

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

**ENDOTELINA-1 INDUZ COMPORTAMENTO DE COÇAR QUANDO
ADMINISTRADA NO DORSO DE CAMUNDONGOS**

PATRÍCIA GONÇALVES TRENTIN

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, 15 de Fevereiro de 2006.

Trentin, Patrícia G. **Endotelina-1 induz comportamento de coçar quando administrada no dorso de camundongos.** Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.

Orientador: Giles Alexander Rae

Defesa: 15/02/2006

O presente estudo investigou o comportamento nociceptivo de camundongos induzido pela administração intradérmica (i.d.) de endotelina-1 (ET-1) no dorso. Assim como o degranulador de mastócitos composto 48/80 e a histamina, a ET-1 provocou acessos de coceira, o que foi prevenido pelo tratamento com morfina ou pela depleção de fibras C através do tratamento neonatal com capsaicina, mas foi resistente à pirlamina, metisergida, dexametasona ou à depleção local de mastócitos por injeções diárias de composto 48/80. No entanto, estes tratamentos foram capazes de reduzir a nocicepção e hiperalgesia induzidas pela aplicação de ET-1 na pata traseira de camundongos. O bloqueio de receptores ET_A, pelos antagonistas BQ-123 ou atrasentan, reduziu o número de acessos de coceira promovidos pela ET-1, enquanto que o bloqueio local de receptores ET_B, pelo antagonista BQ-788, aumentou essa resposta. O agonista de receptores ET_B IRL-1620 reduziu o comportamento promovido pela ET-1, sendo esse efeito prevenido pela naltrexona. Em conjunto esses dados sugerem que a ET-1 é capaz de induzir um comportamento nociceptivo relacionado ao prurido, mediado por receptores ET_A presentes em fibras C, mas aparentemente sem envolvimento de mastócitos. Essa resposta pode ser limitada pela ativação de receptores ET_B com conseqüente liberação local de opióides.

Palavras-chave: [endotelina-1], [prurido], [mastócitos], [camundongo]

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com o apoio financeiro do CNPq.

“Para desenvolver a inteligência não basta realizar exercícios de lógica, mediante uma ou outra técnica. É necessário ter uma idéia adequada da realidade e de suas distintas expressões, já que pensar com rigor significa fazer justiça ao real”.

(Alfonso López Quintás)

*A Deus,
pela vida e tudo que pude realizar.*

*Aos meus pais, Avelino e Liene, por todo apoio,
compreensão e dedicação desde os meus primeiros
passos;*

*Aos meus irmãos: Andréa, Marcelo, Ricardo,
Robson e Márcia (in memoriam), pela força.*

Agradecimentos

- ✓ *À minha família;*
- ✓ *Ao meu orientador prof. Giles A. Rae pelo apoio e ensinamentos durante todos esses anos;*
- ✓ *Aos colegas de laboratório: Juliana, Marcília, Kathryn, Emerson, Fernanda e Janice, pela grande amizade e companheirismo. Ao Cláudio, pela paciência e auxílio durante o período de iniciação científica;*
- ✓ *A todos os meus amigos e colegas de faculdade;*
- ✓ *A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial ao prof. Rogério Tonussi pela cessão da metisergida utilizada neste trabalho;*
- ✓ *À equipe do biotério, em especial ao Pedro pela dedicação e ajuda;*
- ✓ *Ao CNPq pelo apoio financeiro.*

Sumário

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Lista de abreviações | i |
| Lista de figuras e esquemas | iii |
| Resumo | iv |
| Abstract | v |
| 1. Introdução | 01 |
| 2. Objetivos | 12 |
| 3. Materiais e métodos | 15 |
| 3.1. Animais | 16 |
| 3.2. Verificação do efeito induzido pela ET-1, composto 48/80 e histamina quando aplicados no dorso de camundongos | 16 |
| 3.3. Verificação da ação da morfina sobre o comportamento induzido pela ET-1 e histamina | 17 |
| 3.4. Envolvimento de fibras C no comportamento induzido pela ET-1 no dorso | 17 |
| 3.5. Verificação da influência dos antagonistas histaminérgico pirilamina e serotoninérgico metisergida sobre a resposta pruriginosa induzida pela ET-1 | 18 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6. Participação de mastócitos na resposta comportamental induzida pela ET-1 | 18 |
| 3.7. Efeito da dexametasona sobre o comportamento promovido pela ET-1, composto 48/80, histamina ou formalina quando aplicados no dorso ou na pata de camundongos | 19 |
| 3.8. O papel dos receptores endotelinérgicos na resposta promovida pela ET-1..... | 19 |
| 3.9. Verificação da participação de opióides endógenos na mediação do efeito do IRL-1620 | 20 |
| 3.10. Drogas | 21 |
| 3.11. Análise estatística | 22 |
| 4. Resultados | 23 |
| 5. Discussão | 40 |
| 6. Conclusão | 53 |
| 7. Referências bibliográficas | 55 |

Lista de abreviações

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| CEUA | Comitê de Ética para Uso de Animais |
| CGRP | Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina |
| C 48/80 | Composto 48/80 |
| [Ca ²⁺] _i | Cálcio intracelular |
| DAG | Diacilglicerol |
| ET | Endotelina |
| E.P.M. | Erro padrão da média |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado de células gliais |
| i.d. | Intradérmico |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.pl | Intraplantar |
| IASP | The International Association for Study of Pain |
| IB ₄ | Isolectina B ₄ |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IP ₃ | 1, 4, 5 – Trifosfato de inositol |
| NGF | Fator de Crescimento do nervo |
| nmol | Nanomol |
| NO | Óxido nítrico |
| PBS | Solução Salina Tamponada |
| pmol | Picomol |

| | |
|------------------|-----------------------------------------------|
| RNA _m | Ácido ribonucléico mensageiro |
| s.c. | Subcutâneo |
| TrKA | Receptores tirosina quinase A |
| TNF α | Fator de necrose tumoral – alfa |
| TRPV1 | Receptor vanilóide de potencial transitório 1 |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |

Lista de Figuras e Esquemas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Acessos de coceira induzidos pela injeção i.d. de ET-1, composto histamina..... | 25 |
| Figura 2. Efeito do tratamento sistêmico prévio com morfina sobre o comportamento induzido pela ET-1 ou histamina | 26 |
| Figura 3. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida pela ET-1, composto 48/80 ou histamina..... | 27 |
| Figura 4. Influência da pirlamina sobre o comportamento induzido pela administração i.d. de ET-1, composto 48/80, histamina ou formalina..... | 29 |
| Figura 5. Influência da metisergida sobre a resposta induzida pela ET-1, composto 48/80 ou histamina..... | 31 |
| Figura 6. Efeito da degranulação de mastócitos sobre o comportamento induzido pela administração i.d. de ET-1, Composto 48/80 ou capsaicina..... | 32 |
| Figura 7. Influência da dexametasona sobre a resposta induzida pela ET-1, composto 48/80, histamina e formalina no dorso de camundongos..... | 34 |
| Figura 8. Influência da dexametasona sobre a nocicepção induzida pela administração i.pl. de ET-1, composto 48/80, histamina ou formalina..... | 35 |
| Figura 9. Influência dos antagonistas de receptores ET _A ou ET _B sobre os acessos de coceira induzidos pela ET-1 ou composto 48/80..... | 37 |
| Figura 10. Influência do agonista seletivo de receptor ET _B IRL-1620 sobre os acessos de coceira induzidos pela ET-1 ou histamina..... | 38 |
| Figura 11. Influência do antagonista opióide naltrexona sobre o possível efeito anti-pruriginoso do IRL-1620..... | 39 |
| Esquema 1. Representação esquemática do possível mecanismo de indução da resposta pruriginosa pela endotelina-1 | 52 |

Resumo

Este estudo objetivou avaliar, farmacologicamente, o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intradérmica (i.d.) de endotelina-1 (ET-1) no dorso de camundongos. A ET-1 (1 a 30 pmol) causou acessos de coceira de modo dose-dependente, com efeito máximo em 10 pmol, o qual foi equivalente ao obtido com 100 nmol de histamina ou 10 µg do degranulador de mastócito composto 48/80. A resposta à ET-1 foi inibida pelo tratamento prévio com morfina (5 mg/kg, i.p.) ou depleção de fibras C pelo tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), mas foi resistente ao tratamento prévio com pirlamina (10 mg/kg, i.p.; antagonista seletivo de receptores H₁ para histamina), metisergida (30 nmol, i.d.; antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.; glicocorticoide) ou à depleção de mastócitos locais por repetidas injeções diárias de composto 48/80 (injeções de 10, 10, 30 and 30 µg, i.d.). Todos estes tratamentos inibiram a nocicepção e/ou hiperalgesia induzidas pela ET-1 na pata traseira de camundongos. Os acessos de coceira induzidos pela ET-1 foram inibidos pelos antagonistas de receptores ET_A BQ-123 (10 nmol, co-injetado) e atrasentan (10 mg/kg, i.p., 60 min, antes), mas aumentados pelo antagonista de receptores ET_B BQ-788 (3 nmol, co-injetado). A injeção local do agonista de receptores ET_B IRL-1620 (10 pmol) reduziu o efeito induzido pela ET-1, efeito que foi prevenido pela naltrexona (5 µg, i.d.), um antagonista não seletivo de receptores opióides. Assim, a resposta nociceptiva à ET-1 no dorso de camundongos é mediada por receptores ET_A, possivelmente, por estimulação direta de neurônios sensoriais, e não via ativação e degranulação de mastócitos. Este efeito pode ser limitado pela ativação de receptores ET_B acoplados a liberação local de opióides.

Abstract

The present study aimed to assess pharmacologically nocifensive responses induced by intradermal (i.d.) injection of endothelin-1 (ET-1) into the scruff of mice. ET-1 (1 to 30 pmol) induced dose-dependent scratching bouts, with a maximal effect at 10 pmol, which was equivalent to that of i.d. 100 nmol histamine or 10 μ g of the mast cell degranulator compound 48/80. Behavioral responses to ET-1 were inhibited by morphine pretreatment (5 mg/kg, i.p.) or depletion of C fibers by neonatal capsaicin treatment (50 mg/kg, s.c.), but were fully resistant to inhibition by pretreatment with pyrilamine (10 mg/kg, i.p.; selective histamine H₁ receptor antagonist), methysergide (30 nmol, i.d.; non-selective serotonin receptor antagonist) or dexamethasone (0,5 mg/kg, s.c.; glucocorticoid) or to local mast cell depletion by repeated local daily injections of compound 48/80 (injections of 10, 10, 30 and 30 μ g, i.d.). All of these pretreatments inhibit nociception and/or hyperalgesia induced by ET-1 in the mouse hind paw. ET-1-induced scratching bouts were inhibited by ET_A receptor antagonists BQ-123 (10 nmol, co-injection) and atrasentan (10 mg/kg, i.p., 60 min before), but augmented by the ET_B receptor antagonist BQ-788 (3 nmol, co-injection). Local injection of the ET_B receptor agonist IRL-1620 (10 pmol) reduced the behavioral induced by ET-1 and this effect was prevented by the non-selective opioid receptor antagonist naltrexone (5 μ g, i.d.). Thus, ET-1 in the mouse dorsum causes an ET_A receptor-mediated scratching response, possibly by directly stimulating sensory neurons, rather than via mast cell activation and degranulation. This effect can be limited by activation of anti-pruritic ET_B receptors coupled to local opioid release.

1. Introdução

O prurido é caracterizado por uma sensação cutânea desagradável que, como a dor, atua como um alarme de defesa do organismo. Porém, quando se torna exacerbado, interfere na qualidade de vida do indivíduo. É um importante sintoma que geralmente acompanha doenças cutâneas e alguns distúrbios sistêmicos como, dermatite atópica, doença renal crônica, colestase, entre outras. Embora ocorram muitas semelhanças entre o processo pruriginoso e doloroso, os padrões de respostas comportamentais provocadas por ambas as sensações são distintas, onde a dor induz o reflexo de retirada e o prurido o reflexo de coçar (para revisão, ver Yosipovitch et al., 2003).

Tanto o prurido como a dor são considerados resultados da ativação de terminações nervosas livres presentes na junção entre a derme e epiderme (Stante et al., 2005). Inicialmente, defendia-se a hipótese de que o prurido seria uma forma subliminar da dor (teoria da intensidade), ou seja, um estímulo nocivo fraco causaria uma ativação de baixa intensidade dos nociceptores, que resultaria em prurido, enquanto um estímulo mais forte promoveria a ativação mais intensa dos nociceptores, causando dor (para revisão, ver Schmelz, 2002). Entretanto, dados experimentais sugerem que o prurido e a dor são duas modalidades sensoriais distintas, uma vez que o prurido pode ser sentido somente na pele, membranas de mucosa e conjuntiva, indicando a participação de um subtipo de fibras aferentes primárias especializadas na codificação desta modalidade sensorial (para revisão, ver Stante et al., 2005).

A sensação dolorosa tem início com a ativação de neurônios sensoriais primários, denominados de nociceptores, que conduzem informações sensitivas nociceptivas ou não nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para medula

espinhal. As fibras nociceptivas são classificadas dentro de três grupos de acordo com o diâmetro e estrutura da fibra e com a velocidade de condução do impulso: 1) fibras do tipo C que são delgadas (0,4 a 1,2 μm de diâmetro), não mielinizadas e de baixa velocidade de condução (0,5 a 2 m/s); 2) fibras $A\delta$ que são de médio diâmetro (2 a 6 μm), pouco mielinizadas e possuem velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s); e 3) fibras do tipo $A\beta$ que são de grande diâmetro (mais de 10 μm), mielinizadas e de rápida condução (30 a 100 m/s) (Almeida et al., 2004).

As fibras $A\delta$ e C estão envolvidas, exclusivamente, com a transmissão da informação nociceptiva. As primeiras promovem uma resposta mais rápida que resulta na dor aguda ou de primeira fase que freqüentemente desencadeia um reflexo de retirada, enquanto as segundas são responsáveis por uma dor mais difusa, geralmente, secundária à dor aguda. As fibras do tipo $A\beta$, na ausência de um dano tecidual ou do nervo, respondem somente ao toque, vibração e pressão, além de outros estímulos sensoriais não nociceptivos, como o mecânico de baixa intensidade, enquanto que em uma situação patológica promovem alodinia mecânica (Millan, 1999). As fibras do tipo $A\delta$ são classificadas em dois grupos, as do tipo I, que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e fracamente a estímulos térmicos e químicos, e as do tipo II, que correspondem a fibras com receptores mecânicos e térmicos para altas temperaturas (45 - 53°C) e alguns para frio intenso (- 15°C) (Almeida et al., 2004).

Dentre as fibras C, destacam-se aquelas que respondem a todos os estímulos nocivos (mecânico, térmico e químico), sendo denominadas de polimodais. As fibras C são agrupadas em, pelo menos, duas populações. Um grupo produz substância P e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores de tirosina quinase A (TrKA), que apresentam alta afinidade ao fator de crescimento do

nervo (NGF). A outra população expressa receptores purinérgicos P2X3 (para ATP) e para o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), além de sítio de ligação para isolectina B₄ (IB₄). Ambas as populações de fibras C respondem a estímulos nocivos semelhantes e expressam o receptor vanilóide TRPV1, sensível à ativação por capsaicina, H⁺ e calor (Julius e Basbaum, 2001; Hunt e Mantyh, 2001).

Estudos recentes demonstraram a existência de uma via neuronal distinta para o prurido, que consiste de um subtipo de fibras C especializadas. Quando estimuladas por um agente pruriginoso, estas fibras geram impulsos que são enviados para o corno dorsal da medula espinhal e, em seguida, projetados através do trato espinotalâmico para o tálamo e córtex somatosensorial (para revisão, ver Twycross et al., 2003). Cerca de 5% das fibras C na pele humana medeiam a resposta pruriginosa e respondem à histamina e outros agentes pruriginosos, mas são insensíveis a estímulos mecânicos. Estas fibras são caracterizadas pela baixa velocidade de condução e uma expressiva ramificação terminal (Schmelz et al., 1997). Além disso, estudos empregando registros eletrofisiológicos de atividade neuronal em medula espinhal de gatos mostraram a existência de uma classe específica de neurônios do corno dorsal, que se projetam para o tálamo, os quais respondem à aplicação de histamina na pele (Andrew e Craig, 2001). Como não há conhecimento de receptor especializado para o prurido nas terminações nervosas, a especificidade dos neurônios de prurido é atribuída especialmente às suas conexões espinhais (Yosipovitch et al., 2003).

Alguns estudos demonstraram a inibição do prurido por diversos estímulos dolorosos, tais como, térmico, mecânico e químico (Schmelz, 2005). Aliás, é experiência comum a todos que a sensação pruriginosa é reduzida pela dor gerada pelo ato de coçar. Em humanos, a aplicação de uma estimulação elétrica na pele

acarretou na redução do prurido agudo e crônico por várias horas, possivelmente, por um mecanismo inibitório central (Nilsson et al., 1997; 2004). Por outro lado, a inibição do processamento da dor reduz o efeito inibitório desta última sobre a via pruriginosa, resultando na intensificação do prurido. Isto explicaria o efeito pruriginoso da ativação de receptores do tipo μ por analgésicos opióides quando administrados por via intratecal (Schmelz, 2001; 2005). Neurônios sensíveis à histamina, identificados no corno dorsal de gatos, não apresentam atividade espontânea, característica consistente com a idéia de que são tonicamente inibidos pela atividade de outros neurônios sensitivos chamados de neurônios de amplo espectro dinâmico (*Wide Dynamic Range - WDR*). Agonistas opióides diminuem a atividade destes neurônios, reduzindo a inibição tônica e permitindo a ativação espontânea dos neurônios de prurido, enquanto antagonistas de receptores opióides do tipo μ apresentam efeito antipruriginoso. Em contraste, a ativação de receptores opióides do tipo κ reduz o prurido induzido por agonistas de receptores μ , enquanto seu antagonismo o favorece (Schmelz, 2005). O prurido também pode ser influenciado por estímulos térmicos. Em humanos, a aplicação de um estímulo frio sobre a pele tratada com histamina reduz a atividade de aferentes primários diminuindo a área de sensação pruriginosa nas proximidades do local da aplicação. Ao contrário, o calor da pele pode levar à exacerbação do prurido (Schmelz, 2005).

Como a dor, o prurido também pode ser classificado clinicamente quanto a sua origem. O prurido originado na pele, devido a inflamação ou dano tecidual, é denominado de pruridoceptivo. Quando a origem ocorre a partir de um dano no sistema nervoso, é classificado como prurido neuropático. O prurido neurogênico tem origem central, sem evidências de patologia neural e, em geral, está associado com o acúmulo de opióides (Twycross et al., 2003). Por outro lado, um estímulo

pruriginoso pode promover duas respostas distintas. A primeira é uma sensação bem localizada onde foi aplicado o estímulo, que persiste por pouco tempo. A segunda resposta é uma sensação difusa que ocorre próxima ao local da administração, caracterizada por intenso prurido quando aplicado um leve toque, sendo denominada de aloinesia (do inglês *allokinesis*), semelhante à alodinia (Yosipovitch et al., 2003).

Alguns mediadores químicos importantes do processo inflamatório (bradicinina, serotonina, histamina, substância P, tromboxano A₂, proteases, entre outros) são estudados quanto à capacidade de induzirem ou favorecerem o prurido (Stante et al., 2005). A histamina é o mediador pruriginoso mais conhecido. Quando administrada por via intradérmica produz prurido que, em geral, é acompanhado por reações de pele e eritema. Esta amina ativa diretamente receptores do tipo H₁, presentes em fibras C específicas para o prurido. Entretanto, em algumas situações exerce pouca ou nenhuma influência nesta resposta. A principal fonte de histamina na pele é o mastócito (Twycross et al., 2003; Stante et al., 2005). Recentemente, foi observado que a histamina pode atuar ainda como agente quimiotático de mastócitos através da ativação de receptores H₄ expressos na superfície dessas células (Hofstra et al., 2003).

