dos experimentos. As soluções estoque de quimostatina e ET-1(1-31) foram preparadas em DMSO a 10% em salina e ácido acético a 0,1% em salina, respectivamente, sendo diluídas para as concentrações necessárias, momentos antes dos experimentos. Todas as substâncias foram dissolvidas em salina no dia da realização dos experimentos, com exceção da dose mais alta de tiorfano utilizada nesse estudo, a qual foi diluída em solução de salina contendo 33% de etanol. Os animais dos respectivos grupos controle receberam apenas o veículo correspondente em cada experimento.

3.9. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 6 a 8 animais por grupo. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de *Newman-Keuls* foi empregado para análise dos dados obtidos nos testes de nocicepção aguda. Os dados referentes à hipernocicepção mecânica

foram analisados com emprego de ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste de *Newman-Keuls* quando analisados mais de dois grupos concomitantemente. Quando o experimento consistia de apenas dois grupos utilizou-se o teste *t* de *Student* para amostras não pareados. Tanto nos testes comportamentais envolvendo nocicepção declarada, quanto naqueles que envolviam hipernocicepção mecânica, os animais dos grupos controle foram agrupados, visto que, embora em alguns experimentos as substâncias comparadas tivessem veículos distintos, estes não apresentaram diferença significativa entre si em relação aos parâmetros analisados. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. Efeitos nociceptivo e hipernociceptivo induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1

A injeção i.pl. de ET-1 (3, 10 ou 30 pmol), ET-1(1-31) (3, 10, 30 ou 100 pmol) ou Big ET-1 (30 ou 100 pmol) foi capaz de causar nocicepção de maneira dose-dependente, levando a um aumento significativo no tempo de lambida da pata injetada quando comparado àquele manifestado pelo grupo controle, conforme ilustrado na Figura 1A e 1B. Os tempos de lambida obtidos em resposta à administração das doses máximas testadas foram de 184 ± 39 s para dose de 30 pmol de ET-1; 138 ± 23 s para a ET-1(1-31) na dose de 100 pmol e 170 ± 29 s para Big ET-1, também na dose de 100 pmol. Além disso, pode-se observar pelas Figuras 1A e 1B que, para exercer um efeito semelhante àquele desencadeado pela ET-1 (por exemplo, ET-1 10 pmol, 162 ± 34 s), foi necessária uma dose 10 vezes maior de Big ET-1 (por exemplo, Big ET-1 100 pmol, 170 ± 29 s). A ET-1(1-31) demonstrou-se ser equipotente em relação à ET-1, embora sua curva dose-resposta tenha se apresentado menos inclinada que aquelas obtidas para a ET-1 ou a Big ET-1 (Figura 1A e 1B).

Os três peptídeos também causaram hipernocicepção mecânica. A ET-1 diminuiu o limiar de reatividade ao estímulo mecânico nas doses de 10 e 30 pmol, e na dose de 10 pmol este efeito perdurou por até 3 h (Figura 2A). A ET-1(1-31) causou hipernocicepção mecânica nas doses de 10, 30 e 100 pmol, sendo que nas doses de 30 e 100 pmol esse efeito perdurou durante a 1^a h, enquanto na dose de 10 pmol a redução significativa do limiar mecânico ocorreu até a 2^a h (Figura 2B). Já a Big ET-1 reduziu o limiar mecânico nas doses de 10, 30 e 100 pmol até a 3^a h (Figura 2C).

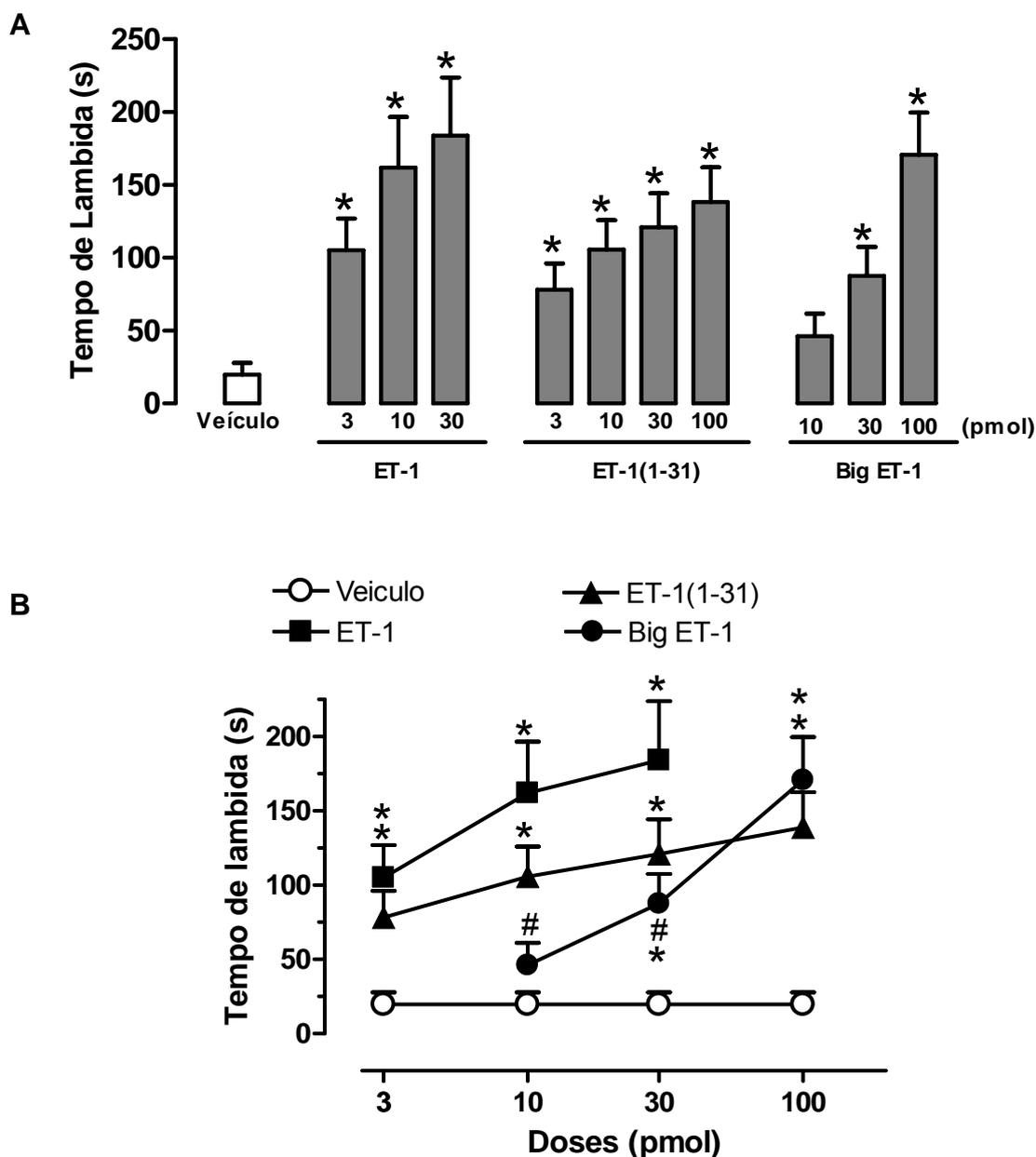


Figura 1: Nocicepção declarada induzida pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 em camundongos. Os animais receberam uma injeção i.pl. (de 20 μ l) de ET-1 (3, 10 e 30 pmol), ET-1(1-31) (3, 10, 30 e 100 pmol), Big ET-1 (10, 30 e 100 pmol) ou veículo. O Painel A ilustra os efeitos causados por doses isoladas de cada peptídeo, enquanto o Painel B apresenta as curvas dose-efeito causadas pelos mesmos. Os valores representam a média \pm e.p.m do tempo que os animais permaneceram lambendo a pata injetada durante os primeiros 30 min após os tratamentos. ($n = 6-8$ animais por grupo). Como os grupos tratados com diferentes veículos não diferiam significativamente entre si, estes foram agrupados totalizando um $n = 12$ animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com ET-1 (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

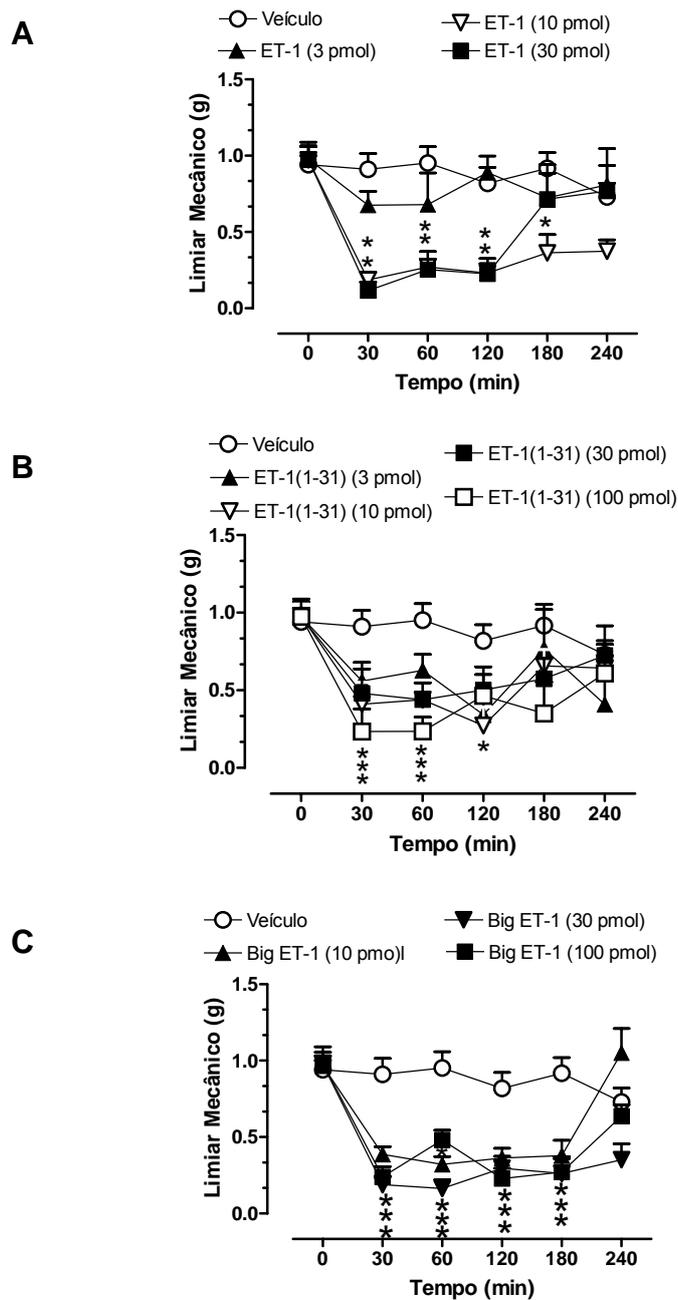


Figura 2: Hipernocicepção mecânica induzida por ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 em camundongos. A reatividade a estimulação mecânica foi avaliada antes e aos 30 min, 1, 2, 3, e 4 h após a injeção i.pl. (20 μ l) de ET-1 (3, 10 e 30 pmol; Painei A), ET-1(1-31) (3, 10, 30 e 100 pmol; Painei B) ou Big ET-1 (10, 30 e 100 pmol; Painei C). Os valores representam a média \pm e.p.m. do limiar de retirada da pata (em g) frente à estimulação mecânica com filamentos de von Frey ($n = 6$ a 8 animais por grupo). Como os grupos tratados com diferentes veículos não diferiam significativamente entre si, estes foram agrupados totalizando um $n = 12$ animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

4.2. Influência das enzimas NEP, ECE e quimases sobre os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1

Para avaliar se as respostas nociceptivas declaradas evocadas pela ET-1(1-31) e Big ET-1 ocorriam por ação direta destes peptídeos ou se este comportamento dependia da sua conversão em ET-1, foram utilizados os inibidores enzimáticos tiorfano (inibidor da enzima NEP), fosforamidon (inibidor da enzima NEP e ECE) e quimostatina (inibidor da enzima mastocitária quimase). Observou-se que nenhum desses inibidores enzimáticos foi capaz de alterar o aumento do tempo de lambida dos animais induzido por ET-1, como ilustrado nas Figuras 3A, 3B e 4A. Entretanto o pré-tratamento com tiorfano foi capaz de abolir a nocicepção induzida pela ET-1(1-31) (Figura 3A). Enquanto os animais pré-tratados com veículo lamberam a pata por 93 ± 19 s, os que receberam tiorfano como pré-tratamento a lamberam por 26 ± 8 s, valor esse não diferente daquele apresentado pelos animais controle, os quais tiveram a nocicepção registrada em 30 ± 12 s. O tiorfano não foi capaz de causar qualquer modificação do efeito da Big ET-1 (Figura 3A). Já o fosforamidon não afetou a resposta à ET-1, mas reduziu tanto o efeito nociceptivo declarado da ET-1(1-31), quanto o da Big ET-1, sendo que esta inibição foi da ordem de 61,5% e 57,5% respectivamente (Figura 3B). O inibidor enzimático quimostatina não modificou os efeitos nociceptivos da ET-1 ou Big ET-1 (Figuras 4A e 4B), entretanto sua influência sobre a nocicepção causada por ET-1(1-31) não foi avaliada.

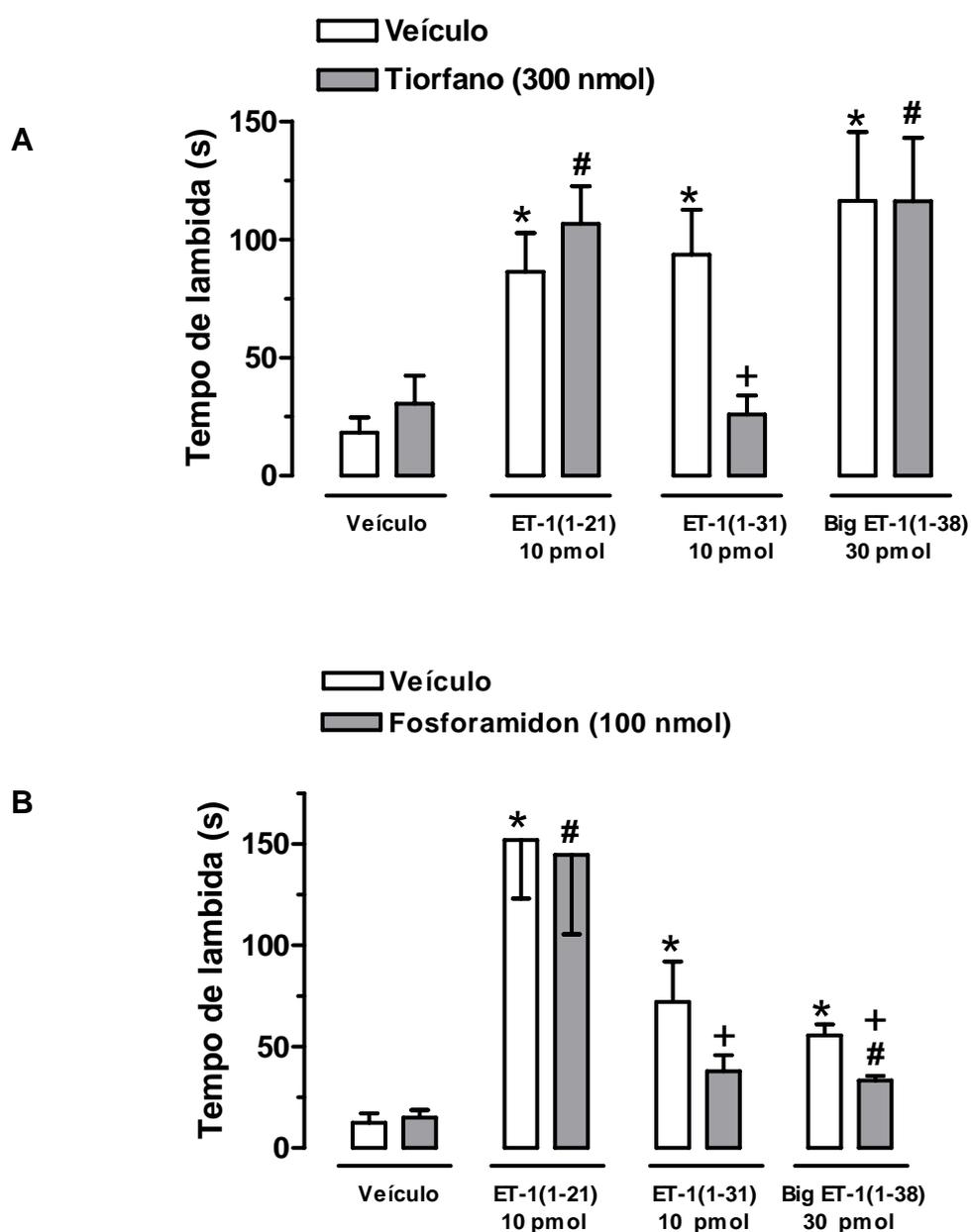


Figura 3: Influência do Tiorfano e do Fosforamidon na nocicepção causada pela ET-1, ET-1(1-31) ou Big ET-1. Painel A: Os animais foram pré-tratados com uma injeção i.pl. (de 30 μ l) de tiorfano (300 nmol) (colunas cinzas) ou veículo (colunas brancas) Painel B: Pré-tratamento dos animais com uma injeção i.pl. (de 30 μ l) de fosforamidon (100 nmol) (colunas cinzas) ou veículo (colunas brancas). Em ambos os painéis após 15 min os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (de 20 μ l) de ET-1 (10 pmol), ET-1(1-31) (10 pmol), Big ET-1 (30 pmol) ou veículo. Os valores representam a média \pm e.p.m. do tempo de lambida durante 30 min após a segunda injeção ($n = 6-8$ animais por grupo). Como os grupos tratados com diferentes veículos não diferiam significativamente entre si, estes foram agrupados totalizando um $n = 12$ animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tiorfano/fosforamidon + veículo; + $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com veículo + ET-1(1-31) (Painel A e B) ou veículo + Big ET-1 (Painel B) (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