Os mastócitos são células de origem hematopoiética que completam sua maturação em tecidos periféricos, permanecendo próximos a nervos, vasos sanguíneos e folículos pilosos (para revisão ver Maurer et al., 2003). Embora estejam bastante implicadas em processos alérgicos, uma vez que expressam receptores para IgE (para revisão ver Williams e Galli., 2000), estas células estão também envolvidas no desencadeamento do prurido. Além da histamina, os mastócitos também liberam de seus grânulos outras substâncias com importante

ação pruriginosa como serotonina, quimase e triptase (para revisão, ver Ui et al., 2006). Além disso, diversos estudos têm demonstrado uma importante participação dos mastócitos na deflagração de processos nociceptivos, através da liberação de mediadores de seus grânulos (Ribeiro et al., 2000; Parada et al., 2001).

Estudos demonstraram que neuropeptídeos liberados de fibras nervosas após a ativação de receptores TRPV1 podem degranular mastócitos e desta maneira liberar histamina, citocinas e triptase, uma vez que a administração de capsaicina ou de neuropeptídeos na pele de humanos e de camundongos resultou na ativação dessas células. Entretanto, como a taxa de liberação de neuropeptídeos *in vivo* normalmente é insuficiente para atingir as concentrações necessárias para causar *per se* a ativação de mastócitos, possivelmente esse efeito pode ser decorrente da ativação de receptores TRPV1 presentes na superfície dos próprios mastócitos (Ständer et al., 2004). Alternativamente, a ação sinérgica entre diversos mediadores, mesmo que em baixas concentrações, também pode desencadear respostas nociceptivas evocadas por um alérgeno com conseqüente degranulação de mastócitos (Lavich et al., 2003).

Os mastócitos (derivados de medula óssea ou de pele fetal e peritoneais) também podem ser degranulados pelas endotelinas (ETs), uma outra classe de mediadores, acarretando a liberação rápida de histamina, serotonina, leucotrieno C4 (Yamamura et al., 1994; 1994; Matsushima et al., 2004). Além disso, esses peptídeos estão presentes em algumas subpopulações de mastócitos (Ehrenreich et al., 1992).

As ETs são peptídeos que produzem efeitos variados em múltiplos tecidos e sistemas. A ET-1 é o representante mais importante desta família, que também inclui a ET-2 e ET-3, todas constituídas por 21 aminoácidos. Embora as células endoteliais

vasculares sejam a principal fonte de ET-1, os genes que codificam os três isopeptídeos são expressos independentemente e em graus variados, por uma ampla variedade de células demonstrando que tais peptídeos podem participar de mecanismos regulatórios complexos em vários órgãos e tecidos (para revisão, ver Webb, 1998; Kedzierski e Yanagisawa, 2001). As ETs exercem funções importantes durante o desenvolvimento embrionário e na regulação da pressão arterial em condições fisiológicas em adultos. Estes peptídeos também estão envolvidos no início e na manutenção de diversas condições patofisiológicas como a hipertensão arterial e pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, processos inflamatórios, neoplasias, entre outras (para revisões, ver Rae e Henriques, 1998; Masaki, 2004).

As ETs têm suas ações mediadas por dois receptores específicos denominados ET_A e ET_B, que pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G. O receptor ET_A apresenta uma afinidade maior pela ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 (Arai et al., 1990), enquanto que o receptor ET_B exibe afinidade semelhante às três isoformas de ET (Sakurai et al., 1990).

Os receptores endotelinérgicos podem estar acoplados, através das proteínas G_q, G_s, G_i ou G_o, a múltiplos mecanismos de transdução de sinal (para revisão, ver Sokolovsky, 1995; Masaki et al., 1999). Funcionalmente, tanto receptores ET_A como ET_B ativam a fosfolipase C, que, rapidamente, hidrolisa o fosfatidilinositol bisfosfato em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O IP₃ mobiliza o Ca²⁺ dos estoques intracelulares ([Ca²⁺]_i) e o DAG ativa a proteína quinase C (para revisão, ver Hyslop e De Nucci, 1992). A fase inicial transitória da elevação do [Ca²⁺]_i é mediada pelo IP₃, enquanto o seu aumento sustentado parece ser devido ao influxo de Ca²⁺ extracelular, através de canais sensíveis à voltagem ou operados por

receptor. A elevação do $[Ca^{2+}]_i$ pode ativar proteínas quinases e também a fosfolipase A_2 , que mobiliza o ácido araquidônico para a síntese de eicosanóides (para revisão, ver Hyslop e De Nucci, 1992). A formação de prostanóides induzida pelas ETs também pode ser mediada diretamente pela ativação da fosfolipase A_2 , ou ainda, através da fosfolipase C, na qual o DAG é convertido, pela ação das lipases do ácido araquidônico (Sokolovsky, 1995).

A ET-1 pode causar respostas nociceptivas e hiperalgésicas em animais e em humanos. Este peptídeo induz contorções abdominais em ratos e camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos e incapacitação articular em cães e ratos (Raffa and Jacoby, 1981; Ferreira et al., 1989; De-Melo et al., 1998; Cunha et al., 2001). Além disso, este peptídeo parece estar implicado na dor crônica associada ao diabetes (Jarvis et al., 2000) e câncer ósseo (Wacnik et al., 2001). A injeção de ET-1 na pata traseira de camundongos induz uma resposta comportamental nociceptiva *per se* caracterizada pelo ato de lamber a pata (Piovezan et al., 2000; Menéndez et al., 2002) e ainda potencializa respostas nociceptivas evocadas por diferentes agentes químicos e inflamatórios (De-Melo et al., 1998; Piovezan et al., 1997, 1998, 2000). Em adição, a administração subcutânea de ET-1 na pata induz comportamentos nociceptivos, os quais coincidem com a despolarização de fibras aferentes primárias (Gokin et al., 2001; Khodorova et al., 2002).

Elevadas concentrações de ET-1 são encontradas nos neurônios do gânglio da raiz dorsal e em células satélites (Giaid et al., 1989; Kar et al., 1991). Além disso, receptores ET_A são observados em neurônios do gânglio da raiz dorsal e fibras sensoriais de pequeno calibre peptidérgicas e não-peptidérgicas e em menor quantidade em neurônios sensoriais de médio diâmetro. Já os receptores ET_B

presentes nos gânglios da raiz dorsal são encontrados apenas em células satélites e células de Schwann (Pomonis et al., 2001).

A nocicepção induzida pela aplicação intraplantar de ET-1 em camundongos e ratos, bem como a ativação de aferentes primários do nervo ciático por este peptídeo, são mediados por receptores ET_A (Piovezan et al., 2000; Gokin et al., 2001). Embora os receptores ET_B possam contribuir para a hiperalgesia mecânica causada por ET-1 na pata desta espécie (Baamonde et al., 2004), a ativação dos mesmos reduz a hiperalgesia à capsaicina induzida pela ET-1 (Piovezan et al., 2000). Em adição, o IRL-1620, um agonista dos receptores ET_B, inibe a resposta nociceptiva promovida pela ET-1 na pata de ratos, através da liberação de β -endorfinas presentes em queratinócitos (Khodorova et al., 2002; 2003). Recentemente, resultados obtidos por nosso grupo demonstraram que a naltrexona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, reverteu o efeito hiperalgésico promovido pela ET-1 à capsaicina em camundongos (Frighetto, 2004). Piovezan et al. (2004) observaram que a nocicepção induzida pela reação de hipersensibilidade do tipo I em camundongos sensibilizados por ovalbumina é dependente da ativação de mastócitos e da conseqüente liberação de ET-1 e ativação local de receptores ET_A e ET_B.

Conforme comentado anteriormente, a ET-1 também é sintetizada e liberada de mastócitos (Liu et al., 1998; Koda et al., 2000). Em condições patológicas, algumas populações de mastócitos têm a expressão do RNAm de ET-1 aumentada (Liu et al., 1999; Gilbert et al., 2000). Além disso, a ET-1 pode induzir potencialmente a degranulação de mastócitos, liberando rapidamente mediadores (histamina, serotonina, leucotrieno C₄), através da ativação de receptores ET_A (Yamamura et al., 1994; 1994; Matsushima et al., 2004). Há evidências de que a estimulação dessas

células pela ET-1 segue um mecanismo distinto do promovido pela estimulação imunológica em camundongos (Yamamura et al., 1995).

A ET-1 também pode ser gerada a partir da quimase secretada de mastócitos. Esta enzima converte o precursor inativo Big ET-1 em ET-1 (1-31), um peptídeo com potente ação vasoconstritora (Leslie et al., 2004), o qual, subseqüentemente, é clivado em ET-1 por ação das enzimas conversoras de ET e/ou por endopeptidase neutra *in vitro* (Nakano et al., 1997) e *in vivo* (Honoré et al., 2002; Fecteau et al., 2005). Entretanto, a ET-1 também pode ser degradada pela ação da quimase proveniente de mastócitos, o que confere a estas células uma importante ação protetora contra os efeitos tóxicos da ET-1 em determinadas patologias, como a peritonite (Maurer et al., 2004).

Embora a ET-1 esteja bastante envolvida com a patofisiologia da nocicepção, foi observado que a aplicação deste peptídeo por via intradérmica no antebraço de humanos desencadeou uma sensação intensa de prurido em queimação, que foi acompanhada por vasodilatação local (Ferreira *et al.*, 1989; Wenzel et al., 1998). Entretanto, não existem dados na literatura que esclareçam e mostrem a efetiva ação da ET-1 na sensação pruriginosa em modelos animais. O presente estudo foi desenvolvido com o propósito de investigar essa possibilidade.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar se a endotelina-1 (ET-1) é capaz de induzir comportamento relacionado ao prurido (i.e. acessos de coceira) em camundongos, quando administrada por via intradérmica na região dorsal.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar o possível efeito comportamental da aplicação intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos, comparando-o com o comportamento induzido pelo composto 48/80 e histamina.

2. Avaliar o efeito do analgésico opióide sobre a resposta comportamental promovida pela ET-1.

3. Caracterizar o envolvimento de fibras C na resposta induzida pela aplicação intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos.

4. Verificar se a histamina e serotonina podem mediar a resposta provocada pela ET-1.

5. Avaliar a participação de mastócitos locais no possível efeito pruriginoso da ET-1 em camundongos.

6. Comparar a ação da dexametasona sobre as respostas comportamentais promovidas pela aplicação intradérmica no dorso ou intraplantar de ET-1 em camundongos.

7. Caracterizar os receptores endotelinérgicos implicados no comportamento promovido pela aplicação intradérmica de ET-1 no dorso.

8. Verificar o envolvimento de opióides endógenos na resposta promovida pela aplicação intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss* machos, criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Depois do período de desmame, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, onde foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro) controladas, com livre acesso a água e ração especial para roedores. Pelo menos uma semana antes de serem utilizados nos experimentos, os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Peptídeos, onde foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente, até atingirem 25 a 35 g de peso corporal. Quarenta e oito horas antes do início dos experimentos propriamente ditos, os animais foram levados ao laboratório, onde tiveram os pêlos da região dorsal removidos por tricotomia, para facilitar a aplicação intradérmica das drogas e foram aclimatados. Os experimentos foram realizados sempre no período entre 8:00 e 17:00 horas, seguindo os protocolos aprovados previamente pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC e os princípios éticos propostos pela “International Association for Study of Pain” (IASP, 1983). Ao término dos experimentos os animais foram sacrificados com CO₂ em câmara apropriada.

3.2. Verificação do efeito induzido pela ET-1, composto 48/80 e histamina quando aplicados no dorso de camundongos

Os animais receberam injeção intradérmica (i.d.) de ET-1 (1, 3, 10 ou 30 pmol), composto 48/80 (3, 10 ou 100 µg), histamina (100 nmol) ou veículo (PBS

- solução salina tamponada com fosfato). Imediatamente após as injeções os animais foram colocados sob funis de vidro invertidos e observados por até 40 minutos. Foi registrado o número de acessos de coceira, que corresponde a cerca de 3 ou mais movimentos rápidos com a pata traseira (direita ou esquerda) dirigidos à área próxima ao local de aplicação, conforme proposto por Kuraishi et al. (1995).

3.3. Verificação da ação da morfina sobre o comportamento induzido pela ET-1 e histamina

Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o analgésico opióide morfina (5 mg/kg) ou veículo (PBS). Após 30 minutos, os animais receberam na região dorsal uma injeção i.d. de ET-1 (10 pmol), histamina (100 nmol) ou PBS. Em seguida foram imediatamente colocados sob funis de vidro para registro do número de acessos de coceira durante um período de observação de 40 minutos, conforme descrito acima.

3.4. Envolvimento de fibras C no comportamento induzido pela ET-1 no dorso de camundongos

Para caracterizar o envolvimento de fibras C na resposta induzida pela aplicação i.d. de ET-1, realizou-se o tratamento neonatal com capsaicina, que causa degeneração irreversível destas fibras (Hiura, 2000). Neste protocolo experimental, camundongos foram tratados por via subcutânea (s.c.) com capsaicina (50 mg/kg) ou veículo no primeiro ou segundo dia após o nascimento, conforme descrito por Holzer (1991) e Beirith et al. (2003). Com aproximadamente dois meses de idade, esses mesmos animais (25 a 30 g)

receberam injeção i.d. de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg), histamina (100 nmol) ou veículo, e em seguida foi registrado o número de acessos de coceira durante 40 minutos.

3.5. Verificação da influência dos antagonistas histaminérgico pirilamina e serotoninérgico metisergida sobre a resposta induzida pela ET-1

Grupos de animais receberam injeção de pirilamina (10 mg/kg) ou veículo, por via i.p., 30 minutos antes da administração i.d. de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 ou 100 µg), histamina (100 nmol), formalina 1% ou veículo.

Em outra série de experimentos, os camundongos receberam no dorso, por via i.d., uma aplicação de metisergida (250 µg) ou veículo, juntamente com ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg), serotonina (250 µg) ou veículo, em um volume final de 20 µL.

Imediatamente após a aplicação i.d. dos estímulos, os camundongos foram colocados sob funis para observação e registro do número de acessos de coceira, como descrito anteriormente.

3.6. Participação de mastócitos na resposta comportamental induzida pela ET-1

Para verificar o envolvimento de mastócitos no comportamento induzido pela ET-1 e de outros estímulos, os animais receberam injeções i.d. repetidas de composto 48/80, um degranulador de mastócitos, durante quatro dias consecutivos na região dorsal. Foram administradas as doses de 10, 10, 30 e 30 µg/local no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia, respectivamente.

Animais controle receberam injeções semelhantes do veículo. No quinto dia os animais receberam a injeção i.d. de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg), capsaicina (1,6 µg) ou veículo. Em seguida, foi avaliado o número de acessos de coceira.

3.7. Efeito da dexametasona sobre o comportamento promovido pela ET-1, composto 48/80, histamina ou formalina quando aplicados no dorso ou na pata de camundongos

Os camundongos foram tratados por via s.c. com dexametasona (0,5 mg/kg). Após 4 horas, receberam uma injeção i.d. de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg), histamina (100 nmol), formalina 1% ou veículo. Em seguida, registrou-se o número de acessos de coceira durante os 40 minutos subseqüentes.

Em outro grupo experimental, passadas 4 horas do tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), foi aplicado por via intraplantar (i.pl.) a ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg), histamina (100 nmol), formalina 1% ou veículo. Imediatamente após a administração i.pl. destes agentes, os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro invertidos para observação. Foi registrado o tempo de lambida (“licking”) da pata injetada durante um período total de 30 minutos.

3.8. O papel dos receptores endotelinérgicos na resposta promovida pela ET-1

Foram realizados dois protocolos experimentais para tentar identificar, funcionalmente, os receptores implicados na resposta induzida pela ET-1. No

primeiro, os antagonistas peptídicos seletivos para o receptor ET_A, BQ-123 (10 nmol), ou ET_B, BQ-788 (10 nmol), ou veículo (PBS) foram co-administrados por via i.d. com ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg) ou veículo em grupos separados de animais, em um volume final de 20 µL. No segundo protocolo, os camundongos foram tratados com injeções i.p. de atrasentan (10 mg/kg) ou A-192621 (20 mg/kg), antagonistas não peptídicos dos receptores ET_A e ET_B, respectivamente. Animais controle foram tratados apenas com o veículo correspondente. Uma hora após o tratamento sistêmico, os animais receberam injeções i.d. de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg) ou veículo.

Em outro protocolo experimental, o agonista dos receptores ET_B, IRL-1620 (10 pmol) ou veículo foi co-administrado com ET-1 (10 pmol) ou histamina (100 nmol), num volume final de 20 µL. Os registros dos acessos de coceira foram realizados conforme descrito anteriormente.

3.9. Verificação da participação de opióides endógenos na mediação do efeito do IRL-1620

Um grupo de camundongos recebeu por via i.d. naltrexona (5 µg) juntamente com ET-1 (10 pmol) e IRL-1620 (10 pmol), em um volume final de 30 µL. Em outro grupo de animais foi administrada histamina (100 nmol), no lugar da ET-1, juntamente com naltrexona (5 µg) e IRL-1620 (10 pmol). Imediatamente após a aplicação das drogas os animais foram colocados sob funis para o registro do prurido como já descrito.

3.10. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: endotelina-1 (ET-1), IRL 1620 (Suc[Glu⁹, Ala^{11,15}]endotelina-1₁₀₋₂₁) provenientes da American Peptide Co., Sunnyvale, U.S.A.), 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), da Research Biochemicals International, Natick, U.S.A.. O composto 48/80, dicloridrato de histamina, cloridrato de serotonina, maleato de metisergida, capsaicina, cloridrato de morfina e cloridrato de naltrexona (NTX) foram adquiridas da Sigma Chemical Co. Saint Louis, U.S.A. O atrasentan e o A-192621 [ácido 2R-(2a,3b,4a)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-[2-(2,6-dietilfenil)amino]-2-oxoetil]-2-(4-propoxifenil)-3 pirrolidinecarboxílico], foram gentilmente fornecidos pelos laboratórios Abbott (Abbott Park, IL, USA).

O atrasentan e o A-192621 foram dissolvidos em salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 3% de etanol e 100 μ L de NaOH 0,1 N. Na preparação da capsaicina foi utilizado 10% de Tween 80, 10% de Etanol e 80% μ L de PBS. As soluções estoque de ET-1, IRL 1620, BQ-123 e BQ-788 foram preparadas em PBS e mantidas a uma temperatura de -18 °C, sendo diluídas momentos antes dos experimentos com o mesmo veículo. As demais drogas foram dissolvidas em PBS no dia da realização dos experimentos.

As doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base na sua efetividade em outros estudos (De-Mello et al., 1998; Jarvis et al., 2000; Piovezan et al., 2004; Maekawa et al., 2000). Por outro lado, as doses de histamina, pirlamina, metisergida, morfina, serotonina e naltrexona referem-se ao respectivo sal mencionado acima.

2.11. Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6 a 8 animais, por grupo experimental. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Bonferroni, quando pertinente. Em todas as análises estatísticas, as diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. Resultados

A injeção intradérmica de ET-1 (1, 3, 10 ou 30 pmol) no dorso de camundongos induziu acessos de coceira, cuja quantidade foi proporcional à dose administrada (Figura 1A), a exemplo do efeito de injeções semelhantes de composto 48/80, um degranulador de mastócitos, nas doses de 3, 10 ou 100 μg (Figura 1B). A resposta máxima à ET-1, deflagrada pela dose de 10 pmol (40 ± 7 acessos), foi semelhante àquela causada por uma dose de efetividade submáxima de 10 μg de composto 48/80 (53 ± 6 acessos) ou 100 nmol de histamina (52 ± 5 acessos; Figura 1B). Os acessos de coceira induzidos pela ET-1 (10 pmol) ou histamina (100 nmol) manifestaram-se predominantemente nos primeiros 10 minutos após a administração, enquanto as respostas promovidas pelo composto 48/80 (10 μg) foram especialmente evidentes nos primeiros 5 minutos (Figura 1C). Contudo, acessos de coceira adicionais também foram observados, ainda que em menor frequência, no transcorrer do restante do período de observação de 40 min que se seguiu após administração das três drogas.

O aumento do número de acessos de coceira induzido pela injeção intradérmica de ET-1 (10 pmol) ou histamina (100 nmol) no dorso foi prevenido pela administração prévia, 30 min antes, do agonista não seletivo de receptores opióides, morfina (5 mg/kg, i.p.). Esses resultados, ilustrados na Figura 2, demonstram que a resposta sensorial a ambos agentes é sensível à inibição por um analgésico opióide.

Na tentativa de caracterizar o possível envolvimento de fibras C na resposta induzida pela administração intradérmica de ET-1, camundongos

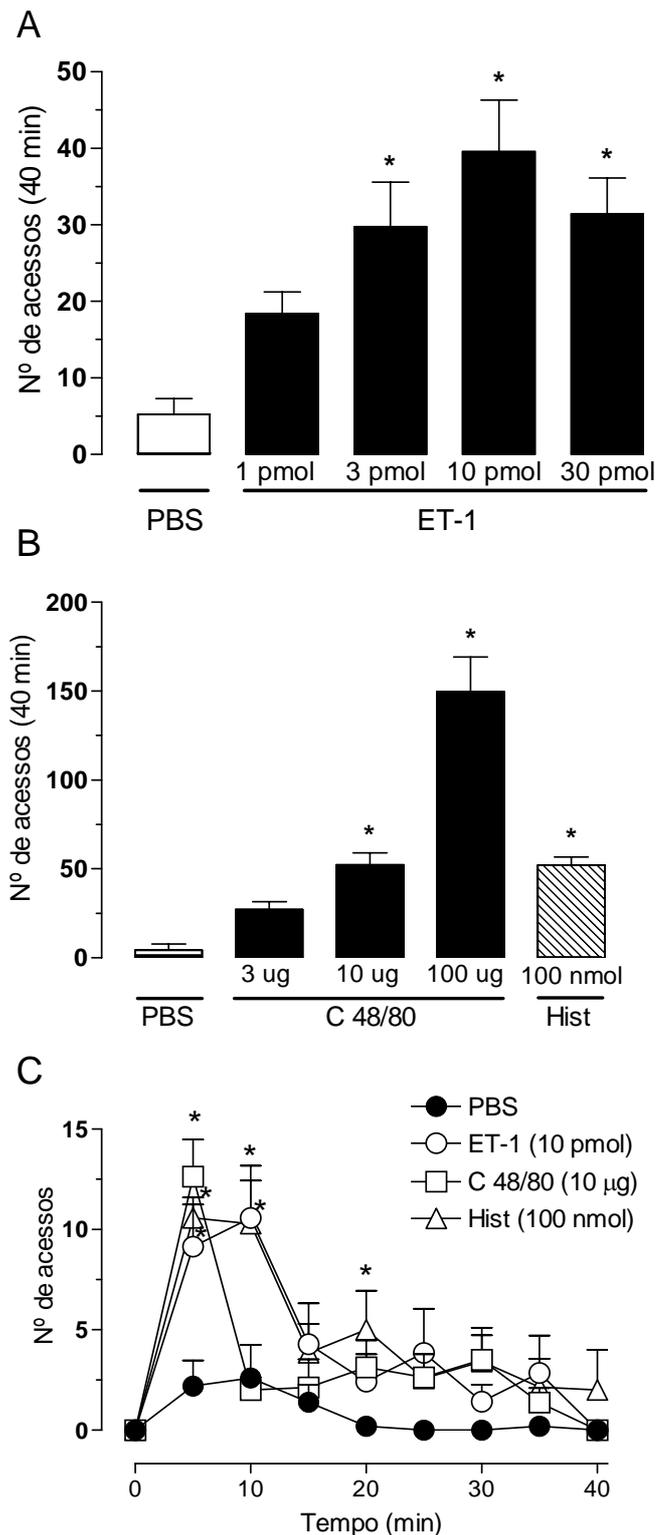


Figura 1. Decurso temporal dos acessos de coceira induzidos pela ET-1, composto 48/80 e histamina (painel C). O painel A e B mostra a curva dose-resposta para ET-1 e Composto 48/80 (C 48/80), respectivamente, quando aplicados por via i.d. no dorso de camundongos. O painel B também demonstra a resposta induzida por 100 nmol de histamina (Hist), também aplicada por via i.d. no dorso. Os controles foram tratados com PBS, sendo o volume total da solução injetada de 20 µL. Os valores representam média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com PBS (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

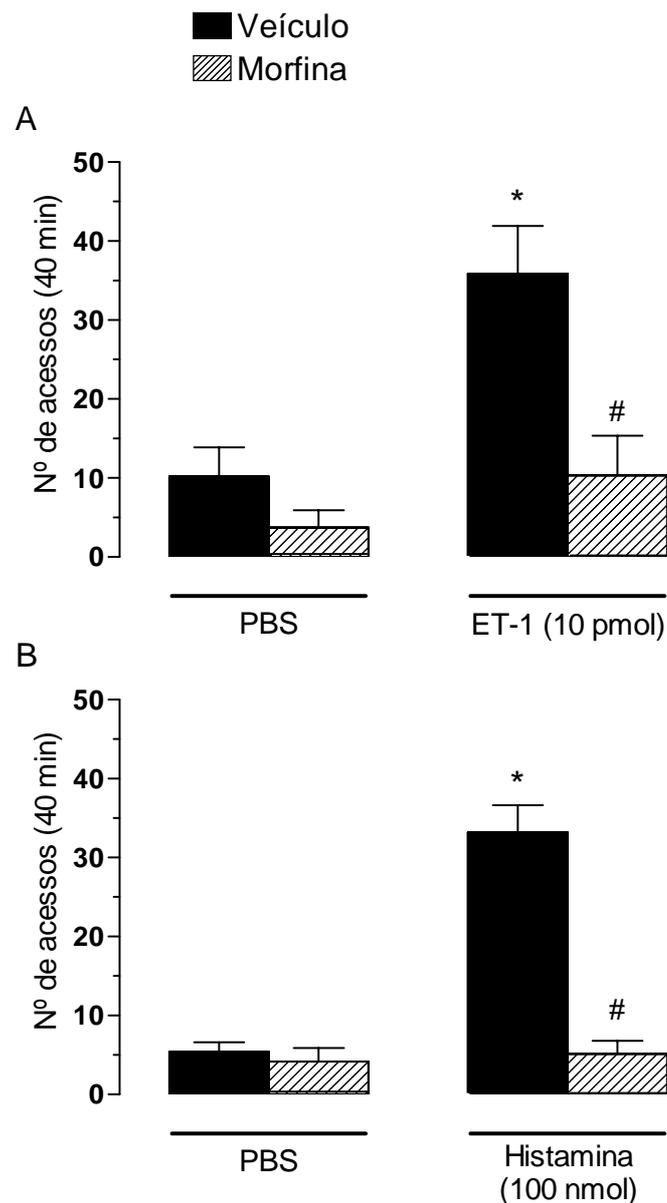


Figura 2. Efeito do tratamento sistêmico prévio com morfina (5 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento induzido pela ET-1 (painel A) e histamina (painel B). ET-1, histamina ou solução PBS foram injetados por via i.d. nas doses indicadas, em um volume final de 20 μ L, 30 min após o tratamento. Os valores representam média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS ou com ET-1 ou histamina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

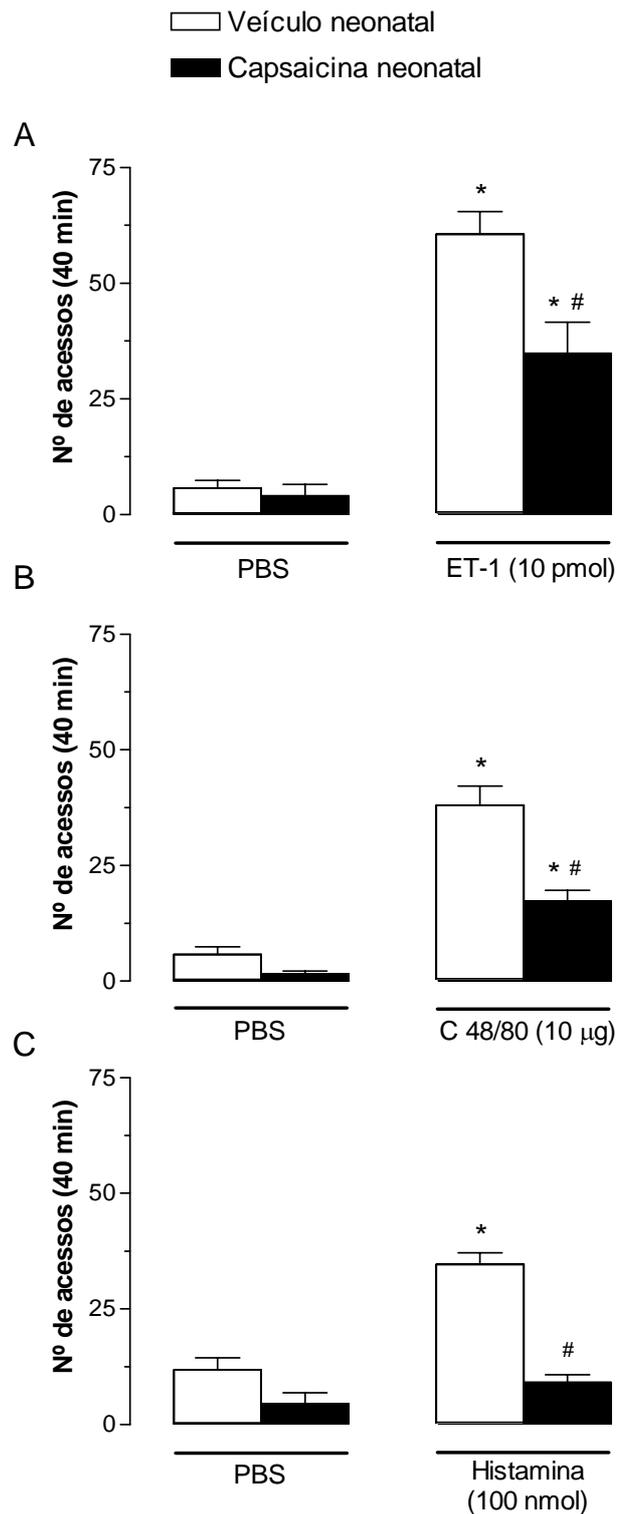


Figura 3. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) sobre a resposta induzida pela ET-1 (painel A), composto 48/80 (painel B) e histamina (painel C). As drogas foram injetadas por via i.d. nas doses indicadas e os controles foram tratados com PBS, sendo administrado um volume final de 20 µL. Os valores representam média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS ou com ET-1, composto 48/80 ou histamina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

foram tratados no período neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), que causa degeneração irreversível dessas fibras. Animais que receberam tratamento neonatal com capsaicina apresentaram inibição acentuada da resposta nociceptiva (tempo de lambida da pata) induzida pela injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior ($19,1 \pm 3,0$ s) em comparação com as respostas de animais tratados no período neonatal com veículo ($50,3 \pm 7,1$ s; $P < 0,05$). O tratamento neonatal com capsaicina causou ainda redução de 47% e 64% dos acessos de coceira induzidos pela administração intradérmica de ET-1 (10 pmol) e composto 48/80 (10 μ g), respectivamente (Figura 3A e B). A depleção de fibras C pela capsaicina neonatal também aboliu o comportamento induzido pela histamina (100 nmol, Figura 3C). Desta forma, esses resultados sugerem a participação de fibras C na manifestação da resposta comportamental de coçar desencadeada por estes agentes.

Como a histamina é o mediador mais estudado e implicado no prurido, verificou-se o envolvimento de receptores H_1 na possível resposta desencadeada pela ET-1. Um grupo experimental foi tratado previamente com pirilamina (10 mg/kg, i.p.), um antagonista para estes receptores. O bloqueio dos receptores H_1 não afetou de modo significativo o comportamento induzido pela ET-1 (10 pmol), mas preveniu significativamente a resposta induzida pelo composto 48/80 nas doses de 10 μ g e 100 μ g (70% e 36% de inibição, respectivamente; Figuras 4A e 4B). O anti-histamínico H_1 também foi capaz de prevenir a manifestação de acessos de coceira induzidos pela histamina (100 nmol; 78 % de redução), porém, não afetou as duas fases da resposta à injeção de formalina 1% no dorso (Figuras 4C e 4D).

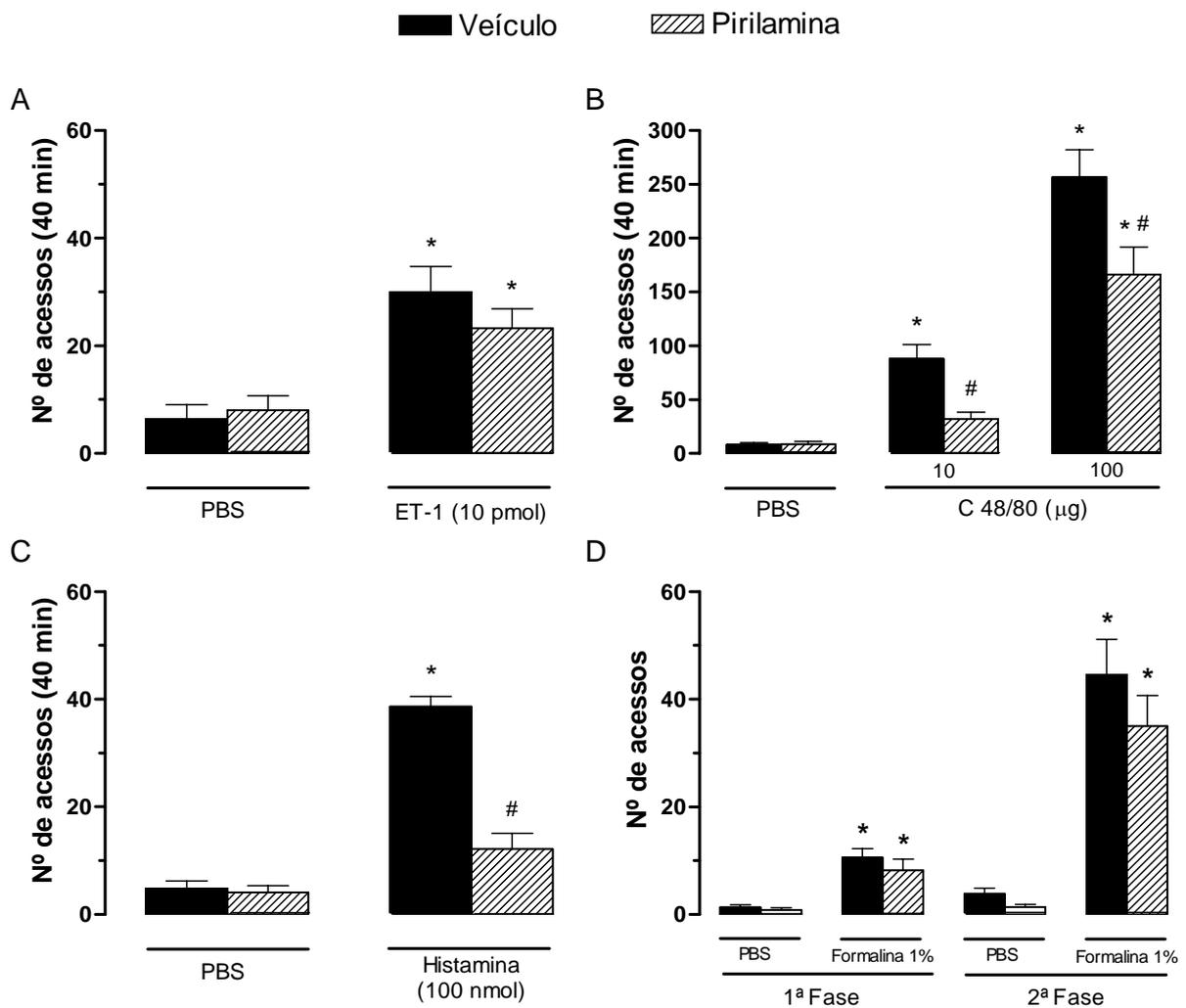


Figura 4. Influência da pirilamina (10 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento de coçar induzido pela administração i.d. de ET-1 (painel A), composto 48/80 (painel B), histamina (painel C) ou formalina (painel D). As drogas foram utilizadas nas doses indicadas e os controles foram tratados com PBS, sendo administrado um volume final de 20 μ L. Os valores representam média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e composto 48/80 (10 ou 100 μ g) ou histamina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

A serotonina, outro mediador presente em mastócitos, também apresenta efeito pruriginoso (Inagaki et al., 2002). A injeção intradérmica de serotonina (1,18 μmol) no dorso de camundongos induziu acessos de coceira que foram abolidos pela metisergida (30 nmol), um antagonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos. Entretanto, quando co-administrada com ET-1 (10 pmol) ou composto 48/80 (10 μg), a metisergida não foi capaz de reduzir a resposta induzida por estes agentes (Figura 5).

Os mastócitos são células bastante envolvidas em processos pruriginosos, uma vez que seus grânulos são ricos em histamina, serotonina e outras substâncias, que têm sido implicadas na patofisiologia do prurido. Desta forma, para verificar o envolvimento dessas células no nosso modelo, realizou-se o protocolo de depleção de mastócitos através da aplicação intradérmica repetida de 10, 10, 30 e 30 μg de composto 48/80 no dorso de camundongos no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia de tratamento, respectivamente. A depleção de mastócitos residentes não promoveu mudança significativa no número de acessos de coceira induzidos pela injeção intradérmica, no quinto dia, de ET-1 (10 pmol) ou do agonista de receptores vanilóides TRPV1 capsaicina (1,6 μg), quando comparado aos valores observados nos respectivos grupos controle tratados repetidamente com salina (Figuras 6A e 6C). No entanto, os animais tratados repetidamente com composto 48/80 apresentaram uma redução de 70% da resposta pruriginosa evocada pela injeção deste agente (na dose de 10 μg), comprovando assim a eficiência do tratamento nos quatro dias anteriores em reduzir a população local de mastócitos residentes (Figura 6B).