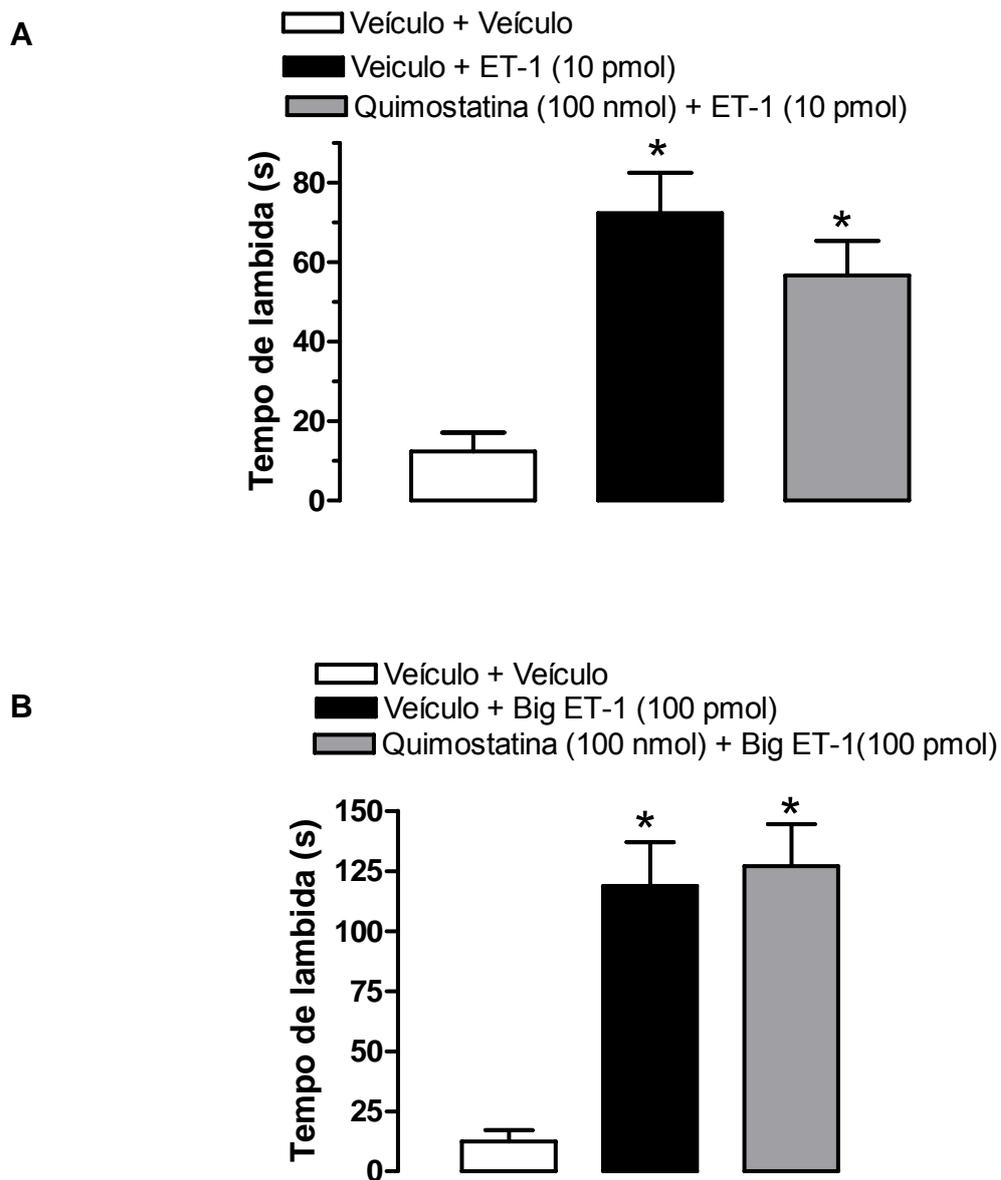


Figura 4: Influência da quimase na nocicepção induzida por ET-1 ou Big ET-1. Os animais receberam como pré-tratamento injeção i.pl. (de 30 μ l) de quimostatina (100 nmol). Após 15 min foi aplicada uma segunda injeção i.pl. (de 20 μ l) de ET-1 (10 pmol; Painel A) e Big ET-1 (100 pmol; Painel B). Os animais do grupo controle foram pré-tratados com DMSO a 10% em salina e receberam uma segunda injeção de salina. Os valores representam a média \pm e.p.m. do tempo de lambida durante 30 min após a segunda injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

4.3. Influência da ativação dos mastócitos na formação de ET-1(1-31)

Com o propósito de investigar se ocorreria formação de ET-1(1-31) através da ação de quimases liberadas por mastócitos sobre a Big ET-1, utilizou-se dois modelos de degranulação dessas células. O primeiro através do composto 48/80, o qual degranula mastócitos através de mecanismos não imunológicos, e o segundo no qual os animais são previamente sensibilizados com OVA e depois re-expostos ao antígeno.

O composto 48/80, quando injetado na pata dos camundongos, foi capaz de induzir nocicepção significativa em doses maiores que 0,1 µg (Figura 5A). Convém salientar que as respostas nociceptivas às doses de 0,3 e 1,0 µg foram semelhantes. Contudo, a dose de 0,1 µg de composto 48/80 mostrou-se desprovida de efeito nociceptivo declarado significativo, embora os animais tenham manifestado resposta hipernociceptiva mecânica significativa por até 3 h após a sua injeção, confirmando dessa maneira, que embora esta dose não tenha causado nocicepção declarada, esta foi capaz de ativar os mastócitos (Figura 5B). Como ilustra a Figura 6, a co-administração de composto 48/80 (0,1 µg) concomitantemente com Big ET-1 (30 pmol) induziu um efeito nociceptivo declarado significativamente maior que aquele causado pela Big ET-1 sozinha. A combinação resultou em resposta nociceptiva declarada 151,5% maior em relação aquela causada pelo composto 48/80 e 93,5% maior em relação àquela induzida pela Big ET-1.

Em seguida, procurou-se inibir essa potencialização do efeito do composto da Big ET-1 (30 pmol) pelo composto 48/80 (0,1 µg) utilizando os inibidores enzimáticos tiorfano, fosforamidon e quimostatina. O pré-tratamento dos camundongos com tiorfano (300 nmol) não afetou a nocicepção declarada induzida

pela combinação de composto 48/80 mais Big ET-1 (Figura 7A). O tempo de lambida dos animais pré-tratados com veículo foi de $76,5 \pm 3$ s, enquanto que para aqueles que receberam tiorfano foi de 76 ± 9 s. Já os animais pré-tratados com uma dose mais alta de tiorfano (1000 nmol) apresentaram uma resposta nociceptiva declarada à combinação de composto 48/80 mais Big ET-1 reduzida em 56% em relação ao grupo pré-tratado com veículo (Figura 7B).

Por outro lado, as respostas nociceptivas declaradas induzidas pela associação de composto 48/80 mais Big ET-1 também se mostraram sensíveis à inibição pelo tratamento com fosforamidon e pela quimostatina (Figura 7A). A nocicepção dos animais que receberam fosforamidon (100 nmol) foi registrada em $43,5 \pm 9$ s, equivalente a uma redução de 53,2 % em relação ao grupo pré-tratado com veículo. Os animais tratados com quimostatina (100 nmol) lambeam a pata por $37,5 \pm 4$ s, o que resultou em uma redução de 63% quando comparados ao grupo pré-tratado com veículo.

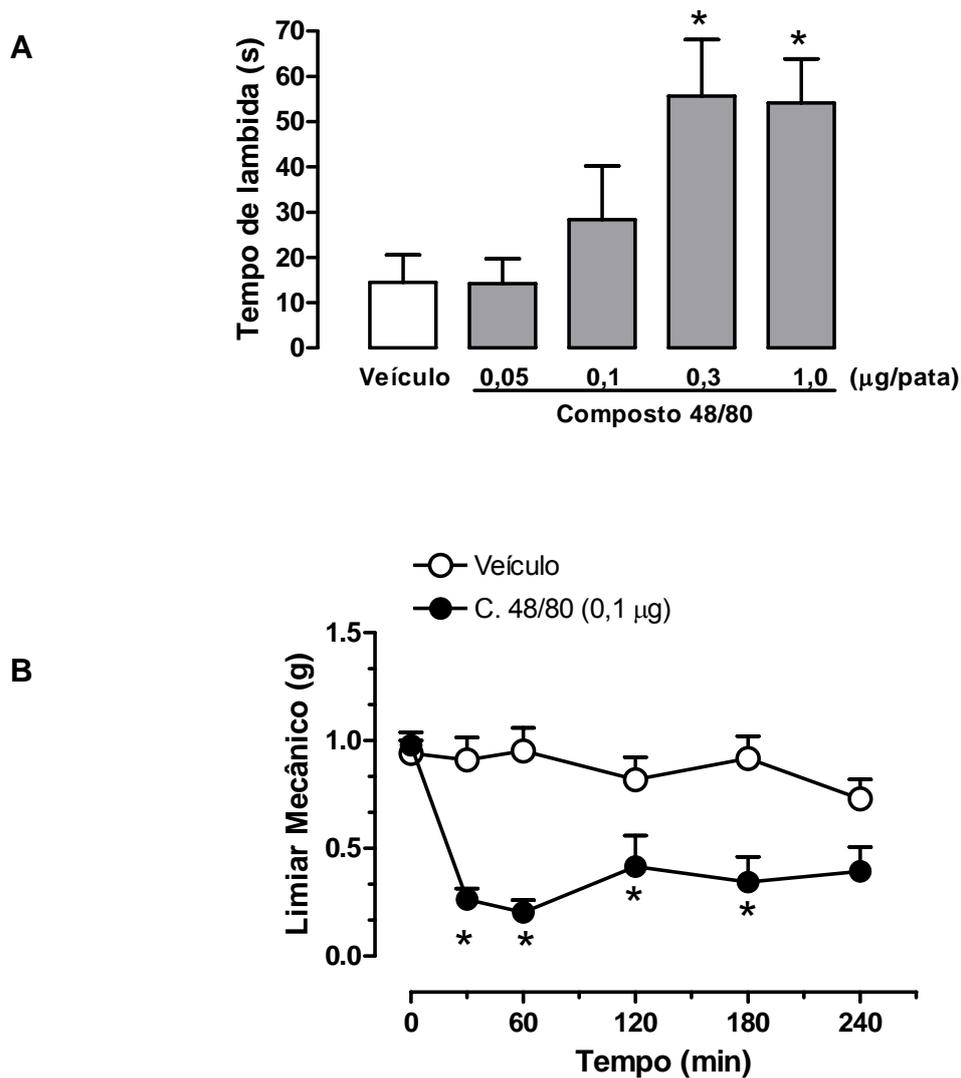


Figura 5: Efeito nociceptivo e hipernociceptivo causado pelo Composto 48/80. Painel A: Tempo de lambida dos animais que receberam uma injeção i.pl. (de 20 µl) de C. 48/80 (0,05; 0,1; 0,3 e 1 µg; colunas cinzas) ou veículo (salina; coluna branca). Painel B: Avaliação da hipernocicepção mecânica em animais tratados com injeção i.pl. (de 20 µl) de veículo ou C. 48/80 (0,1 µg). No painel A os valores representam a média ± e.p.m. do tempo que os animais despenderam lambendo a pata injetada durante 30 min após a injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*). No painel B os valores representam a média ± e.p.m. do limiar de retirada da pata (em g) frente à estimulação mecânica com filamentos de von Frey ($n= 6$ a 8 animais por grupo; Teste *t* de *Student*).

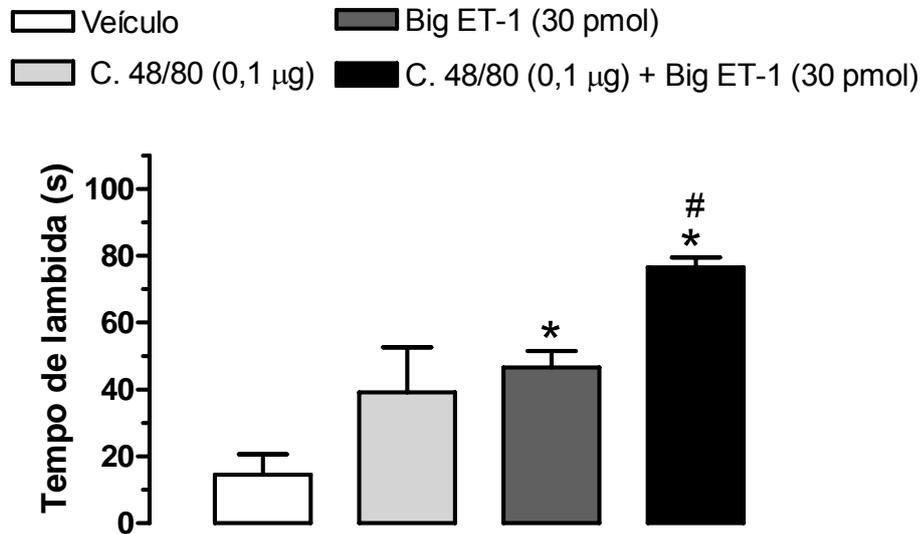


Figura 6: Efeito nociceptivo causado pela co-injeção de Composto 48/80 e Big ET-1. Os animais receberam uma injeção i.pl. (de 20 µl) de Big ET-1 (30 pmol) isoladamente ou associada ao C. 48/80 (0,1 µg). Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 30 min após a injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo e # $p<0,05$ em relação aos grupos que receberam composto 48/80 ou Big ET-1 (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

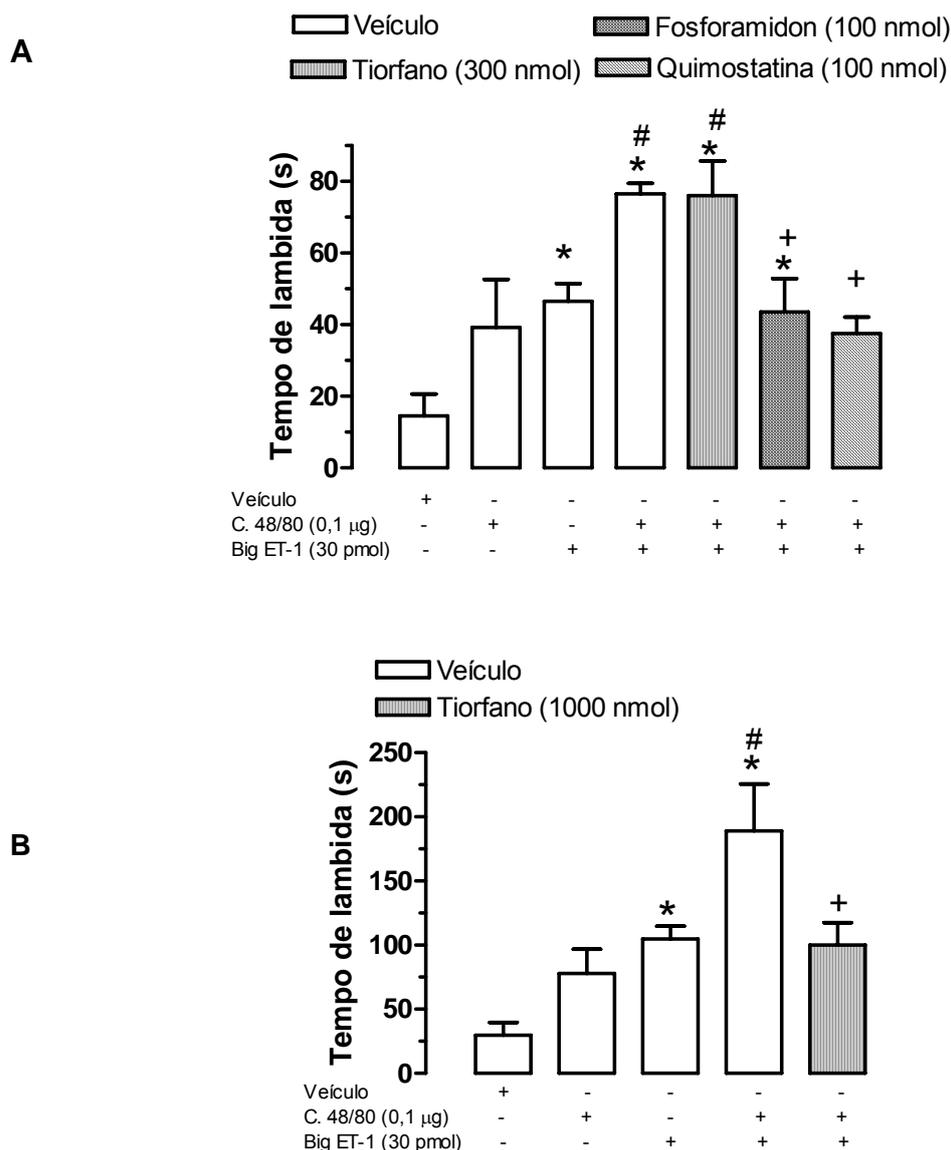


Figura 7: Influência dos inibidores das enzimas NEP, ECE e quimase na nocicepção induzida pelo Composto 48/80 e Big ET-1. Painei A: Os animais foram pré-tratados com uma injeção i.pl. (de 30 µl) de tiorfano (300 nmol), fosforamidon (100 nmol), quimostatina (100 nmol) ou veículo. Após 15 min, os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (de 20 µl) de veículo, C. 48/80 (0,1 µg), Big ET-1 (30 pmol) ou uma co-injeção de C. 48/80 (0,1 µg) + Big ET-1 (30 pmol). Painei B: Os procedimentos foram os mesmos do painei A, porém a dose de tiorfano empregada foi de 1000 nmol. Os valores em todos os painéis representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 30 min após a segunda injeção ($n = 6-8$ animais por grupo). No Painei A os grupos pré-tratados com diferentes veículos e que receberam em seguida veículo, C. 48/80 ou Big ET-1 não diferiram significativamente, portanto foram agrupados de acordo com os seus respectivos pós-tratamentos, totalizando um $n = 12$ animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com C. 48/80 ou Big ET-1. + $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com Big ET-1 + C. 48/80 (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

Quando os animais previamente sensibilizados à OVA receberam injeção i.pl. deste antígeno, obteve-se um padrão de resposta nociceptiva bastante semelhante àquele apresentado pelos animais que receberam composto 48/80, embora estes estímulos causem degranulação dos mastócitos através de mecanismos distintos. A injeção i.pl. de OVA, 14 dias após a primeira exposição, foi capaz de causar nocicepção de maneira dependente da dose, sendo que o tempo de lambda máximo obtido foi com 1 µg/pata (131 ± 22 s) (Figura 8A). A exemplo da conduta adotada nos experimentos ilustrados na Figura 8, escolheu-se a dose de 0,05 µg de OVA para combinar com a Big ET-1 (30 pmol), pois nesta dose, o antígeno não causou efeito nociceptivo declarado significativo, porém causou hipernocicepção mecânica significativa 40 min após a injeção (Figuras 8A e 8B). O tempo de lambda dos animais que receberam 0,05 µg de OVA foi de 45 ± 9 s enquanto os falso-sensibilizados tratados com 1,0 µg de OVA foi de 22 ± 9 s.

Conforme demonstram os resultados da Figura 9, a co-injeção i.pl. de OVA (0,05 µg) juntamente com Big ET-1 (30 pmol) foi capaz de causar efeito nociceptivo declarado maior (tempo de lambda de 85 ± 9 s) que o observado em animais que só receberam a injeção de Big ET- 1 (30 pmol, 47 ± 10 s) ou OVA (0,05 µg, 48 ± 8 s). Essa potencialização da nocicepção foi da ordem de 154 % em relação à resposta induzida pela Big ET-1 e de 144% em relação àquela causada pela OVA.

A resposta nociceptiva declarada dos animais tratados com a combinação de OVA e Big ET-1 não foi alterada pelo pré-tratamento com o inibidor enzimático tiorfano na dose de 300 nmol (Figura 10A). Ao contrário, os animais pré-tratados com fosforamidon (100 nmol) tiveram uma redução significativa do tempo de lambda ($57,3 \pm 10$ s) em comparação aos que receberam veículo ($100,3 \pm 9$ s) (Figura 10B). Essa redução da nocicepção provocada pelo fosforamidon sobre a OVA associada à

Big ET-1 foi de 50,4%. O pré-tratamento com a quimostatina (100 nmol) também foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção provocada pela associação de OVA com Big ET-1 (Figura 10C). Enquanto que os animais que receberam veículo como pré-tratamento lambeam a pata injetada por 100 ± 9 s, os animais que receberam quimostatina lambeam por apenas 30 ± 8 s, o que representou uma inibição de 85%.

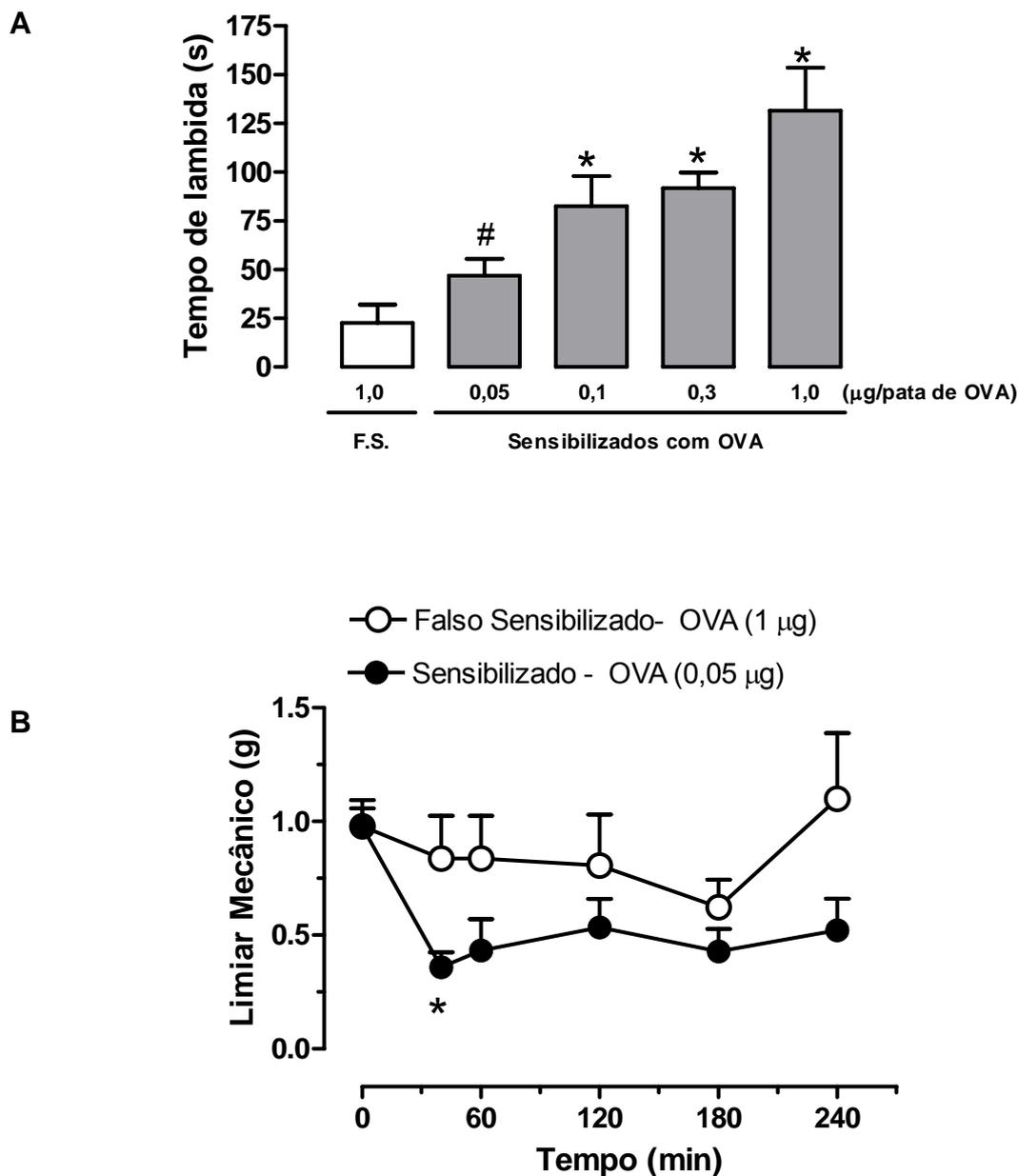


Figura 8: Efeitos nociceptivo e hipernociceptivo causados pela OVA. Painel A: Camundongos pré-sensibilizados à OVA (colunas cinzas), receberam após 14 dias uma injeção i.pl. (de 20 µl) desse antígeno (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 1 µg). Os animais controle (F.S., coluna branca), receberam 1 µg de OVA. Painel B: Efeito hipernociceptivo ao longo de 4 h provocado pela injeção i.pl. (de 20 µl) de 0,05 µg de OVA em relação ao animal falso-sensibilizado, o qual recebeu uma injeção i.pl. (de 20 µl) de 1 µg de OVA. No painel A os valores representam a média ± e.p.m. do tempo que os animais despenderam lambendo a pata injetada durante 40 min após a injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo falso sensibilizado # $p<0,05$ em relação ao grupo sensibilizado tratado com 1 µg de OVA (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*). No painel B os valores representam a média ± e.p.m. do limiar de retirada da pata (em g) frente à estimulação mecânica com filamentos de von Frey ($n= 6$ a 8 animais por grupo; Teste *t* de *Student*).

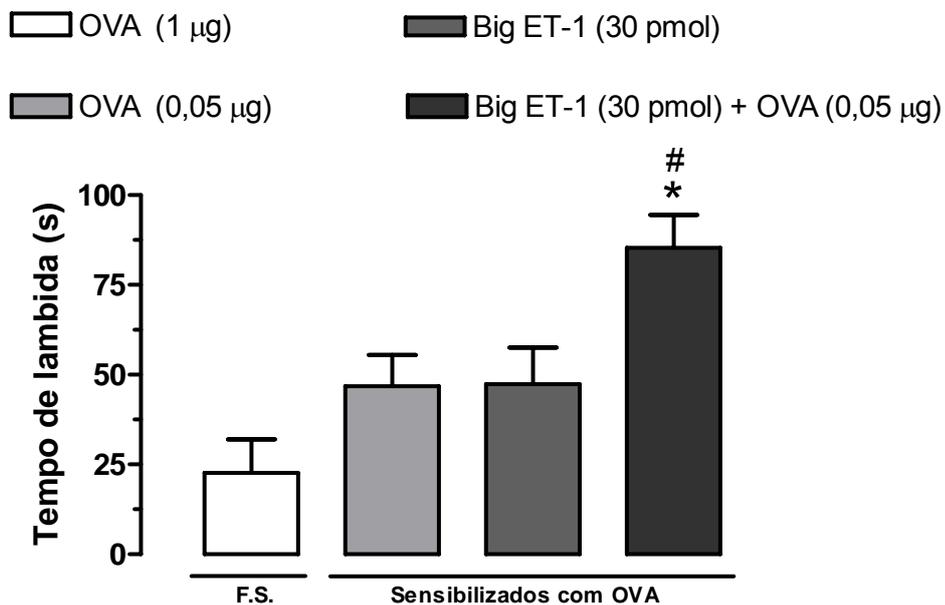


Figura 9: Efeito nociceptivo causado pela administração de OVA e Big ET-1. Camundongos pré-sensibilizados à OVA receberam uma injeção i.pl. (de 20 µl) de OVA (0,05 µg) ou Big ET-1 (30 pmol) ou de OVA (0,05 µg) + Big ET-1 (30 pmol). O grupo controle foi composto de animais F.S. que receberam injeção i.pl. de OVA (1,0 µg). Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 40 min após a injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo falso-sensibilizado. # $p<0,05$ em relação aos grupos tratados com OVA ou Big ET-1 (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

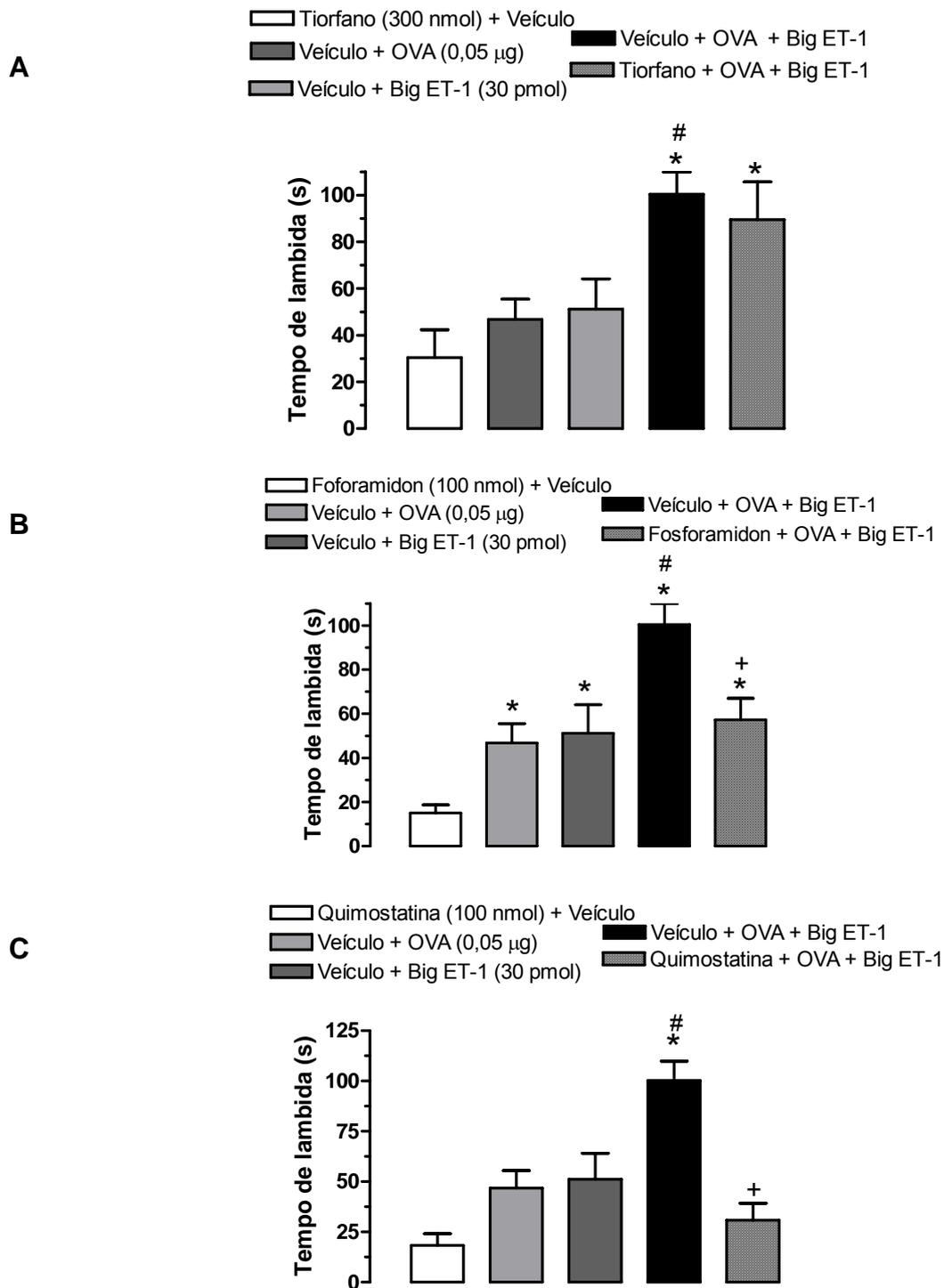


Figura 10: Influência dos inibidores das enzimas NEP, ECE e quimase na nocicepção induzida pela OVA e Big ET-1. Camundongos pré-sensibilizados à OVA foram pré-tratados com uma injeção i.pl. (de 30 µl) de veículo ou dos inibidores enzimáticos: tiorfano (300 nmol; painel A); fosforamidon (100 nmol; painel B) e quimostatina (100 nmol; painel C). Após 15 min os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (de 20 µl) de veículo, OVA (0,05 µg), Big ET-1 (30 pmol) ou uma co-injeção de OVA (0,05 µg) + Big ET-1 (30 pmol). Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 40 min após a segunda injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo tratado com os distintos inibidores + veículo. # $p<0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + OVA ou Big ET-1. + $p<0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + OVA + Big ET-1 (ANOVA seguida pelo teste de Newman Keuls).