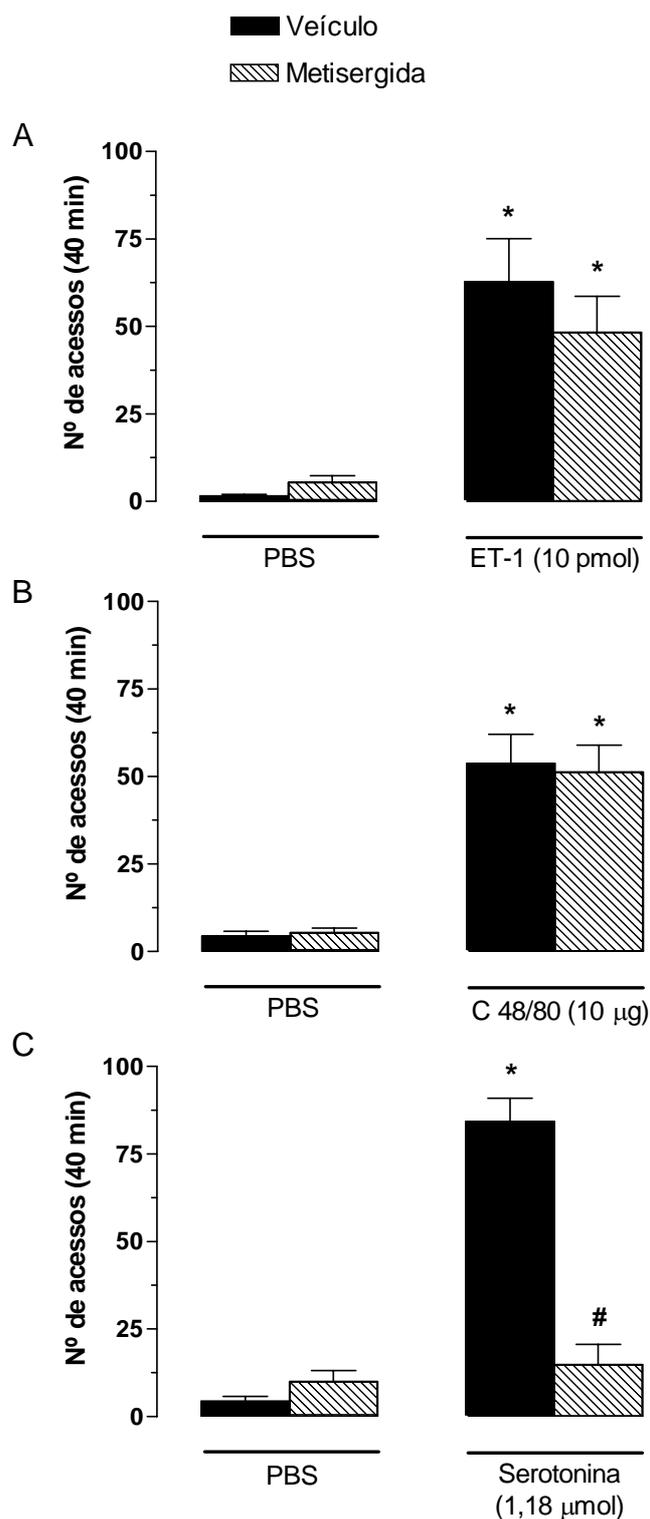


Figura 5. Influência da metisergida (30 nmol) sobre a resposta induzida pela ET-1, composto 48/80 ou serotonina. A metisergida foi co-administrada por via i.d. com ET-1 (painel A), composto 48/80 (painel B), serotonina (painel C) ou PBS. As drogas foram injetadas nas doses indicadas num volume final de 20 µL. Os valores representam média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira de um *n* experimental de 6 a 8 animais por grupo. Asterisco e cerquilha indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e serotonina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

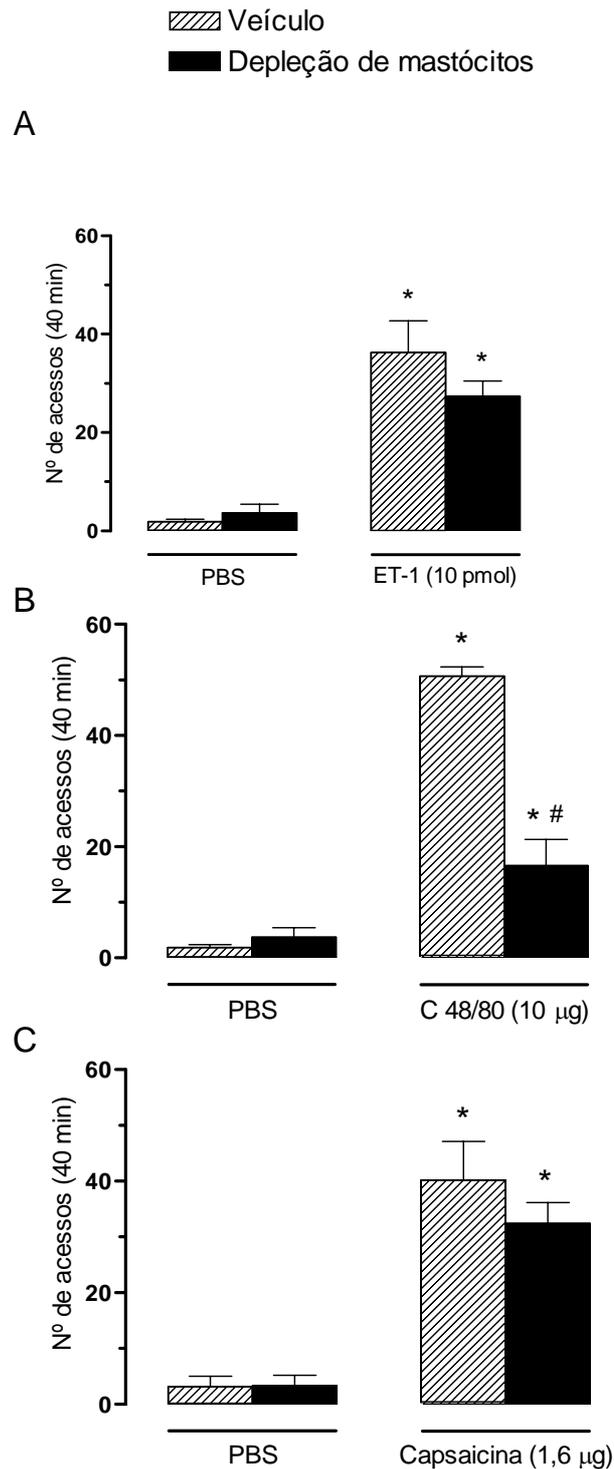


Figura 6. Efeito da degranulação de mastócitos (composto 48/80 10, 10, 30 e 30 µg) sobre o comportamento induzido pela administração i.d. de ET-1 (painel A), composto 48/80 (painel B) ou capsaicina (painel C). As drogas foram injetadas nas doses indicadas e os controles foram tratados com PBS, sendo administrado um volume final de 20 µL. Os valores representam média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira de um *n* experimental de 6 a 8 animais por grupo. Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e composto 48/80, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

A administração prévia do glicocorticoide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 horas antes) não modificou o número de acessos de coceira induzidos pela administração intradérmica de ET-1 (10 pmol), composto 48/80 (10 µg) ou histamina (100 nmol) no dorso de camundongos (Figura 7A, B e C). Além disso, este tratamento também não alterou a resposta bifásica induzida pela aplicação intradérmica de formalina 1% (Figura 7D). Por outro lado, o mesmo tratamento com dexametasona reduziu em 84% e 69%, respectivamente, a resposta nociceptiva (tempo de lambida) induzida pela ET-1 (10 pmol) e composto 48/80 (10 µg), quando estes foram injetados na superfície plantar da pata posterior dos camundongos (Figura 8A e B). O glicocorticoide também aboliu a resposta promovida pela aplicação intraplantar de histamina (100 nmol) e atenuou parcialmente (45% de inibição) o surgimento da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina 1%, sem interferir com a magnitude da primeira fase da resposta (Figuras 8C e 8D). Assim, as respostas sensoriais distintas evocadas por injeção intradérmica (no dorso) ou intraplantar (na pata posterior) de ET-1, composto 48/80, histamina e formalina divergem marcadamente na sua susceptibilidade à inibição pela dexametasona.

Em outra série de experimentos, testou-se a influência de alguns antagonistas seletivos dos receptores para ETs, tanto do tipo ET_A quanto ET_B, com o propósito de caracterizar os possíveis receptores responsáveis pelo possível efeito pruriginoso da ET-1. Observou-se que a resposta comportamental de coçar induzida pela ET-1 (10 pmol) foi inibida quando co-administrada juntamente com o antagonista peptídico seletivo para receptor ET_A, BQ-123 (10 nmol). Ao contrário, a co-injeção local de BQ-788 (3 nmol),

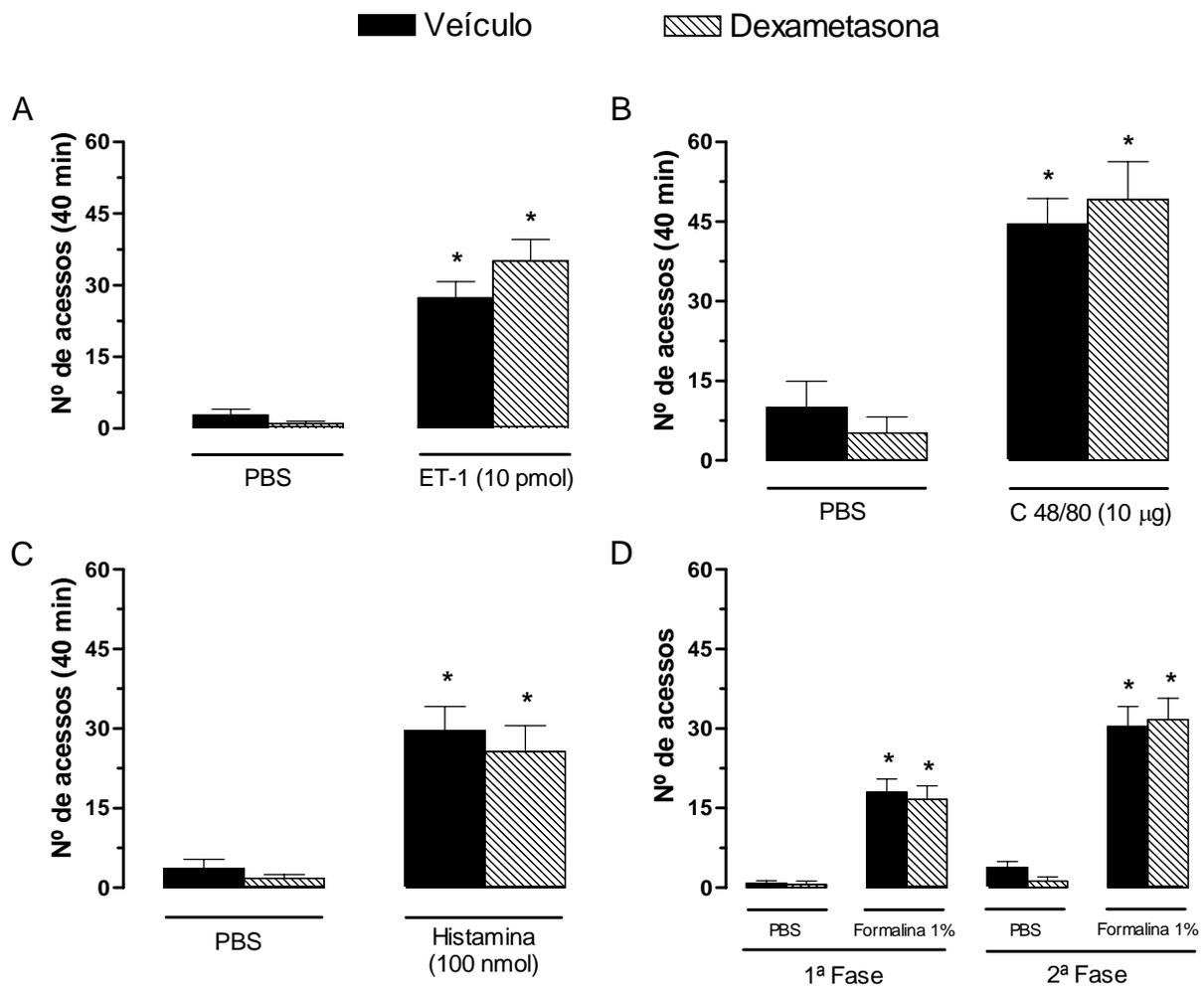


Figura 7. Influência da dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h antes) sobre a resposta comportamental de coçar induzida pela ET-1 (painel A), composto 48/80 (C 48/80; painel B), histamina (painel C) e formalina (painel D) no dorso. As drogas foram injetadas por via i.d. nas doses indicadas e os controles foram tratados com PBS, sendo administrado um volume final de 20 µL. Os valores representam média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Os asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com PBS (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

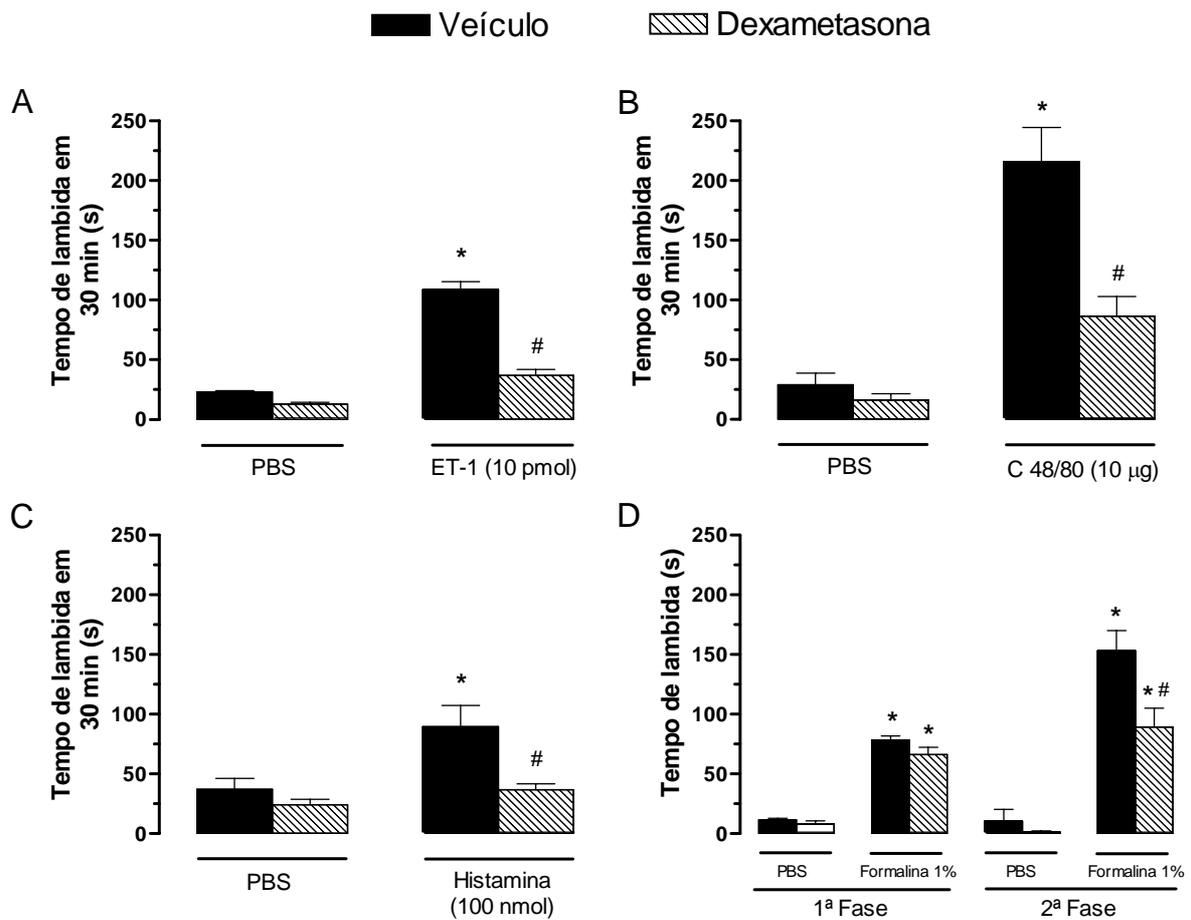


Figura 8. Influência da dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h antes) sobre a nociceção induzida pela administração i.pl. de ET-1 (painel A), composto 48/80 (painel B), histamina (painel C) ou formalina (painel D) na pata posterior de camundongos. As drogas foram injetadas nas doses indicadas e os controles foram tratados com PBS. Os valores representam média \pm erro padrão da média do tempo de lambida da pata ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e ET-1, composto 48/80, histamina ou formalina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

um antagonista peptídico seletivo para receptores ET_B , aumentou em 235% o efeito da ET-1 (Figura 9A). Já o tratamento sistêmico prévio com atrasentan (10 mg/kg, i.p.) ou com A-192621 (20 mg/kg, i.p.), antagonistas não peptídicos seletivos para receptores ET_A e ET_B , respectivamente, inibiram os acessos de coceira induzidos pela ET-1 em 83% e 64% (Figura 9B). Entretanto, nenhum dos quatro antagonistas de receptores endotelinérgicos empregados foi capaz de afetar o número de acessos de coceira evocados pelo composto 48/80 (Figuras 9C e D). Por outro lado, a co-administração local de IRL-1620 (10 pmol), um agonista peptídico seletivo para o receptor ET_B , reduziu de modo pronunciado o comportamento induzido pela aplicação i.d. de ET-1 (10 pmol) ou histamina (100 nmol), resultando em 96% e 81% de inibição, respectivamente (Figura 10A e 10B).

Em um grupo final de experimentos, avaliou-se a influência da co-administração local de naltrexona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, sobre o efeito inibitório do IRL-1620 das respostas induzidas por ET-1 ou histamina. Embora a naltrexona (5 μ g) não promoveu mudanças significativas no número de acessos de coceira induzido pela ET-1 ou histamina, o antagonista opióide foi capaz de reverter o possível efeito antipruriginoso promovido pelo agonista seletivo de receptores ET_B (10 pmol) quando este último foi co-administrado juntamente com ET-1 (10 pmol) ou histamina (100 nmol), como ilustra a Figura 11A e 11B. Esses resultados sugerem que opióides endógenos participem de um provável mecanismo antipruriginoso deflagrado por ativação do receptor ET_B .

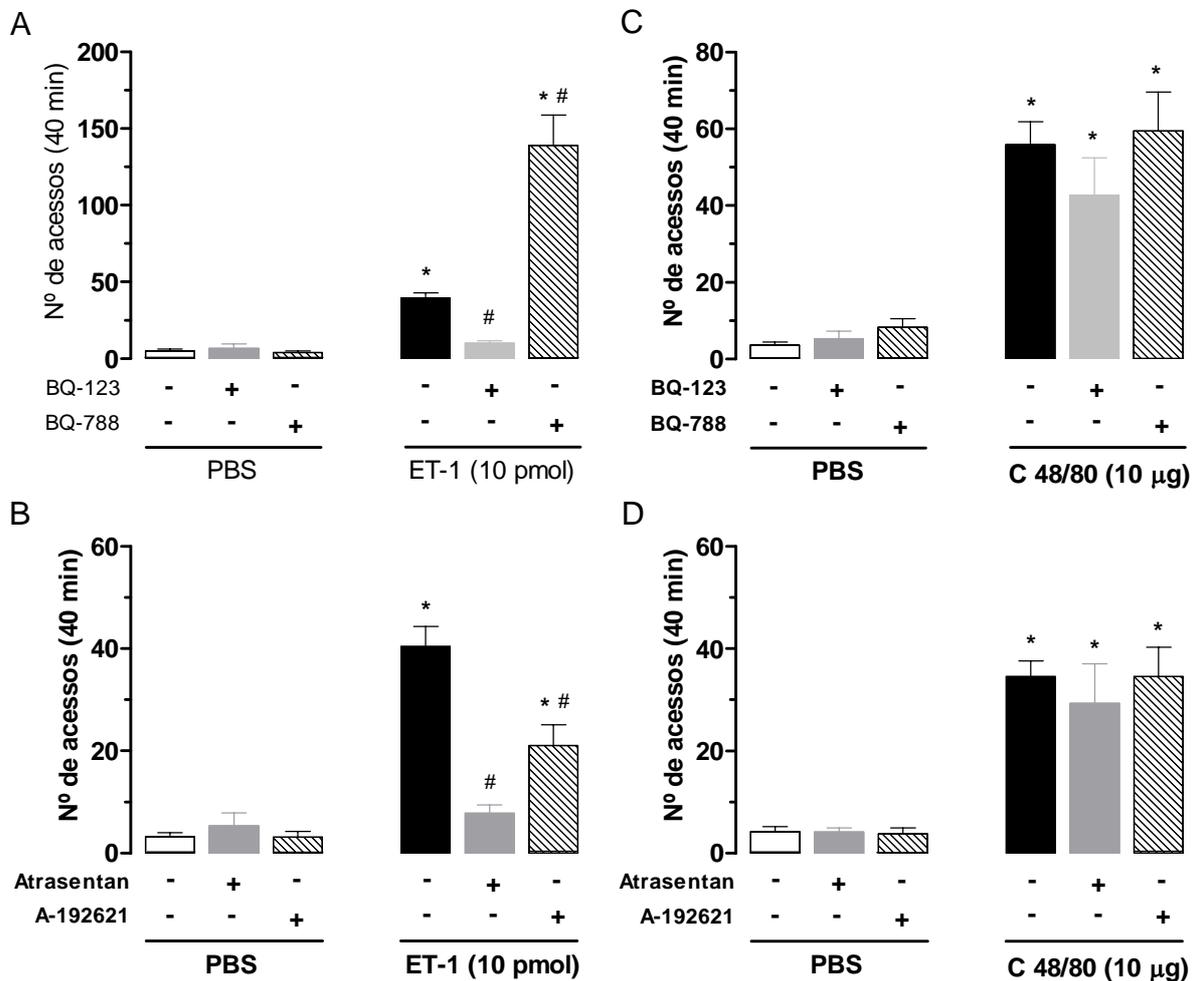


Figura 9. Influência dos antagonistas de receptores ET_A ou ET_B sobre os acessos de coceira induzidos pela ET-1 ou composto 48/80. Nos painéis A e C, os animais foram co-administrados por via intradérmica com BQ-123 (10 nmol) ou BQ-788 (3 nmol) junto com ET-1, composto 48/80 ou PBS no dorso. Nos painéis B e D, os animais foram pré-tratados com uma injeção i.p. de atrasentan (10 mg/kg), A-192621 (20 mg/kg) ou veículo, 1 hora antes da aplicação intradérmica de ET-1, composto 48/80 ou PBS no dorso. Os valores representam média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira de um n experimental de 6 a 8 animais por grupo. Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e ET-1, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