4.4. Participação das ETs endógenas na nocicepção decorrente da ativação de mastócitos

O pré-tratamento i.pl. dos animais com o antagonista seletivo de receptores ET_A (BQ-123, 10 nmol) foi capaz de diminuir tanto a nocicepção evocada pelo composto 48/80, quanto pela OVA, sendo que esta inibição foi da ordem de 64% e de 70,5%, respectivamente (Figura 11A e 12A). Por outro lado, o pré-tratamento análogo com o BQ-788 (10 nmol), um antagonista seletivo de receptores ET_B, inibiu de maneira significativa apenas a nocicepção desencadeada por OVA, conforme mostrado na Figura 12B. Entre os animais que receberam OVA, aqueles que foram pré-tratados com o veículo lamberam a pata por 129 ± 14 s, enquanto que os pré-tratados com BQ-788 lamberam a pata por 88 ± 15 s, o que representou uma redução de 38% na magnitude da nocicepção. O pré-tratamento com quimostatina (100 nmol) foi capaz de reduzir o tempo de lambida em ambos os modelos de degranulação mastocitária, sendo que essa inibição foi da ordem de 90% para o composto 48/80 e 69% para OVA (Figura 11C e 12C). Da mesma maneira que o BQ-788, o fosforamidon (100 nmol) apenas diminuiu a nocicepção desencadeada por OVA (Figura 12D). O tempo de lambida dos animais pré-tratados com fosforamidon foi de 76 ± 15 s enquanto que o daqueles pré-tratados com veículo foi de 111 ± 7 s, o que representou uma inibição de 39%. Os efeitos do tiorfano (1000 nmol), sobre a nocicepção desencadeada por degranulação de mastócitos, foram apenas testados utilizando-se composto 48/80. O tiorfano foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida da pata em 80%, conforme ilustrado na Figura 11E.

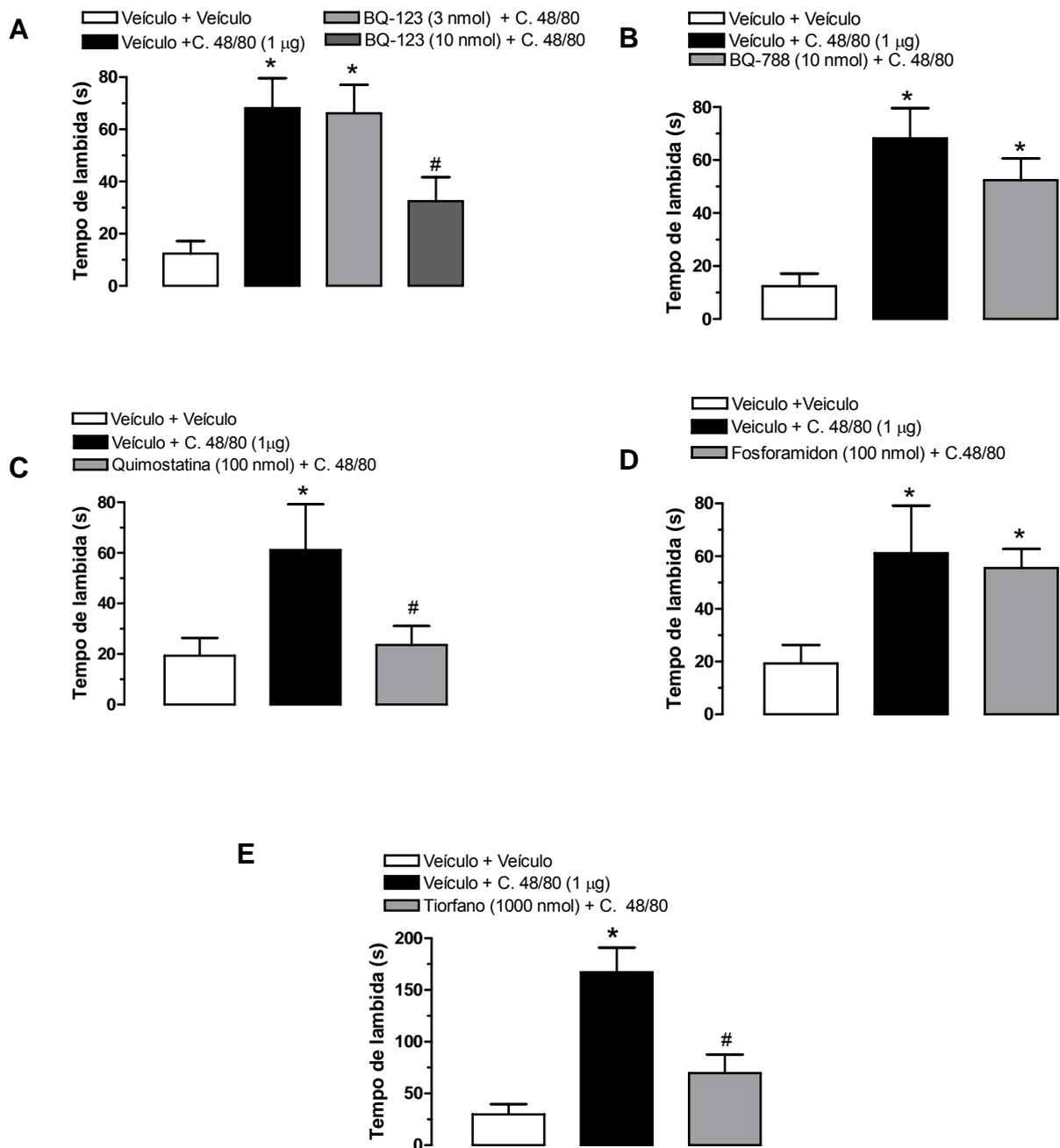


Figura 11: Participação das ETs endógenas na nocicepção induzida pelo composto 48/80. Os animais receberam como pré-tratamento injeção i.pl. de: BQ-123 (3, 10 nmol, 20 µl, Painel A); BQ-788 (10 nmol, 20 µl, Painel B); quimostatina (100 nmol, 30 µl, Painel C); fosforamidon (100 nmol, 30 µl, Painel D) e tiorfano (1000 nmol, 30 µl, Painel E). Os animais do grupo controle foram pré-tratados com os seus respectivos veículos. Decorridos 15 min da primeira injeção, os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (de 20 µl) de composto 48/80 (1,0 µg) ou veículo (salina). Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 30 min após a segunda injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + veículo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + C.48/80 (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

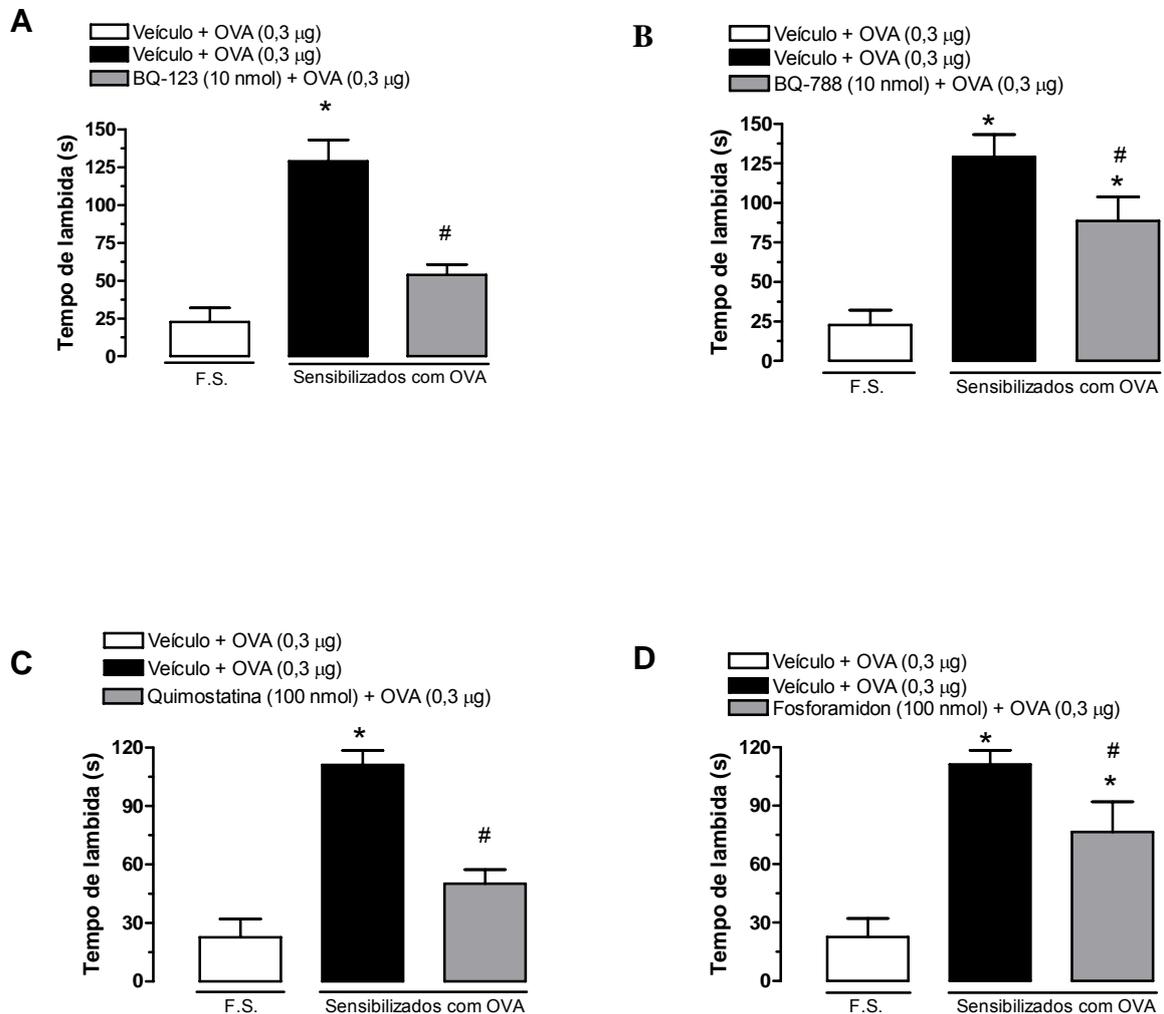


Figura 12: Participação das ETs endógenas na nocicepção induzida pela OVA. Os animais receberam como pré-tratamento uma injeção i.pl. de: BQ-123 (10 nmol, 20 µl, Painel A); BQ-788 (10 nmol, 20 µl, Painel B); quimostatina (100 nmol, 30 µl, Painel C) e fosforamidon (100 nmol, 30 µl, Painel D). Os animais do grupo controle foram pré-tratados com os seus respectivos veículos. Decorridos 15 min da primeira injeção, os animais receberam uma segunda injeção i.pl. (de 20 µl) de OVA (0,3 µg). Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambida durante 40 min após a segunda injeção ($n= 6-8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo falso sensibilizado. # $p<0,05$ em relação ao grupo sensibilizado tratado com veículo + OVA (ANOVA seguida pelo teste de *Newman Keuls*).

5. Discussão

O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que a Big ET-1 e a ET-1(1-31), ambos peptídeos precursores da ET-1, são capazes de causar nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica de maneira dose-dependente, quando injetados na pata posterior de camundongos.

As ações pró-nociceptivas da ET-1 já vem sendo documentadas desde 1989, quando Ferreira e colaboradores demonstraram que este peptídeo causava sensação de prurido em queimação no antebraço de humanos, além de comportamento nociceptivo em cães, ratos e camundongos (Ferreira *et al.*, 1989). Atualmente, alguns dos mecanismos subjacentes aos seus efeitos nociceptivos já estão mais esclarecidos na literatura. O conjunto de resultados do presente estudo confirma e aprofunda as evidências acerca dos efeitos nociceptivos e hipernociceptivos da ET-1. Sabe-se que a ET-1 é capaz de causar comportamento de dor quando administrada intra-peritonealmente (i.p.) em roedores (Raffa *et al.*, 1996), enquanto que a injeção intra-articular deste peptídeo induz nocicepção e hipernocicepção em cães e ratos (Ferreira *et al.*, 1989; De-Melo *et al.*, 1998). De maneira similar, a injeção i.pl. de ET-1 em camundongos potencializa a dor induzida por aplicação de estímulos químicos e inflamatórios na pata (Piovezan *et al.*, 1997; Menendez *et al.*, 2003). Em humanos, a injeção de ET-1 na artéria braquial é capaz de provocar dor severa e alodínia (Dahlof *et al.*, 1990). Os resultados apresentados neste trabalho corroboram estas evidências. Entre os peptídeos estudados neste trabalho, a ET-1 foi o único que não teve seu efeito nociceptivo declarado influenciado pelos inibidores enzimáticos tiorfano, fosforamidon e quimostatina, confirmando o seu papel como um dos mediadores maduros que integram a família das ETs. Neste sentido, também é importante salientar que a ET-1 mostrou-se mais

potente que a Big ET-1 e a ET-1(1-31) em causar nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica.

Diferentemente da ET-1, até o momento apenas dois trabalhos investigaram a nocicepção evocada pela Big ET-1. O primeiro deles, de Raffa e Jacoby (1991), comparou o número de contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ET-1, ET-2, ET-3 e Big ET-1 em camundongos. Foi evidenciado que as contorções abdominais induzidas pela Big ET-1, mas não aquelas causadas pela ET-1, foram inibidas com o uso do fosforamidon (Raffa e Jacoby, 1991). Os autores sugeriram que a Big ET-1 deveria ser clivada enzimaticamente, possivelmente convertida em ET-1, para tornar-se ativa. O segundo trabalho confirmou que a nocicepção visceral evocada pela Big ET-1 poderia ser suprimida pelo fosforamidon, sendo que o uso de inibidores da ECA e bombesina não foram capazes de inibir as contorções abdominais (Raffa *et al.*, 1996). De forma interessante, o estudo evidenciou ainda que o inibidor da NEP tiorfano diminuiu significativamente a nocicepção induzida pela Big ET-1. Porém, esse efeito analgésico do tiorfano foi atribuído à sua ação inibidora sobre as encefalinases, o que resultaria em aumento dos níveis de encefalinas, peptídeos opióides com atividade antinociceptiva (Raffa *et al.*, 1996). Resultados similares a estes foram obtidos no presente estudo. A Big ET-1, quando injetada por via i.pl. em camundongos, foi capaz de causar uma nocicepção declarada sensível à inibição pelo tratamento prévio com fosforamidon. Contudo, ao contrário do observado por Raffa e colaboradores (1996), no presente estudo o tiorfano não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela Big ET-1 com o protocolo utilizado. Nossos achados indicam que a nocicepção desencadeada pela injeção i.pl. de Big ET-1 na pata posterior de camundongos é dependente da

conversão deste peptídeo em ET-1 pela ação da ECE, mas não pela NEP, pelo menos neste modelo experimental.

Os efeitos nociceptivo declarado e hipernociceptivo mecânico induzidos pela ET-1(1-31) nunca haviam sido estudados anteriormente. Conforme já comentado na Introdução, existem ainda dúvidas se a ET-1(1-31) pode exercer os seus efeitos de maneira direta ou indireta. Alguns estudos têm demonstrado que a ET-1(1-31) apresenta atividade *per se*, sem necessidade de ser convertida em ET-1. Em células musculares lisas de artéria coronária humana, a ET-1(1-31) parece capaz de agir diretamente, visto que nem o fosforamidon ou o tiorfano foram capazes de alterar o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular induzido por este peptídeo (Inui *et al.*, 1999). O mesmo trabalho verificou ainda, que esse aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular causado pela ET-1(1-31) foi inibido com o uso de BQ-123, indicando o envolvimento de receptores ET_A neste efeito em células musculares lisas de artéria coronária humana (Inui *et al.*, 1999). Em um outro estudo, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) tipo sanduíche, foram encontrados maiores quantidades de ET-1(1-31) em relação à ET-1 em granulócitos humanos (Okishima *et al.*, 1999). Ainda neste sentido, Cui e colaboradores (2001), constataram que a ET-1(1-31) possui maior atividade quimiotática do que a ET-1 para neutrófilos e monócitos humanos, sendo que estes efeitos não foram suprimidos pelo fosforamidon, mas inibidos pela imunodepleção da ET-1(1-31), sugerindo que esse peptídeo seja capaz de induzir quimiotaxia diretamente. É importante ressaltar que, em um processo inflamatório, os neutrófilos são as principais células envolvidas na fase aguda, enquanto monócitos/macrófagos e alguns tipos de linfócitos são as principais células recrutadas nas fases mais tardias da inflamação (Huerre e Gounon, 1996). Alguns

estudos evidenciam que mediadores liberados por neutrófilos, como o produto 8R derivado da lipoxigenase-15 bem como o TNF α , podem contribuir para a hiperalgesia inflamatória (Levine *et al.*, 1985; Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Além disso, camundongos nocautes para o receptor CCR2, envolvido no recrutamento de monócitos, não desenvolveram alodínia mecânica em um modelo de dor neuropática (Abbadie *et al.*, 2003). Desse modo, a hipernocicepção mecânica evocada pela ET-1(1-31) poderia ser decorrente, ao menos em parte, desse efeito quimiotático. Contudo, neste estudo a hipernocicepção evocada pela ET-1(1-31) perdurou por menos tempo do que aquela evocada pela Big ET-1 e pela ET-1.

Nossos achados demonstram ainda que a ET-1(1-31) é capaz de causar nocicepção declarada quando injetada por via i.pl. em camundongos, porém esse comportamento parece ser dependente da conversão desse peptídeo em ET-1, visto que este efeito foi abolido pelo tiorfano e parcialmente bloqueado pelo fosforamidon. Como o tiorfano foi capaz de abolir a ação nociceptiva da ET-1(1-31), sugere-se que essa atividade dependa de um mecanismo que requer atuação da NEP. Esses achados corroboram os estudos realizados em anéis de aorta de coelhos, onde tanto o tiorfano quanto o fosforamidon, mas não o CGS35066, um inibidor seletivo da ECE, foram capazes de inibir a contração desencadeada pela ET-1(1-31) (Tirapelli *et al.*, 2006).

É interessante observar ainda que a curva dose-resposta obtida para a ET-1(1-31) apresentou um coeficiente angular menor (ou seja, foi menos inclinada) do que aquelas obtidas para os efeitos nociceptivos declarados da Big ET-1 ou da ET-1. Esse fato talvez possa ser atribuído a restrições na disponibilidade de NEP para atuação sobre seu substrato ET-1(1-31), convertendo este último em ET-1, ou ainda devido à ativação seletiva da produção de opióides endógenos pelos queratinócitos.

Neste sentido, Khodorova e colaboradores (2003) demonstraram que a ET-1 pode ativar receptores ET_B localizados em queratinócitos, levando à liberação do opióide β-endorfina. Uma vez liberado, este opióide pode atuar em receptores opióides μ e κ, os quais estão localizados nas terminações nervosas dos neurônios sensoriais, levando à hiperpolarização destas células e, conseqüentemente, à diminuição da sua excitabilidade. Estudo desenvolvido recentemente neste laboratório (Fernandes, 2006) também já demonstrou que a injeção i.pl. de SRTX S6c, um agonista seletivo de receptores ET_B, causou hiperalgesia à formalina e à capsaicina, bem como alodínia mecânica, porém as curvas dose-resposta para estes efeitos apresentaram formato de sino, ou seja, doses mais elevadas foram menos efetivas em causar hipernocicepção química ou mecânica do que doses menores. Contudo, essas mesmas doses elevadas de SRTX S6c apresentaram efeito hipernociceptivo quando administradas juntamente com naltrexona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, indicando que os efeitos hipernociceptivos induzidos pela ativação de receptores ET_B é influenciado por um mecanismo analgésico envolvendo o acionamento de um sistema opióide local. Como queratinócitos expressam níveis apreciáveis de NEP (Orelud *et al.*, 1999), a administração i.pl. de ET-1(1-31) poderia estar favorecendo a sua hidrólise para ET-1 especialmente nas imediações dos queratinócitos. Deste modo, talvez possa haver formação de ET-1 em um microdomínio tissular que pudesse favorecer sua atuação sobre os receptores ET_B localizados nestas células, promovendo a liberação de opióides. Por sua vez, ao atuarem sobre as fibras nociceptivas, os opióides liberados se contraporiam com os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1. Porém, são necessários experimentos adicionais para confirmarem essas suposições.

Poderia se aventar a possibilidade de que os efeitos antinociceptivos mediados pelo tiorfano e o fosforamidon seriam devidos às suas ações inibitórias sobre as encefalinases, conforme sugerido por Raffa e Jacoby (1996). A NEP, inicialmente batizada como encefalinase, é a principal enzima responsável pela degradação das encefalinas (Roques *et al.*, 1980; Matsas *et al.*, 1983). Sabe-se que, embora as ações das encefalinas ocorram principalmente no SNC, estes opióides endógenos são também encontrados em células inflamatórias, tais como os leucócitos, podendo assim exercer efeitos periféricamente (para revisão ver Machelska, 2007). Entretanto, a inibição da degradação das encefalinas não parece ter exercido nenhum efeito analgésico, visto que não foi verificada qualquer alteração na intensidade da nocicepção declarada induzida pela ET-1 em animais pré-tratados com tiorfano ou fosforamidon. A NEP também é a principal enzima responsável pela degradação da ET-1 (Vijayaraghavan *et al.*, 1990) e da substância P em alguns tecidos (Sekizawa *et al.*, 1987). No entanto, a diminuição da degradação dessas substâncias não parece ter influenciado a resposta nociceptiva declarada evocada por qualquer uma das ETs, visto que as mesmas não foram potencializadas pelo tratamento prévio com tiorfano ou fosforamidon. Porém, embora não tenha sido verificada uma potencialização da nocicepção declarada com o uso desses inibidores enzimáticos da NEP, o mesmo não pode ser dito em relação à hipernocicepção. Interessantemente, o pré-tratamento dos animais com o tiorfano ou fosforamidon não foi capaz de evitar a redução do limiar mecânico em nenhuma das ETs testadas (dados não mostrados). Pelo contrário, os camundongos que foram pré-tratados com esses inibidores, também apresentaram uma redução significativa do limiar de reatividade ao estímulo mecânico (dados não mostrados).

Resta ainda investigar os mecanismos responsáveis por essa redução significativa do limiar mecânico dos animais tratados com esses inibidores.

A quimostatina, um inibidor não seletivo da enzima quimase, não foi capaz de exercer qualquer ação sobre a nocicepção declarada induzida pela ET-1 ou pela Big ET-1, quando estas foram administradas isoladamente. Essa inatividade da quimostatina pode ser explicada pelo fato das enzimas quimases serem expressas praticamente apenas em mastócitos. Embora existam algumas evidências da expressão destas enzimas em musculatura lisa, apenas os mastócitos são capazes de acumular quimases em seus grânulos secretores (para revisão ver Caughey, 2007). Quando mastócitos localizados na pata de camundongos foram ativados, seja por injeção i.p. de composto 48/80 ou de OVA, a quimostatina foi capaz de exercer efeitos antinociceptivos, demonstrando que a ação desta enzima é dependente da ativação dos mastócitos. Porém, permanece a ser investigado se os efeitos da quimostatina seriam influenciados pelo tratamento combinado com algum inibidor seletivo da ECE, ou seja, da enzima envolvida na via preponderante de síntese de ET-1 nesse modelo. Em um estudo analisando a contração de aorta de coelhos, a geração de ET-1(1-31) envolvendo a participação das quimases, só foi capaz de ser verificada quando a quimostatina foi associada com fosforamidon, o inibidor dual de ECE e NEP (Tirapelli *et al.*, 2006). No entanto, vale ressaltar que, naquele estudo, a atividade enzimática da quimase na aorta foi menor do que àquela encontrada no coração, pulmão, rim e fígado de coelhos, sugerindo que a produção de ET-1(1-31) seja mais importante nestes últimos órgãos.

No presente estudo foram utilizados dois modelos de degranulação mastocitária, o primeiro induzido por composto 48/80 e o segundo por OVA. Estes agentes são capazes de degranular mastócitos por diferentes mecanismos. O

composto 48/80 constitui um estímulo não imunológico de degranulação, sendo seu mecanismo de ação dependente da ativação direta de subunidades α da proteína $G_{i/o}$, levando a uma rápida liberação de histamina por exocitose e a um aumento transitório nas concentrações de IP_3 (Suzuki-Nishimura *et al.*, 1995). Já a ação degranulatória da OVA, claramente envolve mecanismos imunológicos, mediados por formação e fixação mastocitária de imunoglobulinas (IgE), a partir da primeira exposição a este antígeno (i.e. sensibilização prévia dos animais). Uma vez ocorrido o processo de sensibilização, a re-exposição à OVA permite sua interação com as IgE que irão ligar-se em receptores $Fc\epsilon RI$ presentes na membrana dos mastócitos, com conseqüente liberação de seus mediadores (Marshall, 2004). Após esta ocupação de alta afinidade, ocorre liberação de mediadores pró-inflamatórios como histamina e triptases e a síntese *de novo* de mediadores, além da liberação de prostaglandinas e leucotrienos (para revisão ver Maurer *et al.*, 2003).

Em geral, os mastócitos podem ser ativados por mecanismos diretos e indiretos. Interações diretas incluem os eventos mediados principalmente por receptores *toll-like* (TLR), os quais normalmente não resultam em degranulação dos mastócitos, mas aumentam seletivamente sua capacidade de produzir algumas citocinas pró-inflamatórias de acordo com o estímulo ativador (Marshall, 2004). Por exemplo, o vírus da dengue estimula mastócitos humanos a produzirem pequenas quantidades de IL-1 β e IL-6 e de quantidades substanciais do ligante 5 da quimiocina-CC (CCL5), mas não aumenta a produção do GM-CSF ou do ligante 8 da quimiocina-CX (CXCL8) (King *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002). Em contraste, mastócitos humanos estimulados com *Pseudomonas aeruginosa* aumentam acentuadamente a sua produção de CCL20, IL- α , IL-1 β , CXCL8 e GM-CSF, mas não aumentam significativamente as quantidades de CCL5 (Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*,

2003). Estas interações diretas entre patógenos e mastócitos são cruciais no contexto de defesa contra infecções primárias e condizem com o papel de sentinelas atribuído a estas células. Uma situação que não pode deixar de ser mencionada de ativação direta de mastócitos e conseqüente proteção do hospedeiro, se dá entre o componente mais tóxico do veneno da *Atractaspis engaddensis* (serpente do Oriente Médio), as SRTXs, e os receptores ET_A, presentes na membrana dos mastócitos. As SRTXs possuem homologia estrutural com a ET-1 de cerca de 70%. As taxas de mortalidade e de hipotermia após repetidas administrações de SRTX S6b são significativamente maiores em camundongos que não expressam mastócitos ou naqueles desprovidos de receptores ET_A, indicando que a ativação dos mastócitos via receptores ET_A pelas SRTXs é fundamental para diminuir a toxicidade do veneno (Metz *et al.*, 2006).

Exemplos da ativação indireta dos mastócitos incluem ativações mediadas via receptor FcεRI ou via receptores do complemento. A ativação dos mastócitos via receptores FcεRI leva à sua degranulação e à liberação de múltiplos mediadores. Já os receptores do complemento parecem causar degranulação principalmente pela ativação do receptor C5a (Marshall, 2004).

Populações distintas de mastócitos, bem como estágios diferenciados de maturação, também evocam respostas diferentes frente ao estímulo com ET-1. Mastócitos derivados da pele de feto (FSMC) em cultura expressam RNA_m tanto para receptores ET_A quanto para receptores ET_B, enquanto que mastócitos derivados da medula óssea (BMMC) em cultura expressam baixos níveis de RNA_m para receptores ET_A e praticamente nenhuma expressão de receptores ET_B (Matsushima *et al.*, 2004). Neste estudo, a ET-1 foi capaz de induzir degranulação dos FSMC, mas não dos BMMC, e este efeito foi mediado via ativação de receptores

ET_A. Além disso, a ET-1 induziu a liberação de TNF α e IL-6 dos FSMC, mas não dos BMMC. Por fim, a ET-1 foi produzida por FSMC, mas tal efeito não foi observado em BMMC em resposta a diferentes ligantes dos TLR (Matsushima *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, a administração isolada de Big ET-1 foi capaz de causar nocicepção declarada, a qual pareceu depender da sua conversão no peptídeo funcional ET-1 por ação de uma ECE, já que esse efeito foi inibido pelo fosforamidon, mas não pelo tiorfano ou pela quimostatina. A injeção de composto 48/80 ou de OVA também foram capazes de causar nocicepção declarada de maneira dose-dependente. Estudos sugerem que a resposta nociceptiva induzida pela ativação de mastócitos é mediada principalmente pela liberação de histamina e TNF α (Sorkin *et al.*, 1997; Mizumura *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2001). Porém, como a ativação de mastócitos acarreta liberação de quimases, procuramos investigar se a administração combinada de Big ET-1 mais um degranulador de mastócitos resultaria em uma resposta nociceptiva declarada aumentada, por propiciar a conversão de Big ET-1 em ET-1(1-31). De fato, observou-se que a associação de doses baixas de composto 48/80 ou de OVA (em camundongos sensibilizados) com Big ET-1 em uma única injeção i.pl. causou potencialização significativa da resposta nociceptiva em relação ao grupo controle ou aos grupos que foi feita administração isolada de cada uma destas substâncias. Teoricamente, esta potencialização poderia ter ocorrido tanto por mecanismos isolados entre si, ou seja, cada substância teria agido de maneira distinta e os seus efeitos somar-se-iam, ou por uma ação sinérgica, como por exemplo, através da ação de quimases sobre a Big ET-1, envolvendo a formação do intermediário ET-1(1-31) e por fim, a síntese do peptídeo ativo ET-1. Para se poder discernir entre estas duas hipóteses, avaliou-se a influência dos inibidores enzimáticos tiorfano (da NEP), quimostatina (da quimase)

e fosforamidon (da NEP e da ECE) na nocicepção declarada induzida pela associação de composto 48/80 ou OVA com Big ET-1, a fim de verificar a participação das enzimas quimase, NEP e ECE.

Os resultados obtidos empregando ambos os modelos de ativação mastocitária foram bastante semelhantes. A quimostatina, que não havia exercido qualquer efeito sobre a nocicepção induzida pela ação isolada da ET-1 ou da Big ET-1, foi capaz de inibir a nocicepção causada pela associação de composto 48/80 ou OVA com a Big ET-1. Estes dados parecem indicar que as quimases somente podem atuar sobre a Big ET-1 exógena para contribuir à nocicepção causada por esta última quando ocorre ativação dos mastócitos. Dito de outra forma, este resultado sugere que as quimases estariam exercendo uma ação potencializadora sobre as ações da Big ET-1, através da sua capacidade em clivar este peptídeo em ET-1(1-31). Assim, a ativação de mastócitos através de mecanismos imunológicos ou não imunológicos, habilita uma rota biossintética alternativa importante pela qual o precursor da ET-1 causa nocicepção.