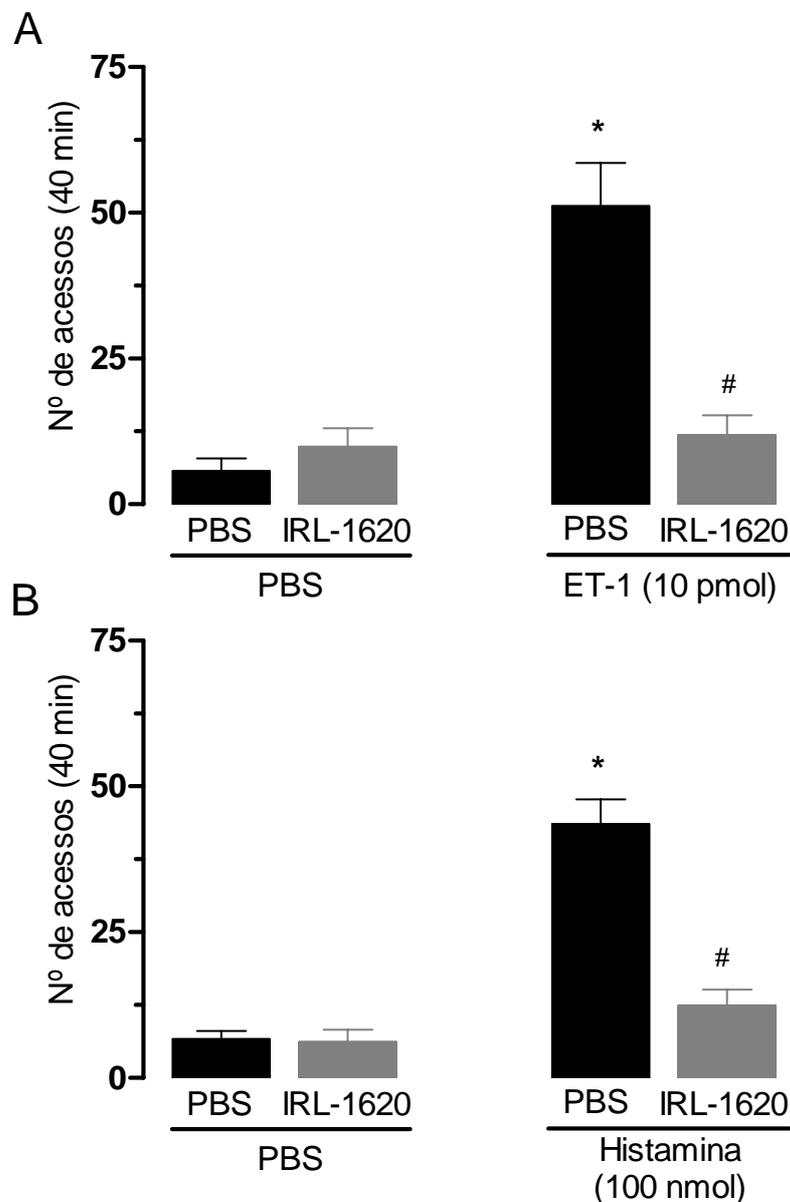


Figura 10. Influência do agonista seletivo de receptor ET_B IRL-1620 sobre os acessos de coceira induzidos pela ET-1 (painel A) ou histamina (painel B). O IRL-1620 (10 pmol) ou veículo (PBS) foi co-administrado com ET-1 ou histamina (nas doses indicadas) ou PBS. Os valores representam média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira de um n experimental de 6 a 8 animais por grupo. Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos controle tratados com PBS e ET-1 ou histamina, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

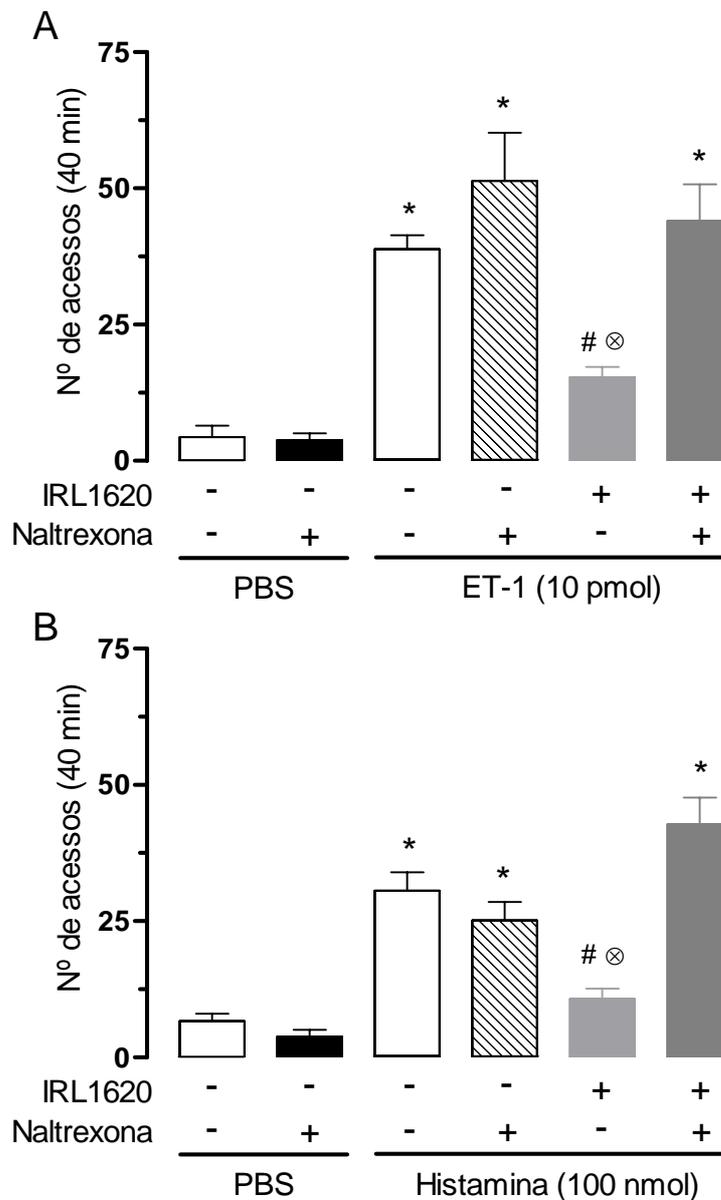


Figura 11. Influência do antagonista opióide naltrexona sobre o possível efeito anti-pruriginoso do IRL-1620. No painel A, a naltrexona (5 μ g) ou PBS foi co-injetada por via i.d. junto com ET-1 (10 pmol) e IRL-1620 (10 pmol) ou respectivos veículos no dorso de camundongos. O painel B, mostra a naltrexona ou PBS aplicada juntamente com a histamina (100 nmol) e IRL-1620 ou respectivos veículos no dorso. Os valores representam média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira ($n = 6$ a 8 animais). Asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com PBS e ET-1 ou histamina, respectivamente, enquanto o círculo cruzado indica $P < 0,05$ em relação ao grupo em que o IRL-1620 foi co-injetado somente com ET-1 ou histamina (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

5. Discussão

O presente trabalho demonstra, ao que parece pela primeira vez, que a administração intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos induz acessos de coceira, sugestivos de um efeito pruriginoso. O decurso temporal desta resposta foi muito semelhante ao comportamento de coceira causado pela histamina, mas um pouco mais prolongado que aquele induzido pelo composto 48/80, que promove seu efeito pela degranulação de mastócitos através de um mecanismo independente de sítio específico de interação com a membrana celular. Especificamente, o composto 48/80 é uma amina catiônica sintética que atua degranulando mastócitos através da ativação direta de subunidades α de proteínas $G_{i/o}$, com conseqüente liberação de histamina e outras substâncias com ação pruriginosa (para revisão, ver Mousli et al., 1990). Nesse sentido, nossos resultados comprovam que tanto o composto 48/80 quanto a histamina causam um comportamento associado ao prurido em camundongos (Kuraishi et al., 1995; Maekawa et al., 2000; Inagaki et al., 2002). Além disso, a resposta comportamental à ET-1 foi dependente de dose, atingindo o valor máximo na dose de 10 pmol, que foi semelhante àquele induzido por 10 μ g de composto 48/80 e claramente menor à dose de 100 μ g desse agente.

A exemplo dos acessos de coceira causados pela histamina, a resposta à aplicação intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos também foi reduzida marcadamente pela administração sistêmica prévia de morfina, agonista preferencial de receptores opióides do tipo μ , que induz analgesia por mecanismos centrais e periféricos (Dogrul et al., 2001; para revisão, ver Janson e Stein, 2003). Estes achados sugerem que os acessos de coceira causados por ambas as substâncias apresentam um componente nociceptivo. Contudo,

há alguns relatos discrepantes acerca dos efeitos de drogas opióides sobre o prurido. Na literatura está demonstrado que agonistas de receptores μ opióides promovem a indução de prurido, seja através da degranulação de mastócitos quando administrados por via sistêmica ou, possivelmente, como agentes pruriginosos quando injetados centralmente (para revisão, ver Schmelz, 2005; Umeuchi et al., 2003). Em contraste, antagonistas de receptor κ opióide favoreceram a resposta pruriginosa, sendo esta reduzida por um agonista κ opióide seletivo (Umeuchi et al., 2003). Além disso, um agonista deste tipo de receptor também reduz a resposta promovida pelo composto 48/80 (Kamei & Nagase, 2001). Por outro lado, recentemente foi observado em humanos que receptores μ parecem não estar envolvidos na ativação de mastócitos por opióides (Blunk et al., 2004). Em vista destas considerações e da falta de seletividade da morfina, é possível que o efeito antipruriginoso observado para este opióide tenha sido mediado por receptores κ .

A capsaicina é uma substância derivada da pimenta que, quando aplicada, ativa receptores TRPV1 presentes em um subtipo de fibras nociceptivas polimodais (fibras C). Uma vez ativados, os receptores TRPV1 apresentam aumento de condutância a cátions (especialmente Ca^{2+} e Na^+), que, por sua vez, resulta em despolarização local seguido de geração de potenciais de ação e liberação de neuropeptídeos das terminações nervosas, causando dor. A exposição a doses elevadas de capsaicina ou a repetidas aplicações desta droga induz dessensibilização das fibras sensoriais que expressam TRPV1. Tal efeito, que decorre da entrada maciça de cálcio e conseqüente ativação de proteases sensíveis ao cátion, pode ser observado como um declínio da resposta destas fibras à própria capsaicina ou a outros

estímulos, podendo até mesmo ocorrer degeneração irreversível de terminais nervosos (para revisão, ver Anand, 2005).

Neste trabalho verificamos que a depleção de neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina, pelo tratamento neonatal com dose alta desta substância, resultou na redução da resposta comportamental de coçar causada por administração intradérmica de ET-1, composto 48/80 ou histamina. A existência de um grupo específico de fibras C que respondem seletivamente à histamina, induzindo prurido em humanos (Schmelz et al., 1997), pode explicar o bloqueio completo dos acessos de coceira induzidos pela histamina, e também a redução marcada da resposta promovida pelo composto 48/80, uma vez que este agente atua degranulando mastócitos e, conseqüentemente, liberando histamina, substância presente em grande quantidade nos grânulos dessa célula. Todavia, como o comportamento observado com a aplicação de ET-1 também foi reduzido pela depleção de fibras C pela capsaicina, está claro que as respostas comportamentais promovidas por esse peptídeo também decorrem da atuação sobre essas fibras.

A histamina é considerada um importante mediador do prurido, principalmente, através de sua atuação nos receptores H₁ presentes nas fibras C específicas. O envolvimento da histamina no prurido é confirmado pela ação antipruriginosa de anti-histamínicos, principalmente antagonistas H₁ em diversas condições como urticária, reações a picadas de insetos, reações a algumas drogas entre outras, embora haja situações em que sua presença exerça pouco ou nenhum efeito (Twycross, *et al*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que receptores H₄ e, em menor grau, H₃ também parecem estar implicados na indução do prurido pela histamina (Bell et al., 2004).

Observamos no presente estudo que o comportamento induzido pela histamina foi inibido pelo pré-tratamento com a pirilamina (antagonista de receptores H₁), assim como demonstrado na literatura (Takano *et al*, 2003). Igualmente, viu-se que a resposta pruriginosa causada pelo composto 48/80 também foi bloqueada pela pirilamina.

Por outro lado, Frighetto (2004) demonstrou que os efeitos nociceptivo direto, hiperalgésico (para dor causada por capsaicina) e edematogênico da injeção de ET-1 na superfície plantar da pata de camundongos eram todos bloqueados pela pirilamina, bem como após depleção da população local de mastócitos com injeções repetidas de composto 48/80. Além disso, a resposta nociceptiva induzida por injeção de ovalbumina na pata de camundongos sensibilizados ao antígeno, que é mediada em grande parte por endotelinas, também é prevenida por injeções repetidas de composto 48/80 (Piovezan *et al.*, 2004). Embora tais resultados pudessem sugerir que talvez os acessos de coceira causados pela administração de ET-1 no dorso fossem dependentes de mastócitos e mediados, ao menos em parte, pela histamina, os resultados aqui apresentados indicaram que a resposta à ET-1 não foi afetada pela pirilamina. O resultado sugere que, diferentemente da nocicepção, os acessos de coceira induzidos pela ET-1 são mediados por um mecanismo independente de histamina.

A pirilamina foi capaz de reduzir o número de acessos de coceira induzido pela administração intradérmica do composto 48/80, indicando que o prurido induzido por este agente é mediado, principalmente, pela ativação de receptores H₁ pela histamina proveniente da degranulação de mastócitos. Em contraste, Inagaki *et al.* (2002) demonstraram que os antagonistas do receptor

H₁, cetotifeno e terfenadina, não reverteram o efeito do composto 48/80 em camundongos BALB/c. Além disso, estudos mostraram que composto 48/80 aplicado no dorso de camundongos deficientes de receptores H₁ induziu prurido (Sugimoto *et al*, 1998). Estes achados sugerem que, além da histamina, outros mediadores químicos provenientes do mastócito, tais como serotonina, substância P e leucotrieno B₄, também podem estar envolvidos no prurido (Andoh e Kuraishi, 1998; Andoh *et al*, 1998).

A serotonina, também presente em mastócitos (Selye, 1965), pode causar prurido através de um mecanismo periférico ou central (para revisão, ver Twycross *et al.*, 2003; Ständer *et al.*, 2003). Periféricamente, pode estimular fibras C pruriginosas diretamente (Beck e Handwerker, 1974), ou atuar indiretamente através da ativação de mastócitos e conseqüente liberação de histamina. Neste sentido, injetada na pata de camundongo, a serotonina provoca hiperalgesia à capsaicina (Piovezan *et al.*, 1998), enquanto que a metisergida, um antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos, reduz marcadamente o efeito hiperalgésico da ET-1, mas não o seu efeito nociceptivo (Frighetto, 2004). O presente estudo evidenciou que a metisergida, em dose que suprimiu os acessos de coceira promovidos pela serotonina, não alterou a intensidade das respostas evocadas pelo composto 48/80 ou pela ET-1.

Conforme mencionado na Introdução, há evidências de que a ET-1 pode degranular mastócitos (Uchida *et al.*, 1992; Yamamura *et al.*, 1994; Szalay *et al.*, 2000; Matsushima *et al.*, 2004), bem como ser produzida por estas células (Matsushima *et al.*, 2004; Ehrenreich *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 2000). Alguns subtipos de mastócitos apresentam, inclusive, aumento dos níveis de RNAm para ET-1 em certas condições patológicas (Liu *et al.*, 1999;

Gilbert et al., 2000). Em camundongos, o comportamento nociceptivo induzido pela aplicação de ET-1 na pata foi prevenido pelo bloqueio de receptores ET_A (Piovezan et al., 2000) ou pela depleção da população local de mastócitos através de sucessivas injeções de composto 48/80 (Frighetto, 2004). No presente estudo, um protocolo semelhante de injeções intradérmicas diárias de composto 48/80 no dorso, por quatro dias, acarretou na redução expressiva da resposta induzida pelo próprio composto 48/80, mas não interferiu na magnitude daquela induzida pela ET-1 ou pela capsaicina. Em resumo, apesar da pirlamina, metisergida ou depleção local de mastócitos inibirem os efeitos nociceptivos induzidos pela ET-1 na pata de camundongos, a resistência da resposta comportamental induzida pela aplicação intradérmica deste peptídeo no dorso a cada um destes tratamentos sugere, fortemente, que o mecanismo envolvido na geração dos acessos de coceira independe de degranulação mastocitária. Ainda assim, o(s) mecanismo(s) celular(es) envolvido(s) na mediação deste efeito da ET-1 permanece(m) a ser caracterizado(s). Por outro lado, considerando que ao menos algumas sub-populações de mastócitos podem expressar receptores TRPV1 (Ständer et al., 2004), o fato do tratamento repetido prévio com composto 48/80 no dorso não ter afetado as respostas à capsaicina sugere que o efeito deste agente álgico não decorreu de degranulação destas células.

Embora neste estudo a injeção i.d. de capsaicina no dorso tenha induzido resposta comportamental muito semelhante aos causados pela ET-1, histamina e composto 48/80, não se pode afirmar que essa resposta seja realmente prurido. Voluntários que receberam capsaicina por via intradérmica relatam que o tratamento causa dor, mas nenhum prurido, apesar de ativar

fortemente fibras relacionadas com o prurido (Schmelz et al., 2003). Já voluntários que receberam injeções semelhantes de ET-1 relatam prurido em queimação (Ferreira et al., 1989; Wenzel et al., 1998). Isto demonstra que a interação central entre prurido e dor tem grande importância na fisiopatologia dessas sensações, além da ativação de fibras relacionadas com o prurido. Por outro lado, Vivancos et al. (2003) verificaram recentemente diferenças nas respostas comportamentais dependendo da profundidade da injeção local na pata de rato (injeção subcutânea *versus* intradérmica), verificando que a via Arginina/NO/GMPc exerce influências opostas sobre a nocicepção. Quando essa via foi estimulada no tecido subcutâneo, demonstrou efeito anti-nociceptivo, por outro lado, no tecido intradérmico apresentou ação pró-nociceptiva. Os autores sugeriram que diferentes extratos da pele são inervados por tipos diferentes de neurônios nociceptivos primários.

O tratamento prévio com dexametasona não preveniu o efeito da administração intradérmica da ET-1 ou histamina, da mesma forma como demonstrado por Takano *et al.* (2003) em relação ao prurido induzido pela histamina em camundongos BALB/c. Entretanto, confirmando achados prévios de Frighetto (2004), o presente estudo demonstrou que a resposta nociceptiva causada pela administração i.pl. de ET-1 na pata é prevenida pelo tratamento prévio com esse glicocorticóide. Além disso, diferenças na sensibilidade à dexametasona também foram vistas para os efeitos do composto 48/80, histamina e formalina aplicadas em ambas as regiões. Os efeitos do composto 48/80 e da histamina no dorso não foram prevenidos pela dexametasona, mas sim na pata. Ainda, o glicocorticóide inibiu apenas a segunda fase da resposta comportamental induzida por formalina na pata, como observado na literatura

(Shibata *et al*, 1989; Yashpal *et al*, 1998), mas não quando aplicada no dorso do animal. Desta forma, podemos sugerir que as modificações diferenciais observadas com a dexametasona nas respostas à ET-1, composto 48/80, histamina e formalina podem ser resultantes da presença de tipos diferentes de neurônios nociceptivos primários nos tecidos intradérmicos e subcutâneos, que podem diferenciar ambas as respostas nociceptivas.

Os acessos de coceira induzidos pela ET-1 foram totalmente prevenidos pelo tratamento local com BQ-123 ou sistêmico com atrasentan (ambos antagonistas seletivos de receptores ET_A), indicando o importante papel dos receptores ET_A nessa resposta. Estes resultados se correlacionam com a importância primordial desses receptores na mediação da nocicepção, bem como da hiperalgesia à capsaicina ou ao calor induzidos por ET-1 na pata de camundongos (Piovezan *et al.*, 2000; Menendez *et al.*, 2003).