No entanto, é relevante ressaltar que o tratamento de camundongos com tiorfano na dose de 300 nmol, antes da administração i.pl. combinada de Big ET-1 com composto 48/80 ou com OVA, não alterou a magnitude da nocicepção declarada. Por outro lado, o tratamento prévio com uma dose maior de tiorfano (1000 nmol) inibiu marcadamente a nocicepção declarada induzida pela associação de Big ET-1 com composto 48/80. Pode-se inferir que o motivo pelo qual apenas a maior dose de tiorfano foi capaz de reduzir a nocicepção desencadeada pela associação de composto 48/80 e Big ET-1, ao contrário do verificado no experimento no qual foi injetada apenas ET-1(1-31), foi a disponibilização de ET-1(1-31) no tecido pela ativação mastocitária, o que causou uma diferente cinética de inibição da NEP.

Estes resultados com a dose maior de tiorfano fomentam a nossa hipótese de que a síntese do peptídeo intermediário ET-1(1-31) seria uma rota alternativa importante na nocicepção desencadeada pela associação de Big ET-1 e composto 48/80. Permanece a ser investigado se o mesmo se aplica à situação na qual a Big ET-1 é injetada juntamente com a OVA em camundongos previamente sensibilizados ao antígeno. Em adição, o fosforamidon também foi capaz de causar inibição da nocicepção induzida tanto pela associação de Big ET-1 com composto 48/80, quanto com OVA.

Ao contrário dos nossos resultados, um outro estudo verificou que a contração induzida pela adição de Big ET-1 em traquéia isolada de camundongos que haviam sido previamente sensibilizadas à OVA não foi afetada pela incubação com quimostatina ou com o inibidor da NEP CGS24592 (De Campo *et al.*, 2002). Embora as traquéias dos animais sensibilizados possuíssem 40% a mais de mastócitos em relação aos falso-sensibilizados, essa contração só foi diminuída pelo inibidor da ECE CGS35066. Dessa maneira, os autores concluíram que quimases derivadas de mastócitos não processavam Big ET-1 de maneira significativa nas vias aéreas de camundongos alérgicos (De Campo *et al.*, 2002). Porém, esta conclusão não parece aplicar-se ao sistema pulmonar de outras espécies. Em um estudo utilizando o método de ELISA tipo sanduíche, foi verificado que amostras de pulmão humano apresentavam níveis significantes de ET-1(1-31), embora estes fossem inferiores aos níveis de ET-1 (Okishima *et al.*, 2001). Outro estudo verificou que, em pulmão perfundido de cobaias, o tiorfano foi capaz de abolir a liberação de eicosanóides induzida tanto por ET-1(1-31), quanto por Big ET-1, indicando a existência da ET-1(1-31) na vasculatura pulmonar de cobaias (Plante *et al.*, 2002).

Como já referido na Introdução, algumas sub-populações de mastócitos também sintetizam ET (Ehrenreich *et al.*, 1992). Neste sentido, alguns estudos demonstraram que reações imunes mediadas por antígeno são capazes de ativar um componente endotelinérgico em diferentes modelos. Dessa maneira, a imunoreatividade para ETs encontrou-se aumentada no plasma (Filep *et al.*, 1993) e nas vias aéreas (Kizawa *et al.*, 1999) em resposta ao desafio com OVA em cobaias previamente sensibilizadas a este antígeno. Observou-se ainda, num modelo de inflamação alérgica, que um antagonista misto de receptores ET_A/ET_B ou um antagonista seletivo para receptores ET_A foi capaz de reduzir significativamente o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e a infiltração de neutrófilos nos pulmões de camundongos sensibilizados expostos à OVA (Fujitani *et al.*, 1997). Resultados semelhantes foram obtidos por Sampaio e colaboradores (2000), os quais demonstraram que o influxo de leucócitos, predominantemente de células mononucleares e eosinófilos, induzidos por administração de OVA na pleura destes animais, foi bloqueado por antagonistas de receptores ET_A , mas não por antagonistas de receptores ET_B . Um estudo prévio do nosso laboratório demonstrou pela primeira vez que ETs endógenas, liberadas em resposta a reações imunes, também contribuíam para a nocicepção declarada induzida por ativação de mastócitos (Piovezan *et al.*, 2004).

Nossos dados corroboram parcialmente os resultados obtidos por Piovezan e colaboradores (2004), os quais demonstraram que a resposta nociceptiva à OVA em animais sensibilizados é sensível ao bloqueio com BQ-123 ou com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B , em doses que não alteravam a nocicepção declarada induzida pelo composto 48/80. Esta discrepância nos dados pode ser justificada pelas doses empregadas em cada estudo. Enquanto Piovezan e colaboradores

(2004) utilizaram apenas a dose de 3 nmol, tanto para o BQ-123 quanto para o BQ-788, a dose utilizada no nosso estudo que apresentou efeito antinociceptivo significativo foi de 10 nmol.

Embora o papel antinociceptivo dos antagonistas de receptores ET_A esteja cada vez mais evidenciado e documentado em trabalhos científicos, o papel dos antagonistas de receptores ET_B precisa ainda ser melhor esclarecido. Alguns estudos, conforme já comentado na Introdução, demonstraram uma ação anti-nociceptiva de agonistas de receptores ET_B, porém os resultados obtidos no presente estudo com o BQ-788 constataram uma ação pró-nociceptiva destes receptores na nocicepção evocada pela OVA. Alguns trabalhos corroboram os nossos dados. De-Melo e colaboradores (1998), por exemplo, demonstraram um importante papel da ativação dos receptores ET_B na nocicepção articular de ratos desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* no joelho previamente sensibilizado com carragenina. Outro estudo demonstrou que camundongos nocaute para os receptores ET_B são muito menos sensíveis à estimulação inflamatória (injeção i.p. de fenilbenzoquinona), embora mantenham a sensibilidade à estimulação térmica no modelo da placa quente (Griswold *et al.*, 1999). Por fim, Chichorro e colaboradores (2006) verificaram que a administração sistêmica do antagonista do receptor ET_B, A-192621, foi capaz de reduzir a alodínia mecânica na face de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática trigeminal. No nosso estudo, a inibição da nocicepção induzida pelo antagonista ET_B foi verificada nos animais que receberam injeção i.pl. de OVA, mas não naqueles que receberam composto 48/80. Essa diferença pode ser atribuída aos distintos mecanismos pelos quais a OVA e o composto 48/80 ativam os mastócitos, como já discutido anteriormente. Já foi demonstrado, por exemplo, que o arsenal de

mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos da pele em resposta ao composto 48/80 é diferente daquele liberado após exposição a antígeno (Church *et al.*, 1991).

A nocicepção declarada induzida pelo composto 48/80 ou pela OVA também foi inibida pela quimostatina. As quimases são serina-endopeptidases com atividade do tipo quimo tripsina, ou seja, são enzimas dependentes do resíduo de serina na sua molécula para exercerem sua atividade catalítica. Estas enzimas são propensas a quebrar internamente peptídeos e proteínas em porções que apresentam aminoácidos aromáticos, especialmente tirosina e fenilalanina (Caughey, 2007). Em um notável trabalho, Maurer e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos nocautes para mastócitos apresentavam hipotermia, diarreia e taxa de mortalidade mais elevadas que camundongos *wild type* em resposta à administração i.p. de ET-1, indicando que os mastócitos protegem os animais contra a toxicidade induzida pelas ETs. O trabalho demonstrou ainda que animais *wild type* pré-tratados com quimostatina e que receberam injeção i.p. de ET-1 desenvolveram hipotermia, diarreia e taxa de mortalidade significativamente maiores do que aqueles pré-tratados com veículo, sugerindo que as quimases contribuem significativamente para a degradação da ET-1 induzida por mastócitos. Por outro lado, um estudo recente demonstrou que camundongos geneticamente manipulados para não apresentarem atividade catalítica da carboxipeptidase-A (CPA), são mais sensíveis aos efeitos deletérios da ET-1 ou da SRTX S6b (Schneider *et al.*, 2007). A CPA é uma enzima específica de mastócitos relacionada com a carboxipeptidase pancreática, a qual cliva preferencialmente aminoácidos aromáticos C-terminais (Serafin *et al.*, 1987). Neste sentido, o estudo de Schneider e colaboradores (2007) demonstrou que a CPA era capaz de clivar de

um a dois aminoácidos C-terminais da ET-1, e que essa clivagem era a responsável pela inativação da ET-1, ao contrário do estudo anterior do grupo de Maurer (2004), que atribuiu esta inativação da ET-1 às quimases. Corroborando estes resultados, Metz e colaboradores (2006) verificaram que quando camundongos eram pré-tratados com um inibidor de CPA e recebiam uma injeção de SRTX S6b, estes exibiam severa hipotermia, maior taxa de mortalidade e concentrações de SRTX S6b no peritônio mais elevadas em relação ao grupo que havia recebido veículo. Porém, camundongos nocautes para a quimase-4 e o seu respectivo controle não apresentaram diferença significativa entre a queda da temperatura quando se administrava ET-1 e SRTX S6b, além de que, todos os animais envolvidos neste experimento sobreviveram (Metz *et al.*, 2006). No presente estudo também não se obteve indícios da inativação dos efeitos da ET por parte da quimase. Pelo contrário, ao inibir as quimases com quimostatina, verificamos uma diminuição da nocicepção declarada induzida pela OVA e pelo composto 48/80, tanto quando estes foram injetados de modo isolado ou associados com a Big ET-1.

Como as quimases são enzimas multifuncionais, pode-se aventar a possibilidade de que o efeito antinociceptivo induzido pela inibição desta enzima pode ter sido evocado por mecanismos não relacionados com a via de síntese alternativa da ET-1. Já foi previamente demonstrado que a inibição da quimase é capaz de inibir a liberação de histamina dependente de IgE (He *et al.*, 2001), além de inibir a liberação de histamina em cultura de mastócitos de pele humana (Walter *et al.*, 1996). Experimentos *in vitro* com quimases isoladas de mastócitos humanos demonstraram também que estas são um potente e seletivo quimioatraente para monócitos e neutrófilos, os quais, como citado anteriormente, podem estar envolvidos com quadros dolorosos (Tani *et al.*, 2000). Porém, o fato do tempo de

lambida induzido por doses elevadas de composto 48/80 ter sido significativamente inibido pelo tiorfano, favorece a possibilidade de que a formação do precursor ET-1(1-31) seja uma importante via de síntese de ET-1, contribuindo para a manifestação da nocicepção declarada induzida por degranulação de mastócitos.

O valor preditivo de resultados obtidos com experimentos envolvendo quimases em roedores para as funções desempenhadas por estas enzimas em humanos é limitada. Enquanto este é o principal grupo de proteases presentes em mastócitos de roedores, em humanos os diferentes tipos de quimases estão confinadas a subtipos de mastócitos (MC_{TC} ou MC_{CC}) e talvez algumas células vasculares endoteliais. Nenhuma das quimases de roedores assemelham-se às quimases humanas em relação à seqüência de aminoácidos, exceto a quimase-5 de camundongos (para revisão ver Welle, 1997). Interessantemente, a quimase-5 é precisamente a enzima responsável por clivar a Big ET-1 nas porções Tirosina³¹-Glicina³² e conseqüentemente gerar ET-1(1-31) em camundongos (Nakano *et al.*, 1997). Alguns estudos clínicos já estão relacionando a presença da ET-1(1-31) com determinadas patologias em humanos. Suzaki e colaboradores (2003), por exemplo, usando o ensaio ELISA tipo sanduíche, verificaram que os níveis de ET-1(1-31) e de ET-1 estavam significativamente aumentados no plasma de pacientes com aneurisma de aorta abdominal quando comparados com os níveis detectados em voluntários saudáveis.

O uso do fosforamidon foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela OVA, mas não pelo composto 48/80. O fato do fosforamidon não ter exercido nenhuma ação sobre a nocicepção evocada pelo composto 48/80 isoladamente talvez possa ser atribuído, conforme já discutido anteriormente, a diferenças no mecanismo de ativação dos mastócitos e conseqüente liberação de distintas substâncias por parte

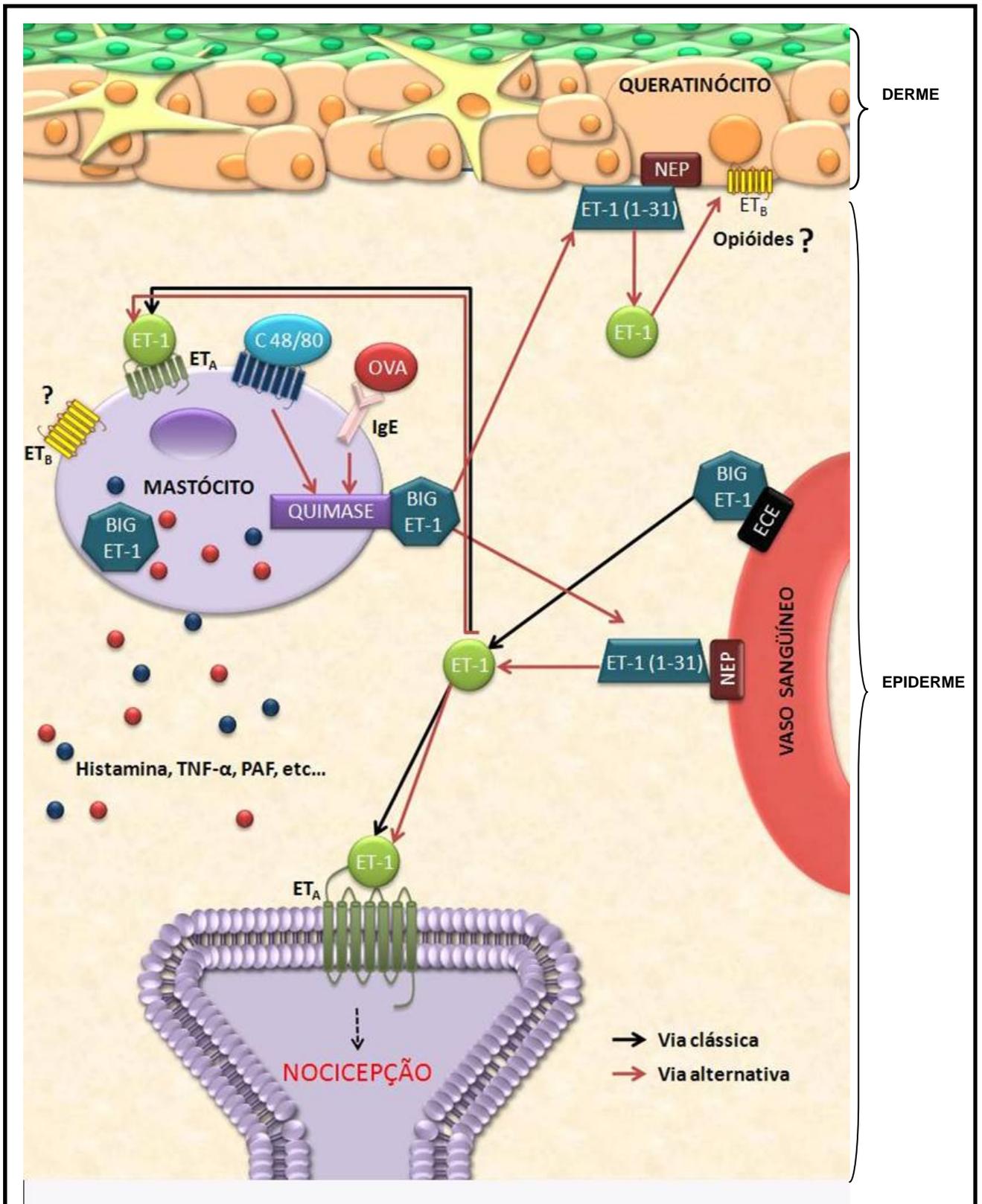
do composto 48/80 e da OVA. Sabe-se que a ativação dos mastócitos por mecanismos independentes de IgE podem induzir a liberação de mediadores e/ou citocinas que diferem na composição, magnitude e/ou cinética daqueles induzidos pela IgE e antígeno na mesma população de mastócitos (para revisão ver Maurer *et al.*, 2003). Pode-se notar, por exemplo, que a intensidade da nocicepção induzida pela OVA foi maior que aquela induzida pelo composto 48/80. Dessa maneira, a ativação dos mastócitos por mecanismos dependente e independente de IgE, pode ter levado a liberação de diferentes concentrações de Big ET-1 ou ET-1 (1-31) no tecido, o que levou à diferenças na farmacocinética de inibição da ECE/NEP pelo fosforamidon entre estes estímulos. O fato do fosforamidon só ter inibido a nocicepção evocada pela associação de composto 48/80 e Big ET-1, mas não de composto 48/80 isolado, também possa talvez ser explicado por diferenças farmacocinéticas na inibição da ECE/NEP, devido às diferentes concentrações de ETs no tecido induzida por esses dois modelos. Talvez uma dose maior de fosforamidon fosse capaz de inibir a nocicepção evocada pelo composto 48/80 isoladamente.

Outra interessante questão diz respeito à presença da ECE em mastócitos. A literatura carece de trabalhos demonstrando a presença desta enzima em mastócitos. Dessa maneira, como os métodos de detecção de ET-1 muitas vezes não são precisos, surge a dúvida se é realmente a ET-1 a ET presente em mastócitos. Já foi verificado que quando a ET-1 é hidrolisada internamente, as suas pontes dissulfeto podem continuar mantendo a estrutura de 21 aminoácidos, embora esta mudança conformacional da molécula não seja detectável pelo método de ELISA, além do que, não se sabe ainda se essa alteração é capaz de inativar o peptídeo (Schneider *et al.*, 2007). Deve-se estar atento também à metodologia

aplicada em imunoenaios que visam detectar diferentes concentrações destes peptídeos, pois muitas vezes ocorre reatividade cruzada entres os mesmos (Okishima *et al.*, 1999). Dessa maneira, os resultados obtidos no presente estudo sugerem fortemente que os mastócitos estejam contribuindo para o aumento das concentrações tissulares de ET-1 não através da via sintética operada pela ECE, mas sim pela conversão da Big ET-1 em ET-1(1-31), através da ação de suas quimases. Entretanto, deve-se deixar claro que a comprovação desta hipótese ainda requer a realização de estudos complementares que façam uso de metodologias analíticas mais refinadas.

Por fim, este trabalho verificou que a ET-1(1-31) é capaz de causar nocicepção quando injetada por via i.pl. em camundongos, porém este comportamento parece ser dependente da sua conversão em ET-1 por ação da NEP. Nossos resultados com os inibidores enzimáticos quimostatina, tiorfano e fosforamidon também sugerem fortemente que a ET-1(1-31) é sintetizada endogenamente e participa da nocicepção induzida pela ativação de mastócitos. Porém, são necessárias evidências adicionais para definir se a nocicepção declarada mediada pela síntese do intermediário ET-1(1-31) tem caráter protetor, patológico ou ambos. Embora alguns trabalhos demonstrem que a ativação dos mastócitos via receptores ET_A é fundamental para liberação de importantes mediadores contra bactérias e venenos (Maurer *et al.*, 2004; Metz *et al.*, 2006), outros demonstram que ETs e mastócitos estão envolvidos em doenças vasculares, inflamatórias e fibróticas (Matsushima *et al.*, 2004). De qualquer forma, a literatura tem demonstrado que em várias patologias (e.g. diabetes, câncer, doenças vasculares) são encontrados níveis elevados de ET-1. Dessa maneira, inibidores enzimáticos da síntese de ET-1 podem vir a ser importantes ferramentas

farmacológicas em combinação com antagonistas de receptores de ET-1. Entre as enzimas que estão envolvidas neste processo, a ECE merece uma atenção especial, visto que esta enzima tem uma ação preponderantemente seletiva sobre a Big ET-1, interferindo insignificamente no metabolismo de outros peptídeos. Porém, é possível que a via de síntese controlada pela ECE não constitua sempre a rota de síntese preponderante das ETs em todas as situações.



Esquema 2: Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na nocicepção induzida pelas ETs e mastócitos na pata de camundongos.

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo, obtidos a partir da injeção i.pl. de ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 na pata de camundongos, nos permitem concluir que:

- A ET-1, ET-1(1-31) e Big ET-1 causam nocicepção declarada e hipernocicepção mecânica de maneira dose-dependente;
- Os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1(1-31) possivelmente são dependentes da sua conversão em ET-1 pela NEP;
- Na ausência de degranulação significativa de mastócitos, os efeitos nociceptivos induzidos pela Big ET-1 parecem depender da sua conversão em ET-1 pela via clássica mediada pela ECE;
- A ativação de mastócitos parece possibilitar o surgimento de uma via alternativa de síntese de ET-1, envolvendo a formação do peptídeo intermediário ET-1(1-31) para posterior conversão em ET-1 pela NEP;
- A nocicepção declarada induzida por Big ET-1 é potencializada pela sua associação com composto 48/80 ou OVA, sendo que parte dessa potencialização parece depender da via alternativa de síntese de ET-1, a qual envolve a formação do intermediário ET-1(1-31);
- A via de síntese alternativa de ET-1 parece contribuir para a nocicepção induzida pela ativação dos mastócitos.

7. Referências Bibliográficas

Abassi, Z. A.; Tate, J. E.; Golomb, E.; Keiser, H. R. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. **Hypertension**, v.20, n.1, p.89-95. 1992.

Abbadie, C.; Lindia, J. A.; Cumiskey, A. M.; Peterson, L. B.; Mudgett, J. S.; Bayne, E. K.; Demartino, J. A.; Macintyre, D. E.; Forrest, M. J. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.13, p.7947-52. 2003.

Ahmed, S. I.; Thompson, J.; Coulson, J. M.; Woll, P. J. Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.22, n.4, p.422-31. 2000.

Alanen, K.; Deng, D. X.; Chakrabarti, S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. **Histopathology**, v.36, n.2, p.161-7. 2000.

Almeida, T. F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v.1000, n.1-2, p.40-56. 2004.

Anggard, E.; Galton, S.; Rae, G.; Thomas, R.; Mcloughlin, L.; De Nucci, G.; Vane, J. R. The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.13 Suppl 5, p.S46-9; discussion S74. 1989.

Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, v.348, n.6303, p.730-2. 1990.

Aramori, I.; Nakanishi, S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. **J Biol Chem**, v.267, n.18, p.12468-74. 1992.

Asham, E.; Shankar, A.; Loizidou, M.; Fredericks, S.; Miller, K.; Boulos, P. B.; Burnstock, G.; Taylor, I. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. **Br J Cancer**, v.85, n.11, p.1759-63. 2001.

Ashburn, M. A.; Staats, P. S. Management of chronic pain. **Lancet**, v.353, n.9167, p.1865-9. 1999.

Berti-Mattera, L. N.; Garipey, C. E.; Burke, R. M.; Hall, A. K. Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. **Exp Neurol**, v.201, n.2, p.399-406. 2006.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n.9164, p.1610-5. 1999.

Bienenstock, J.; Befus, D.; Denburg, J.; Goto, T.; Lee, T.; Otsuka, H.; Shanahan, F. Comparative aspects of mast cell heterogeneity in different species and sites. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v.77, n.1-2, p.126-9. 1985.

Blais, V.; Fugere, M.; Denault, J. B.; Klarskov, K.; Day, R.; Leduc, R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. **FEBS Lett**, v.524, n.1-3, p.43-8. 2002.

Caughey, G. H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immunol Rev**, v.217, p.141-54. 2007.

Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Pogrel, J. W.; Chung, J. M.; Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, n.1, p.55-63. 1994.

Chichorro, J. G.; Zampronio, A. R.; Rae, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.231, n.6, p.1136-40. 2006.

Church, M. K.; Okayama, Y.; El-Lati, S. Mediator secretion from human skin mast cells provoked by immunological and non-immunological stimulation. **Skin Pharmacol**, v.4 Suppl 1, p.15-24. 1991.

Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J. C.; Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, n.5, p.359-71. 2005.

Craig, A. D.; Dostrovsky, J. O. **Medulla to thalamus**. In: **WALL, P.D., MELZACK, R. (eds)**. Endiburgo: Churchill Livingstone. 1999. 183-214 p. (Textbook of pain)

Cui, P.; Tani, K.; Kitamura, H.; Okumura, Y.; Yano, M.; Inui, D.; Tamaki, T.; Sone, S.; Kido, H. A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes. **J Leukoc Biol**, v.70, n.2, p.306-12. 2001.

Cunha, T. M.; Verri, W. A., Jr.; Vivancos, G. G.; Moreira, I. F.; Reis, S.; Parada, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.3, p.401-7. 2004.

D'orleans-Juste, P.; Plante, M.; Honore, J. C.; Carrier, E.; Labonte, J. Synthesis and degradation of endothelin-1. **Can J Physiol Pharmacol**, v.81, n.6, p.503-10. 2003.

Dahlof, B.; Gustafsson, D.; Hedner, T.; Jern, S.; Hansson, L. Regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reaction. **J Hypertens**, v.8, n.9, p.811-7. 1990.

De-Melo, J. D.; Tonussi, C. R.; D'orleans-Juste, P.; Rae, G. A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, v.77, n.3, p.261-9. 1998.

De Campo, B. A.; Goldie, R. G.; Jeng, A. Y.; Henry, P. J. Role of endothelin-converting enzyme, chymase and neutral endopeptidase in the processing of big ET-1, ET-1(1-21) and ET-1(1-31) in the trachea of allergic mice. **Clin Sci (Lond)**, v.103 Suppl 48, p.353S-356S. 2002.

Dixon, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.20, p.441-62. 1980.

Eckman, E. A.; Watson, M.; Marlow, L.; Sambamurti, K.; Eckman, C. B. Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. **J Biol Chem**, v.278, n.4, p.2081-4. 2003.

Ehrenreich, H.; Burd, P. R.; Rottem, M.; Hultner, L.; Hylton, J. B.; Garfield, M.; Coligan, J. E.; Metcalfe, D. D.; Fauci, A. S. Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. **New Biol**, v.4, n.2, p.147-56. 1992.

Emoto, N.; Yanagisawa, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **J Biol Chem**, v.270, n.25, p.15262-8. 1995.

Fecteau, M. H.; Honore, J. C.; Plante, M.; Labonte, J.; Rae, G. A.; D'orleans-Juste, P. Endothelin-1 (1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration in vivo. **Hypertension**, v.46, n.1, p.87-92. 2005.

Fernandes, M. B. M. M. **Modulação da nocicepção em camundongos por receptores ET_B para endotelinas: envolvimento de mecanismos opióides.** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. 75 p.

Fernandez-Patron, C.; Radomski, M. W.; Davidge, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. **Circ Res**, v.85, n.10, p.906-11. 1999.

Ferreira, S. H.; Romitelli, M.; De Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.13 Suppl 5, p.S220-2. 1989.

Filep, J. G.; Telemaque, S.; Battistini, B.; Sirois, P.; D'orleans-Juste, P. Increased plasma levels of endothelin during anaphylactic shock in the guinea-pig. **Eur J Pharmacol**, v.239, n.1-3, p.231-6. 1993.

Fujitani, Y.; Trifilieff, A.; Tsuyuki, S.; Coyle, A. J.; Bertrand, C. Endothelin receptor antagonists inhibit antigen-induced lung inflammation in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v.155, n.6, p.1890-4. 1997.

Galli, S. J.; Maurer, M.; Lantz, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v.11, n.1, p.53-9. 1999.

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**, v.21, n.14, p.5358-66. 2001.

Griswold, D. E.; Douglas, S. A.; Martin, L. D.; Davis, T. G.; Davis, L.; Ao, Z.; Luttmann, M. A.; Pullen, M.; Nambi, P.; Hay, D. W.; Ohlstein, E. H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Mol Pharmacol**, v.56, n.4, p.807-12. 1999.

Hanson, G. C.; Andersson, K. E.; Gyllstedt, E.; Hogestatt, E. D.; Lindberg, B. F. Hydrolysis of big endothelin-1 by a serine protease in the membrane fraction of human lung. **Regul Pept**, v.68, n.1, p.63-9. 1997.

Hasegawa, H.; Hiki, K.; Sawamura, T.; Aoyama, T.; Okamoto, Y.; Miwa, S.; Shimohama, S.; Kimura, J.; Masaki, T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. **FEBS Lett**, v.428, n.3, p.304-8. 1998.

Hatanaka, K.; Kitamura, Y.; Maeyama, K.; Watanabe, T.; Matsumoto, K. Deciduoma formation in uterus of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. **Biol Reprod**, v.27, n.1, p.25-8. 1982.

Hayasaki-Kajiwara, Y.; Naya, N.; Shimamura, T.; Iwasaki, T.; Nakajima, M. Endothelin generating pathway through endothelin1-31 in human cultured bronchial smooth muscle cells. **Br J Pharmacol**, v.127, n.6, p.1415-21. 1999.

Haynes, W. G.; Webb, D. J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **Lancet**, v.344, n.8926, p.852-4. 1994.

He, S.; Gaca, M. D.; Walls, A. F. The activation of synovial mast cells: modulation of histamine release by tryptase and chymase and their inhibitors. **Eur J Pharmacol**, v.412, n.3, p.223-9. 2001.

Herbert, M. K.; Just, H.; Schmidt, R. F. Histamine excites groups III and IV afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neurosci Lett**, v.305, n.2, p.95-8. 2001.

Hoang, M. V.; Turner, A. J. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. **Biochem J**, v.327 (Pt 1), p.23-6. 1997.

Honore, J. C.; Plante, M.; Bkaily, G.; Rae, G. A.; D'orleans-Juste, P. Pressor and pulmonary responses to ET-1(1-31) in guinea-pigs. **Br J Pharmacol**, v.136, n.6, p.819-28. 2002.

Hopfner, R. L.; Gopalakrishnan, V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. **Diabetologia**, v.42, n.12, p.1383-94. 1999.

Huerre, M. R.; Gounon, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res Immunol**, v.147, n.7, p.417-34. 1996.

Hultner, L.; Ehrenreich, H. Mast cells and endothelin-1: a life-saving biological liaison? **Trends Immunol**, v.26, n.5, p.235-8. 2005.

Hunskar, S.; Fasmer, O. B.; Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Methods**, v.14, n.1, p.69-76. 1985.

Hunt, S. P.; Mantyh, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.2, p.83-91. 2001.

Ikeda, S.; Emoto, N.; Alimsardjono, H.; Yokoyama, M.; Matsuo, M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. **Biochem Biophys Res Commun**, v.293, n.1, p.421-6. 2002.

Inui, D.; Yoshizumi, M.; Okishima, N.; Houchi, H.; Tsuchiya, K.; Kido, H.; Tamaki, T. Mechanism of endothelin-1-(1-31)-induced calcium signaling in human coronary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v.276, n.6 Pt 1, p.E1067-72. 1999.

Jarvis, M. F.; Wessale, J. L.; Zhu, C. Z.; Lynch, 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**, v.388, n.1, p.29-35. 2000.

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-10. 2001.

Kakui, S.; Mawatari, K.; Ohnishi, T.; Niwa, Y.; Tanoue, N.; Harada, N.; Takahashi, A.; Izumi, K.; Nakaya, Y. Localization of the 31-amino-acid endothelin-1 in hamster tissue. **Life Sci**, v.74, n.11, p.1435-43. 2004.

Kasuya, Y.; Abe, Y.; Hama, H.; Sakurai, T.; Asada, S.; Masaki, T.; Goto, K. Endothelin-1 activates mitogen-activated protein kinases through two independent signalling pathways in rat astrocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.204, n.3, p.1325-33. 1994.

Kedzierski, R. M.; Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.851-76. 2001.

Kenny, A. J.; Stephenson, S. L. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. **FEBS Lett**, v.232, n.1, p.1-8. 1988.

Khan, Z. A.; Chakrabarti, S. Endothelins in chronic diabetic complications. **Can J Physiol Pharmacol**, v.81, n.6, p.622-34. 2003.

Khodorova, A.; Navarro, B.; Jouaville, L. S.; Murphy, J. E.; Rice, F. L.; Mazurkiewicz, J. E.; Long-Woodward, D.; Stoffel, M.; Strichartz, G. R.; Yukhananov, R.; Davar, G.

Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med**, v.9, n.8, p.1055-61. 2003.

Kido, H.; Nakano, A.; Okishima, N.; Wakabayashi, H.; Kishi, F.; Nakaya, Y.; Yoshizumi, M.; Tamaki, T. Human chymase, an enzyme forming novel bioactive 31-amino acid length endothelins. **Biol Chem**, v.379, n.7, p.885-91. 1998.

King, C. A.; Anderson, R.; Marshall, J. S. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. **J Virol**, v.76, n.16, p.8408-19. 2002.

King, C. A.; Marshall, J. S.; Alshurafa, H.; Anderson, R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **J Virol**, v.74, n.15, p.7146-50. 2000.

Kishi, F.; Minami, K.; Okishima, N.; Murakami, M.; Mori, S.; Yano, M.; Niwa, Y.; Nakaya, Y.; Kido, H. Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v.248, n.2, p.387-90. 1998.

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**, v.122, n.2, p.239-43. 1999.

Krishnaswamy, G.; Kelley, J.; Johnson, D.; Youngberg, G.; Stone, W.; Huang, S. K.; Bieber, J.; Chi, D. S. The human mast cell: functions in physiology and disease. **Front Biosci**, v.6, p.D1109-27. 2001.

Kurbel, S.; Kurbel, B.; Kovacic, D.; Sulava, D.; Krajina, Z.; Dmitrovic, B.; Sokcevic, M. Endothelin-secreting tumors and the idea of the pseudoectopic hormone secretion in tumors. **Med Hypotheses**, v.52, n.4, p.329-33. 1999.

Levin, E. R. Endothelins. **N Engl J Med**, v.333, n.6, p.356-63. 1995.

Levine, J. D.; Gooding, J.; Donatoni, P.; Borden, L.; Goetzl, E. J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **J Neurosci**, v.5, n.11, p.3025-9. 1985.

Lin, T. J.; Garduno, R.; Boudreau, R. T.; Issekutz, A. C. Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. **J Immunol**, v.169, n.8, p.4522-30. 2002.

Lin, T. J.; Maher, L. H.; Gomi, K.; Mccurdy, J. D.; Garduno, R.; Marshall, J. S. Selective early production of CCL20, or macrophage inflammatory protein 3alpha, by human mast cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v.71, n.1, p.365-73. 2003.

Loeser, J. D.; Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, n.9164, p.1607-9. 1999.

Lumpkin, E. A.; Caterina, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. **Nature**, v.445, n.7130, p.858-65. 2007.

Machelska, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. **Neuropeptides**, v.41, n.6, p.355-63. 2007.

Maguire, J. J.; Kuc, R. E.; Davenport, A. P. Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro. **Br J Pharmacol**, v.134, n.6, p.1360-6. 2001.

Malaviya, R.; Abraham, S. N. Interaction of bacteria with mast cells. **Methods Enzymol**, v.253, p.27-43. 1995.

Marshall, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nat Rev Immunol**, v.4, n.10, p.787-99. 2004.

Masaki, T.; Vane, J. R.; Vanhoutte, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol Rev**, v.46, n.2, p.137-42. 1994.

Matsas, R.; Fulcher, I. S.; Kenny, A. J.; Turner, A. J. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.80, n.10, p.3111-5. 1983.

Matsushima, H.; Yamada, N.; Matsue, H.; Shimada, S. The effects of endothelin-1 on degranulation, cytokine, and growth factor production by skin-derived mast cells. **Eur J Immunol**, v.34, n.7, p.1910-9. 2004.

Maurer, M.; Metz, M. The status quo and quo vadis of mast cells. **Exp Dermatol**, v.14, n.12, p.923-9. 2005.

Maurer, M.; Theoharides, T.; Granstein, R. D.; Bischoff, S. C.; Bienenstock, J.; Henz, B.; Kovanen, P.; Piliponsky, A. M.; Kambe, N.; Vliagoftis, H.; Levi-Schaffer, F.; Metz, M.; Miyachi, Y.; Befus, D.; Forsythe, P.; Kitamura, Y.; Galli, S. What is the physiological function of mast cells? **Exp Dermatol**, v.12, n.6, p.886-910. 2003.

Maurer, M.; Wedemeyer, J.; Metz, M.; Piliponsky, A. M.; Weller, K.; Chatterjea, D.; Clouthier, D. E.; Yanagisawa, M. M.; Tsai, M.; Galli, S. J. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. **Nature**, v.432, n.7016, p.512-6. 2004.

Mazzocchi, G.; Rossi, G. P.; Malendowicz, L. K.; Champion, H. C.; Nussdorfer, G. G. Endothelin-1[1-31], acting as an ETA-receptor selective agonist, stimulates proliferation of cultured rat zona glomerulosa cells. **FEBS Lett**, v.487, n.2, p.194-8. 2000.

Menendez, L.; Lastra, A.; Hidalgo, A.; Baamonde, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.367, n.1, p.28-34. 2003.

Merskey, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v.6, n.3, p.249. 1979.

Metz, M.; Lammell, V.; Gibbs, B. F.; Maurer, M. Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. **Am J Pathol**, v.169, n.3, p.815-22. 2006.

Metz, M.; Piliponsky, A. M.; Chen, C. C.; Lammell, V.; Abrink, M.; Pejler, G.; Tsai, M.; Galli, S. J. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. **Science**, v.313, n.5786, p.526-30. 2006.

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

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

Mizumura, K.; Koda, H.; Kumazawa, T. Possible contribution of protein kinase C in the effects of histamine on the visceral nociceptor activities in vitro. **Neurosci Res**, v.37, n.3, p.183-90. 2000.

Mogil, J. S.; Yu, L.; Basbaum, A. I. Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. **Annu Rev Neurosci**, v.23, p.777-811. 2000.

Mota, I. The mast cell revisited. **Braz J Med Biol Res**, v.28, n.8, p.895-901. 1995.

Motta, E. M.; Calixto, J. B.; Rae, G. A. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.231, n.6, p.1141-5. 2006.

Nagata, N.; Niwa, Y.; Nakaya, Y. A novel 31-amino-acid-length endothelin, ET-1(1-31), can act as a biologically active peptide for vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275, n.2, p.595-600. 2000.

Nakano, A.; Kishi, F.; Minami, K.; Wakabayashi, H.; Nakaya, Y.; Kido, H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. **J Immunol**, v.159, n.4, p.1987-92. 1997.

Nicol, G. D. ET--phone the pain clinic. **Trends Neurosci**, v.27, n.4, p.177-80; discussion 180. 2004.

Okishima, N.; Hagiwara, Y.; Seito, T.; Yano, M.; Kido, H. Specific sandwich-type enzyme immunoassays for smooth muscle constricting novel 31-amino acid endothelins. **Biochem Biophys Res Commun**, v.256, n.1, p.1-5. 1999.

Okishima, N.; Yoshizumi, M.; Tsuchiya, K.; Cui, P.; Kitamura, H.; Tamaki, T.; Kido, H. Determination of the levels of novel 31-amino acid endothelins and endothelins in human lungs. **Life Sci**, v.68, n.18, p.2073-80. 2001.

Olerud, J. E.; Usui, M. L.; Seckin, D.; Chiu, D. S.; Haycox, C. L.; Song, I. S.; Ansel, J. C.; Bunnett, N. W. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. **J Invest Dermatol**, v.112, n.6, p.873-81. 1999.

Papandreou, C. N.; Usmani, B.; Geng, Y.; Bogenrieder, T.; Freeman, R.; Wilk, S.; Finstad, C. L.; Reuter, V. E.; Powell, C. T.; Scheinberg, D.; Magill, C.; Scher, H. I.; Albino, A. P.; Nanus, D. M. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. **Nat Med**, v.4, n.1, p.50-7. 1998.

Parada, C. A.; Vivancos, G. G.; Tambeli, C. H.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.5, p.2923-8. 2003.

Patterson, K.; Macnaul, R.; Rubanyi, G. M.; Parker-Botello, L. H. Separation and biological activity of the chymotrypsin and cathepsin G cleavage products of big endothelin(1-39) **FASEB J**, v.4, n.A909. 1990.

Peters, C. M.; Lindsay, T. H.; Pomonis, J. D.; Luger, N. M.; Ghilardi, J. R.; Sevcik, M. A.; Mantyh, P. W. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. **Neuroscience**, v.126, n.4, p.1043-52. 2004.

Pickering, V.; Jay Gupta, R.; Quang, P.; Jordan, R. C.; Schmidt, B. L. Effect of peripheral endothelin-1 concentration on carcinoma-induced pain in mice. **Eur J Pain**. 2007.

Piovezan, A. P.; D'orleans-Juste, P.; Frighetto, M.; Souza, G. E.; Henriques, M. G.; Rae, G. A. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. **Br J Pharmacol**, v.141, n.4, p.755-63. 2004.

Piovezan, A. P.; D'orleans-Juste, P.; Souza, G. E.; Rae, G. A. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br J Pharmacol**, v.129, n.5, p.961-8. 2000.

Piovezan, A. P.; D'orleans-Juste, P.; Tonussi, C. R.; Rae, G. A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can J Physiol Pharmacol**, v.75, n.6, p.596-600. 1997.

Piovezan, A. P.; D'orleans-Juste, P.; Tonussi, C. R.; Rae, G. A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur J Pharmacol**, v.351, n.1, p.15-22. 1998.

Plante, M.; Honore, J. C.; Neugebauer, W.; D'orleans-Juste, P. Endothelin-1 (1-31) induces a thiorphan-sensitive release of eicosanoids via ET(B) receptors in the guinea pig perfused lung. **Clin Sci (Lond)**, v.103 Suppl 48, p.128S-131S. 2002.

Pomonis, J. D.; Rogers, S. D.; Peters, C. M.; Ghilardi, J. R.; Mantyh, P. W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci**, v.21, n.3, p.999-1006. 2001.

Raffa, R. B.; Jacoby, H. I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sci**, v.48, n.17, p.PL85-90. 1991.

Raffa, R. B.; Schupsky, J. J.; Jacoby, H. I. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v.276, n.2, p.647-51. 1996.

Rebuffat, P.; Malendowicz, L. K.; Neri, G.; Nussdorfer, G. G. Endothelin-1[1-31] acts as a selective ETA-receptor agonist in the rat adrenal cortex. **Histol Histopathol**, v.16, n.2, p.535-40. 2001.

Rodriguiz, R. M.; Gadnidze, K.; Ragnauth, A.; Dorr, N.; Yanagisawa, M.; Wetsel, W. C.; Devi, L. A. Animals lacking endothelin-converting enzyme-2 are deficient in learning and memory. **Genes Brain Behav**. 2007.

Roques, B. P.; Fournie-Zaluski, M. C.; Soroca, E.; Lecomte, J. M.; Malfroy, B.; Llorens, C.; Schwartz, J. C. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. **Nature**, v.288, n.5788, p.286-8. 1980.

Rubin, S. A.; Levin, E. R. Clinical review 53: The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. **J Clin Endocrinol Metab**, v.78, n.1, p.6-10. 1994.

Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, v.348, n.6303, p.732-5. 1990.

Sampaio, A. L.; Rae, G. A.; Henriques, M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. **J Leukoc Biol**, v.67, n.2, p.189-95. 2000.

Sawynok, J.; Liu, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v.69, n.5, p.313-40. 2003.

Schmidt, B. L.; Pickering, V.; Liu, S.; Quang, P.; Dolan, J.; Connelly, S. T.; Jordan, R. C. Peripheral endothelin A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain. **Eur J Pain**, v.11, n.4, p.406-14. 2007.

Schneider, L. A.; Schlenner, S. M.; Feyerabend, T. B.; Wunderlin, M.; Rodewald, H. R. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. **J Exp Med**, v.204, n.11, p.2629-39. 2007.

Sekizawa, K.; Tamaoki, J.; Nadel, J. A.; Borson, D. B. Enkephalinase inhibitor potentiates substance P- and electrically induced contraction in ferret trachea. **J Appl Physiol**, v.63, n.4, p.1401-5. 1987.

Serafin, W. E.; Dayton, E. T.; Gravallesse, P. M.; Austen, K. F.; Stevens, R. L. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker. **J Immunol**, v.139, n.11, p.3771-6. 1987.

Shimada, K.; Takahashi, M.; Tanzawa, K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. **J Biol Chem**, v.269, n.28, p.18275-8. 1994.

Sokolovsky, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmacol Ther**, v.68, n.3, p.435-71. 1995.

Sorkin, L. S.; Xiao, W. H.; Wagner, R.; Myers, R. R. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v.81, n.1, p.255-62. 1997.

Stassen, M.; Hultner, L.; Schmitt, E. Classical and alternative pathways of mast cell activation. **Crit Rev Immunol**, v.22, n.2, p.115-40. 2002.

Steinhoff, M.; Stander, S.; Seeliger, S.; Ansel, J. C.; Schmelz, M.; Luger, T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Arch Dermatol**, v.139, n.11, p.1479-88. 2003.

Sur, R.; Cavender, D.; Malaviya, R. Different approaches to study mast cell functions. **Int Immunopharmacol**, v.7, n.5, p.555-67. 2007.

Suzaki, Y.; Yoshizumi, M.; Yamashita, Y.; Abe, S.; Tsuchiya, K.; Satoh, Y.; Kuroda, Y.; Horike, K.; Kano, M.; Fukata, Y.; Kitaichi, T.; Hori, T.; Masuda, Y.; Kitagawa, T.; Minakuchi, K.; Tamaki, T. Determination of plasma concentrations of endothelin-1(1-31) and endothelin-1 in healthy subjects and patients with atherosclerosis. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.41 Suppl 1, p.S83-7. 2003.

Suzuki-Nishimura, T.; Oku, N.; Nango, M.; Uchida, M. K. PEI6, a new basic secretagogue in rat peritoneal mast cells: characteristics of polyethylenimine PEI6 resemble those of compound 48/80. **Gen Pharmacol**, v.26, n.6, p.1171-8. 1995.

Tani, K.; Ogushi, F.; Kido, H.; Kawano, T.; Kunori, Y.; Kamimura, T.; Cui, P.; Sone, S. Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. **J Leukoc Biol**, v.67, n.4, p.585-9. 2000.

Tirapelli, C. R.; Fecteau, M. H.; Honore, J. C.; Legros, E.; Gobeil, F.; D'orleans-Juste, P. Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta. **Br J Pharmacol**, v.148, n.4, p.527-35. 2006.

Tjolsen, A.; Berge, O. G.; Hunnskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, n.1, p.5-17. 1992.

Turner, A. J. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. **Biochem Soc Trans**, v.31, n.Pt 3, p.723-7. 2003.

Turner, A. J.; Murphy, L. J. Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. **Biochem Pharmacol**, v.51, n.2, p.91-102. 1996.

Turner, A. J.; Tanzawa, K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. **Faseb J**, v.11, n.5, p.355-64. 1997.

Vanegas, H.; Schaible, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v.46, n.3, p.295-309. 2004.

Vijayaraghavan, J.; Scicli, A. G.; Carretero, O. A.; Slaughter, C.; Moomaw, C.; Hersh, L. B. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). **J Biol Chem**, v.265, n.24, p.14150-5. 1990.

Walter, M.; Plotnick, M.; Schechter, N. M. Inhibition of human mast cell chymase by secretory leukocyte proteinase inhibitor: enhancement of the interaction by heparin. **Arch Biochem Biophys**, v.327, n.1, p.81-8. 1996.

Watkins, L. R.; Maier, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev**, v.82, n.4, p.981-1011. 2002.

Webb, M. L.; Meek, T. D. Inhibitors of endothelin. **Med Res Rev**, v.17, n.1, p.17-67. 1997.

Welle, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **J Leukoc Biol**, v.61, n.3, p.233-45. 1997.

Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v.80, n.5, p.617-53. 2000.

Xu, D.; Emoto, N.; Giaid, A.; Slaughter, C.; Kaw, S.; Dewit, D.; Yanagisawa, M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. **Cell**, v.78, n.3, p.473-85. 1994.

Yanagisawa, H.; Hammer, R. E.; Richardson, J. A.; Emoto, N.; Williams, S. C.; Takeda, S.; Clouthier, D. E.; Yanagisawa, M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. **J Clin Invest**, v.105, n.10, p.1373-82. 2000.

Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v.332, n.6163, p.411-5. 1988.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-10. 1983.