Mastócitos da pele de fetos de camundongos em cultura expressam tanto receptores ET_A como ET_B, mas apenas a ativação dos primeiros promove a sua degranulação. No entanto, mastócitos não diferenciados provenientes da medula óssea expressam poucos receptores ET_A e nenhum ET_B, e não respondem à ET-1 (Matsushima *et al.*, 2004). Assim, se *in vivo* os mastócitos de pele no animal adulto mantivessem o fenótipo observado na fase fetal, a resposta à aplicação intradérmica de ET-1 poderia ser mediada pela degranulação de mastócitos via ativação de receptores ET_A, pelo menos em princípio. Porém, conforme já discutido acima, essa hipótese parece pouco provável. Uma outra explicação mais plausível seria a ativação direta dos receptores ET_A presentes em neurônios sensoriais. Já foram detectados receptores ET_A tanto em neurônios sensitivos peptidérgicos e não

peptidérgicos com corpos celulares de pequeno diâmetro presentes em gânglios de raízes dorsais de ratos e coelhos (Pomonis et al., 2001; Peters et al., 2004), quanto em axônios de fibras sensitivas em camadas superficiais da pele (Khodorova et al., 2003). Ainda, a ET-1 é capaz de sensibilizar canais de sódio resistentes a tetrodotoxina via receptores ET_A em fibras sensitivas do nervo ciático de rato (Zhou et al., 2002).

A co-administração local do antagonista peptídico de receptores ET_B, BQ-788, aumentou pronunciadamente o número de acessos de coceira induzido pela ET-1. Este resultado, somado ao efeito do agonista seletivo desses mesmos receptores, IRL-1620, que promoveu a redução do comportamento de coceira causado pela ET-1, confirma a possível ação antipruriginosa dos receptores ET_B locais. Em adição, este mesmo agonista foi também capaz de reduzir o prurido induzido pela histamina, o que demonstra ser improvável essa resposta ser mediada por mastócitos, já que não há relatos da ativação destas células por receptores ET_B. Além disso, nenhum dos antagonistas endotelinérgicos foi capaz de afetar o número de acessos de coceira induzido pelo composto 48/80, reforçando a hipótese de que os mastócitos não estão envolvidos na resposta comportamental observada no modelo utilizado neste trabalho.

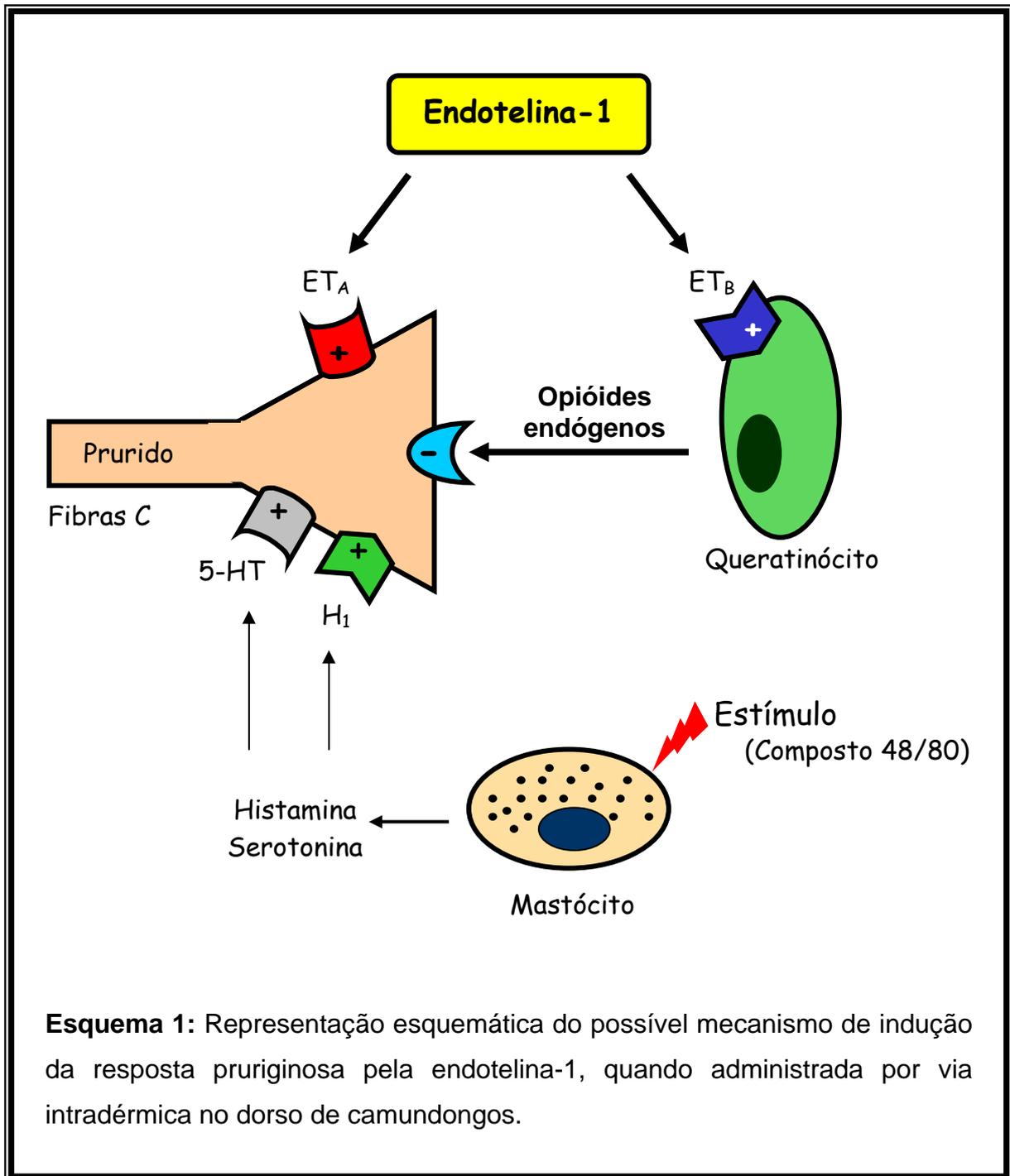
A estimulação de receptores ET_B na pata de camundongos e ratos suprime as respostas hiperalgésicas à capsaicina e nocicepção induzidas pela aplicação i.pl. de ET-1 (Piovezan et al., 2000; Khodorova et al., 2003). Além disso, a ativação de receptores ET_B presentes em queratinócitos promove liberação de β -endorfinas que limitam o efeito nociceptivo promovido pela ET-1 através de receptores ET_A (Khodorova et al., 2003). De modo semelhante,

observou-se no presente estudo que o efeito do IRL-1620 sobre o comportamento induzido pela ET-1 ou histamina foi revertido pela co-administração do antagonista de receptores opióides, naltrexona. Somando a isto o fato de que a morfina reduziu os acessos de coceira causados pela ET-1 e histamina, sugere-se que o mecanismo operado pelo receptor ET_B é mediado pela liberação de opióides a partir de queratinócitos. Além de que as injeções intradérmicas de ET-1 no dorso disponibilizam o peptídeo a um local mais próximo aos queratinócitos do que aquelas aplicadas subcutaneamente na pata.

Inesperadamente, o pré-tratamento sistêmico com o antagonista de receptores ET_B, A-192621, produziu efeito oposto ao do BQ-788. O resultado revelou que, de alguma forma, o bloqueio sistêmico dos receptores ET_B impediu a possível modulação antipruriginosa desses receptores. No entanto, como os receptores ET_B presentes nas células endoteliais promovem a depuração de ET-1 circulante (Depuis et al., 1998), seu bloqueio pelo tratamento sistêmico pode acarretar no aumento dos níveis de ET-1 circulante, e assim, favorecer a vasoconstrição e conseqüente redução do fluxo sanguíneo, reduzindo a irrigação da derme. Todavia, essa hipótese ainda precisa ser esclarecida.

Em conclusão, este estudo demonstrou que a ET-1 aplicada por via intradérmica no dorso de camundongos é capaz de induzir um comportamento nociceptivo associado ao prurido (i.e. acessos de coceira) independente da ativação de mastócitos, tendo em vista as diferenças observadas com a administração sistêmica de dexametasona *versus* as respostas do peptídeo no dorso e na pata. Além disso, o comportamento promovido pela ET-1 foi muito

semelhante ao da histamina, que apresenta conhecida ação pruriginosa. O comportamento induzido pela ET-1 no dorso é mediado pela ativação de receptores ET_A, provavelmente localizados em fibras sensoriais presentes na derme, mas não em mastócitos. Por outro lado, o possível prurido promovido pela ativação de receptores ET_A ou de outros receptores acoplados à produção deste efeito (receptores H₁ para histamina, por exemplo) pode ser limitado por receptores ET_B, possivelmente presentes em queratinócitos, que estimulam a liberação local de opióides endógenos. O esquema a seguir representa de maneira simplificada o possível mecanismo da resposta desencadeada pela administração intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos.



Esquema 1: Representação esquemática do possível mecanismo de indução da resposta pruriginosa pela endotelina-1, quando administrada por via intradérmica no dorso de camundongos.

6. Conclusão

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

◆ A aplicação i.d. de ET-1, bem como histamina e composto 48/80, no dorso de camundongos, é capaz de induzir um comportamento associado ao prurido. Os acessos de coceira induzidos pela ET-1 foram inibidos pelo tratamento prévio com morfina, indicando um componente nociceptivo, e pelo tratamento neonatal com capsaicina, indicando a implicação de fibras C nessa resposta.

◆ O mecanismo envolvido na gênese da resposta induzida pela ET-1 no dorso parece ser distinto daquele relatado para o efeito nociceptivo do peptídeo na pata de camundongos, pois se mostrou insensível à depleção de mastócitos locais, ou tratamento prévio com pirlamina, metisergida ou dexametasona.

◆ O comportamento promovido pela ET-1 é mediado por ativação de receptores ET_A , enquanto, que receptores ET_B locais parecem desempenhar uma provável função anti-pruriginosa mediada através da liberação local de opióides endógenos, possivelmente, a partir de queratinócitos.

7. Referências bibliográficas

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 12; 1000 (1-2): 40-56. 2004.

Anand P. Capsaicin and menthol in the treatment of itch and pain: recently cloned receptors provide the key. *Gut.* 52 (9): 1233-5, 2003.

Andoh, T, Kuraishi, Y. Intradermal leukotriene B₄, but not prostaglandin E₂, induces itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol.* 353: 93-96, 1998.

Andoh, T, Nagasawa, T, Satoh, M, Kuraishi, Y. Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 286: 1140-1145, 1998.

Andrew D e Craig AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci.* 4 (1) :72-7, 2001.

Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkub, H. E Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348: 730-732, 1990.

Baamonde A, Lastra A, Villazon M, Bordallo J, Hidalgo A, Menendez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369 (2): 245-51, 2004.

Beck PW, Handwerker HO. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibres. *Pflugers Arch.* 347: 209–222, 1974.

Beirith, A; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Research.* 969, 110–116, 2003.

Bell JK, McQueen DS, Rees JL. Involvement of histamine H₄ and H₁ receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. *Br J Pharmacol.* 142 (2): 374-80, 2004.

Blunk JA, Schmelz M, Zeck S, Skov P, Likar R, Koppert W. Opioid-induced mast cell activation and vascular responses is not mediated by μ -opioid receptors: an in vivo microdialysis study in human skin. *Anesth Analg.* 98 (2): 364-70, 2004.

Cunha, J.M. et al. "Endotelinas induzem hiperalgesia através de receptores do tipo ET_B". XXXIII Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Caxambu, 443P, 2001.

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.*, 8: 811-817, 1990.

De-Melo, J.D., Tonussi, C.R., D'orléans-Juste, P., Rae, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints of the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain*. 77: 261-270, 1998.

Dupuis J, Rouleau JL, Cernacek P. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation*. 98:1684-7, 1998.

Dogrul A, Yesilyurt O, Isimer A, Guzeldemir ME. L-type and T-type calcium channel blockade potentiate the analgesic effects of morphine and selective μ opioid agonist, but not to selective delta and kappa agonist at the level of the spinal cord in mice. *Pain*. 93 (1): 61-8, 2001.

Ehrenreich H, Burd PR, Rottem M, Hultner L, Hylton JB, Garfield M, Coligan JE, Metcalfe DD, Fauci AS. Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol*. 4 (2): 147-56, 1992.

Fecteau MH, Honore JC, Plante M, Labonte J, Rae GA, 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*. 46 (1): 87-92, 2005.

Ferreira, S. H.; Romitelli, M.; De Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol*. 13 (suppl. 5): S220-S222, 1989.

Frighetto, M. Mediadores envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e edema causados pela endotelina-1 em camundongos. 2004. 93 f. Dissertação (mestrado em farmacologia) – curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

Giaid, A; Gibson, S. J.;Ibrahlim, B. N.; Legon, S.; Blonn, S.R.; Yanagisawa, M.; Masaki, T.; Varndell, I. M.; Polak, J.M. Endothelin-1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad sci*. 86: 7634-7638, 1989.

Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z, Cox AJ, van Eeden P, Allen TJ, Kelly DJ, Cooper ME. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ Res* 86 (2): 158-65, 2000.

Gokin, A. P. et al. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. *J Neurosci.* 21: 5358-5366, 2001.

Hiura A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch Histol Cytol.* 63 (3): 199-215, 2000.

Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. Histamine H₄ receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 305 (3): 1212-21, 2003.

Holzer, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 43, 143-201, 1991.

Honore JC, Plante M, Bkaily G, Rae GA, D'Orleans-Juste P. Pressor and pulmonary responses to ET-1(1-31) in guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 136 (6): 819-28, 2002.

Hunt SP e Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2): 83-91. 2001.

Hyslop, S., De Nucci, G. Vasoactive mediators released by endothelins, *Pharmacol Res.* 26: 223-242, 1992.

Inagaki, N.; Igeta, K.; Kim, J.F.; Nagao, M.; Shiraishi, N.; Nakamura, N.; Nagai H. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur. J. Pharmacol.* 448: 175-183, 2002.

Jarvis MF, Wessale JL, Zhu CZ, Lynch JJ, Dayton BD, Calzadilla SV, Padley RJ, Opgenorth TJ, Kowaluk EA. ABT-627, an endothelin ET(A) receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 388: 29-35, 2000.

Janson W, Stein C. Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol.* 4 (4): 270-4, 2003.

Julius D e Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 13; 413 (6852): 203-10. 2001.

Kamei J, Nagase H. Norbinaltorphimine, a selective kappa-opioid receptor antagonist, induces an itch-associated response in mice. *Eur J Pharmacol.* 20; 418 (1-2): 141-5, 2001.

Kar, S.; Chabot, J. G.; Quirion, R. Quantitative autoradiographic localization of [125I] endothelin-1 binding sites in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neurosci Lett.* 133 (1): 117-20, 1991.

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

Khodorova A, Farred MU, Gokin A, Strinchartz GR, Davar G. Local injection of a selective agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. *J. Neurosc.* 22 (17): 7788-7796, 2002.

Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy JE, Rice FL, Mazurkiewicz JE, Long-Woodward D, Stoffel M, Strichartz GR, Yukhananov R, Davar G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med* 9:1055-1061, 2003.

Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 14: 75(3):229-33, 1995.

Koda W, Harada K, Tsuneyama K, Kono N, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest* 80 (7): 1007-17, 2000.

Lavich TR, Cordeiro RS, Calixto JB, e Silva PM, Martins MA. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 21;462(1-3):185-92, 2003.

Leslie SJ, Rahman MQ, Denvir MA, Newby DE, Webb DJ. Endothelins and their inhibition in the human skin microcirculation: ET[1-31], a new vasoconstrictor peptide. *Br J Clin Pharmacol.* 57 (6): 720-5, 2004.

Liu Y, Yamada H, Ochi J. Immunocytochemical studies on endothelin mast cells and macrophage in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 109: 301-307, 1998.

Liu G, Keane-Myers A, Miyazaki D, Tai A, Ono SJ. Molecular and cellular aspects of allergic conjunctivitis. *Chem Immunol* 73:39-58, 1999.

Maekawa T, Nojima H, Kuraishi Y. Itch-associated responses of afferent nerve innervating the murine skin: different effects of histamine and serotonin in ICR and ddY mice. *Jpn J Pharmacol.* 84(4): 462-6, 2000.

Masaki T, Ninomiya H, Sakamoto A, Okamoto Y. Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem.* 90 (1-2): 153-156, 1999.

Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci.* 25 (4): 219-24, 2004.

- 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* 34 (7): 1910-9, 2004.
- Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, Kovanen P, Piliponsky AM, 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*. 12 (6): 886-910, 2003.
- Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature*. 25; 432 (7016): 512-6. 2004.
- Menéndez, L. et al. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 36: 28-34, 2002.
- Menéndez 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* 367:28-34, 2003.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 57(1):1-164, 1999.
- Mousli M, Bueb JL, Bronner C, Rouot B, Landry Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 11 (9): 358-62, 1990.
- 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*. 15; 159 (4): 1987-92, 1997.
- Nilsson HJ, Levinsson A, Schouenborg J. Cutaneous field stimulation (CFS): a new powerful method to combat itch. *Pain*. 71 (1): 49-55, 1997.
- Nilsson HJ, Psouni E, Carstam R, Schouenborg J. Profound inhibition of chronic itch induced by stimulation of thin cutaneous nerve fibres. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 18 (1): 37-43, 2004.
- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 102 (4): 937-44, 2001.

Peters CM, Lindsay TH, Pomonis JD, Luger NM, Ghilardi JR, Sevcik MA, Mantyh PW. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. *Neurosc.* 126 (4): 1043, 2004.

Piovezan, A. P., D'orléans-Juste, P., Tonussi, C.R. E Rae, G.A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. *Can J Phys Pharmacol*, 75, 596-600, 1997.

Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Tonussi CR, Rae GA. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 12; 351 (1): 15-22, 1998.

Piovezan, A.P.; D'orléans-Juste, P.; Souza, G.E.P. 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.* 129 (5), 961-968, 2000.

Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Frighetto M, Souza GE, Henriques MG, Rae GA. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. *Br J Pharmacol.* 141 (4): 755-63, 2004.

Pomonis JD, Rogers SD, Peters CM, Ghilardi JR, Mantyh PW. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. *J Neurosci.* 1;21 (3): 999-1006, 2001.

Rae, G.A. & Henriques, M. G. M. O. Endothelins in inflammation. In: S. Said (Ed.), *Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Peptides*, Marcel Dekker, New York, pp.163-202, 1998.

Raffa, R.B. e Jacoby, H.I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. *Life Sci.* 48: PL85-PL90, 1991.

Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol.* 3; 387 (1): 111-8, 2000.

Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K. E Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 348: 731-735, 1990.

Shibata, M, Ohkubo, T, Takahashi, H, Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38:347-352, 1989.

Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *The journal of Neuroscience* 15: 8003-8008, 1997.

Schmelz M. A neural pathway for itch. *Nat Neurosci.* 4 (1): 9-10, 2001.

Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol.* 89 (5): 2441-8, 2003.

Schmelz M. Itch--mediators and mechanisms. *J Dermatol Sci.* 28 (2): 91-6, 2002.

Schmelz M. Itch and pain. *Dermatol Ther.* 18 (4): 304-7, 2005.

Selye, H., *The Mast Cells*. Butterworths. Washington, 1965.

Sokolovsky, M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell Mol Neurobiol.* 15: 561-571, 1995.

Ständer S, Steinhoff M, Schmelz M, Weisshaar E, Metze D, Luger T. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. *Arch Dermatol.* 139 (11): 1463-70, 2003.

Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol.* 13 (3): 129-39, 2004.

Stante M, Hanna D, Lotti T. Itch, pain, and metaesthetic sensation. *Dermatol Ther.* 18(4):308-13, 2005.

Sugimoto, Y, Umakoshi, k, Kamei, C. Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80 - induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol.* 351: 1-5, 1998.

Szalay L, Kaszaki J, Nagy S, Boros M. Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation in the rat small intestine. *Life Sci.* 67(16):1947-58, 2000.

Takano, N, Arai, I, Kurachi, M. Analysis of the spontaneous scratching behavior by NC/Nga mice: a possible approach to evaluate antipruritics for subjects with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* 471:223-228, 2003.

Twycross, R.; Greaves, M. W.; Handwerker, H.; Jones, E. A.; Libretto, S.E.; Szepietowski, J. C. e Zyllys, Z. Itch: scratching more than the surface. *Q. J. Med.*, 96: 7-26, 2003.

Uchida Y, Ninomiya H, Sakamoto T, Lee JY, Endo T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 189(2):1196-201, 1992.

Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharmacol.* 530(1-2):172-8, 2006.

Umeuchi H, Togashi Y, Honda T, Nakao K, Okano K, Tanaka T, Nagase H. Involvement of central μ -opioid system in the scratching behavior in mice, and the suppression of it by the activation of kappa-opioid system. *Eur J Pharmacol.* 5; 477 (1): 29-35, 2003.

Vivancos, G G, Parada, C A, Ferreira, S H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br J Pharmacol.* 138:1351-1357, 2003.

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K. Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol.* 14; 265 (1-2): 9-15, 1994.

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K. Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C4 from mouse bone marrow-derived mast cells. *Eur J Pharmacol.* 23; 257 (3): 235-42, 1994.

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K. Mechanism of histamine release by endothelin-1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow-derived mast cells. *Eur J Pharmacol.* 15; 288 (3): 269-75, 1995.

Yashpal, K, Coderre, T. J. Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin. *Eur J Pain.* 2 (1): 63-68, 1998.

Yosipovitch, G.; Greaves, M.W. e Schmelz, M. Itch. *Lancet.* 361: 690-94, 2003.

Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, Beitz AJ, Wilcox GL. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J Neurosci* 21 (23): 9355-66, 2001.

Webb DJ. Endothelin: from molecule to man. *Br J Clin Pharmacol.* 44(1): 9-20. 1998.

Wenzel RR, Zbinden S, Noll G, Meier B, Luscher TF. Endothelin-1 induces vasodilation in human skin by nociceptor fibres and release of nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol.* 45 (5): 441-6, 1998.

Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 105 (5): 847-59, 2000.

Zhou Z, Davar G, Strichartz G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. *J Neurosci* 22 (15): 6325-30, 2002.

Anexo 1

Parte destes resultados integram um trabalho completo a ser publicado na revista *Experimental Biology and Medicine* em Julho de 2006 (no prelo).

Endothelin-1 causes pruritus in mice.

Trentin, Patrícia Gonçalves¹, Fernandes, Marcília Baticy¹, D'Orléans-Juste, Pedro², Rae, Giles Alexander^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

*Corresponding author: Tel.: +55 48 3319491; fax: +55 48 3375479

Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Center of Biological Sciences, Block D, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

E-mail address: garae@farmaco.ufsc.br

Abstract

Endothelin-1 (ET-1) evokes a burning pruritus sensation when injected intradermally in humans and nocifensive behavior when injected into the hind paw of rodents. As pain and pruritus are clearly distinct nociceptive sensory modalities in humans, the current study evaluates the potential of ET-1 to elicit scratching behavior in mice. Mice received an intradermal injection of ET-1 (1 to 30 pmol), the mast cell degranulator compound 48/80 (10 μ g), histamine (100 nmol) or vehicle into the scruff and the number of scratching bouts displayed over the first 40 min was recorded. ET-1 caused dosedependent scratching bouts distributed evenly throughout the observation period (as seen with histamine), while responses to compound 48/80 occurred mainly during the first 10 min. The effect of ET-1 was maximal at 10 pmol (total 40 ± 7 bouts), a value similar to that caused by histamine (52 ± 5 bouts) and compound 48/80 (53 ± 6 bouts). The selective ETB receptor agonist IRL-1620 (10 pmol) was not pruritic per se and actually inhibited responses to histamine and ET-1. Pruritus induced by ET-1 was inhibited by ETA receptor antagonists BQ-123 (10 nmol, co-injected, net inhibition 87%) and atrasentan (10 mg/kg, i.p.; net inhibition 83%) or the ETB receptor antagonist A-192621 (20 mg/kg, i.p.; net inhibition 64%), but the response was augmented by co-injection of the ETB receptor antagonist BQ-788 (3 nmol; net potentiation 234%). Responses to compound 48/80 or responsiveness of vehicle-treated mice were unaffected by these antagonists. Thus, ET-1 displays potent pruritic actions in the mouse mediated to a substantial extent via local ETA receptors. The findings with IRL-1620 and BQ-788 suggest that local ETB receptors exert an antipruritic role, but, for reasons still unknown, the results obtained using systemic A-192621 injection are at variance with this view.

Keywords: pruritus, endothelin-1, histamine, compound 48/80, scratching behavior, mice.

1. Introduction

Itch and pain are unpleasant sensory experiences that can lead to serious life quality impairment. Along with pain, itch can be an important symptom of systemic malfunctions, as well as skin diseases. However, the behavioral response patterns evoked by both sensations differ, i.e. pain elicits a withdrawal reflex, whereas itch leads to a scratch reflex (1). Progress in understanding the neuropathophysiology of pruritus has been made with the elucidation of a distinct pathway that carries this kind of sensory information. These itch neurons consist of C fibers that can be identified by their lasting response to histamine application and represent about 5% of C-fibers in human skin afferents (2, 3).

Histamine is one of the most outstanding chemical mediators causing pruritus and indeed H1 receptor antagonists provide first choice treatment for this symptom (4). However, other peripheral mediators can be involved in induction of itch alongside mast cell-derived histamine (5). One such candidate is endothelin-1 (ET-1), a peptide of the ET family produced and released by various cell types including mast cells (6, 7). The ETs exert physiopathological actions through activation of specific G protein-coupled ETA and ETB receptors (8). Injection of ET-1 into the rat or mouse hind paw evokes nociceptive behavior (i.e. overt pain) as well as hyperalgesia (i.e. sensitization to noxious stimuli; 9, 10, 11, 12). In volunteers, the peptide causes deep pain when infused into the brachial artery, as well as intense burning pruritus, tactile allodynia and vasodilatation if injected intradermally into the forearm (13, 14, 15). The ET receptors mediating such actions can differ considerably depending on the species and nociceptive model considered. Thus, ETA and ETB receptors subservise pro-nociceptive and/or pro-hyperalgesic roles in abdominal writhes induced by ET-3 (16) and mechanical hyperalgesia induced by ET-1 in mice (17), but only ETB receptors seem to mediate the later effect in rats (18). On the other hand, only ETA receptors mediate the nociceptive and hyperalgesic responses to intraplantar ET-1 injection into the hind paw of mice or rats, whereas activation of ETB receptors in this body region usually elicits antinociceptive and/or antihyperalgesic effects (9, 10, 11, 12).

Although the participation of the ET system has been widely demonstrated in animal models of immune, inflammatory, neuropathic and neoplastic pain (9, 19, 20, 21, 22, 23), to the best of our knowledge no studies have yet investigated the capability of these peptides to induce pruritus in animals. Thus, the present study assesses the

potential pruritic actions of ET-1 in mice and attempts to characterize the receptors implicated in these effects.

2. Methods

2.1. Animals

Experiments were conducted on male Swiss mice (30 – 35 g) from our own colony, housed at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) and had free access to food and water. The experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA) of the Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2. Behavioral experiments

One day after tricotomy of the rostral part of the back and scruff (i.e. back of the neck), mice were given an intradermal injection into the scruff of ET-1 (1 to 30 pmol), the mast cell degranulator compound 48/80 (3 to 100 μg), histamine (100 nmol) or vehicle (20 μl of PBS solution). Each mouse was placed immediately and individually under inverted glass funnels and the number of scratching bouts displayed during the first 40 min was recorded, as described previously (24).

Two protocols were conducted with ET receptor antagonists to functionally identify the receptors implicated in the effects of ET-1. In the first, selective peptidic antagonists for the ETA (BQ-123, 10 nmol) or ETB receptor (BQ-788, 3 nmol and 10 nmol), or vehicle, were coinjected intradermally together with ET-1 (10 pmol) or compound 48/80 (10 μg) in separate groups of animals, in a final volume of 20 μl . In the second protocol, mice were pre-treated intraperitoneally with selective non-peptidic antagonists of ETA (atrasentan, 10 mg/kg) or ETB receptors (A-192621, 20 mg/kg), or vehicle, 1 h prior to injection of ET-1 or compound 48/80. The main rationale for testing a peptidic and a non-peptidic antagonist for either endothelin receptor type, each via a distinct route of administration, was to compare the local versus systemic effects of ETA or ETB receptor blockade on the pruritic behavior. In additional experiments, the selective ETB receptor agonist IRL-1620 (10 pmol) or vehicle was co-injected with ET-1 (10 pmol) or histamine (100 nmol). Doses of the various drug used were selected on the basis of those shown to be effective in previous studies (19, 21, 22, 25).

2.3. Drugs

The following drugs were used: ET-1 and IRL-1620 (Suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]-endothelin-1 (8-21)) from American Peptide Co. (Sunnyvale, CA, USA); compound 48/80 and histamine from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA); BQ-123 (ciclo[DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]) and BQ-788 (N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L- γ -methylleucil-D-1-methoxycarboyl-D-norleucine) from Research Biochemicals International, Natick, U.S.A.); and atrasentan and A-192621 [[2R-(2a,3b,4a)]-4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-[2-(2,6-diethylphenyl)amino]-2-oxoethyl]-2-(4-propoxyphenyl)-3 pyrrolidinecarboxylic acid], which were kindly provided by Abbott Laboratories (Abbot Park, IL, USA). Atrasentan and A-192621 were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) containing 3% ethanol and 100 μ l of 0.1 N NaOH. All the other drugs were dissolved in PBS.

2.4. Statistical Analysis

All data are expressed as the mean \pm s.e. mean of 6 to 8 animals. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. In all statistical analyses, differences with $P < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results

Intradermal injection of ET-1 (1 to 30 pmol), but not of vehicle, evoked dose-dependent scratching bouts (Figure 1A). The maximal response to ET-1 was obtained using 10 pmol of the peptide (40 ± 7 bouts) and was equivalent to the effects induced by 10 μ g of compound 48/80 (53 ± 6 bouts) or 100 nmol of histamine (52 ± 5 bouts; Figure 1B). Scratching bouts triggered by ET-1 and histamine were distributed evenly throughout the 40 min observation period, while responses to compound 48/80 occurred mainly during the first 10 min after injection (data not shown).

Pruritus induced by ET-1 was markedly inhibited when it was co-administered locally together with the selective ETA receptor antagonist BQ-123 or by systemic pretreatment with either the selective antagonist for ETA receptors atrasentan or ETB receptors A-192621 (net inhibitions of 87%, 83% and 64%, respectively; Figure 2). In contrast, local co-injection of the selective ETB receptor antagonist BQ-788 (3 nmol) augmented substantially the effect of ET-1 (net potentiation of 235%), whereas a higher dose of the antagonist (10 nmol) evoked significant pruritus response per se. On the other hand, co-injection of the selective ETB receptor agonist IRL-1620 profoundly

inhibited scratching behavior induced either by ET-1 or histamine (net inhibitions of 96% and 81%, respectively, Figure 3). None of the antagonists nor IRL 1620 affected the responsiveness of vehicle-treated mice (Figures 2 and 3). The antagonists also failed to affect responses to compound 48/80 (data not shown).

4. Discussion

The current study demonstrates, to our knowledge for the first time, that ET-1 induces pruritus when injected intradermally in mice. This response was inhibited by local coadministration of an ETA receptor antagonist or of an ETB receptor agonist, but was potentiated by local co-injection of an ETB receptor antagonist.

There is evidence that ET-1 can degranulate mast cells (26, 27, 28, 29), can be produced by these cells (29, 30, 31, 32) and that some mast cell subtypes display augmented levels of mRNA for ET-1 in certain physiopathological conditions (33, 34). In the mouse hind paw ET-1 injection elicits nociceptive licking behavior which is fully prevented by local ETA receptor blockade (9) or prior desensitization of resident mast cells induced by multiple injections of the degranulating synthetic cationic polyamine compound 48/80 (Frighetto et al., unpublished observation). The current study shows that ET-1 elicited scratching bouts when injected into the scruff of mice, which were indistinguishable from and followed a similar time course to those induced by histamine, but those triggered by compound 48/80 followed a shorter time course and reached a greater maximal response. Although it is possible that the pruritic effect of ET-1 may have derived from mast cell degranulation, this still remains to be adequately demonstrated. Nonetheless, the data is sufficient to safely state that ET-1 can stimulate intradermal sensory fibers, directly or indirectly, to evoke itch in mice. In humans, itchselective neurons comprise only 5% of C-fibers present in skin (2), but their proportion in mouse skin is unknown.

Considering that ET-1-induced scratching behavior was fully prevented by local coadministration of BQ-123 or prior systemic treatment with atrasentan (both selective ETA receptor antagonists), ETA receptors seem to play a major role in eliciting this response. This finding correlates very well with the central role played by ETA receptors in mediating ET-1-induced nociceptive behavior and hyperalgesia to capsaicin or heat stimulation in the mouse hind paw (9, 10). Cultured mouse fetal skin mast cells express both ET receptors, but only ETA receptors mediate ET-1-induced degranulation, whereas cultured (undifferentiated) bone marrow mast cells express less

ETA and no ETB receptors and are unresponsive to the peptide (29). Thus, if adult skin mast cells in vivo maintain the phenotype of fetal skin mast cells, ETA receptor-mediated mast cell degranulation could account, at least in principle, for the pruritic action of ET-1. Another attractive possibility is direct activation of ETA receptors on sensory neurons, as ET-1 sensitizes tetrodotoxin-resistant voltage-sensitive sodium channels to activation in acutely dissociated rat dorsal root ganglion sensory neurons via ETA receptors (35).

Local co-administration of BQ-788 markedly augmented the pruritic effect of ET-1. This result, allied to the finding that ET-1-induced scratching behavior was substantially inhibited by local co-administration of the selective ETB receptor agonist IRL 1620 confirms the antipruritic role of local ETB receptors. Moreover, as IRL 1620 also inhibited scratching elicited by histamine, it seems unlikely that this effect was mediated via mast cell ETB receptors. Stimulation of local ETB receptors in the hind paw of mice and rats suppresses hyperalgesia to capsaicin and nociception induced by intraplantar ET-1, respectively (9, 12). Interestingly, the latter study also demonstrated that ETB receptors on keratinocytes trigger β -endorphin release to limit the ETA receptor-dependent nociceptive effect of ET-1. It appears reasonable to expect that such an ETB receptor-operated mechanism might suppress pruritus, since intradermal injections of ET-1 employed in the present study must deliver the peptide much closer to the keratinocytes in the scruff than intraplantar (subcutaneous) injections do in the hind paw.

Unexpectedly, however, systemic pretreatment with the selective ETB receptor antagonist A-192621 produced an effect opposite to that obtained with local BQ-788 administration (i.e. it diminished ET-1-induced scratching). This suggests that, somehow, systemic ETB receptor blockade overrides this antipruritic modulatory influence of local ETB receptors in the skin. At present, we cannot envisage a satisfactory explanation for this discrepancy. Nonetheless, as ETB receptors on endothelial cells act as clearance receptors for ET-1 (36), their extensive blockade by systemic treatment with the ETB receptor antagonist A-192621 may well have increased circulating levels of ET-1, thus enhancing vasoconstriction and reducing blood flow. Clearly, this hypothesis remains to be proven experimentally.

In addition to producing ET-1 and responding to the peptide by degranulating, serosal mast cells also secrete chymase, which can influence local ET-1 levels in two ways. First, chymase can generate ET-1 by converting extracellular big-ET-1 (the

inactive precursor of ET-1) into the intermediate peptide ET-1 (1-31), which is then cleaved to yield ET-1 by neutral endopeptidase and ET-converting enzyme in vitro (37) and in vivo (38, 39). Mast cell-derived chymase can also degrade ET-1, thus exerting a protective role in situations where high levels of ET-1 can be detrimental, such as peritonitis (40). We have shown that intradermal ET-1 injection causes ETA receptor-mediated pruritus in the mouse, which can be limited locally by stimulation of ETB receptors. It would now appear important to assess if this effect of ET-1 is indeed dependent on mast cells, and if there is a link between mast cells and the ET system in pruritus associated to type I hypersensitivity reactions and other pathophysiological states.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq, CAPES, PRONEX and FAPESC (Brazil). The authors are most grateful to Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA) for providing atrasentan and A-192622.

Reference List

1. Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M. Itch. *The Lancet* 361: 690-694, 2003.
2. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *The journal of Neuroscience* 15: 8003-8008, 1997.
3. Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, Zyllicz Z. Itch: scratching more than the surface. *QJM* 96(1): 7-26, 2003.
4. Clough GF, Boutsiouki P, Church MK. Comparison of the effects of levocetirizine and loratadine on histamine-induced wheal, flare, and itch in human skin. *Allergy* 56(10):985-8, 2001.
5. Ständer S, Steinhoff M, Schmelz M, Weisshaar E, Metze D, Luger T. Neurophysiology of pruritus. *Arch Dermatol* 139: 1463-1470, 2003.
6. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105(5):847-59, 2000.

7. Hultner L, Ehrenreich H. Mast cells and endothelin-1: a life-saving biological liaison? *Trends Immunol* 26(5): 235-8, 2005.
8. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 851-876, 2001.
9. Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Souza GE, Rae GA. 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* 129:961-968, 2000.
10. 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* 367:28-34, 2003.
11. Khodorova A, Farred MU, Gokin A, Strinchartz GR, Davar G. Local injection of a selective agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. *The Journal of Neuroscience* 22(17):7788-7796, 2002.
12. Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy JE, Rice FL, Mazurkiewicz JE, Long- Woodward D, Stoffel M, Strichartz GR, Yukhananov R, Davar G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med* 9:1055-1061, 2003.
13. Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 13:S220-2, 1989.
14. Wenzel RR, Zbinden S, Noll G, Méier B, Lüscher T. Endothelin-1 induces vasodilation in human skin by nociceptor fibres and release of nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol* 45: 441-446, 1998.
15. 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* 8: 811-817, 1990.
16. Raffa RB, Schupsky JJ, Jacoby HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 276:647-651, 1996.
17. Baamonde A, Lastra A, Villazon M, Bordallo J, Hidalgo A, Menendez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:245-251, 2004.

18. Da Cunha JM, Rae GA, Ferreira SH, Cunha F de Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 501(1-3): 87-94, 2004.
19. De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, Rae GA. 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* 77:261-269, 1998.
20. Griswold DE, Douglas SA, Martin LD, Davis TG, Davis L, Ao Z, Luttmann MA, Pullen M, Nambi P, Hay DW, Ohlstein EH. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. *Mol Pharmacol* 56(4):807-12, 1999.
21. Jarvis MF, Wessale JL, Zhu CZ, Lynch JJ, Dayton BD, Calzadilla SV, Padley RJ, Opgenorth TJ, Kowaluk EA. ABT-627, an endothelin ET(A) receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 388:29-35, 2000.
22. Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Frighetto M, Souza GE, Henriques MG, Rae GA. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitized mice. *Br J Pharmacol* 141(4): 755-63, 2004.
23. Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, Beitz AJ, Wilcox GL. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J Neurosci* 21(23):9355-66, 2001.
24. Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 14: 275(3):229-33, 1995.
25. Maekawa T, Nojima H, Kuraishi Y. Itch-associated responses of afferent nerve innervating the murine skin: different effects of histamine and serotonin in ICR and ddY mice. *Jpn J Pharmacol* 84(4): 462-6, 2000.
26. Uchida Y, Ninomiya H, Sakamoto T, Lee JY, Endo T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189(2):1196-201, 1992.
27. Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K. Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol*. 14265(1-2):9-15, 1994.
28. Szalay L, Kaszaki J, Nagy S, Boros M. Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation in the rat small intestine. *Life Sci*. 67(16):1947-58, 2000.

29. 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* 34(7):1910-9, 2004.
30. Ehrenreich H, Burd PR, Rottem M, Hultner L, Hylton JB, Garfield M, Coligan JE, Metcalfe DD, Fauci AS. Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol* 4(2):147-56, 1992.
31. Liu Y, Yamada H, Ochi J. Immunocytochemical studies on endothelin mast cells and macrophage in the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 109: 301-307, 1998.
32. Koda W, Harada K, Tsuneyama K, Kono N, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest* 80(7):1007-17, 2000.
33. Liu G, Keane-Myers A, Miyazaki D, Tai A, Ono SJ. Molecular and cellular aspects of allergic conjunctivitis. *Chem Immunol* 73:39-58, 1999.
34. Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z, Cox AJ, van Eeden P, Allen TJ, Kelly DJ, Cooper ME. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ Res* 86(2):158-65, 2000.
35. Zhou Z, Davar G, Strichartz G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. *J Neurosci* 22(15):6325-30, 2002.
36. Dupuis J, Rouleau JL, Cernacek P. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation* 98(16):1684-7, 1998.
37. 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* 159(4):1987-92, 1997.
38. Honore JC, Plante M, Bkaily G, Rae GA, D'Orleans-Juste P. Pressor and pulmonary responses to ET-1(1-31) in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 136(6):819-28, 2002.
39. Fecteau MH, Honore JC, Plante M, Labonte J, Rae GA, 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* 46(1):87-92, 2005.

40. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1- induced toxicity. *Nature* 25; 432 (7016):512-6, 2004.

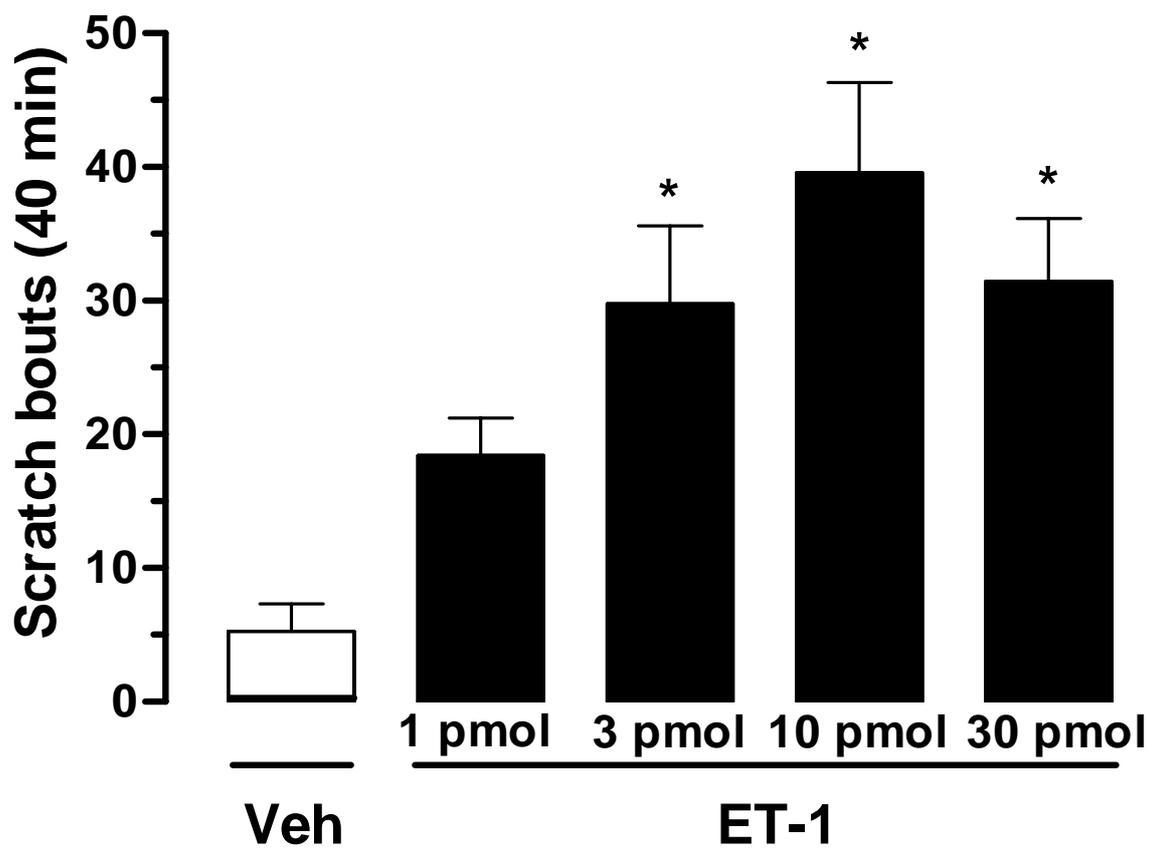
Figure Legends

Fig 1. Pruritus induced by endothelin-1 (Panel A), compound 48/80 and histamine (Panel B) in mice. The drugs were injected intradermally at the doses indicated and controls were similarly treated with 20 μ l of PBS. Values represent the mean \pm s.e. mean of the number of scratching bouts recorded over 40 minutes ($n = 6-8$ animals per group). Asterisks denote $P < 0.05$ relative to PBS-treated controls (one-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

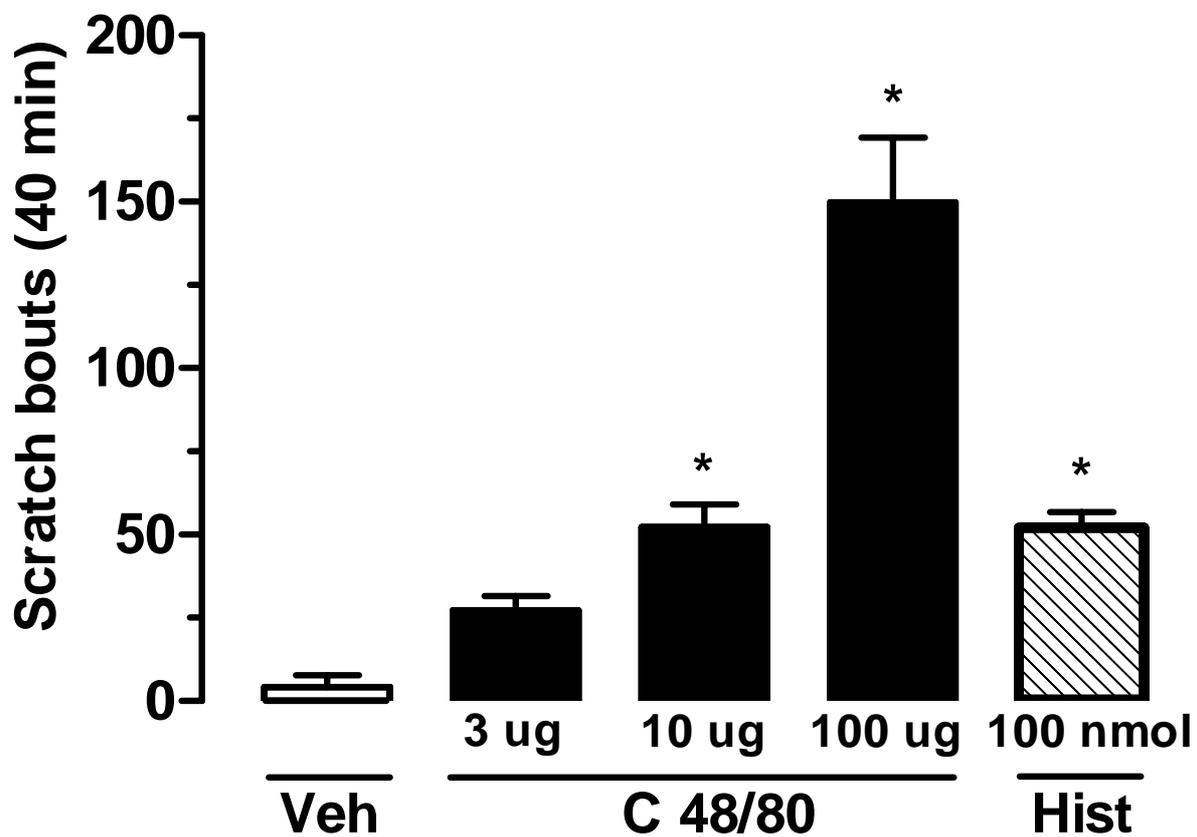
Fig 2. Influence of endothelin ETA or ETB receptor antagonists on scratching behavior induced by ET-1. In panel A, mice were given an intradermal co-injection of BQ-123 (10 nmol) or BQ-788 (3 nmol) together with ET-1 (10 pmol) or vehicle (PBS) into the scruff. Those in panel B received an i.p. injection of atrasentan (10 mg/kg) or A-192621 (20 mg/kg) or the corresponding vehicle 1 h before intradermal injection of ET-1 (10 pmol) or its vehicle into the scruff. Values represent the mean \pm s.e. mean of the number of scratching bouts over 40 minutes ($n = 6-8$ animals per group). Asterisks and fences denote $P < 0.05$ relative to vehicle-treated and to ET-1-injected mice, respectively (one-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

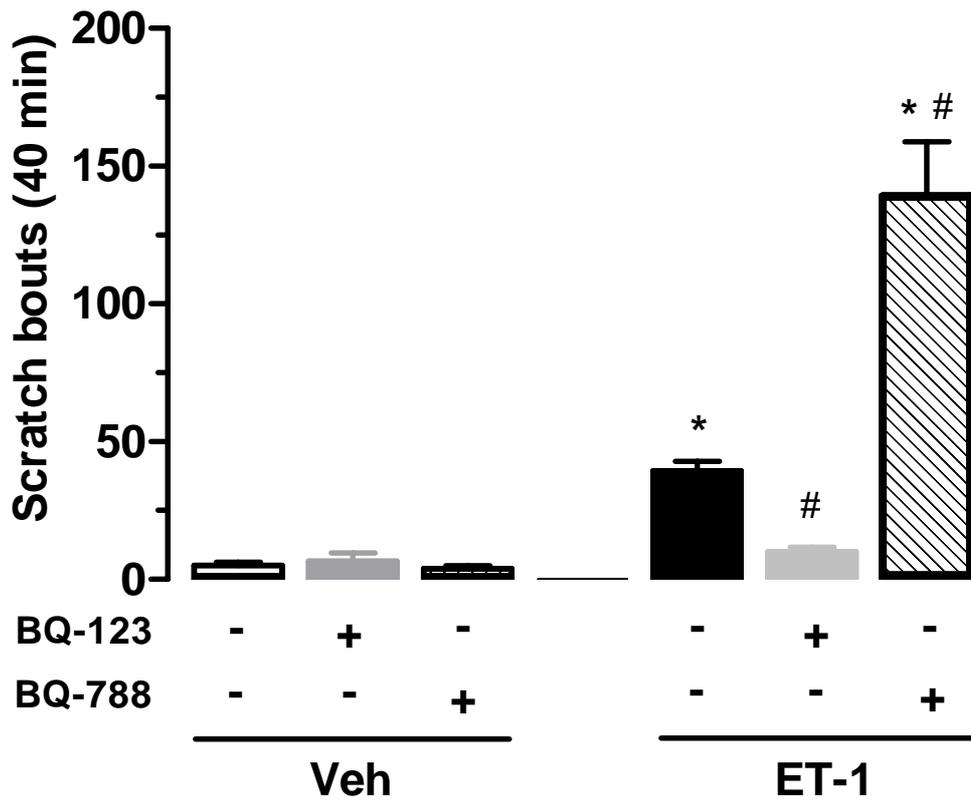
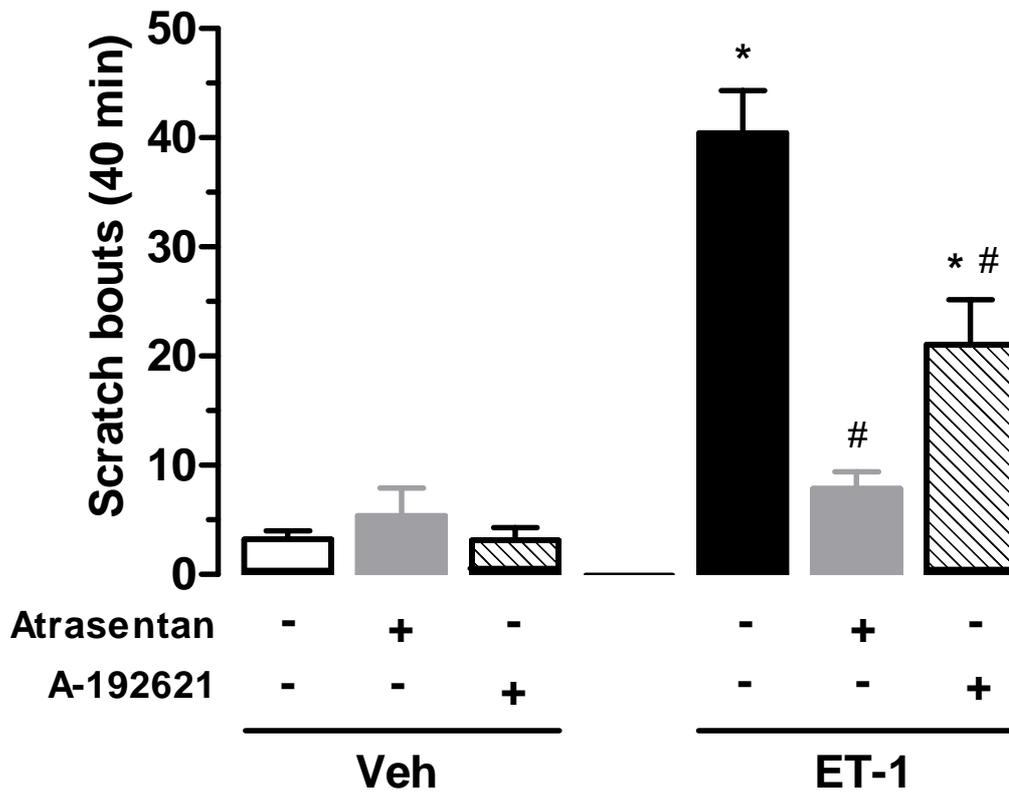
Fig 3. Influence of the selective ETB receptor agonist IRL 1620 on pruritus induced by ET-1 (A) or histamine (B). IRL-1620 (10 pmol) or vehicle was co-injected into the scruff together with ET-1, histamine (at doses indicated) or vehicle. Values represent the mean \pm s.e. mean of the number of scratching bouts over 40 minutes ($n = 6-8$ animals per group). Asterisks and fences denote $P < 0.05$ relative to vehicle-treated and to ET-1- (panel A) or histamine-injected (panel B) groups, respectively (one-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

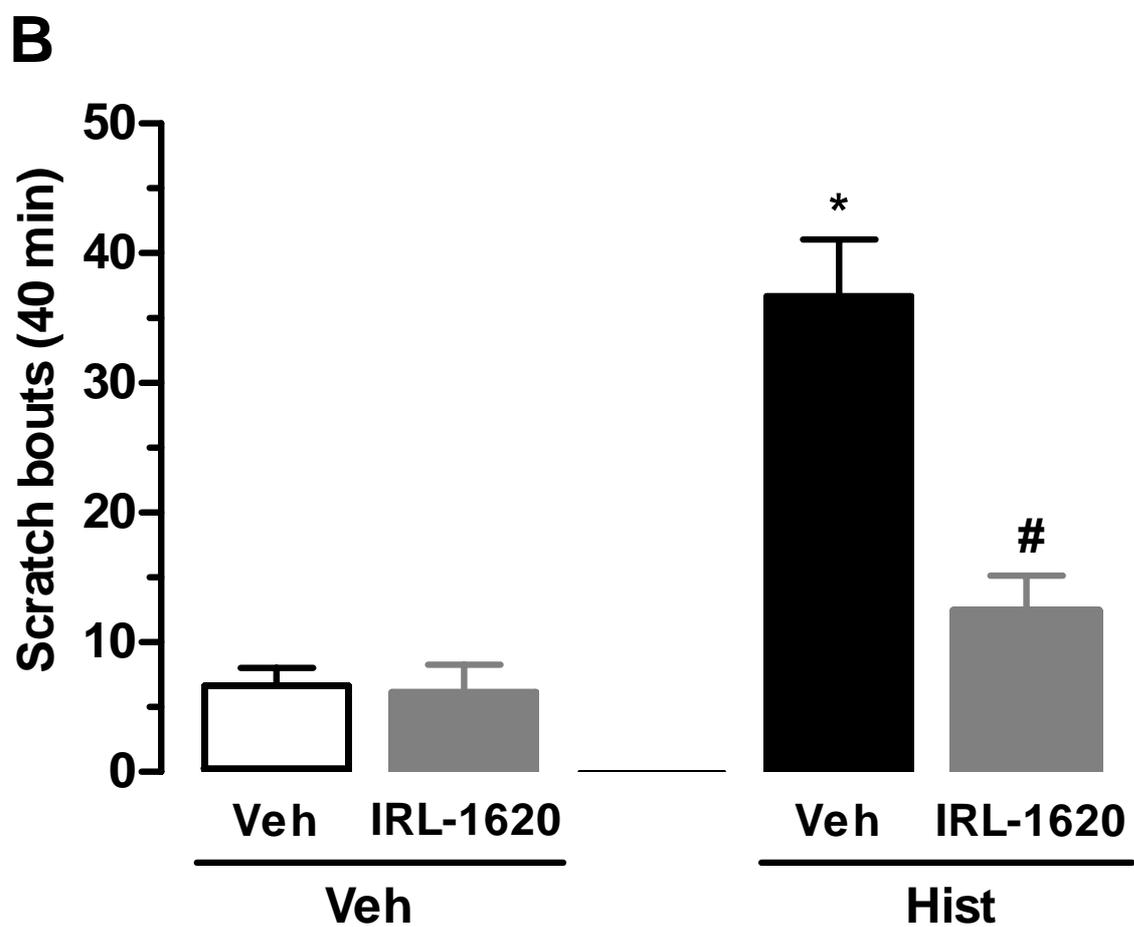
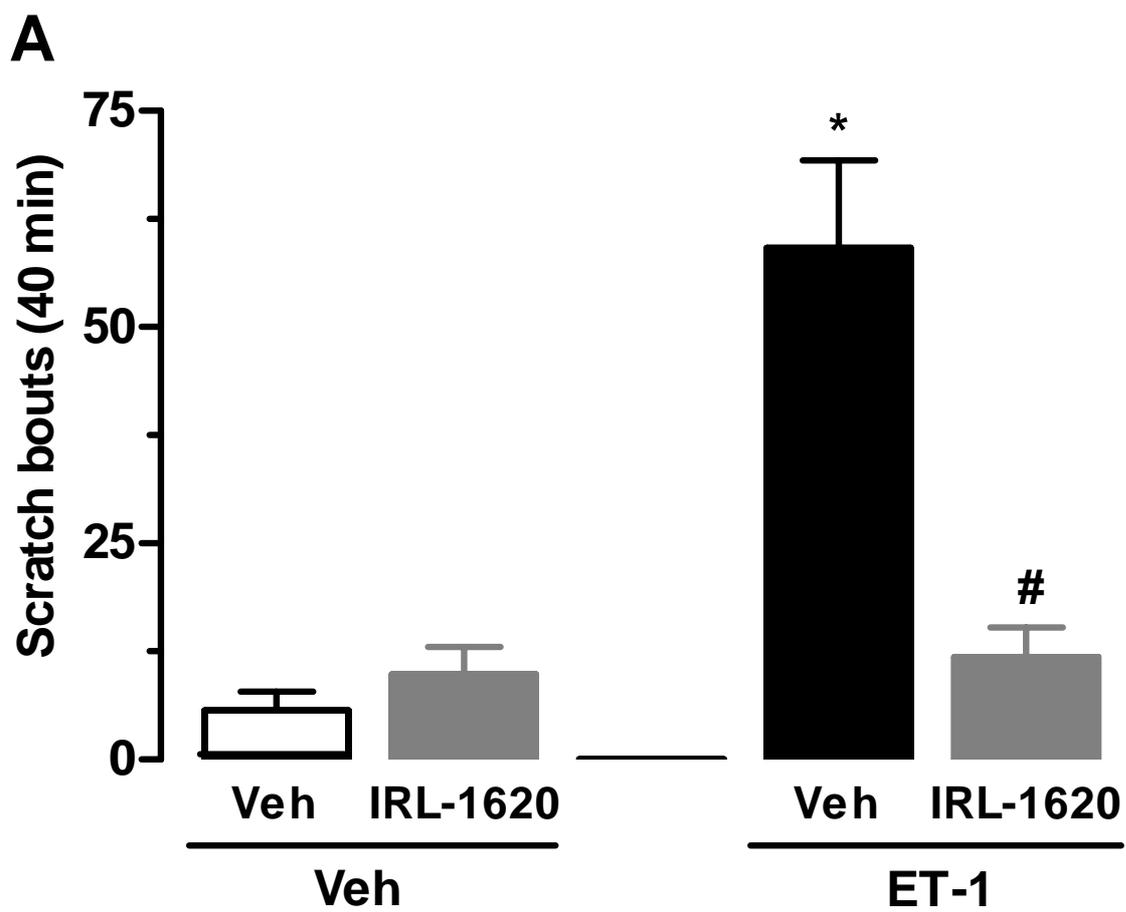
A



B



A**B**



O presente trabalho foi impresso com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos.