

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Envolvimento das endotelinas na nocicepção
articular induzida por carragenina e
lipopolissacarídeo de *E. coli* no rato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

JOSÉLIA DAHER DE-MELO
Florianópolis
1998

De-Melo, Josélia Daher. *Envolvimento das endotelinas na nocicepção articular induzida por carragenina e lipopolissacarídeo de E. coli no rato*. Florianópolis, 1998, 109 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina).

Orientador: Professor Doutor Giles Alexander Rae.

Defesa: 17/07/1998.

As propriedades locais das [endotelina]s, [hiperalgesia] e [nocicepção], foram testadas no modelo da incapacitação [nocicepção] articular em joelho de rato induzida por carragenina (CG) ou lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). A endotelina(ET)-1 induziu nocicepção e potencializou o aumento do tempo de elevação da pata (TEP) induzido pela CG ou LPS, em articulações normais. A nocicepção induzida pela ET-1 em articulações normais parece ser mediada por receptores ET_A, pois foi reduzida pelo antagonista misto de receptores ET_A/ET_B [bosentan] e pelo antagonista seletivo de receptores ET_A [BQ-123] mas não pelo antagonista seletivo de receptores ET_B [BQ-788]. O estímulo prévio da articulação com CG tornou a articulação mais sensível à nocicepção induzida tanto pela ET-1 ou pela [sarafotoxina S6c]. A nocicepção induzida pela ET-1 na articulação sensibilizada foi inibida tanto pelo BQ-123 como pelo BQ-788, indicando que receptores ET_A e ET_B contribuem para esta ação. A sensibilização prévia com CG também aumentou o TEP para a própria CG e para o LPS. O bosentan e o BQ-788, mas não o BQ-123, inibiram a nocicepção induzida pelo LPS em articulações sensibilizadas, sugerindo que esta é mediada em grande parte pela liberação de endotelinas endógenas e ativação de receptores ET_B locais.

**“ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS NA NOCICEPÇÃO
ARTICULAR INDUZIDA POR CARRAGENINA E
LIPOPOLISSACARÍDEO DE E. COLI NO RATO”**

POR


JOSÉLIA DAHER DE MELO

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Banca Examinadora em
sessão de defesa pública em 17 de Julho
de 1998.**

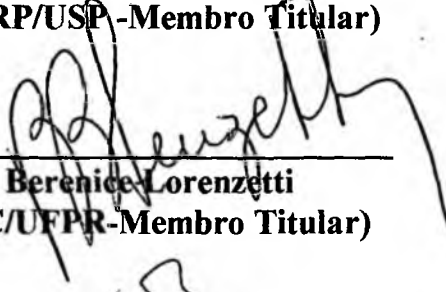
Banca Examinadora:




**Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Fernando de Queiroz Cunha
(FMRP/USP -Membro Titular)**



**Berenice Lorenzetti
(IBC/UFPR-Membro Titular)**



**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 17 de Julho de 1998.

Este trabalho é dedicado especialmente:

Ao Aroldo pelo apoio, pelas palavras de incentivo, pela companhia e dedicação. Esse momento de vitória também é seu, pois foi com sua paciência, carinho e amor que chegamos até aqui. Eu não teria conseguido sem você!

Aos nossos filhos, Marielle e Thiago, por aceitarem tantas mudanças e a minha ausência física, mas com a certeza do meu amor.

Aos meus pais, Elías e Duda, exemplos de humanidade, integridade, humildade e força interior, pela ajuda e por tanto amor.

*A alegria está na luta,
na tentativa, no sofrimento,
não na vitória propriamente dita.*

Gandhi

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela oportunidade, inestimável orientação científica, apoio e paciência constantes, mas além de tudo pelo exemplo e pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, pela valiosa co-orientação e a paciência durante a execução técnica deste trabalho.

Aos meus amigos do coração: Gilboé, Irinéia, Marcos, Martha, Rose, Rubens, Sandro e Tânia, pela união, compreensão e ajuda. A convivência com a turma 96 foi uma experiência incrível.

À Anna Paula pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos da equipe "Giles": Valdecir, Anna Paula, Alcíbia, Janice e Cláudio pela acolhida, ajuda e "torcida" para que tudo desse certo.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC pela dedicação.

Aos funcionários do Biotério Setorial da UFSC, especialmente Zeri, Pedro e João pelo convívio e carinho.

À Tânia Saleh, Daniela, Martha e Vânia pelo carinho com que me acolheram.

À Rose e Tânia Saleh pela companhia e apoio num momento muito difícil da minha vida.

Ao Eduardo pela carinhosa confecção dos desenhos para a apresentação da dissertação.

À Cleonice pela confecção dos slides.

À Jô pelas valiosas "dicas" sobre um tal computador.

À todos os demais estudantes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, que com sua alegria e entusiasmo, tornam o nosso dia a dia agradável e estimulante.

À todos os técnicos de laboratório, em especial à colega Terezinha pela amizade e apoio.

À todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC, pela ajuda constante.

Aos amigos Alvorita e Eduardo pelo incentivo, apoio e tantas e tantas “caronas” da Meia-Praia.

Aos meus queridos irmãos e sobrinhos: Joseli, Iratã, Joseline, Joseane e Leopoldo, pela força e o amor de sempre.

Aos amigos: Achilles, Dalva, Rodrigo, Frederico e Marina, pelo carinho, dedicação e amor que dispensaram à “nossa Marielle”.

À Elvira, Ilma e Linda pela inestimável ajuda na manutenção da “ordem doméstica”.

À Elaine M. W. Ferrari pela amizade de hoje e sempre.

À Josiane C. B. Madalozzo pela “barra” que enfrentou, na minha ausência, com toda dedicação e competência.

Aos colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG e, em especial à Josiane P. de Paula pelo voto de confiança.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Análises Clínicas “Alfredo Berger” e, em especial ao Ênio, por ter compreendido a importância deste trabalho para mim.

À Beatriz P. Z. da Luz, que “batalhou” junto ao ISEP, pela concessão da minha licença com vencimentos, sem a qual não teria sido viável a minha permanência aqui.

Ao Dr. José Alinor Munhoz pelas inúmeras vezes em que soube carinhosamente me ouvir e “socorrer”.

A tantos e tantos amigos que é impossível listar, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu realizasse um sonho da juventude, ainda que na idade madura.

Aos mentores espirituais que sempre estiveram ao meu lado e constantemente de “plântão” na BR 101.

À Deus, acima de tudo, pela vida e oportunidade de elevação espiritual.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), na forma de uma bolsa de mestrado do programa "PICDT", pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <u>Fisiopatologia da inflamação articular</u>.....	1
1.1.1. Características estruturais importantes da articulação	1
1.1.2. Doenças inflamatórias da articulação.....	3
1.1.3. Dor articular	4
1.1.4. Inervação Articular.....	5
1.1.5. Mediadores inflamatórios articulares	8
1.1.5.1. Citocinas	9
1.1.5.2. Eicosanóides	10
1.1.5.3. Sistema Complemento	12
1.1.5.4. Bradicinina e peptídeos análogos	13
1.1.5.5. Histamina e serotonina.....	14
1.1.5.6. Neuropeptídeos	14
1.1.6. Testes algométricos articulares.....	15
1.1.7. Carragenina e LPS como estímulos inflamatórios nociceptivos	17
1.2. <u>Endotelinas como peptídeos pró-inflamatórios</u>.....	19
1.2.1. A família das endotelinas.....	19
1.2.2. Biossíntese das endotelinas e sua regulação	20
1.2.3. Receptores endotelinérgicos e seus ligantes.....	21

1.2.4. Mecanismos de transdução ativados por receptores endotelinérgicos.....	23
1.2.5. Endotelinas na inflamação	24
1.2.6. Endotelinas na dor	27
1.2.7. Endotelinas na articulação	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Animais	32
3.2. Drogas	32
3.3. A injeção intra-articular de drogas	33
3.4. O teste de nocicepção articular	34
3.5. Incapacitação articular induzida pela endotelina-1 ou sarafotoxina S6c	36
3.6. Incapacitação articular induzida pela carragenina	36
3.7. Incapacitação articular induzida pelo LPS	37
3.8. Incapacitação induzida por carragenina ou LPS em articulações sensibilizadas previamente com carragenina	38
3.9. Incapacitação induzida por endotelina-1 ou sarafotoxina S6c em articulações sensibilizadas previamente com carragenina.....	39
3.10. Apresentação e análise estatística dos resultados	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Nocicepção induzida pela endotelina-1 ou sarafotoxina S6c	41
4.2. Influência do tratamento local com endotelina-1 ou sarafotoxina S6c sobre	

a incapacitação articular induzida pela carragenina	44
4.3. Influência do tratamento local com endotelina-1 ou sarafotoxina S6c sobre a incapacitação articular induzida pelo LPS.....	52
4.4. Sensibilização articular nociceptiva induzida pela carragenina.....	56
4.5. Influência do bosentan na nocicepção causada por carragenina ou LPS.....	59
4.6. Influência do BQ-123 ou do BQ-788 na nocicepção causada por LPS em articulação sensibilizada por carragenina	64
4.7. Efeitos nociceptivos da endotelina-1 ou da sarafotoxina S6c em articulações sensibilizadas pela carragenina	67
4.8. Efeitos anti-nociceptivos dos antagonistas endotelinérgicos testados	67
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	85
7. PUBLICAÇÕES.....	86
8. RESUMO	87
9. SUMMARY	90
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos nociceptivos da endotelina-1 (ET-1) em articulações normais de rato	42
Figura 2: Efeitos da sarafotoxina S6c (S6c), um agonista seletivo de receptores ET _B , em articulações normais de rato	43
Figura 3: Influência do bosentan (BOS), sobre as respostas nociceptivas induzidas pela injeção de endotelina-1 (ET-1; 120 pmol) em articulações normais de rato.....	46
Figura 4: Influência do BQ-123 ou BQ-788, sobre as respostas nociceptivas induzidas por injeção de endotelina-1 (ET-1; 120 pmol) em articulações normais de rato.....	47
Figura 5: Efeitos nociceptivos da carragenina (CG) em articulações normais de rato	48
Figura 6: Influência da endotelina-1 (ET-1; 30 pmol), em diferentes tempos, sobre o TEP induzido pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato.....	49
Figura 7: Influência da endotelina-1 (ET-1) sobre a nocicepção inflamatória induzida pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato	50

Figura 8: Influência da sarafotoxina S6c (S6c) sobre a nocicepção inflamatória induzida pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato.....	51
Figura 9: Efeitos nociceptivos do LPS em articulações normais de rato	53
Figura 10: Influência da endotelina-1 (ET-1) sobre a nocicepção inflamatória induzida pela injeção de LPS (1 µg) em articulações normais de rato	54
Figura 11: Influência da sarafotoxina S6c (S6c) sobre a nocicepção inflamatória induzida pela injeção de LPS em articulações normais de rato	55
Figura 12: Comparação dos efeitos nociceptivos da carragenina (CG; 300 µg) injetada em articulações normais ou sensibilizadas previamente (72 h) com a própria carragenina	57
Figura 13: Comparação dos efeitos nociceptivos do LPS (1 µg), injetado em articulações normais ou sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina	58
Figura 14: Influência do bosentan (BOS), sobre as respostas nociceptivas induzidas pela carragenina (CG; 300 µg) em articulações normais de rato	60
Figura 15: Influência do bosentan (BOS), sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo LPS (1 µg) em articulações normais de rato	61
Figura 16: Influência do bosentan (BOS), sobre as respostas nociceptivas induzidas pela carragenina (CG; 300 µg) em articulações previamente sensibilizadas (72 h) com a própria carragenina	62

Figura 17: Influência do bosentan (BOS), sobre as repostas nociceptivas induzidas pelo LPS (1 µg) em articulações previamente sensibilizadas (72 h) com carragenina.....63

Figura 18: Influência do BQ-123 sobre as repostas nociceptivas induzidas por injeção *i.a.* de LPS (1 µg) em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina.....65

Figura 19: Influência do BQ-788 sobre as repostas nociceptivas induzidas por injeção *i.a.* de LPS em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina66

Figura 20: Influência da injeção de endotelina-1 (ET-1) em articulações de rato sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina68

Figura 21: Efeitos da injeção de sarafotoxina S6c (S6c) em articulações de rato sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina69

Figura 22: Influência do BQ-123 ou BQ-788 sobre as repostas nociceptivas induzidas pela endotelina-1 (ET-1; 30 pmol) em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina70

Tabela 1: Respostas antinociceptivas de antagonistas de receptores endotelinérgicos, sobre diferentes agentes nociceptivos no modelo da incapacitação articular de rato.....71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiopatologia da inflamação articular

1.1.1. Características estruturais importantes da articulação

A sinóvia consiste de uma camada de tecido conjuntivo recoberta por células de revestimento que separam o fluído sinovial da cápsula articular. A camada de revestimento é bastante innervada e possui grande número de receptores articulares, mas é pouco vascularizada. Ao contrário, a sinóvia é bastante vascularizada, mas pobremente innervada e composta predominantemente por duas populações de células: a) os sinoviócitos A, que são células tipo macrófagos, com função fagocítica e atividade sintética; e b) as células residentes ou sinoviócitos B, com características semelhantes aos fibroblastos, responsáveis pela síntese proteica (HENDERSON, 1988). Embora figuras mitóticas sejam raras no revestimento sinovial normal, os sinoviócitos B proliferam-se localmente, enquanto os sinoviócitos A originam-se da medula óssea, provavelmente descendentes de monócitos periféricos (DREHER, 1982), e são constantemente substituídos através da circulação. Sob a influência de fatores locais, como o fator estimulador de granulócitos-macrófagos, os monócitos podem transformar-se em novos macrófagos residentes, o que envolve a expressão de marcadores diferentes de

superfície (GASSON, 1991).

Nos estágios iniciais do processo da artrite, as células fagocíticas da camada de revestimento tornam-se ativadas, por mecanismos ainda pouco conhecidos. A ativação destas células e de outras células sinoviais podem direcionar o influxo de células inflamatórias como polimorfonucleares, monócitos e células T aos tecidos articulares, característica básica no desenvolvimento de artrite. Na artrite reumatóide, uma observação inicial notável é o aumento do número de células que ocupam a camada de revestimento sinovial (SCHUMACHER e KITRIDOU, 1972). Isto se deve principalmente à agregação de macrófagos da periferia que se acumulam em volta desta camada. A proporção relativa de sinoviócitos A na sinóvia passa de 20-30% do total de células em indivíduos sadios para 80-100% na artrite reumatóide (POULTER et al., 1982a; para revisão ver CUTOLO et al., 1993). Os sinoviócitos ativados geram citocinas que induzem os condrócitos a participar da sua própria destruição através da liberação de proteases e de colagenase específica (WEISSMAN, 1996).

A cartilagem articular tem duas importantes funções que incluem a capacidade de minimizar a fricção e o desgaste entre as superfícies articulares opostas, durante o movimento e dissipar as forças excessivas sobre a articulação (SCHUMACHER, 1996). O fluido sinovial contém ácido hialurônico e glicoproteína, denominada lubrificina. Ambos são responsáveis

pela lubrificação da articulação, embora sejam específicas para determinados componentes. O ácido hialurônico é importante para a lubrificação da cápsula articular enquanto a lubricina é necessária para a lubrificação da cartilagem sobre a própria cartilagem. O fluido sinovial é também o meio pelo qual os nutrientes e resíduos são transportados nos componentes avasculares da articulação (GAY e GAY, 1996).

As terminações de ossos longos que formam as articulações sinoviais são compostas de um osso macio e esponjoso chamado de osso sub-condral que é recoberto e protegido pela cartilagem hialina. Exceto as próprias terminações de ossos longos, estes são geralmente muito resistentes (SCHUMACHER, 1996).

1.1.2. Doenças inflamatórias da articulação

As doenças articulares podem ser inflamatórias, metabólicas, degenerativas ou uma combinação destas. As inflamatórias apresentam sinais comuns a todas elas, como edema e aumento da sensibilidade nociceptiva. Em doenças inflamatórias articulares como a artrite reumatóide ou artrite séptica, a cavidade articular e a membrana sinovial são primariamente afetadas. A perda da cartilagem pode ser secundária à inflamação sinovial ou por trauma. Um exemplo disso é a necrose avascular do osso que está associada com o dano após o colapso da placa óssea terminal, subsequente à inflamação

resultante da deposição de cristais de urato no espaço sinovial, que ocorre na gota ou pseudo-gota. Entretanto, os processos patológicos descritos podem afetar ainda sistemas extra-articulares, como a pele, os músculos e a vasculatura (GORDON, 1996).

A inflamação da membrana de revestimento sinovial (sinovite) da articulação é típica de poliartrites inflamatórias, como a artrite reumatóide. Se a sinovite for persistente pode resultar em dano articular irreversível. A poliartrite da artrite reumatóide é como aquela encontrada nas doenças difusas do tecido conjuntivo associadas com auto-anticorpos. Estas desordens auto-imunes do colágeno incluem o lúpus, a esclerodermia, a polimiosite, as vasculites e a síndrome de Sjögren (GAY e GAY, 1996). Outra região articular importante onde pode ocorrer inflamação é a êntese, uma zona anatômica de transição (próxima à sinóvia) onde os ligamentos fixam-se ao osso. Doenças que envolvem inflamação de êntese incluem a síndrome de Reiter, a artrite psoriática e, principalmente, a artrite reativa e a artropatia associada à doença inflamatória intestinal (CUSH e LIPSKY, 1996).

1.1.3. Dor articular

A dor associada às doenças artríticas pode constituir bem mais do que uma conseqüência debilitante do próprio processo, já que este fator influencia diretamente a morbidez (perda de peso e atividade locomotora diminuída) da

artrite crônica induzida por adjuvante em ratos (DARDICK et al., 1986; LANDIS et al., 1988). Certamente, a hiperalgesia e/ou dor da região articular constituem determinantes muito importantes da incapacitação articular associada às artrites. Boa parte dos tratamentos farmacológicos e fisioterápicos disponíveis têm como meta primordial restaurar a função através da supressão da dor articular. Em muitos casos, entretanto, as articulações permanecem refratárias ao tratamento, resultando em quadros de dor crônica (para revisão ver SCHAIBLE e GRUBB, 1993).

1.1.4. Inervação articular

A articulação é innervada por ramificações descendentes do tronco nervoso principal dispostos em ramos musculares, cutâneos ou periosteos (para revisão ver POLACEK, 1966). Os nervos articulares contêm fibras ascendentes sensoriais mielinizadas e não-mielinizadas, bem como fibras eferentes pós-ganglionares não-mielinizadas simpáticas (LANGFORD e SCHMIDT, 1983; para revisão ver SCHAIBLE e GRUBB, 1993). A maioria das fibras mielinizadas finas de condução rápida são do tipo A δ , chamadas de mecanociceptores, mas há algumas poucas do tipo A β , que têm maior diâmetro. Por outro lado, as fibras aferentes não-mielinizadas, ou fibras C, também chamadas de receptores polimodais, são de condução lenta e respondem a diferentes estímulos como pressão, temperatura e agentes

químicos. As demais fibras não-mielinizadas (cerca de 50% do total) são eferentes simpáticas, pois desaparecem após simpatectomia cirúrgica (LANGFORD E SCHMIDT 1983).

Os neurônios aferentes não-mielinizados que inervam as articulações sinoviais também parecem ser a fonte primária de neuropeptídeos articulares, como a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP; MAPP et al., 1990) e neurocinina A (BILEVICIUTE et al., 1993). De modo semelhante ao que acontece na pele (JANCSO et al., 1967), a estimulação nervosa antidrômica nas fibras C articulares pode gerar extravasamento plasmático e vasodilatação, sintomas típicos da inflamação (FERREL E RUSSEL, 1986; FERREL e CANT, 1987).

As fibras nervosas simpáticas articulares geralmente circundam os vasos sangüíneos, particularmente nas regiões mais profundas da sinóvia normal. Elas contêm e liberam neurotransmissores clássicos (noradrenalina) e neuropeptídeo Y (MAPP et al., 1994). Fitzgerald (1989) postulou um modelo no qual as fibras C ativadas por dano articular não apenas transmitem a informação nociceptiva à medula espinhal, como também participam na gênese de alterações funcionais locais, liberando mediadores inflamatórios, que a seu turno exacerbam a inflamação e a excitação das próprias fibras C. Concomitantemente, neurônios pós-ganglionares simpáticos são ativados tanto por reflexos somato-simpáticos ativados pelas fibras C como por

exacerbação do tona simpático geral (FITZGERALD, 1989). Nesse sentido, há evidências de que o estresse frequentemente provoca o agravamento da artrite reumatóide. Os axônios simpáticos também podem liberar mediadores inflamatórios e excitar as fibras-C. Em síntese, durante o curso das artrites crônicas, os neurotransmissores simpáticos facilitam a transmissão da informação nociceptiva pelas fibras sensoriais e aumentam a inflamação sinovial (CODERRE et al., 1984; LEVINE et al., 1990).

A articulação também apresenta uma pequena parcela das fibras nervosas aferentes que normalmente não são responsivas a estímulos intensos de curta duração. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios (*i.e.* bradicinina e prostaglandinas), ou seguindo a administração de irritantes, essas fibras exibem atividade espontânea ou tornam-se sensibilizadas e responsivas a estímulos sensoriais (SCHAIBLE e SCHMIDT 1988; SCHMELZ et al., 1994). Tais fibras têm sido denominadas de “aferentes mecanicamente insensíveis”, “nociceptores silenciosos” ou “nociceptores dormentes”.

Outro fenômeno importante foi descrito por Mendell (1966), denominado de “wind-up” (*i.e.* aumento progressivo da amplitude de resposta nociceptiva à medida que estímulos repetitivos são aplicados na periferia), fenômeno central importante para o desenvolvimento de estados dolorosos crônicos (para revisão ver SIDDALL E COUSINS, 1995). Este fenômeno

ocorre geralmente por estímulo repetido ou persistente de fibras C ou A δ , embora tenha sido também recentemente evocado por estimulação repetida de fibras táteis A β em ratos artríticos, por um mecanismo dependente de receptores GABA_A (WENG et al., 1998).

O estímulo transmitido pelas fibras aferentes sensitivas (A δ ou C), gera potenciais de ação que são transmitidos pelos nervos periféricos e cranianos, alcançam a medula espinhal principalmente pelas raízes dorsais. A informação nociceptiva que chega ao corno da raiz dorsal da medula espinhal pode sofrer influências excitatórias ou inibitórias. Tais influências, que modulam de modo muito importante a transmissão da informação para neurônios nociceptivos secundários dos tratos espinhais ascendentes, constituem o “sistema de controle da dor por comportas” (MELZACK e WALL, 1965). Ao nível espinhal, fazem parte desse sistema neurônios descendentes originados em diversos centros cerebrais, que liberam neurotransmissores inibitórios, como a serotonina, a dopamina, a noradrenalina, peptídeos opióides e GABA (para revisão ver MALCANGIO e BOWERY, 1996).

1.1.5. Mediadores inflamatórios articulares

Vários mediadores inflamatórios têm sido identificados no fluido sinovial. Tais substâncias são produzidas por tecidos articulares e/ou são

liberados de diferentes fontes durante a inflamação articular no homem e em modelos de artrite experimental.

1.1.5.1. Citocinas

Constituem um grupo de glicoproteínas, responsáveis pelo controle e modulação dos vários aspectos dos sistemas de defesa do organismo, como o processo inflamatório. Este grupo inclui as interleucinas (ILs), fatores de necrose tumoral (TNFs), fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias e interferons. Diversas citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α), principalmente a IL-1 β , possuem potentes atividades pró-inflamatórias e hiperalgésicas (FERREIRA et al., 1988; DAVIS e PERKINS, 1994, para revisão ver WATKINS et al., 1995), por estimularem a síntese e liberação de mediadores pró-hiperalgésicos (peptídeos, neurotrofina - fator de crescimento neural; NGF) (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995) ou a expressão de receptores (receptores para cininas B₁) sobre os neurônios sensoriais e simpáticos, bem como células do sistema imune (DAVIS e PERKINS, 1994; SEABROOK et al., 1995). Células do revestimento sinovial expressam muitos desses mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 α , TNF α , TGF β , IL-6, IL-8 e fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (POULTER et al., 1982b, DELEURAN et al., 1992; CHU et al., 1991a,b; WOOD et al., 1993; FIELD et al., 1993).

1.1.5.2. Eicosanóides

Estes compostos incluem as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e lipoxinas, formados a partir da oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados (ácido araquidônico). As prostaglandinas (produtos da via ciclo-oxigenase), PGE₁, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} e PGD₂ são encontradas no fluido sinovial de pacientes portadores de doenças articulares inflamatórias, e são produzidas em quantidades aumentadas em culturas de células sinoviais isoladas de pacientes com artrite reumatóide (ROBINSON e LEVINE, 1973; DAYER et al., 1976; TRANG et al., 1977; STURGE et al., 1978; EGG, 1984; BRODIE et al., 1980; BOMBARDIERI et al., 1981; TOKUNAGA et al., 1981; McGUIRE et al., 1982; SALMON et al., 1983; MOILANEN 1989). A PGE₂, produzida no tecido sinovial reumatóide, provavelmente desempenha um papel chave na erosão da cartilagem e do osso justa-articular (ROBINSON et al., 1975; DAYER et al., 1976) e, assim como a PGI₂, possui ações vasoativas sobre a microcirculação sinovial (DICK e GRENNAN, 1976). Além disso, a PGE₂, a PGI₂ e a PGE₁ induzem incapacitação ou sensibilização articular em cães e ratos (ROSENTHALE et al, 1966; FERREIRA et al., 1989; TONUSSI e FERREIRA, 1992).

A hiperalgesia induzida pelos prostanóides não decorre apenas da sensibilização periférica dos nociceptores (DAVIES, et al., 1984), mas também por facilitação da transmissão ao nível espinhal (MALMBERG et al.,

1992) e supra-espinhal (OKA et al., 1993). A PGI₂ e PGE₂ são encontradas no fluido sinovial em várias artrites no homem (BRODIE et al., 1980; BOMBARDIERI et al., 1981), e ambas têm sido implicadas na mediação de hiperalgesia (para revisão ver FERREIRA, 1979). Além disso, antagonistas seletivos de receptores EP para PGE₂ e IP para PGI₂ exibem atividade anti-hiperalgésica em diversos modelos de nocicepção inflamatória, incluindo a artrite (para revisão ver BLEY et al., 1998). Nesse sentido, experimentos descritos recentemente, utilizando camundongos nos quais o gene do receptor IP para PGI₂ foi deletado (“knock-out”), sugerem que a PGI₂ é o prostanóide vasodilatador e hiperalgésico mais importante, pelo menos nessa espécie (MURATA et al., 1997).

Diante da participação importante dos prostanóides na gênese da dor articular, drogas que atuam bloqueando sua formação por inibição da ciclo-oxigenase (COXs) são muito utilizadas para o tratamento da dor articular inflamatória. Há duas isoformas conhecidas da COX: uma constitutiva - a COX-1, e outra indutível, chamada de COX-2 (MITCHELL et al., 1993). A COX-2, quase indetectável na maioria dos tecidos, tem sua expressão aumentada durante os estados de inflamação aguda e artrite (MASFERRER et al., 1994; PAIRET e ENGELHARDT, 1996). O aumento na expressão de uma COX indutível, já havia sido observado em cultura de sinoviócitos de coelho (ROTHENBERG, 1987), em tecido sinovial de pacientes com artrite

reumatóide ou osteoartrite (CROFFORD et al., 1994), bem como em ratos com artrite induzida com adjuvante ou com peptídeoglicanos bacterianos (SANO et al., 1992). Além disso, a indução da COX-2 pela IL-1 foi detectada em condrócitos (LYONS-GIORDANO et al., 1993; KNOTT et al., 1994) e osteoblastos humanos (De BRUM-FERNANDES et al., 1994).

Os leucotrienos (produtos da via lipooxigenase), principalmente o LTB₄ têm seus níveis aumentados no fluído sinovial de pacientes com doenças inflamatórias articulares (RAE et al., 1982; DAVIDSON et al., 1983; GURSEL et al., 1997; PRETE et al., 1997; SHOWELL et al., 1998) e na artrite experimental em diversas espécies animais (HENDERSON e HIGGS 1987; De BRUM-FERNANDES et al. 1988; FOGH et al., 1989; ROCHA et al., 1997).

1.1.5.3. Sistema Complemento

O sistema complemento envolve diversas proteínas plasmáticas que interagem em cascata para mediar uma variedade de efeitos inflamatórios. Há duas vias de ativação, a primeira, ativada pela ligação dos anticorpos IgG ou IgM aos seus antígenos, a outra principalmente por polissacarídeos (*i.e.* carragenina e LPS) e moléculas poliméricas celulares. Vários eventos inflamatórios decorrem da ativação do complemento, incluindo alterações na permeabilidade vascular associada com a clivagem de C4 e C2, a indução de

liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos por C3a e C5a, assim como várias propriedades quimiotáticas induzidas por estes e outros fatores do sistema complemento. Os componentes do complemento são sintetizados pelo tecido sinovial (RUDDY e COLTEN, 1974) e são encontrados no fluido sinovial (RUDDY et al., 1969), embora em concentrações menores na artrite reumatóide do que em outras doenças inflamatórias articulares (KAPLAN et al., 1980).

1.1.5.4. Bradicinina e peptídeos análogos

A bradicinina é um nonapeptídeo inflamatório sintetizado nos sítios de dano tecidual que exerce uma série de efeitos pró-inflamatórios que incluem dilatação venular, aumento da permeabilidade vascular, além da estimulação de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C (MARCEAU et al., 1983; PROUD e KAPLAN, 1988; HARGREAVES et al., 1988; DRAY e PERKINS, 1992). Os dois tipos de receptores para a bradicinina, B₁ e B₂ (REGOLI e BARABÉ, 1980) quando ativados, induzem também a liberação de outros importantes mediadores inflamatórios como PGE₂, PGI₂, LTs, histamina, PAF, IL-1 e TNF, cujos efeitos somados podem levar à perda da função articular (para revisão ver SHARMA e BUCHANAN, 1994). Enquanto os receptores articulares B₂ parecem ser responsáveis pela hiperalgesia, os receptores B₁, que são ativados seletivamente pelo metabólito

da bradicinina des-Arg⁹-bradicinina, medeiam a nocicepção (TONUSSI e FERREIRA, 1997).

1.1.5.5. Histamina e serotonina

Estas aminas biogênicas são encontradas em várias células, incluindo plaquetas, basófilos, mastócitos e neurônios. Mastócitos são células imunocompetentes e contém entre seus diversos mediadores pré-formados, a histamina e a serotonina. Estas células estão amplamente distribuídas pelo organismo e presentes também na sinóvia, onde contribuem com várias respostas inflamatórias articulares (MICAN e METCALF, 1990). Mastócitos sinoviais isolados liberam histamina em resposta tanto a estímulos imunogênicos como não-imunogênicos (substância P e composto 48/80, por exemplo) (De PAULIS et al., 1996).

1.1.5.6. Neuropeptídeos

Neuropeptídeos têm sido encontrados em aspirados do fluído sinovial de pacientes com artrite reumatóide (LYGREN et al., 1986; LARSSON et al., 1991). Técnicas de imuno-histoquímica têm demonstrado que muitas fibras nervosas finas na sinóvia normal são imuno-reativas para substância P e CGRP (considerados marcadores de fibras sensoriais), assim como para neuropeptídeo Y (encontrado na maioria dos neurônios periféricos

noradrenérgicos). Muitas das fibras imuno-reativas foram encontradas em áreas perivasculares e na superfície sinovial (MAPP et al., 1990).

Em estágios agudos da inflamação, a densidade de terminações nervosas contendo CGRP está aumentada (HANOSCH et al., 1996). Além disso, neurônios ganglionares da raiz dorsal positivos para o CGRP parecem estar aumentados durante as fases aguda e crônica da inflamação articular em ratos (HANESH et al., 1993). Este aumento na expressão de CGRP ocorre mais ou menos em paralelo com a da substância P nos gânglios da raiz dorsal e nervos periféricos nas fases aguda e crônica da inflamação articular (NOGUCHI et al., 1988; LEMBECK et al., 1991; MINAMI et al., 1990).

Há evidências de que a inflamação articular envolve tanto tecidos como nervos e que o evento desencadeante (freqüentemente desconhecido, exceto no caso das artrites reativas) pode iniciar sua ação sobre os nervos, os tecidos, ou ambos. Assim, a cascata de eventos inflamatórios articulares é caracterizada por interações complexas, das quais resulta uma progressiva piora da doença. A partir daí, torna-se claro que a separação entre inflamação neurogênica e tecidual é apenas artificial (para revisão ver ZOPPI e CHRUBASIK, 1997).

1.1.6. Testes algésimétricos articulares

Vários métodos para o estudo da dor inflamatória articular têm sido

propostos, entre eles a utilização de cristais de urato de sódio (FAIRES e McCARTY, 1962; ROSENTHALE et al., 1966), formalina (PARDO e RODRIGUEZ, 1966), ou carragenina (VAN ARMAN, 1970) em cães. Devido às muitas limitações na execução técnica em cães, foi introduzido o modelo de artrite induzida pelo adjuvante de Freund, em ratos (PIRCIO et al., 1975; De CASTRO COSTA et al., 1981; LARSEN e ARNT et al., 1985, ATTAL et al., 1988), considerado modelo que envolve a dor crônica (COLPAERT, 1987; CALVINO et al., 1987). Entretanto, este é um modelo que provoca alto nível de estresse no animal, o que pode ser evidenciado por aumento expressivo de vocalizações ultrasônicas, comumente associadas a comportamentos de agressão e/ou defesa nessa espécie (CALVINO et al., 1996). Por reproduzir uma forma mais grave de poliartrite, a artrite por adjuvante de Freund pode produzir todas as conseqüências do estado inflamatório crônico, incluindo alterações neuronais, bioquímicas e imunohistoquímicas nem sempre restritas somente às articulações.

Um outro modelo para se avaliar, objetivamente, a nocicepção associada a artrites experimentais é o teste da incapacitação articular em ratos (TONUSSI e FERREIRA 1992). O método não só é sensível à drogas reconhecidamente analgésicas, mas permite detectar a participação de mediadores na nocicepção inflamatória e discriminar a *nocicepção*, resultante da ativação direta de terminações nervosas sensoriais (nociceptores), da

hiperalgesia. Estes efeitos são claramente avaliados pelo aparecimento e registro da incapacitação articular (ver abaixo em Materiais e Métodos). Convém mencionar que o método permitiu identificar até mesmo diferenças no mecanismo de ação de drogas como a indometacina e o diclofenaco, normalmente classificadas em mesmo grupo (TONUSSI e FERREIRA, 1994). Além disso o método atende aos princípios éticos da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983).

1.1.7. Carragenina e LPS como estímulos inflamatórios nociceptivos

A carragenina, um mucopolissacarídeo sulfatado extraído de um musgo (*Chondrus crispus*), injetada em articulação de coelho e cobaia, promove uma intensa agregação de macrófagos e proliferação de fibroblastos que, do ponto de vista fisiopatológico, são muito semelhantes à artrite no homem (GARDNER, 1960). Além disso, a carragenina induz incapacitação articular durante o andar, sensível ao tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais clássicos como a aspirina e a indometacina em cães e ratos (VAN ARMAN et al., 1970; TONUSSI e FERREIRA, 1992). Associado à incapacitação, ocorre uma sensibilização da articulação, manifestada pela retirada do membro quando a articulação inflamada é pressionada (*i.e.* hiperalgesia mecânica) (SANTER et al. 1983). A injeção de carragenina na cavidade articular promove, já nas primeiras horas, a síntese e liberação de mediadores

inflamatórios que produzem edema e uma rápida infiltração de granulócitos polimorfonucleares (SANTER et al. 1983). O efeito vasodilatador do CGRP e da SP é aumentado em articulações tratadas previamente com carragenina (LAM e FERRELL, 1993).

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é o constituinte principal da membrana celular externa da maioria das bactérias Gram negativas. Um grande número de efeitos fisiopatológicos em vários mamíferos, incluindo o homem, podem ser atribuídos ao LPS (SCHLETTER et al., 1995). O LPS, administrado pelas vias intra-peritoneal e intra-plantar, induz hiperalgesia de longa duração em ratos e camundongos (MAIER et al., 1993; WATKINS et al. 1994; KANAAN et al. 1996). Portanto, o LPS tem sido muito utilizado como agente experimental para indução de dor (KANNAN et al., 1996; 1997). Além disso, o LPS também originou um modelo de sinovite experimental que mimetiza a sinovite aguda em cavalos (PALMER e BERTONE, 1994). Por outro lado, sabe-se que o LPS interage com vários tipos de células, dentre as quais macrófagos e monócitos, estimulando o aumento da produção de eicosanóides (O'NEILL e LEWIS 1989; DECKER 1990), formas reativas do oxigênio (BEASLEY et al., 1991) e citocinas incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (FERREIRA et al., 1988, 1993; MAIER et al. 1993; RITSCHHEL et al. 1994, WATKINS et al. 1994).

1.2. Endotelinas como peptídeos pró-inflamatórios

1.2.1. *A família das endotelinas*

A endotelina-1, membro de uma importante família de peptídeos, foi isolada do sobrenadante de culturas de células endoteliais aórticas porcinas e identificada por YANAGISAWA et al. (1988) como sendo o mais potente vasoconstritor conhecido. A família é integrada ainda por mais dois isopeptídeos, a endotelina-2 e a endotelina-3, cada qual codificada por um gene distinto. Cada isoforma é composta de 21 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto ligando dois pares de resíduos de cisteína e seqüência hexapeptídica idêntica na porção hidrofóbica C-terminal (INOUE et al., 1989). A família das endotelinas apresenta, ainda, estrutura e atividades biológicas semelhantes às sarafotoxinas S6a, S6b, S6c, S6d e S6e, isoladas do veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis*, bem como da bibrotoxina, do veneno da *Atractaspis bibroni*, sugerindo uma origem evolucionária comum (TAKASAKI et al., 1988; BECKER et al., 1993; KOCHVA et al., 1993; para revisão ver HAYNES e WEBB, 1993).

Embora as células endoteliais vasculares sejam a principal fonte de endotelina-1, os genes que codificam os três isopeptídeos são expressos, em graus variados, por uma ampla variedade de células, incluindo miócitos cardíacos, células musculares lisas vasculares, epiteliais tubulares renais,

gliais, pituitária, macrófagos, mastócitos, sugerindo que tais peptídeos possam participar independentemente em mecanismos regulatórios complexos em vários órgãos (INOUE et al., 1989; SAKURAI et al., 1991). Além das suas ações vasculares, as endotelinas exercem efeitos pleiotrópicos em diversos tecidos dos tratos respiratório, gastrointestinal, rins, glândulas endócrinas e sistema nervoso central e periférico. Embora haja evidências que as endotelinas possam estar relacionadas ao controle fisiológico normal de certas funções, certamente sua maior relevância parece ser no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos como hipertensão, hipertensão pulmonar, insuficiência renal aguda, vasoespasmos cerebral, insuficiência cardíaca crônica, hipertrofia cardíaca e outras (para revisão ver GOTO et al., 1996). Além disso, as endotelinas têm sido descritas como possíveis mediadores nociceptivos e inflamatórios (para revisões ver SAKURAI et al., 1992; RUBANYI e POLOKOFF 1994; RAE e HENRIQUES, 1998).

1.2.2. Biossíntese das endotelinas e sua regulação

A seqüência de cada endotelina é determinada por meio de um gene distinto, que codifica a correspondente prepro-endotelina (INOUE, et al., 1989). Esses precursores são inicialmente clivados, provavelmente pela furina, para originarem pró-peptídeos denominados big-endotelinas (DENAULT et al., 1995) que são, por sua vez, convertidos a peptídeos

maduros pela ação de uma enzima conversora de endotelina (ECE). Duas ECEs já foram consistentemente identificadas como metaloproteinases, a ECE-1 e a ECE-2, sendo que ambas são inibidas pelo fosforamidon e processam com maior eficácia a big-endotelina-1 do que a big-endotelina-2 ou big-endotelina-3 (para revisões ver OPGENORTH et al., 1995; TURNER e MURPHY, 1996).

A expressão do RNAm de endotelina-1 em culturas de células endoteliais é estimulada por trombina (EMORI et al., 1992), fator de necrose tumoral- α (TNF- α ; MARSDEN e BRENNER, 1992), interleucina-1 (IL-1; MAEMURA et al., 1992), insulina (MARSDEN et al., 1991), noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, bradicinina, lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada ou acetilada (YANAGISAWA et al., 1988; IMAI et al., 1992). O aumento na expressão de RNAm de endotelina-1 induzido pela trombina, angiotensina II e vasopressina, depende de aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , ativação de proteína-quinase C (EMORI, et al., 1991; EMORI, et al., 1992).

1.2.3. Receptores endotelinérgicos e seus ligantes

As diversas ações das endotelinas são mediadas através de receptores específicos, que pertencem à família de receptores contendo sete domínios transmembrana e acoplados a proteínas G. Três receptores endotelinérgicos

foram clonados: os receptores endotelinérgicos ET_A, ET_B e ET_C. A endotelina-1 e endotelina-2 apresentam uma afinidade 10 a 100 vezes maior do que para endotelina-3 pelo receptor do tipo ET_A (ARAI et al., 1990). As três isoformas de endotelinas apresentam afinidades semelhantes pelo receptor ET_B (SAKURAI et al., 1990). Finalmente, há o receptor ET_C, que, por enquanto, foi clonado apenas do genoma de anfíbios, cuja isoforma com maior afinidade é a endotelina-3 do que a endotelina-1 (KARNE et al., 1993).

Os receptores ET_A ou ET_B podem ainda ser discriminados pelo uso de agonistas ou antagonistas seletivos. Assim, receptores ET_A são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123 (IHARA et al., 1992), ou não peptídicos como o BMS 182874 e o A-127722-5. Por outro lado, os receptores ET_B são ativados seletivamente por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala^{1,3,11,15}]endotelina-1, o BQ-3020 e o IRL 1620, e seletivamente bloqueados por antagonistas peptídicos como o BQ-788 (ISHIKAWA et al., 1994) e RES-701-1, ou pelo composto não-peptídico Ro-46-8443 (para revisões ver MASAKI et al., 1994; SOKOLOVSKY, 1995; OHLSTEIN, et al., 1996; WEBB E MEEK, 1997). Convém mencionar que, até o momento, não foi identificado qualquer agonista seletivo de receptores ET_A, e que há vários antagonistas não-seletivos (ou mistos) para receptores ET_A/ET_B como o peptídeo TAK-044 (IKEDA, et al., 1994) e a sulfonamida bosentan (CLOZEL, et al., 1994).

1.2.4. Mecanismos de transdução ativados por receptores endotelinérgicos

Receptores endotelinérgicos podem estar acoplados, através de proteínas ligantes de GTP (Gq, Gs, Gi, Go, etc.), a múltiplos mecanismos de transdução de sinal (para revisão ver SOKOLOVSKI, 1995). Funcionalmente, tanto receptores ET_A como ET_B comumente ativam a fosfolipase C, causando hidrólise do fosfatidilinositol bisfosfato, com rápida formação de 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. 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 (SILBERBERG et al., 1989; GOTO et al., 1989; INOUE et al., 1990). A elevação do [Ca²⁺]_i pode ativar proteínas quinases e também a fosfolipase A₂, que fornece ácido araquidônico para a síntese de eicosanóides (para revisão ver HYSLOP e DE NUCCI, 1992). A formação de prostanóides, induzida pelas endotelinas, pode ainda ser mediada diretamente pela ativação da fosfolipase A₂, ou através da fosfolipase C, na qual o DAG é convertido, pela ação das lipases do ácido araquidônico (SOKOLOVSKI, 1995). Atuando em receptores ET_A, as endotelinas podem ainda estimular a síntese de prostaglandina E₂ em osteoblastos, por mecanismo dependente da proteína tirosina quinase C (LEIS et al., 1998), levando à formação de ácido

fosfatídico e DAG, de modo semelhante ao que ocorre pela ativação da fosfolipase D (GRIENGLING et al., 1989). Por outro lado, as endotelinas podem causar alcalinização celular por ativação do antiporte Na^+/H^+ , aumentando indiretamente o $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que parece ser uma consequência da ativação da proteína quinase C (LONCHAMPT et al., 1991).

A via da guanilato ciclase parece ser importante para algumas ações depressoras das endotelinas e sarafotoxinas, mas o aumento nos níveis de GMPc nesses casos parece ser mediado pela síntese de óxido nítrico (para a endotelina-3) ou monóxido de carbono (para as sarafotoxinas) (MORITOKI et al., 1993; SHAGRA-LEVINE et al., 1994). Além de outros mecanismos já descritos, tanto por ativação de receptores ET_A como ET_B a endotelina-1 também induz a expressão de proto-oncogenes (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*) (SIMONSON et al., 1992; WANG et al., 1994) e, através de estímulos mitogênicos, ativa a cascata intracelular de quinases, incluindo a ativação sequencial da raf-1, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (para revisão ver GOTO et al., 1996).

1.2.5. Endotelinas na inflamação

As endotelinas, são substâncias que agem como hormônios locais de ação autócrina e parácrina, estimulando a liberação de outros mediadores, muitos dos quais podem induzir novamente a sua produção. São expressas e

secretadas por diversas células importantes durante a inflamação, como células endoteliais (YANAGISAWA et al., 1988), mastócitos (YAMAMOTO et al., 1994), macrófagos (EHRENREICH et al., 1990) e monócitos (CUNNINGHAM et al., 1991; EHRENREICH et al., 1993). Neutrófilos podem formar endotelina-1 se presente o seu precursor imediato, a big-endotelina-1 (SESSA et al. 1991).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* vêm contribuir para o esclarecimento dessa atividade. A endotelina-1, por exemplo, é um estímulo efetivo para a produção de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, peptídeo quimiotático de monócitos-1 e fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos em cultura de macrófagos/monócitos humanos (HURIBAL et al., 1992; CUNNINGHAM et al., 1993; HELSET et al., 1993), IL-6 de monócitos humanos (McMILLEN, 1995) e de leucócitos pluripotentes de medula óssea de rato (AGUI et al., 1994). Ainda, a endotelina-1 também estimula a produção de TNF α , IL-1 e IL-6 em culturas de células endoteliais humanas e de rato (XIN et al., 1995; STANKOVA, et al., 1996).

Ao ativar a fosfolipase A₂ em várias células, as endotelinas podem estimular a liberação do fator ativador de plaquetas (FAP), bem como de produtos do ácido araquidônico, derivados tanto da via ciclo-oxigenase como da lipoxigenase. *In vitro*, antagonistas do receptor do FAP inibem os efeitos pró-agregantes da endotelina-1 em neutrófilos humanos (GOMEZ-GARRE et

al., 1992) e seu efeito vasoconstritor nas vias aéreas de cobaia (FILEP et al., 1991; NINOMIYA et al., 1992a). A endotelina-1, um potente liberador de prostanóides, pode estimular a liberação da tromboxana A₂ (TXA₂) de células das vias aéreas de cobaia (FILEP et al., 1991) e de macrófagos das vias aéreas de cão (NINOMIYA, et al., 1992b), da PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂ de brônquio humano (HAY et al., 1993) e da PGD₂ e PGF_{2α} a partir de células epiteliais das vias aéreas de gato (WU et al., 1993). Há ainda relatos de que a endotelina-1 estimula a expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2; a isoforma indutível), mas não da isoforma constitutiva ciclo-oxigenase-1 (COX-1), em cultura de células mesangiais (KESTER et al., 1994) e osteoblastos (LEIS et al., 1998).

Antagonistas de receptores de LTs reduzem a constrição induzida pela endotelina-1 nas vias aéreas de cobaia *in vitro* (FILEP et al., 1991), enquanto inibidores da lipoxigenase inibem a fase inicial da broncoconstrição induzida pelo peptídeo no cão (UCHIDA et al., 1992a). Além disso, pelo menos em pulmão de rato e brônquios humanos, a endotelina-1 induz a liberação de eicosanóides por meio da estimulação de receptores ET_A (D'ORLÉANS-JUSTE et al., 1992; HAY et al., 1993). Por outro lado, a endotelina-1 libera histamina de mastócitos pulmonares de cobaia (mas não os peritoniais) por ativação de receptores ET_B (NINOMIYA et al., 1992a; UCHIDA et al., 1992b).

Quando administrada intravenosamente, a endotelina-1 aumenta o extravasamento de proteínas plasmáticas da microvasculatura de estômago, duodeno, baço, coração, diafragma, traquéia e brônquio de ratos (FILEP et al., 1991; FILEP et al., 1994; SIROIS et al., 1992; LOPEZ-BELMONTE e WHITTLE, 1995; KUROSE et al., 1993). As endotelinas endógenas, por sua vez, parecem contribuir para o edema local, induzido pela ovoalbumina na pata de camundongos (SAMPAIO et al., 1995) ou pela carragenina na pata de ratos (BERTELLI et al., 1992).

A endotelina-1 pode também atuar como fator quimiotático para monócitos e macrófagos (ACHMAD e RAO, 1992) que, por sua vez, são capazes de gerar endotelina-1 na presença de estímulos inflamatórios como o LPS (EHRENREICH et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1991). Além disso, os níveis circulantes de endotelina-1 estão aumentados em animais tratados com LPS, e essa alteração está correlacionada a mudanças nos níveis plasmáticos de várias citocinas pró-inflamatórias e/ou marcadores inflamatórios importantes (para revisão ver BATTISTINI 1996).

1.2.6. Endotelinas na dor

Alguns poucos trabalhos têm demonstrado que as endotelinas podem apresentar propriedades nociceptivas. As três isoformas de endotelinas causam contorções abdominais quando injetadas intraperitonealmente em

camundongos (FERREIRA et al., 1989; RAFFA e JACOBY, 1991; RAFFA et al., 1991; RAFFA et al., 1996). Por outro lado, a injeção intraplantar de endotelina-1 induz hiperalgesia, ou seja diminuição do limiar de resposta à aplicação de um estímulo mecânico em ratos, ou de um estímulo químico (formalina ou capsaicina) em camundongos (FERREIRA et al., 1989; PIOVEZAN et al., 1997; PIOVEZAN, 1997). No homem, a injeção intradérmica de endotelina-1 no antebraço também causa efeito hiperalgésico, sensibilizando a área circunjacente a estímulos mecânicos (FERREIRA et al., 1989). Além disso, voluntários que receberam infusão de endotelina-1 na artéria braquial, relataram dor profunda no antebraço, a qual foi aumentada ao toque ou por contração muscular (DAHLOF et al., 1990). Os mecanismos subjacentes a essas ações não foram ainda esclarecidos, mas podem envolver, pelo menos em parte, a despolarização direta das terminações periféricas de neurônios aferentes primários (YOSHIZAWA, et al., 1989).

Por outro lado, quando administradas centralmente, as endotelinas parecem exercer ações antinociceptivas. Os efeitos antinociceptivos supra-espinais da endotelina-1 e da endotelina-3 parecem ser mediados pela ativação de canais de Ca^{2+} , mas independem da liberação de opióides endógenos (NIKOLOV et al., 1993), enquanto o efeito antinociceptivo espinal da endotelina-1 se deve, pelo menos em parte, à ativação de canais de Ca^{2+} e aumento da liberação de metionina-encefalina, que age sobre os

receptores opióides do tipo δ (KAMEI et al., 1993). Além disso, a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, na substância cinzenta periaquedutal, parece ser uma etapa essencial para a antinocicepção induzida pela endotelina-1 (D'AMICO et al., 1996).

1.2.7. Endotelinas na articulação

Vários tecidos articulares, inclusive culturas de condrócitos de ratos (KHATIB et al., 1997) e células endoteliais humanas de vasos sangüíneos sinoviais (WHARTON et al., 1992) e sinoviócitos (YOSHIDA et al., 1997; 1998), expressam e/ou secretam quantias significantes de endotelina-1. Além disso, a endotelina-1 é mitogênica em condrócitos articulares (STOJILKOVIC et al., 1994; KHATIB et al., 1997) e induz a expressão de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e CD-44 em cultura de fibroblastos sinoviais (SCHWARTING et al., 1996) e a produção de fibronectina e colágeno em sinoviócitos de coelho (GUTIERREZ et al., 1996). A endotelina-1 estimula a produção de IL-6, mas não o fator estimulador de colônia de macrófagos em osteoblastos, podendo influenciar o metabolismo e a homeostasia óssea (PERKINS et al., 1997).

Os níveis de endotelina-1 no fluído sinovial de pacientes com artrite reumática, gota ou osteoartrite são mais elevados do que aqueles encontrados normalmente no plasma (NAHIR et al., 1991; MIYASAKA et al., 1992;

SILVERI et al., 1996). O nível plasmático de endotelina-1 é mais alto durante artrite reumática ativa (quando comparado aos de indivíduos normais ou nos quais a doença está inativa; MIYASAKA et al., 1992) e em pacientes com a doença de Behcet, uma condição associada com complicações articulares (USLU et al., 1997). Além disso, corações isolados de ratos poliartríticos, mas não de controles, apresentaram uma marcada vasoconstrição coronária *ex vivo*, que foi abolida por um antagonista misto de receptores ET_A/ET_B (KLEMM et al., 1995).

O conjunto dessas evidências sugere, fortemente, que certas doenças inflamatórias articulares poderiam estar associadas com uma produção aumentada de endotelina-1. Considerando que a endotelina-1 sensibiliza marcadamente a articulação de joelho de cães para o efeito hiperalgésico da PGE₂ (FERREIRA et al., 1989), talvez a dor associada a doenças articulares inflamatórias possa decorrer, pelo menos em parte, da produção exagerada de endotelinas por constituintes desse tecido. Até o presente momento, não há trabalhos que tenham procurado investigar essa possibilidade. Sendo assim, o teste da incapacitação articular em ratos, capaz de avaliar a nocicepção associada a artrites experimentais, além de detectar a participação de mediadores inflamatórios, parece ser um importante método para investigar o envolvimento das endotelinas na nocicepção inflamatória articular.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- 1. Investigar os possíveis efeitos periféricos da endotelina-1 e sarafotoxina S6c no modelo da incapacitação articular de joelho de rato.**
- 2. Caracterizar os receptores endotelinérgicos envolvidos nas ações nociceptivas e/ou hiperalgésicas da endotelina-1.**
- 3. Verificar a possível participação das endotelinas endógenas na nocicepção articular induzida pela carragenina ou LPS.**

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Em nossos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos com pesos variando entre 150 e 200 gramas, criados até o desmame pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e depois mantidos até o uso no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12h), com livre acesso à água e ração. Por ocasião do delineamento experimental, cada animal foi transferido ao laboratório de experimentação e mantido por pelo menos 1 h para ambientação antes de qualquer procedimento experimental. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983).

3.2. Drogas

Este estudo foi conduzido utilizando-se as seguintes drogas: carragenina (Marine Colloids Co., E.U.A.), lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; sorotipo 055:B5; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.), endotelina-1 e sarafotoxina S_{6c} (American Peptide Co., Sunnyvale, CA, E.U.A.), BQ-123 (ciclo [D-Trp-DAsp-Pro-D-Val-Leu]; sintetizado pelo Departamento de

Farmacologia da Universidade de Sherbrooke, Sherbrooke, Canadá), BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetil-piperidino-carbonil-L- γ -metil-leucil-D-1-metoxi-carbonil-triptofanil-D-norleucina; Research Biochemicals International, Natick, MA, E.U.A.) e bosentan (gentilmente doado pela Dra. Martine Clozel, F. Hoffmann La-Roche A.G., Basel, Suíça). As soluções estoque (10 a 100 μ M) de endotelina-1, sarafotoxina S6c, BQ-123 e BQ-788 foram preparadas em solução estéril salina tamponada com fosfato (PBS), estocadas a -18°C e diluídas em PBS nas concentrações desejadas, no momento do uso. O bosentan foi dissolvido no dia de uso em água destilada estéril, sob aquecimento em banho-Maria (50°C). A carragenina e o LPS foram preparados no dia de uso em PBS.

3.3. A injeção intra-articular de drogas

As injeções intra-articulares (*i.a.*) foram feitas com o animal acordado. Para tanto, os animais foram cuidadosamente imobilizados dentro de um cone feito de cartolina, de forma que ficasse exposta apenas a parte do corpo do terço inferior do abdomen para baixo. Com uma das mãos segurou-se o rato em decúbito dorsal e sua perna posterior direita foi fletida. Em seguida, o joelho do animal foi depilado para que o local de introdução da agulha pudesse ser visualizado. Tocando-se levemente com a ponta dos dedos, foi possível sentir a extremidade do fêmur e da tíbia, sendo possível também ver o ligamento que ancora a patela aos dois, como uma faixa esbranquiçada

longitudinal. Procedeu-se à antissepsia da área depilada com álcool 70°. Na linha desse ligamento, acima da patela e abaixo da ponta do fêmur introduziu-se, perpendicularmente, a agulha (13 x 3,8) em cerca de 1/3 de seu comprimento, sem oferecer resistência. Os volumes das soluções injetadas não excederam a 40 µl.

O termo “articulação normal” é usado para identificar quando uma articulação recebe apenas um estímulo nociceptivo inflamatório, enquanto “articulação sensibilizada” refere-se ao estímulo prévio (72 h) de uma articulação com agente nociceptivo inflamatório (carragenina). Estes estímulos nociceptivos foram sempre obtidos a partir de injeções intra-articulares.

3.4. O teste de nociceção articular

Para avaliar quantitativamente o grau de incapacitação motora do membro que recebeu o estímulo nociceptivo, foi utilizado o modelo de nociceção articular induzida por agentes inflamatórios descrito anteriormente por Tonussi e Ferreira (1992). O sistema de registro é constituído por um conjunto de cilindro de aço inox (30 cm largura x 30 cm diâmetro), coberto com tela de trama fina de arame de aço inox, que gira a uma velocidade de 3 r.p.m.. A superfície do cilindro é dividida em 3 trilhas iguais, cada qual ligada ao terra de um microcomputador, permitindo a

colocação no aparelho de 3 animais simultaneamente. O sistema se completa com as sapatilhas metálicas, que são colocadas nas patas direitas e conectadas à porta de entrada de dados do microcomputador e aquelas colocadas nas patas esquerdas apenas com a função de dar equilíbrio aos animais. Após a colocação das sapatilhas, os animais permaneceram nas caixas durante pelo menos 30 min para habituação. Os registros do estado funcional das articulações foram realizados colocando-se os animais sobre o cilindro em rotação e medindo-se, por meio de um programa específico no microcomputador, o tempo em que a pata direita posterior do animal deixou de tocar a superfície do cilindro, durante um período de tempo fixo de 60 s. A deambulação sobre o cilindro obriga as patas posteriores a, alternadamente, deixarem de apoiar o animal. Acumulando-se o tempo em que a pata posterior direita não toca o cilindro durante um período de observação de 60 s obtém-se o “Tempo de Elevação da Pata”, ou TEP. Em animais normais o TEP varia em torno de 10 s, e elevações desse índice indicam desenvolvimento de incapacitação articular. Para evitar flutuações, principalmente durante o registro do valor do TEP basal, os animais foram treinados no aparelho no dia anterior ao do teste. Durante os experimentos, as medidas do TEP foram realizadas a intervalos de 1 h, nos quais os animais permaneceram em suas gaiolas.

3.5. Incapacitação articular induzida pela endotelina-1 ou sarafotoxina

S6c

Nos experimentos iniciais, examinou-se a influência de injeções *i.a.* de endotelina-1 ou do agonista seletivo de receptores ET_B, a sarafotoxina S6c (cada qual a 15, 30, 60, 120 ou 240 pmol) sobre o TEP. Animais controle receberam injeções semelhantes do veículo (PBS). Os efeitos desses agonistas endotelinérgicos foram avaliados a cada h por até 6 h em animais normais e por até 12 h em animais cuja articulação havia sido tratada 72 h antes com carragenina (300 µg, *i.a.*; ver abaixo). Paralelamente, alguns animais foram tratados com injeção intravenosa (*i.v.*) do antagonista não-peptídico misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B, bosentan (10 e 30 mg/kg), ou com injeção *i.a.* de BQ-123 (10 e 30 nmol) ou BQ-788 (10 nmol), antagonistas peptídicos seletivos para receptores ET_A ou ET_B, respectivamente, 15 min antes da injeção de endotelina-1 (30 ou 120 pmol, *i.a.*). Nestes experimentos, os animais controle receberam tratamentos análogos com salina (*i.v.*) e/ou PBS (*i.a.*).

3.6. Incapacitação articular induzida pela carragenina

Com o objetivo de quantificar o efeito nociceptivo da carragenina no modelo, comparou-se a influência da injeção *i.a.* de diferentes doses desse agente (75, 150, 300 ou 3000 µg) sobre o TEP, avaliado a cada hora por 60 s

até 6 h após a administração. Em alguns animais, o TEP foi ainda reavaliado às 24, 48 e 72 h após a injeção de carragenina. Animais controle receberam tratamento análogo com o veículo (PBS). A partir destes experimentos, foram selecionadas as doses de 150 e 300 µg de carragenina para estudos subseqüentes, porque estas provocaram níveis submáximos de respostas nociceptivas (ver em Resultados).

Para avaliar a influência da endotelina-1 sobre a nocicepção induzida pela carragenina, em alguns experimentos injetou-se uma dose não-nociceptiva do peptídeo (30 pmol, *i.a.*) ou veículo (PBS) 30, 60 ou 120 min antes da administração de carragenina (150 µg, *i.a.*). No grupo experimental seguinte, os animais receberam injeções *i.a.* de endotelina-1, sarafotoxina S6c (cada qual 15, 30 ou 60 pmol) ou veículo 30 min antes da carragenina (tempo escolhido a partir dos resultados obtidos no grupo anterior).

Em outro grupo experimental avaliou-se o possível envolvimento de endotelinas endógenas na nocicepção induzida por carragenina. Para tal, testamos os efeitos da carragenina (300µg, *i.a.*) 15 min após o tratamento com o antagonista não-peptídico misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B, bosentan (3, 10 ou 30 mg/kg, *i.v.*) ou salina.

3.7. Incapacitação articular induzida pelo LPS

A exemplo do que foi feito com a carragenina, também quantificou-se o

efeito nociceptivo de diferentes doses de LPS de *E. coli* (1, 5 ou 10 µg, *i.a.*) sobre o TEP, avaliado a cada hora por 60 s até 6 h após a administração. Animais controle receberam tratamento análogo com o veículo (PBS). A partir destes experimentos, foi selecionada a dose de 1 µg de LPS para estudos posteriores, porque foi a que acarretou respostas nociceptivas sub-máximas mais consistentes. Em alguns grupos de animais, testou-se a influência do antagonista não-peptídico misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B, bosentan (3, 10 ou 30 mg/kg, *i.v.*, 15 min antes do LPS) sobre a nocicepção acarretada pelo LPS (1 µg, *i.a.*). Em outros, injetou-se doses não-nociceptivas de endotelina-1, sarafotoxina S6c (cada qual a 15, 30 ou 60 pmol) ou veículo (PBS) 30 min antes da administração de LPS (1 µg, *i.a.*), para verificar a possível influência desses agonistas endotelinérgicos na nocicepção induzida por este agente.

3.8. Incapacitação induzida por carragenina ou LPS em articulações sensibilizadas previamente com carragenina

Conforme demonstrado por Tonussi (1996), a injeção *i.a.* de carragenina (300 µg) causa, 72 h depois, um aumento pronunciado de respostas nociceptivas ao próprio agente e ao LPS, bem como modificações no perfil de mediadores envolvidos nesses fenômenos. Nesse sentido, foram realizados experimentos, utilizando-se antagonistas de receptores

endotelinérgicos, para investigar o possível papel das endotelinas endógenas sobre a nocicepção induzida pela carragenina ou LPS em articulações sensibilizadas previamente com carragenina. Alguns animais foram tratados com o antagonista não-peptídico misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , bosentan (10 ou 30 mg/kg, no caso da carragenina; 1, 3, 10 ou 30 mg/kg, no caso do LPS; *i.v.* 15 min antes) ou salina. Outros receberam injeções *i.a.* de BQ-123 (10 e 30 nmol) ou BQ-788 (3 e 10 nmol), antagonistas peptídicos seletivos para receptores ET_A ou ET_B , respectivamente, ou PBS, 15 min antes do LPS.

3.9. Incapacitação induzida por endotelina-1 ou sarafotoxina S6c em articulações sensibilizadas previamente com carragenina

Alguns experimentos foram realizados para analisar se a sensibilização prévia (72 h) das articulações com carragenina altera as propriedades nociceptivas da endotelina-1 ou do agonista seletivo de receptores ET_B , a sarafotoxina S6c. Nestes estudos, 72 h após tratamento *i.a.* com carragenina, cada agonista foi injetado, isoladamente, na dose de 30 pmol (*i.a.*). Parte dos animais foram ainda tratados *i.a.* 15 min antes da injeção de endotelina-1 com PBS, BQ-123 (10 nmol) ou BQ-788 (10 nmol), antagonistas peptídicos seletivos para receptores ET_A ou ET_B , respectivamente.

3.10. Apresentação e análise estatística dos resultados

Para minimizar a interferência de possíveis flutuações espontâneas da reatividade nociceptiva dos animais sobre a interpretação dos resultados, os animais controle em cada grupo foram sempre testados em paralelo com os seus respectivos animais experimentais.

Os resultados são apresentados como as médias aritméticas de 6 a 10 observações, acompanhadas dos seus respectivos erros padrão da média (E.P.M.) dos valores absolutos dos tempos de elevação das patas (TEPs) ou como as Áreas Sob as Curvas (ASCs), calculadas em unidades arbitrárias a partir das curvas representativas dos TEPs, tomados a intervalos de 1 h, por períodos de 0-6 ou 0-12 h.

A análise estatística dos resultados foi realizada inicialmente utilizando-se análise de variância (ANOVA). Quando este teste acusou diferenças com nível de significância $P \leq 0,05$, procedeu-se à realização do teste de Bonferroni. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram tomadas como estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Nociceção induzida pela endotelina-1 ou sarafotoxina S6c

Os resultados da Figura 1 mostram que a injeção *i.a.* de endotelina-1 (15, 30, 60, 120 ou 240 pmol) induziu, em articulações normais, respostas nociceptivas dependentes da dose. Nas doses de 120 ou 240 pmol, a endotelina-1 induziu incapacitação progressiva, começando aos primeiros 15 min da injeção (dados não mostrados) e declinando 6 h depois. A incapacitação é representada pelo aumento significativo no TEP (*i.e.* efeito nociceptivo; Figura 1A), e pelo aumento das ASCs calculadas a partir dos valores de TEP, registrados entre 0-6 h, de 63 ± 2 (controle PBS) para 131 ± 17 e 217 ± 12 (endotelina-1 120 e 240 pmol, respectivamente; $P \leq 0,05$) (Figura 1B). Em contraste, a injeção *i.a.* do agonista seletivo de receptores ET_B, a sarafotoxina S6c, em todas as doses testadas (15, 30, 60, 120 ou 240 pmol) não alterou o TEP até 6 h após a sua injeção (Figura 2).

Considerando-se que a resposta nociceptiva obtida com 120 pmol de endotelina-1 foi significativa e claramente sub-máxima, esta dose foi escolhida para investigar, com emprego de antagonistas de receptores endotelinérgicos, os possíveis receptores envolvidos nessa ação.

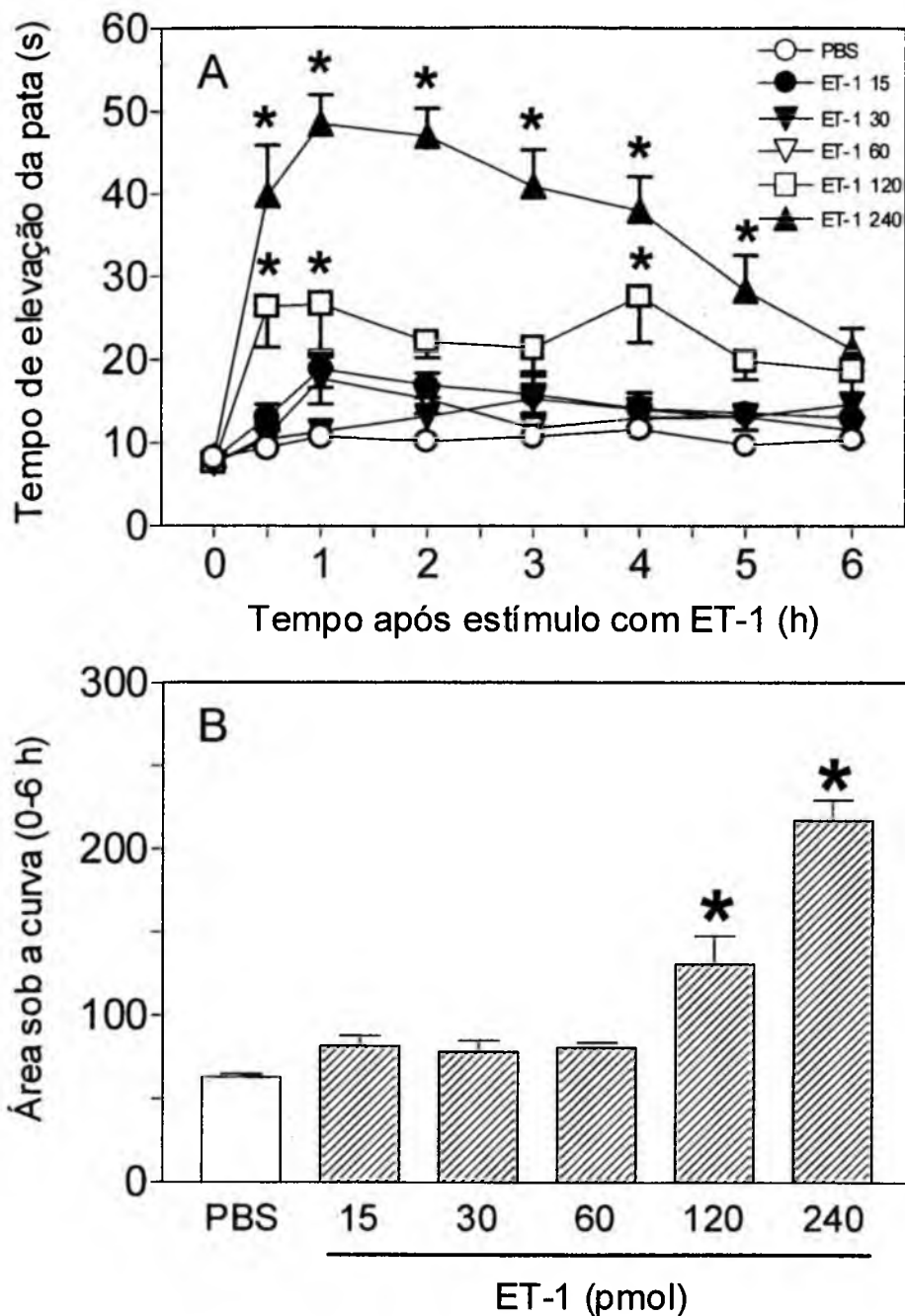


Figura 1: Efeitos nociceptivos da endotelina-1 (ET-1) em articulações normais de rato. Os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou de ET-1, nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de ET-1 ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas (em unidades arbitrárias) a partir dos TEPs de cada grupo apresentados no Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor obtido é comparado ao respectivo valor controle (PBS) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

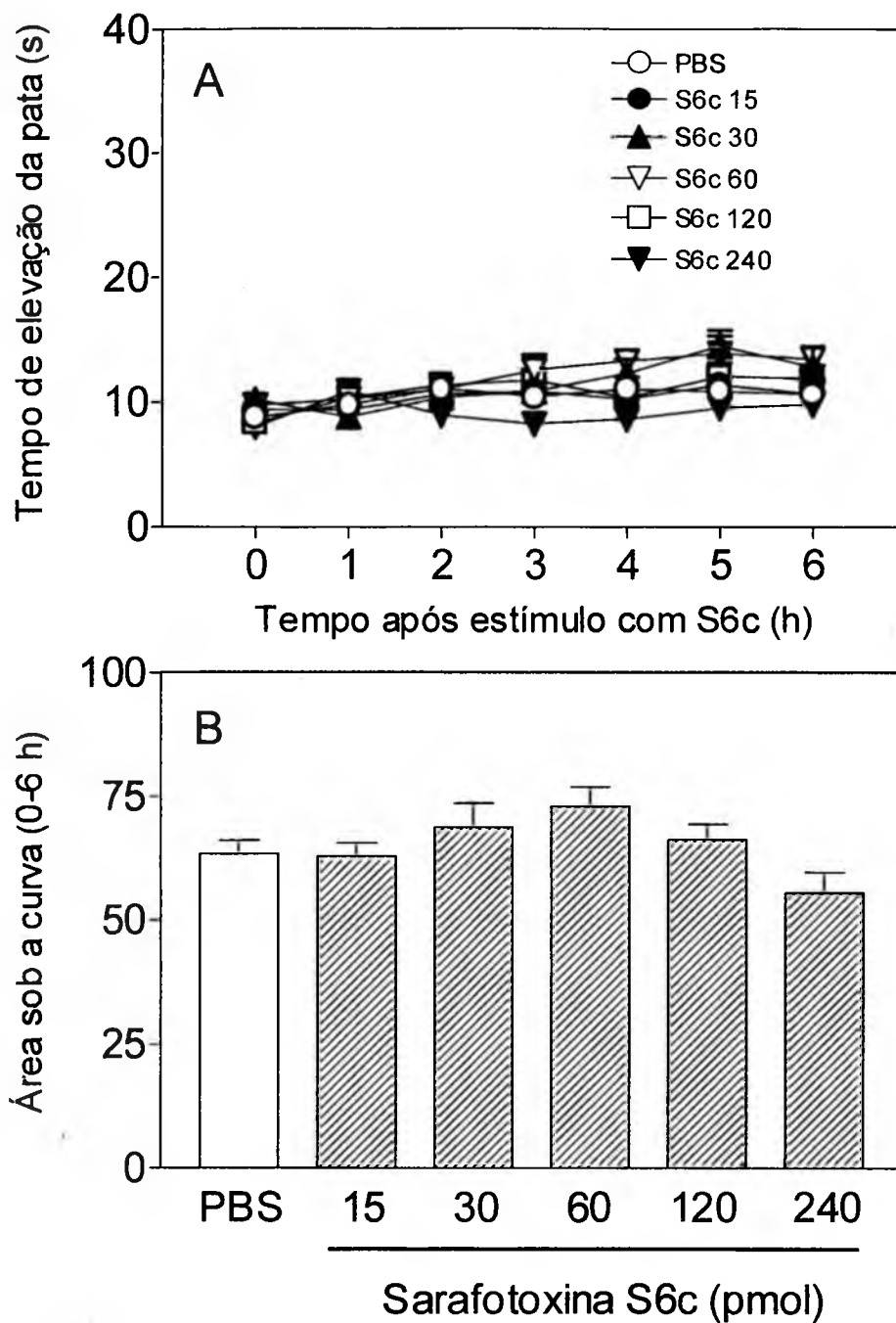


Figura 2: Efeitos da sarafotoxina S6c (S6c), um agonista seletivo de receptores ET_B , em articulações normais de rato. Os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou de sarafotoxina S6c, nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de S6c ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas (em unidades arbitrárias) a partir dos TEPs de cada grupo apresentados no Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. A sarafotoxina S6c, nas doses utilizadas não alterou os TEPs nos animais testados ($P > 0,05$; ANOVA).

Verificou-se que o tratamento com o antagonista não-peptídico misto (*i.e.* não seletivo) de receptores ET_A/ET_B, bosentan (10 ou 30 mg/kg, *i.v.*, 15 min antes da endotelina-1) inibiu seus efeitos nociceptivos em 54 e 72%, respectivamente (Figura 3). De modo semelhante, a nocicepção induzida pela endotelina-1 (120 pmol) também foi significativamente reduzida pelo tratamento prévio (15 min, *i.a.*) com 10 ou 30 nmol do antagonista seletivo de receptores ET_A, o BQ-123 (\cong 48% de inibição para cada dose), mas foi inalterada pelo antagonista seletivo de receptores ET_B, o BQ-788 (10 nmol; Figura 4).

4.2. Influência do tratamento local com endotelina-1 ou sarafotoxina S6c sobre a incapacitação articular induzida pela carragenina

Os resultados de estudos preliminares realizados para avaliar os efeitos das injeções *i.a.* de carragenina (75, 150, 300, 3.000 μ g) sobre o TEP de ratos, bem como as ASCs 0-6 h calculadas a partir das curvas dos TEPs, estão apresentados na Figura 5. Verificou-se que a resposta nociceptiva induzida por 150 μ g de carragenina (ASC = 106 ± 5) foi claramente submáxima, uma vez que diferiu significativamente daquela obtida em resposta à dose de 3.000 μ g (ASC 0-6 h = 176 ± 22). Assim, para os estudos subsequentes, utilizou-se carragenina 150 μ g como estímulo nociceptivo e para investigar a possível

influência da injeção de endotelina-1, em dose não-nociceptiva (30 pmol, *i.a*), 30, 60 ou 120 min antes da carragenina. Conforme ilustra a Figura 6, essa dose de endotelina-1 potencializou as respostas nociceptivas à carragenina em todos os intervalos testados, sendo este efeito mais pronunciado quando o intervalo foi de 30 min.

Para melhor investigar o fenômeno da potencialização das respostas à carragenina pela endotelina-1, injetou-se diferentes doses não-nociceptivas desse peptídeo ou da sarafotoxina S6c (15, 30 ou 60 pmol) 30 min antes do polissacarídeo. Como ilustra a Figura 7, a nocicepção induzida pela carragenina foi claramente potencializada por todas as doses testadas de endotelina-1, o que pode ser apreciado tanto pelos aumentos significativos dos TEPs quanto das ASCs ($P \leq 0,05$). Ao contrário da endotelina-1, o agonista seletivo para receptores ET_B sarafotoxina S6c (15, 30 ou 60 pmol) não modificou a nocicepção induzida pela carragenina (150 μ g; Figura 8).

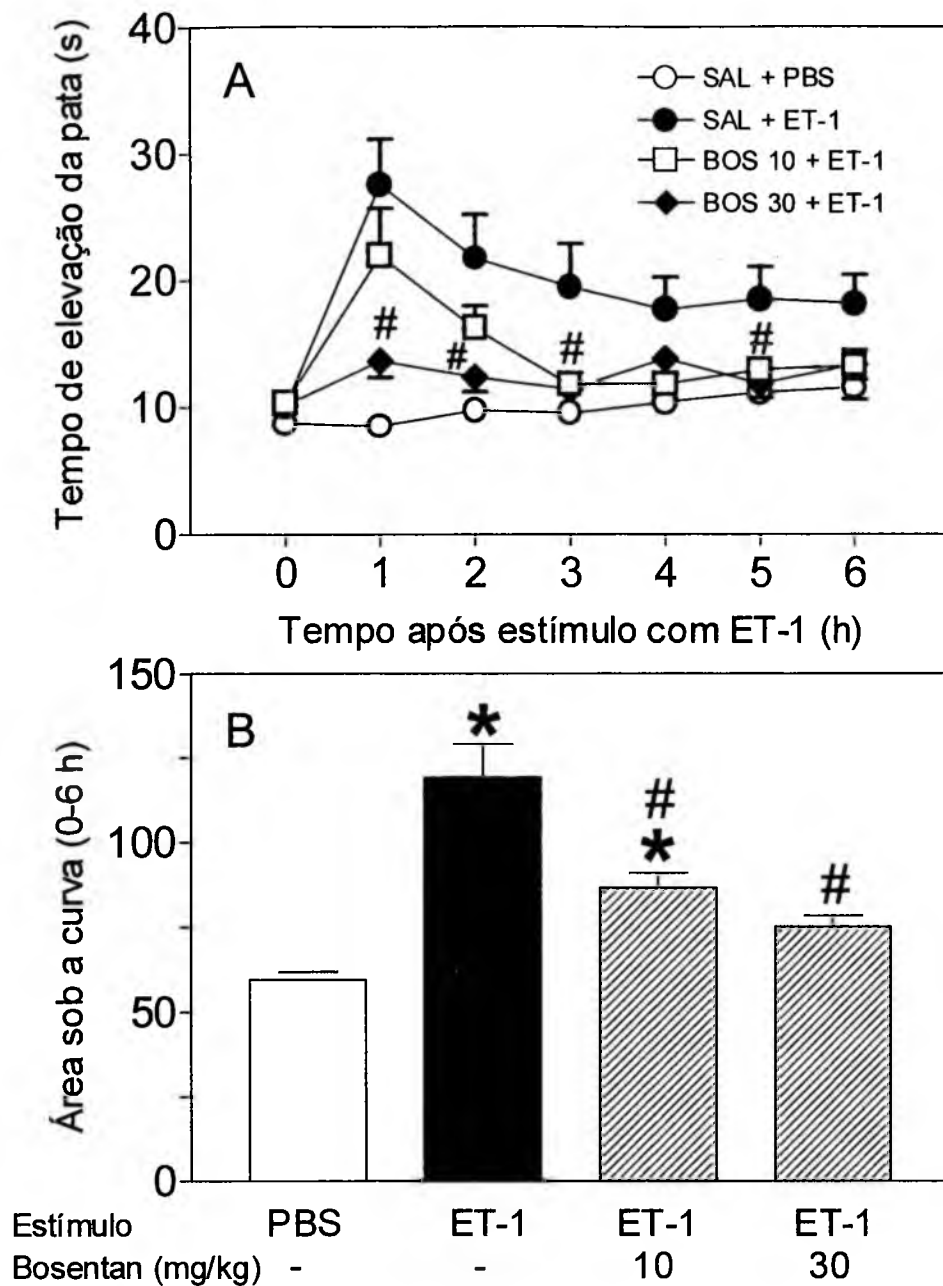


Figura 3: Influência do bosentan (BOS), um antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , sobre as respostas nociceptivas induzidas pela injeção de endotelina-1 (ET-1 120 pmol) em articulações normais de rato. Quinze minutos antes da injeção *i.a.* de ET-1, os animais receberam injeção *i.v.* do veículo (salina) ou bosentan nas doses de 10 ou 30 mg/kg. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de ET-1 ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou tratado somente com endotelina-1, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

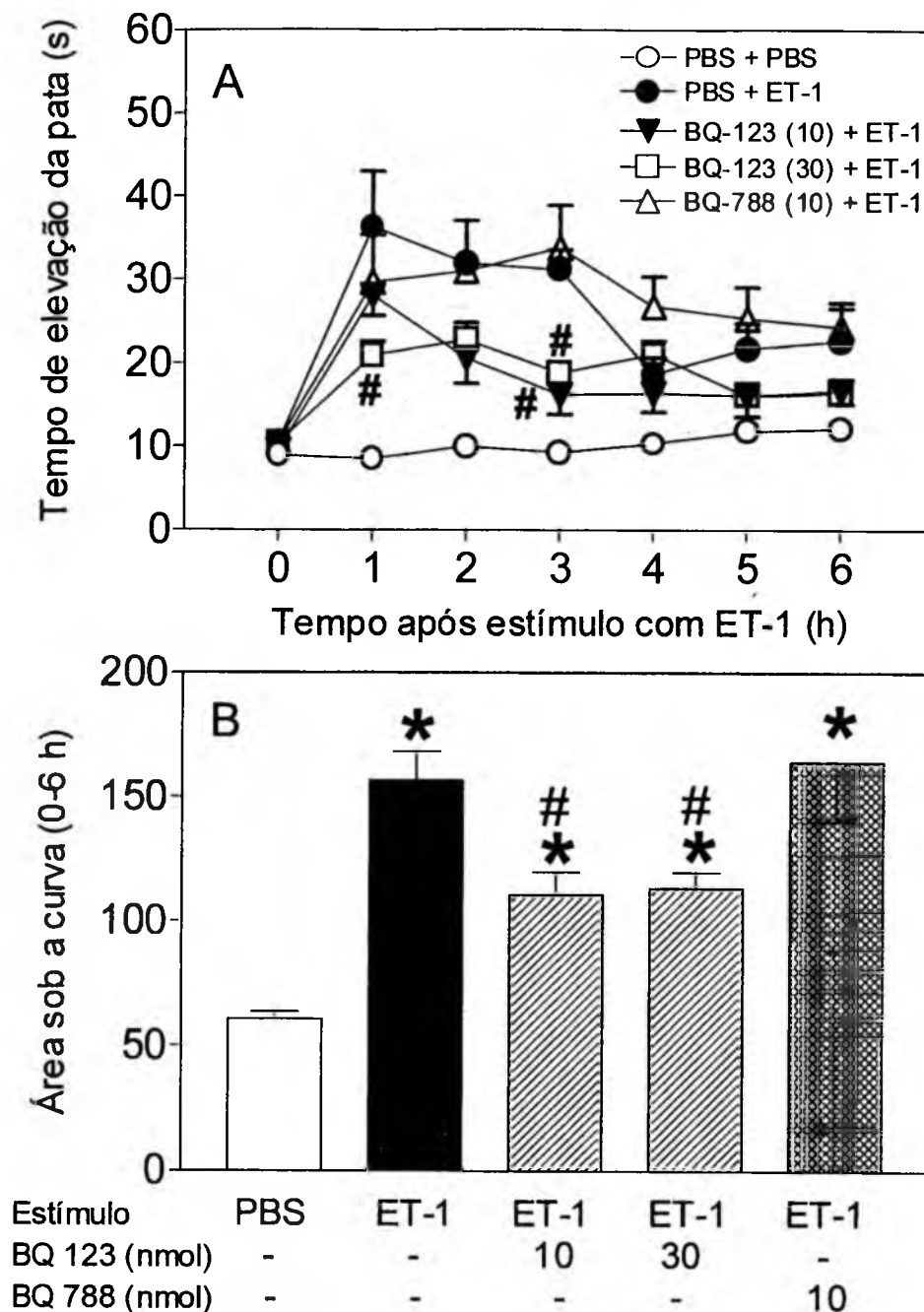


Figura 4: Influência do BQ-123 ou BQ-788, antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B , respectivamente, sobre as respostas nociceptivas induzidas por injeção *i.a.* de endotelina-1 (ET-1; 120 pmol) em articulações normais de rato. Quinze minutos antes do estímulo com ET-1 os diferentes grupos de animais receberam injeção *i.a.* do veiculo (PBS), BQ-123 (10, 30 nmol) ou BQ-788 (10 nmol). **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de ET-1 ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou tratado somente com ET-1, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

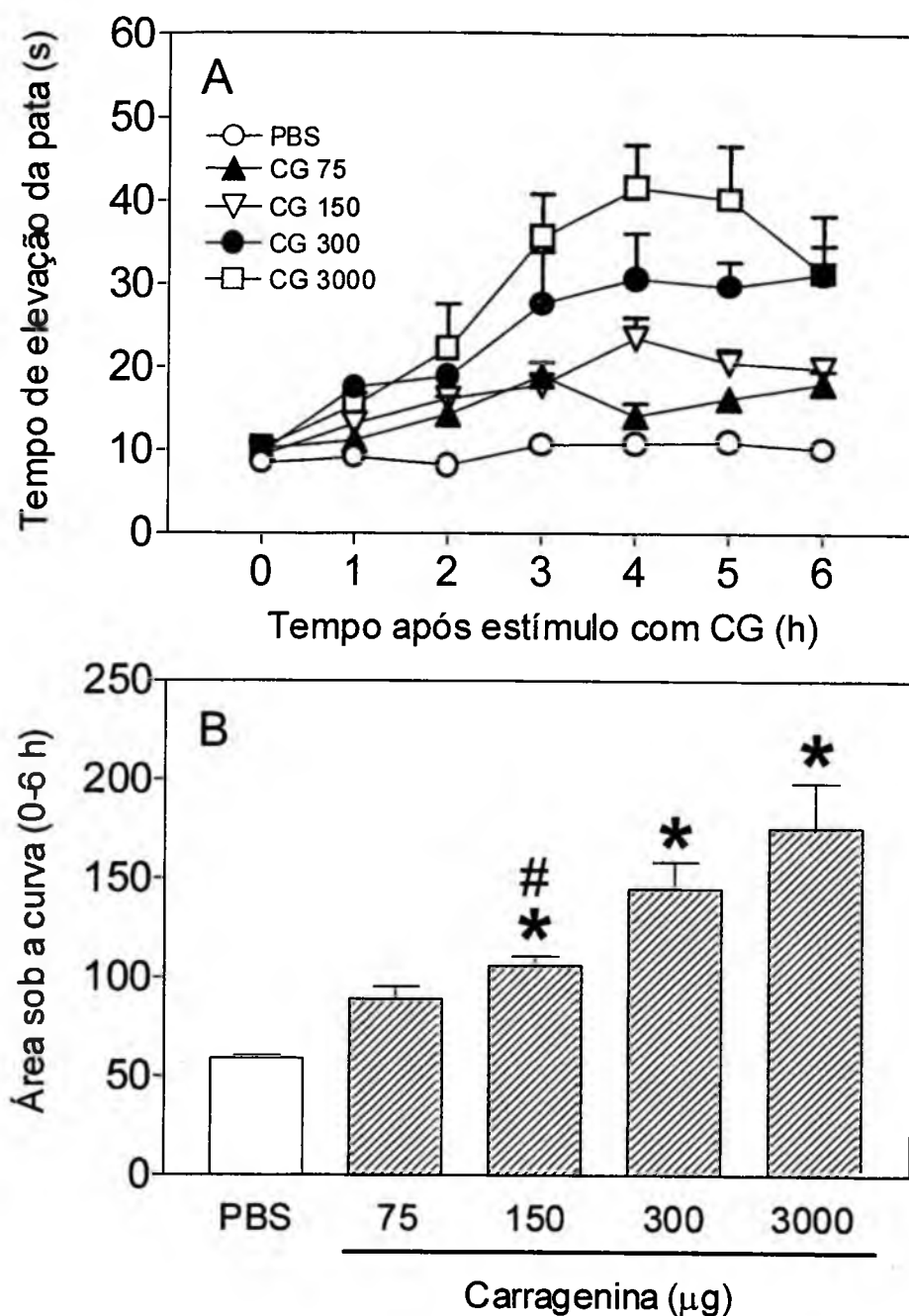


Figura 5: Efeitos nociceptivos da carragenina (CG) em articulações normais de rato. Os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou de carragenina, nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas (em unidades arbitrárias) a partir dos TEPs de cada grupo apresentados no Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) e a cerquilha (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor obtido é comparado ao respectivo valor controle (PBS) ou tratado com carragenina na dose de 3.000 μg , respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

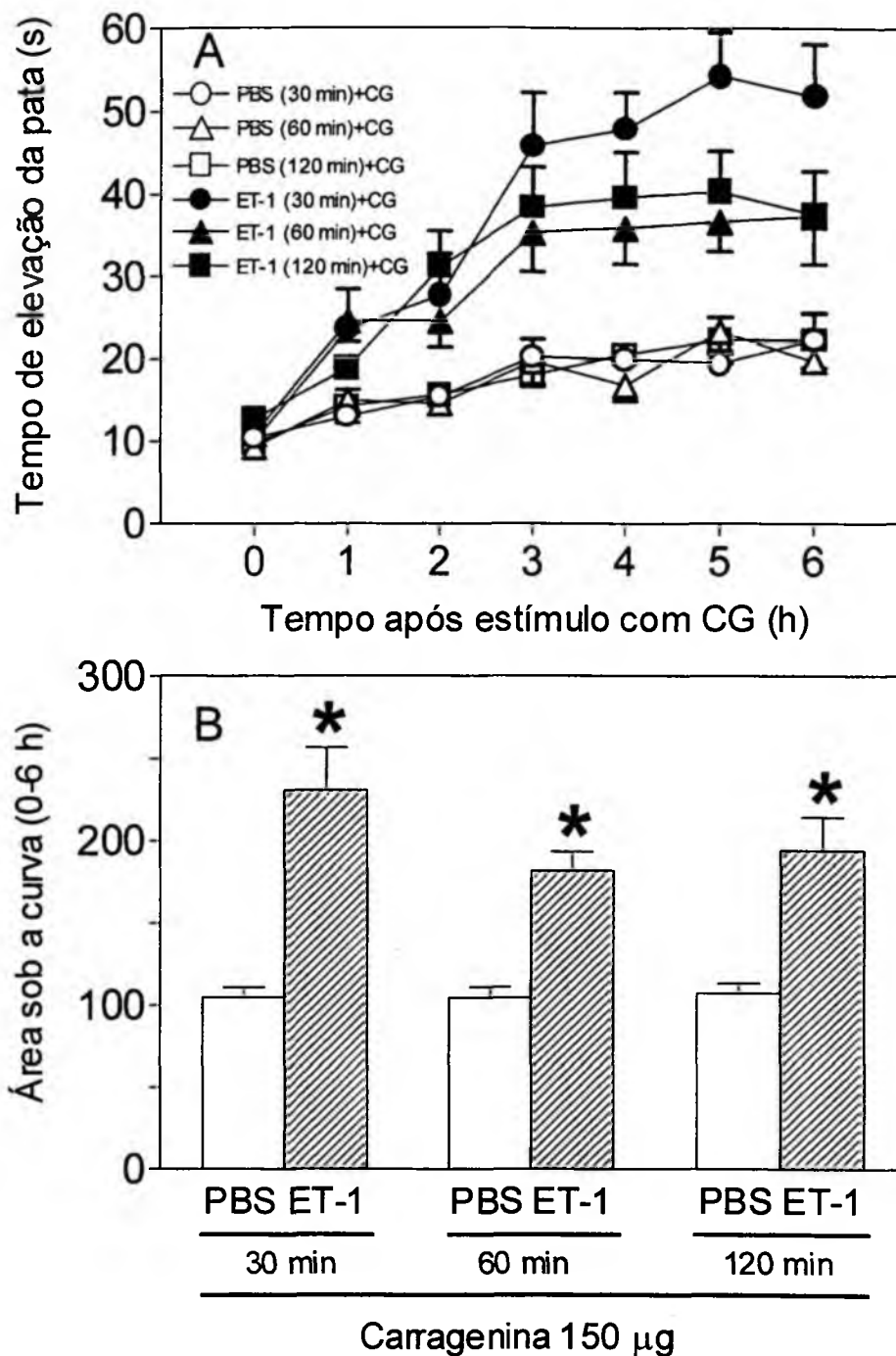


Figura 6: Influência da injeção *i.a.* prévia de endotelina-1 (ET-1; 30 pmol), em diferentes tempos, sobre o TEP induzido pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas (em unidades arbitrárias) a partir dos TEPs de cada grupo apresentados no Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor obtido é comparado ao correspondente valor controle (PBS; 30 min, 60 min, 120 min) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

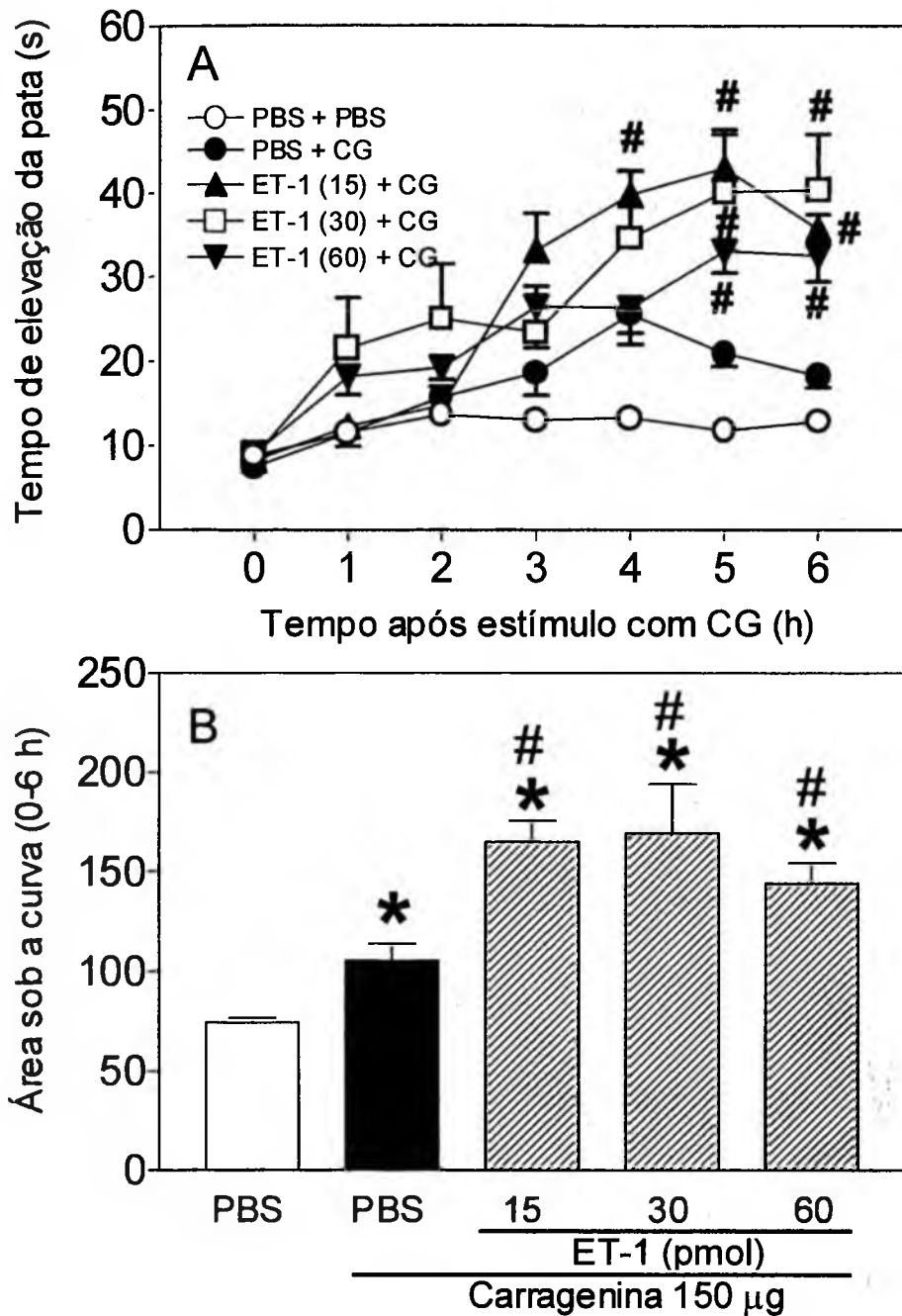


Figura 7: Influência da endotelina-1 (ET-1) sobre a nociceção inflamatória induzida pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato. Trinta minutos antes do estímulo com carragenina os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou ET-1 nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou tratado somente com CG, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

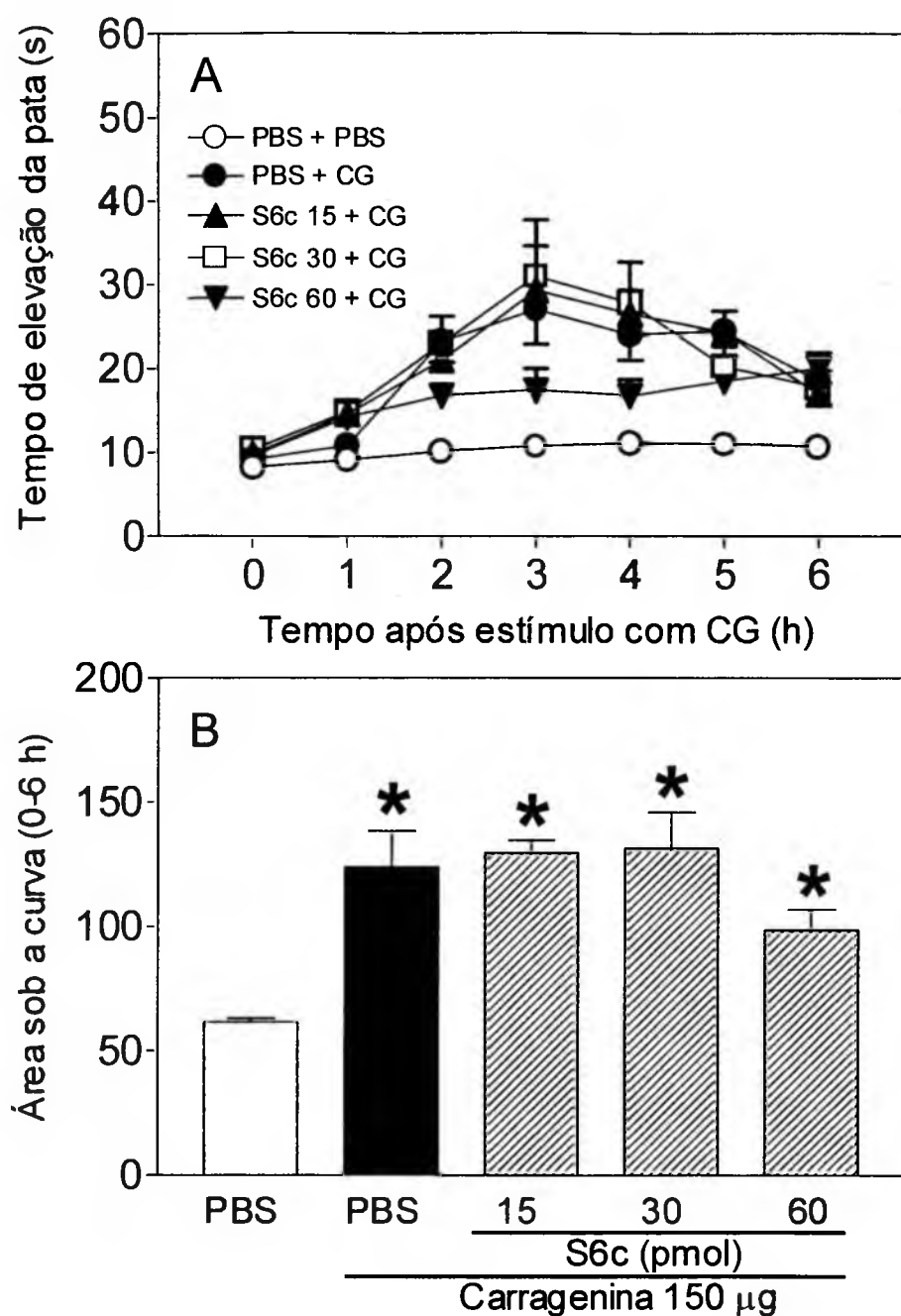


Figura 8: Influência da sarafotoxina S6c (S6c) sobre a nociceção inflamatória induzida pela injeção de carragenina (CG; 150 µg) em articulações normais de rato. Trinta minutos antes do estímulo com carragenina os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou S6c nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS). A sarafotoxina S6c, nas doses utilizadas, não alterou os TEPs induzidos pela CG nos animais testados ($P > 0,05$; ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3. Influência do tratamento local com endotelina-1 ou sarafotoxina S6c sobre a incapacitação articular induzida pelo LPS

A injeção *i.a.* de diferentes doses de LPS (1, 5, ou 10 µg) em articulações normais de ratos causou respostas nociceptivas que não diferiram entre si quanto à intensidade ou decurso temporal (Figura 9). Como a resposta induzida pela dose de 1 µg de LPS foi a mais consistente, esta foi escolhida para os experimentos subsequentes. A exemplo do que foi observado com relação à carragenina, doses não-nociceptivas de endotelina-1 (15, 30 ou 60 pmol; 30 min antes) também potencializaram a incapacitação articular induzida pelo LPS, aumentando significativamente tanto os valores do TEP quanto das ASCs calculadas de 0-6 h (de 109 ± 5 para 133 ± 7 e 141 ± 8 nas doses de 15 e 30 pmol, respectivamente; Figura 10). Diferentemente da endotelina-1, o agonista seletivo para receptores ET_B, a sarafotoxina S6c (15, 30 ou 60 pmol) não alterou a nocicepção induzida pelo LPS (1 µg) em articulações normais de rato (Figura 11).

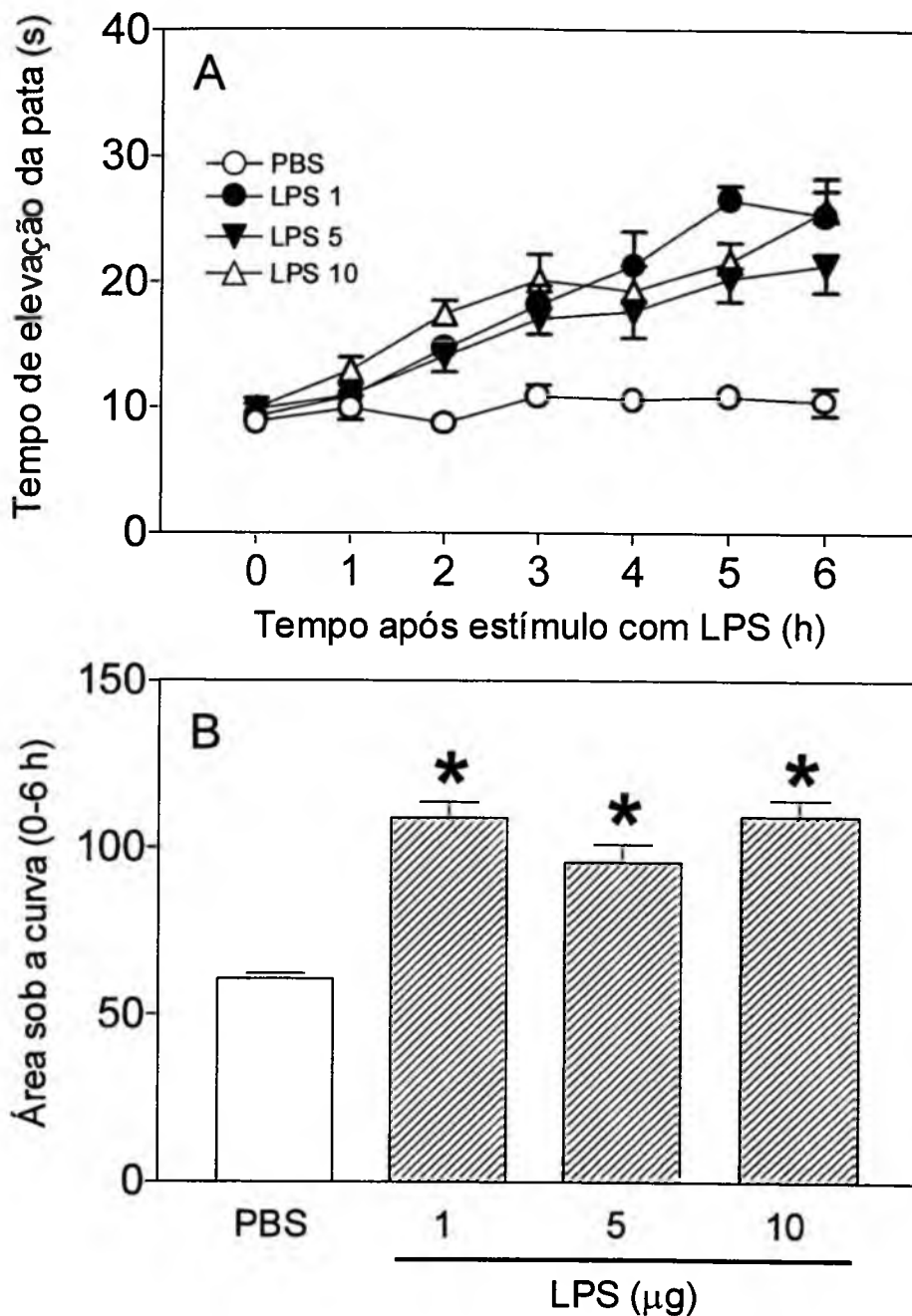


Figura 9: Efeitos nociceptivos do LPS em articulações normais de rato. Os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou de LPS, nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas (em unidades arbitrárias) a partir dos TEPs de cada grupo apresentados no Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor obtido é comparado ao respectivo valor controle (PBS) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

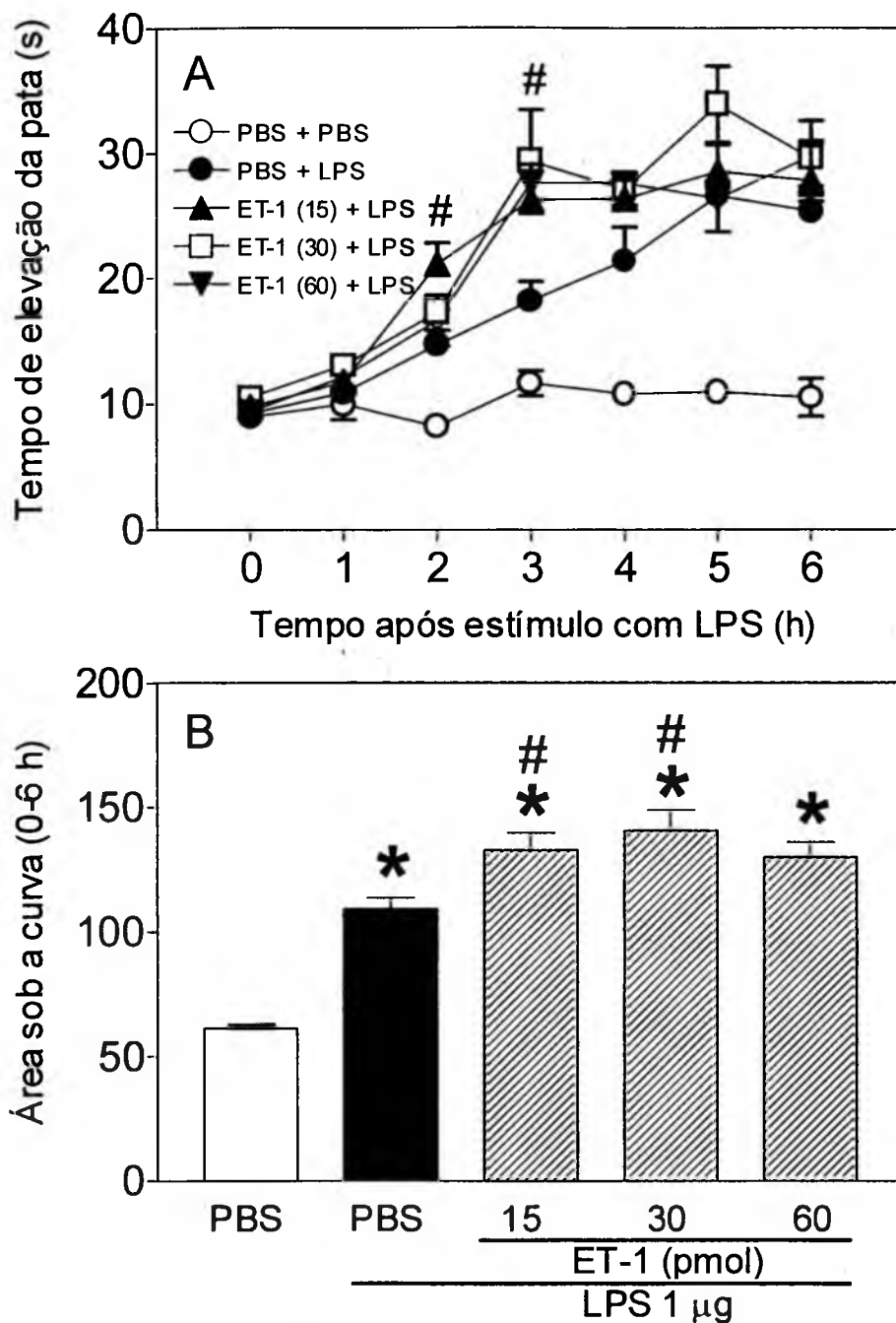


Figura 10: Influência da endotelina-1 (ET-1) sobre a nociceção inflamatória induzida pela injeção de LPS (1 μ g) em articulações normais de rato. Trinta minutos antes do estímulo com LPS os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou ET-1 nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou tratado somente com LPS, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

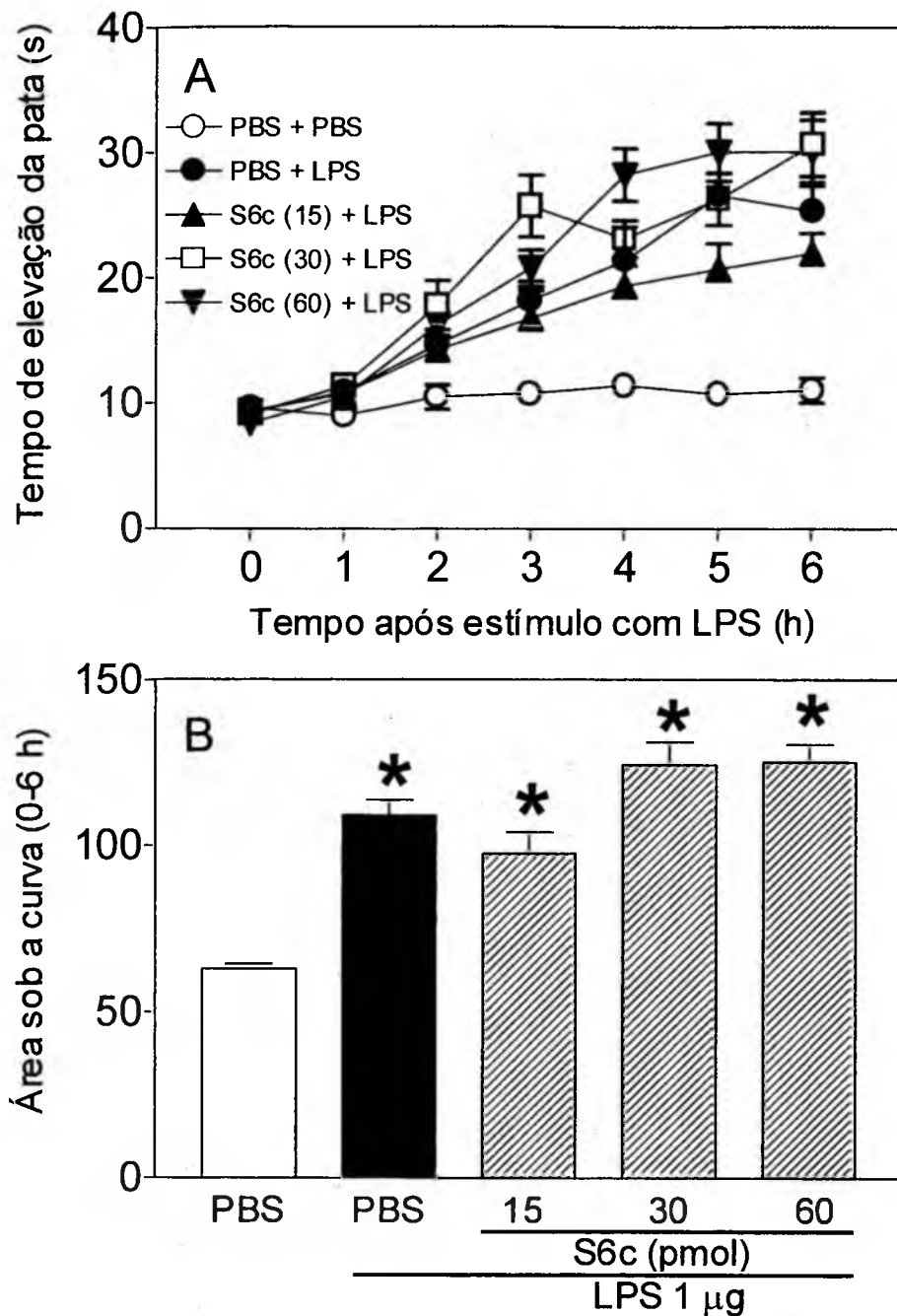


Figura 11: Influência da sarafotoxina S6c (S6c) sobre a nocicepção inflamatória induzida pela injeção de LPS (1 µg) em articulações normais de rato. Trinta minutos antes do estímulo com LPS os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou sarafotoxina S6c nas doses indicadas. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 6 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-6 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS). A sarafotoxina S6c, nas doses utilizadas, não alterou os TEPs induzidos pelo LPS nos animais testados ($P > 0,05$) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.4. Sensibilização articular nociceptiva induzida pela carragenina

Embora a resposta nociceptiva à carragenina (300 µg) houvesse desaparecido por completo 72 h após sua injeção *i.a.*, a injeção subsequente da própria carragenina (300 µg) ou do LPS (1 µg) nesse momento induziu respostas nociceptivas claramente maiores que as causadas em articulação normal (Figuras 12 e 13, respectivamente). Tal potencialização das ações da carragenina e do LPS caracterizou-se por desenvolvimento mais rápido, bem como por maior intensidade e duração das respostas nociceptivas a esses agentes. Em relação ao que se observou em articulações normais, as ASCs relativas aos TEPs no período 0-12 h de animais sensibilizados com carragenina e injetados 72 h após com o mesmo agente apresentaram-se potencializadas em cerca de 142% (Figuras 12-B). Quando a comparação foi feita entre a injeção de LPS em articulações normais ou sensibilizadas previamente com a carragenina a potencialização foi cerca de 82% (13-B). É importante salientar que injeções de PBS não alteraram o TEP basal (ou as ASCs 0-6 h e 0-12 h) em articulações normais, ou em articulações que receberam, 72 h antes, injeção de carragenina ou de PBS.

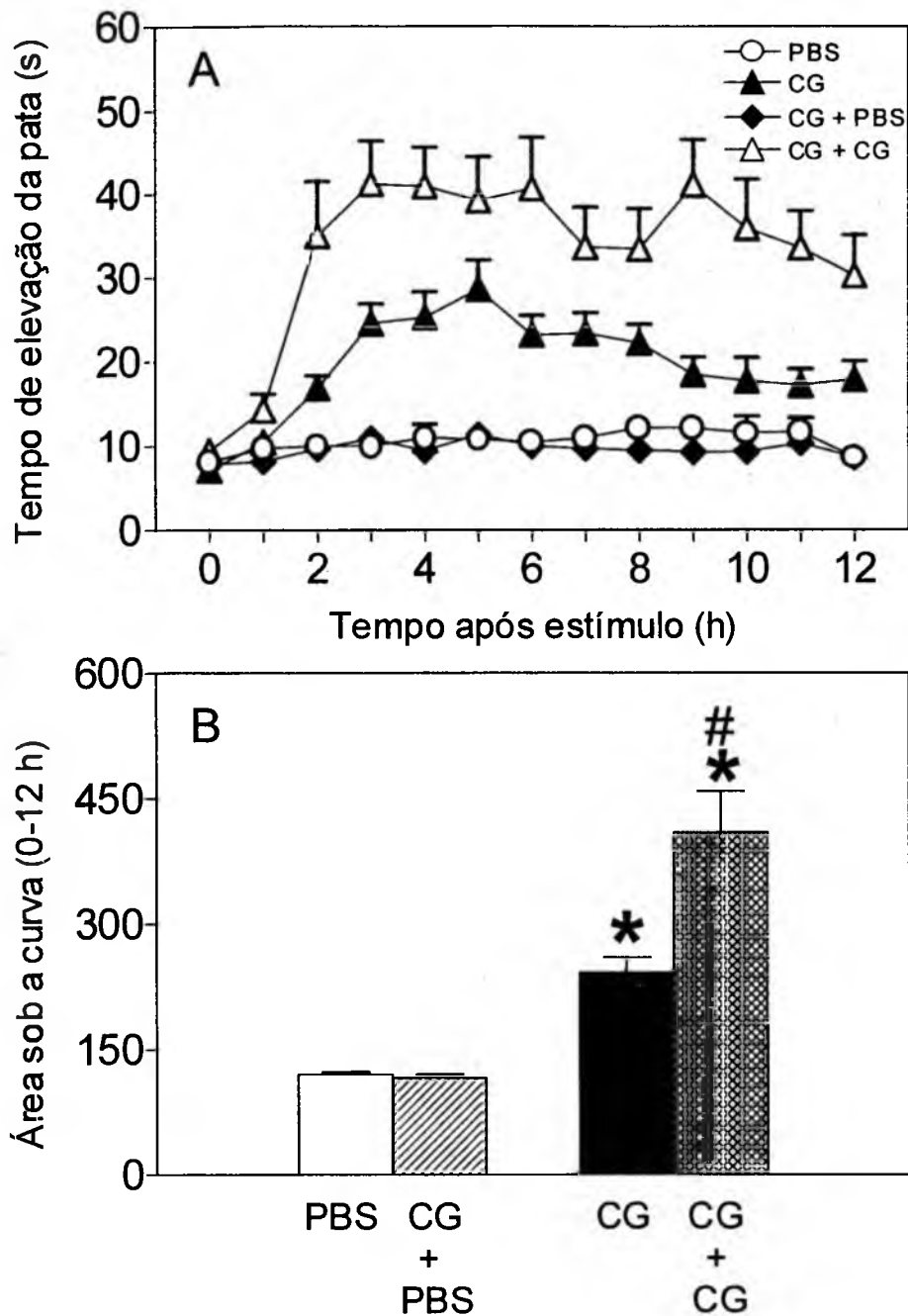


Figura 12: Comparação dos efeitos nociceptivos da carragenina (CG; 300 μ g) injetada em articulações normais ou sensibilizadas previamente (72 h) com a própria CG. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e a cerquilha (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou com o estímulo único de CG, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

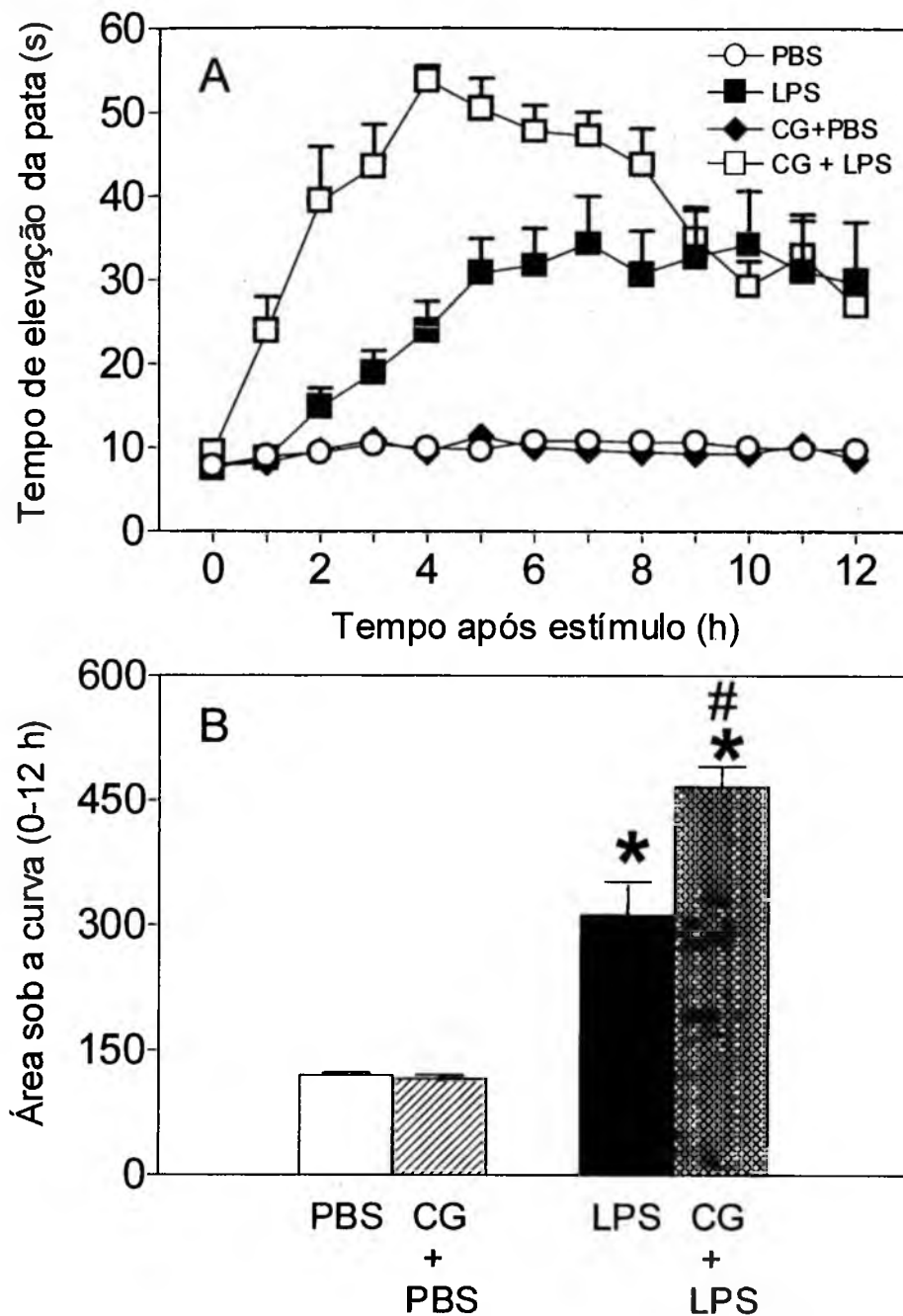


Figura 13: Comparação dos efeitos nociceptivos do LPS (1 µg), injetado em articulações normais ou sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 µg). **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e a cerquilha (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) ou com o estímulo único de LPS, respectivamente. (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.5. Influência do bosentan na nocicepção causada por carragenina ou LPS

O antagonista misto para receptores ET_A/ET_B , bosentan (3 ou 10 mg/kg, *i.v.*), não modificou o TEP de animais normais injetados com PBS (resultados não mostrados), carragenina (300 μ g; Figura 14) ou LPS (1 μ g; Figura 15). Também não modificou as respostas nociceptivas induzidas por carragenina em articulação sensibilizada previamente com esse agente (Figura 16). Ao contrário, quando as articulações sensibilizadas com carragenina receberam LPS, o bosentan induziu, claramente, uma redução pronunciada e duradoura das respostas nociceptivas. Este efeito antinociceptivo do bosentan foi dependente da dose e exibiu efeitos significantes na faixa de doses de 3 a 10 mg/kg, mas foi inefetivo nas doses de 1 ou 30 mg/kg (Figura 17).

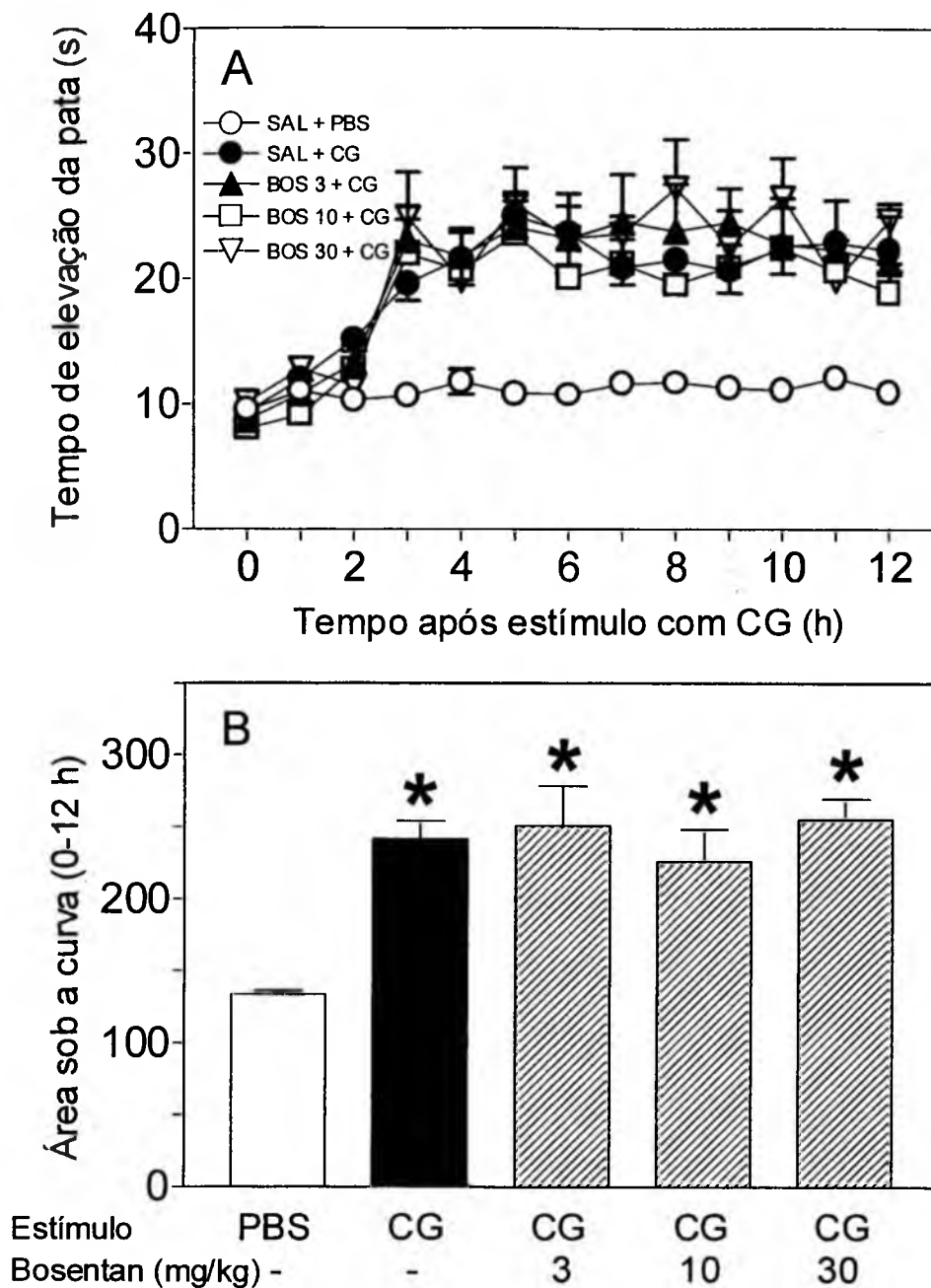


Figura 14: Influência do bosentan (BOS), um antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , sobre as respostas nociceptivas induzidas pela carragenina (CG; 300 μ g) em articulações normais de rato. Quinze minutos antes do estímulo com CG, os animais receberam injeção *i.v.* do veículo (salina) ou bosentan nas doses de 10 ou 30 mg/kg. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS). O bosentan, nas doses utilizadas, não alterou as respostas nociceptivas induzidas pela CG nos animais testados ($P > 0,05$) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

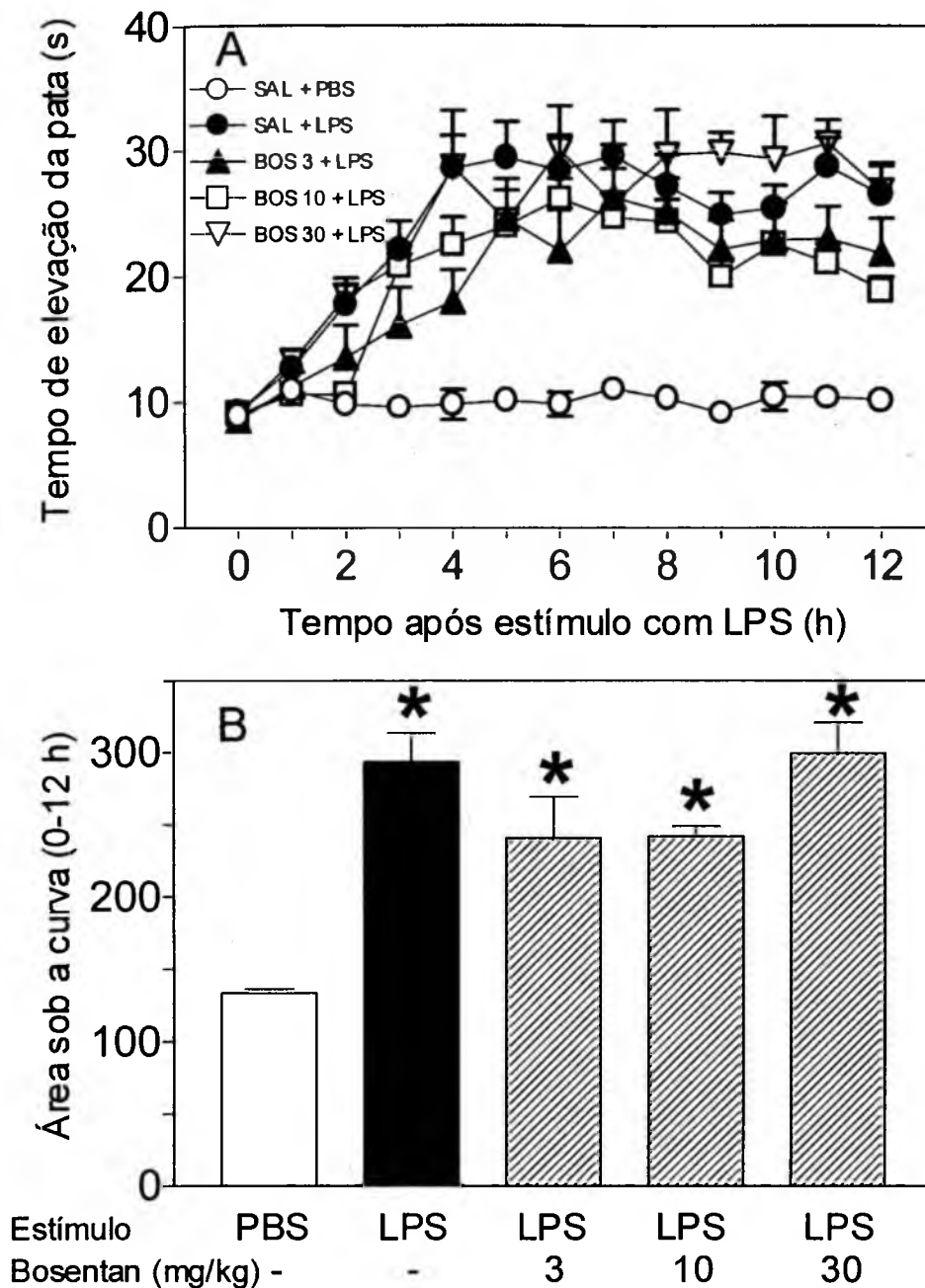


Figura 15: Influência do bosentan (BOS), um antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo LPS ($1 \mu\text{g}$) em articulações normais de rato. Quinze minutos antes do estímulo com LPS, os animais receberam injeção *i.v.* do veículo (salina) ou bosentan nas doses de 10 ou 30 mg/kg. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS). (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). O bosentan, nas doses utilizadas, não alterou as respostas nociceptivas induzidas pelo LPS nos animais testados ($P > 0,05$) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

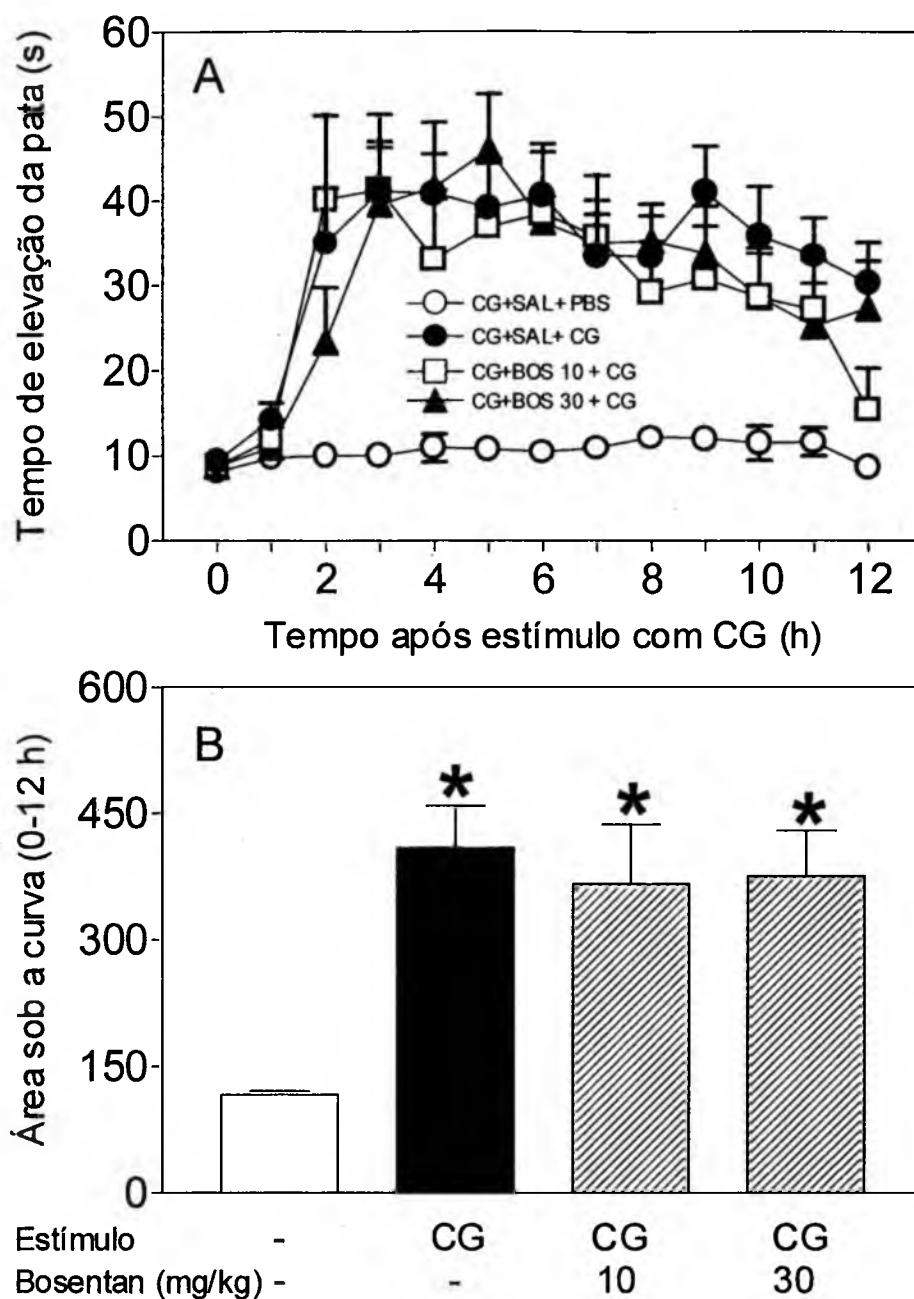


Figura 16: Influência do bosentan (BOS), um antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , sobre as respostas nociceptivas induzidas pela carragenina (CG; 300 μ g) em articulações previamente sensibilizadas (72 h) com a própria CG. Quinze minutos antes do segundo estímulo com CG, os animais receberam injeção i.v. do veículo (salina) ou bosentan nas doses de 10 ou 30 mg/kg. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de CG ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado ao valor correspondente obtido em animal controle (PBS) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

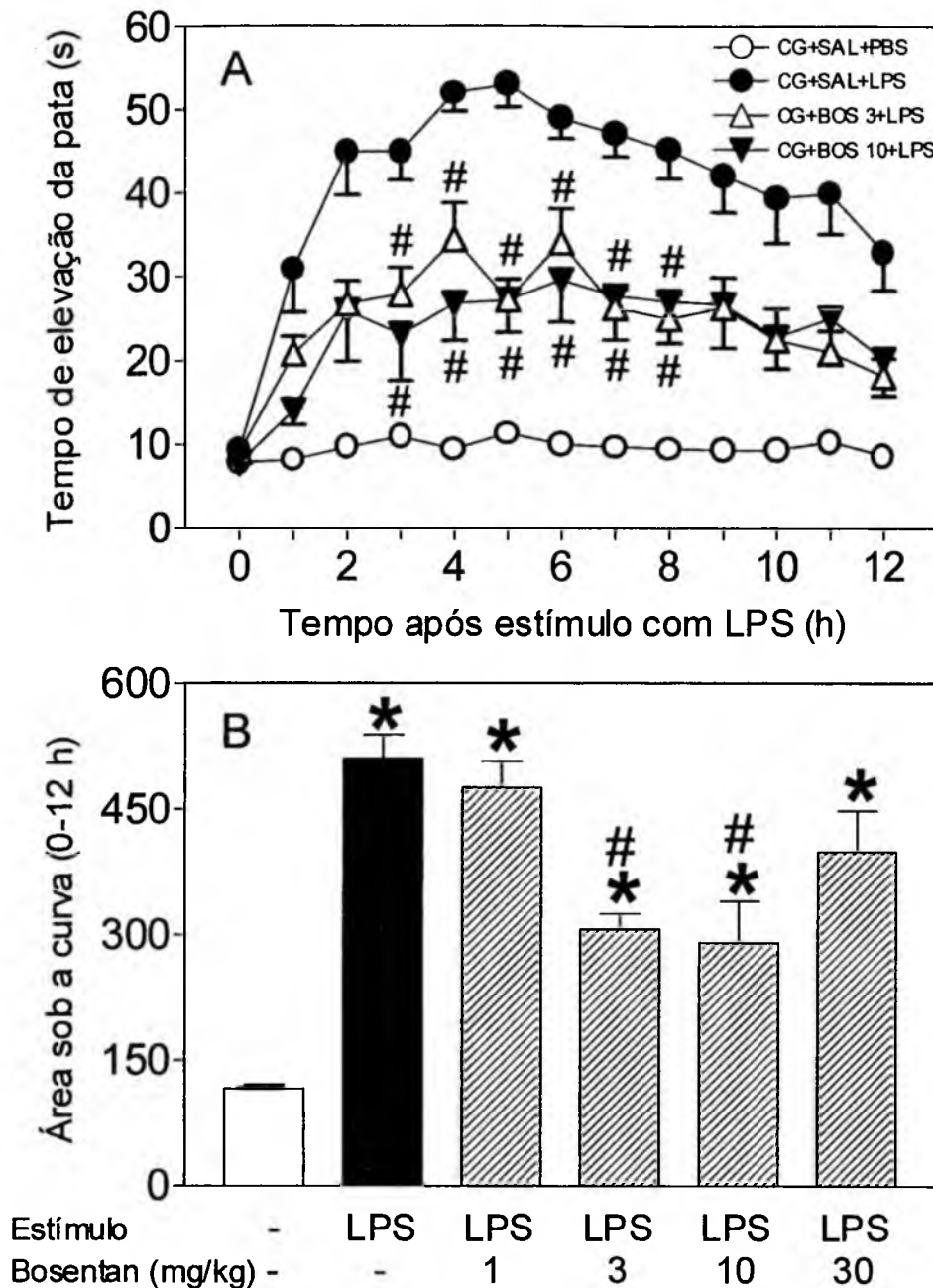


Figura 17: Influência do bosentan (BOS), um antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo LPS (1 μ g) em articulações previamente sensibilizadas (72 h) com carragenina (CG; 300 μ g). Quinze minutos antes do estímulo com LPS, os animais receberam injeção *i.v.* do veículo (salina) ou bosentan nas doses de 1, 3, 10 ou 30 mg/kg. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS) ou animais tratados com LPS, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.6. Influência do BQ-123 ou do BQ-788 na nocicepção causada por LPS em articulação sensibilizada por carragenina

O tratamento prévio com BQ-123 (10 ou 30 nmol, *i.a.*), um antagonista seletivo de receptores ET_A, não afetou significativamente a resposta nociceptiva pronunciada induzida pelo LPS (1 µg) em articulações sensibilizadas 72 h por carragenina (Figura 18). Porém, tratamento semelhante com BQ-788 (na dose de 10 nmol, mas não de 3 nmol), um antagonista seletivo de receptor de ET_B, notadamente atenuou as respostas nociceptivas (TEPs e ASC 0-12 h) ao LPS durante a quase totalidade do período de observação (Figura 19). O grau de inibição proporcionado pelo BQ-788 da nocicepção induzida pelo LPS (59% de redução da ASC 0-12 h; 10 nmol) na articulação sensibilizada previamente pela carragenina foi comparável àqueles acarretados por 3 ou 10 mg/kg de bosentan (52 e 56% de redução, respectivamente).

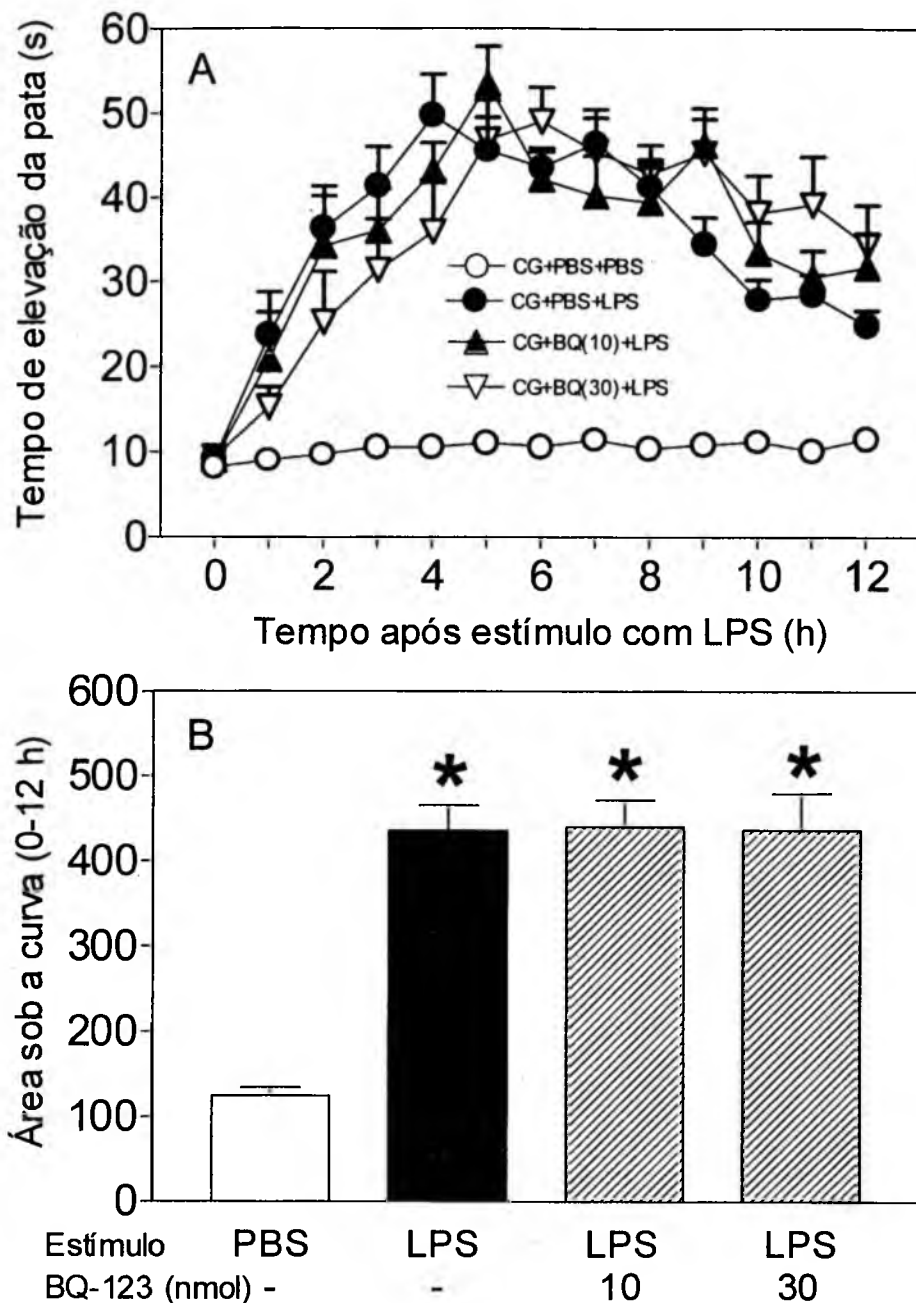


Figura 18: Influência do BQ-123, antagonista seletivo de receptores endotelinérgicos ET_A , sobre as respostas nociceptivas induzidas por injeção *i.a.* de LPS (1 μ g) em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 μ g). Quinze minutos antes do estímulo com LPS, os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou BQ-123 nas doses de 10 ou 30 nmol. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS). O BQ-123 não alterou o TEP induzido pelo LPS ($P > 0,05$) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

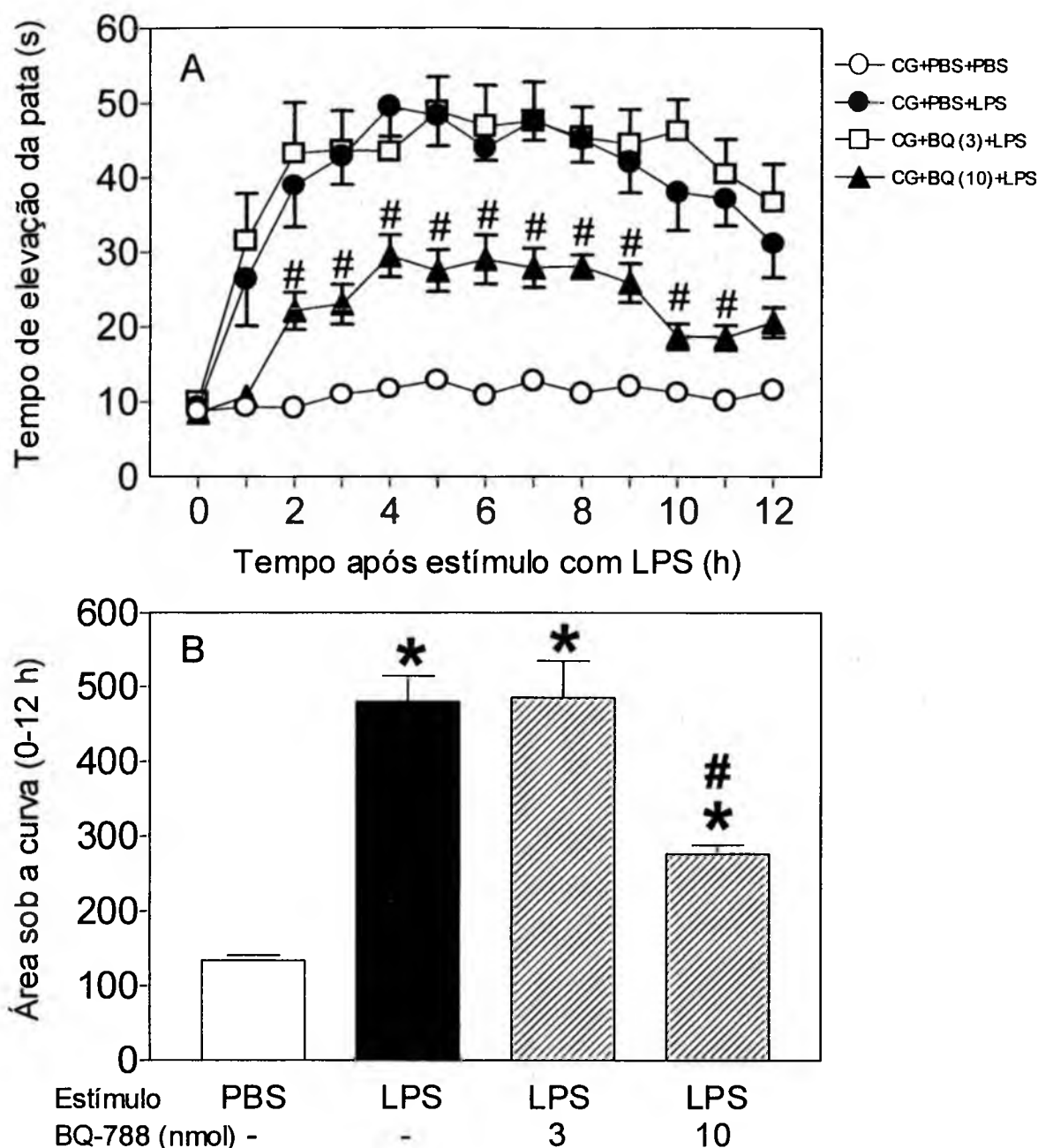


Figura 19: Influência do BQ-788, antagonista seletivo de receptores endotelinérgicos ET_B, sobre as respostas nociceptivas induzidas por injeção *i.a.* de LPS (1 µg) em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 µg). Quinze minutos antes do estímulo com LPS, os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS) ou BQ-788 nas doses de 3 ou 10 nmol. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de LPS ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS) ou animais tratados com LPS (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7. Efeitos nociceptivos da endotelina-1 ou da sarafotoxina S6c em articulações sensibilizadas com carragenina

Como observado anteriormente (Figuras 1 e 2) baixas doses tanto de endotelina-1 como de sarafotoxina S6c (15 a 60 pmol), um agonista seletivo de receptores ET_B, falharam em alterar os valores do TEP em articulações normais. No entanto, ambos os peptídeos induziram respostas nociceptivas significantes quando injetados nessas doses em articulações sensibilizadas 72 h antes com carragenina (300 µg). As respostas nociceptivas à endotelina-1 (Figura 20) ou à sarafotoxina S6c (Figura 21) exibiram início rápido, com picos ocorrendo 1 ou 2 h após a injeção e duração de até 7-10 h. Ambos peptídeos originaram ASCs 0-12 h em forma de sino, dependentes da dose, com valores máximos obtidos com a dose de 30 pmol. Além disso, como ilustra a Figura 22, os efeitos nociceptivos da endotelina-1 (30 pmol) na articulação sensibilizada previamente com carragenina foram reduzidos significativamente, pelo tratamento prévio (15 min) com BQ-123 ou com BQ-788.

4.8. Efeitos anti-nociceptivos dos antagonistas endotelinérgicos testados

Um resumo dos efeitos do bosentan, BQ-123 e BQ-788 sobre a nocicepção induzida por carragenina, LPS ou endotelina-1 na articulação normal ou sensibilizada com carragenina 72 h antes é apresentada na Tabela 1

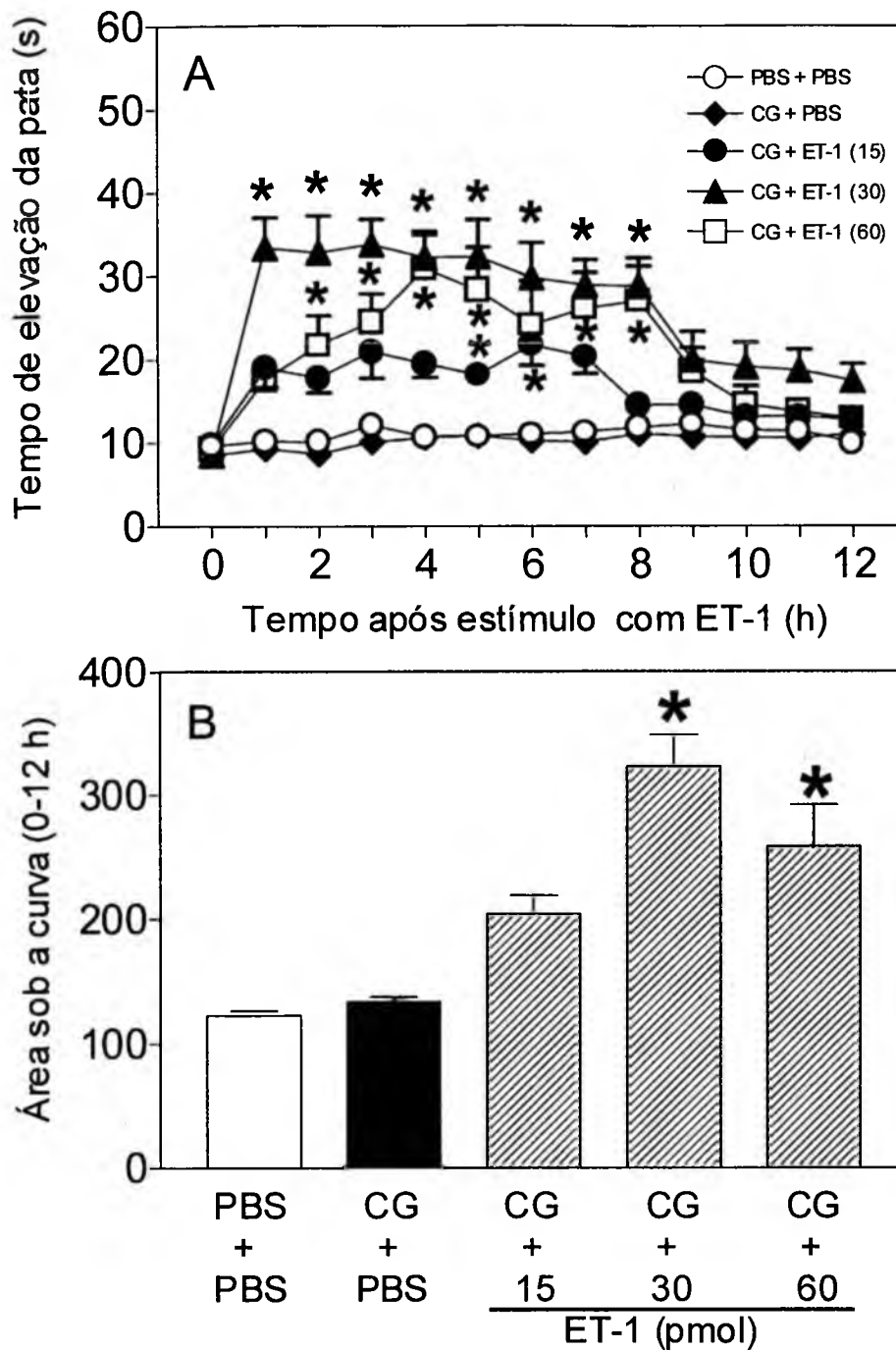


Figura 20: Influência da injeção de endotelina-1 (ET-1) em articulações de rato sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 μ g) ou PBS. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de ET-1 ou PBS. **Painel B:** Representa as ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do painel A. Os valores representam a média \pm E.P.M. 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

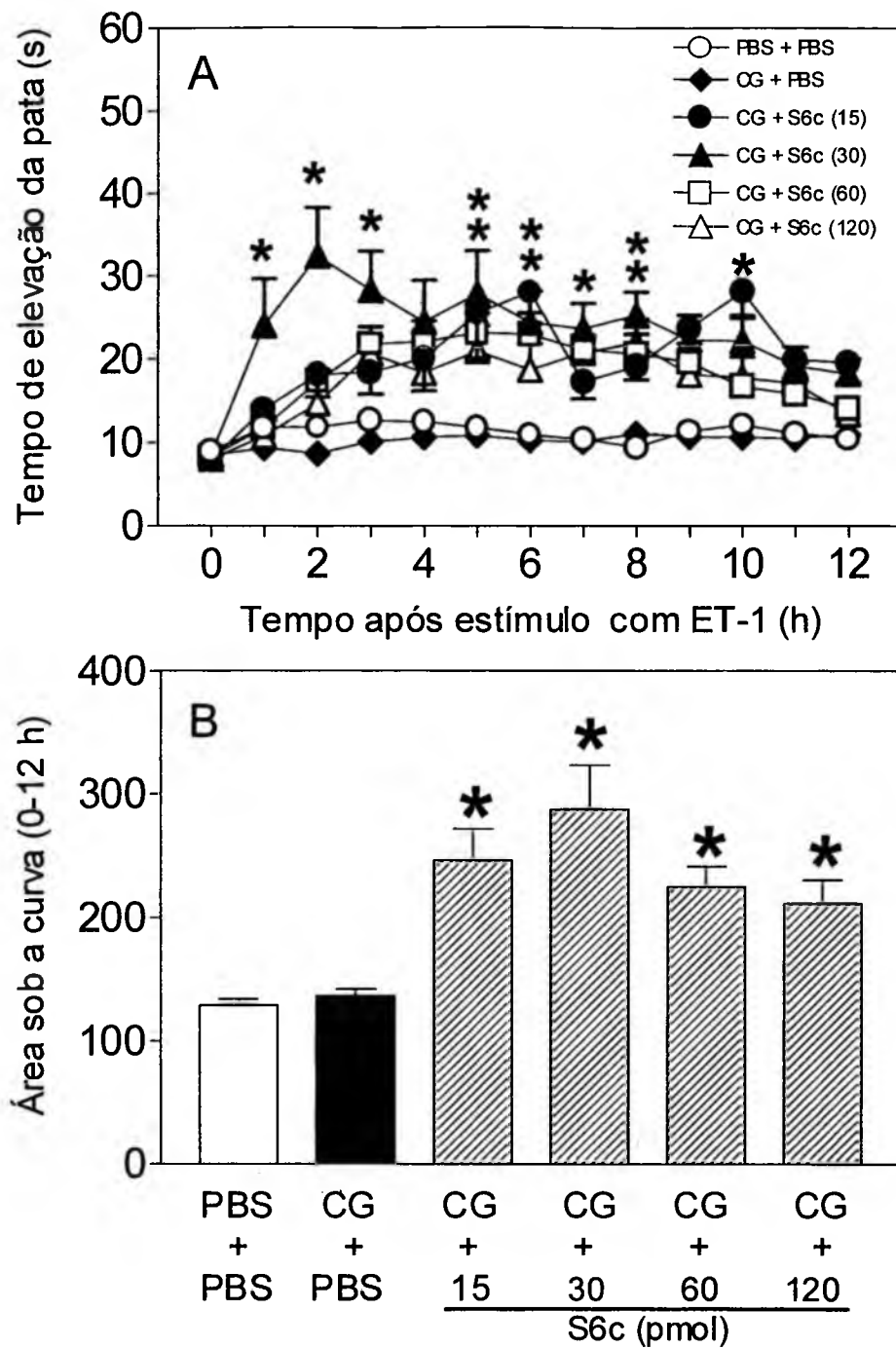


Figura 21: Efeitos da injeção de sarafotoxina S6c (S6c) em articulações de rato sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 µg) ou PBS. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de S6c ou PBS. **Painel B:** Representa as ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do painel A. Os valores representam a média ± E.P.M. 6-10 animais por grupo. Asteriscos (*) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

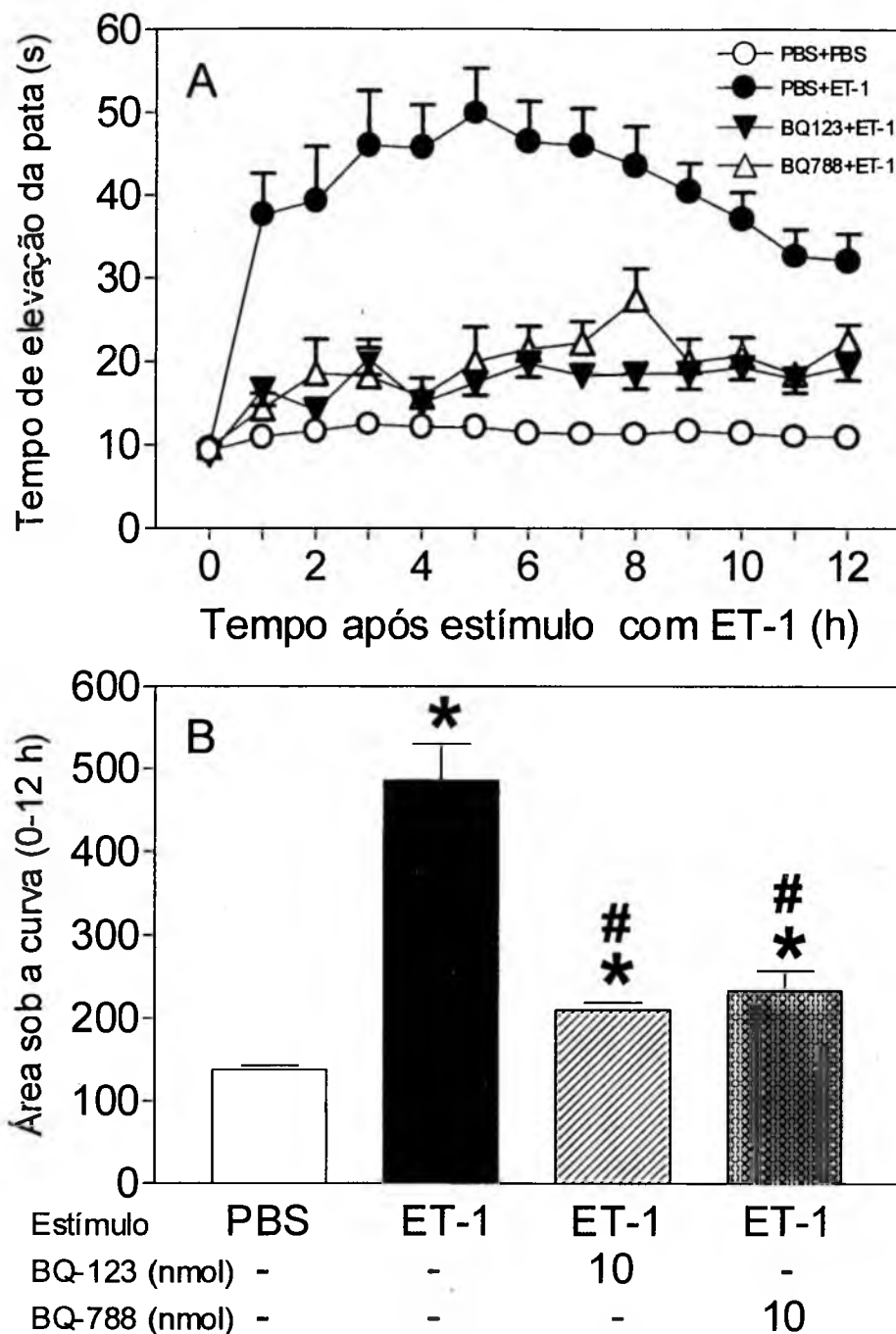


Figura 22: Influência do BQ-123 ou BQ-788 (10 nmol), antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B , respectivamente, sobre as respostas nociceptivas induzidas pela endotelina-1 (ET-1; 30 pmol) em articulações sensibilizadas previamente (72 h) com carragenina (CG; 300 μ g) ou PBS. Quinze minutos antes do estímulo com ET-1, os animais receberam injeção *i.a.* do veículo (PBS), BQ-123 ou BQ-788. **Painel A:** Valores dos TEPs avaliados a cada hora até 12 h após a injeção de ET-1 ou PBS. **Painel B:** Valores das ASCs 0-12 h calculadas a partir dos resultados do Painel A. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por grupo. Os asteriscos (*) e as cerquilhas (#) denotam $P \leq 0,05$ quando cada valor é comparado com o valor correspondente obtido com o controle (PBS) ou animais tratados com ET-1 (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

Tabela 1: Respostas antinociceptivas de antagonistas de receptores endotelinérgicos, sobre diferentes agentes nociceptivos no modelo da incapacitação articular de rato

CONDIÇÃO	AGENTE NOCICEPTIVO (dose)	ANTAGONISTA		
		BOSENTAN (anti-ET _A /ET _B)	BQ-123 (anti-ET _A)	BQ-788 (anti-ET _B)
Articulação normal	Carragenina (300 µg)	-	N.T.	N.T.
	LPS (1 µg)	-	N.T.	N.T.
	Endotelina-1 (120 pmol)	+	+	-
72 h após sensibilização com Carragenina 300 µg	Carragenina (300 µg)	-	N.T.	N.T.
	LPS (1 µg)	+	-	+
	Endotelina-1 (30 pmol)	+	+	+

(-) = Inativo

(+) = Inibição Significativa

(N.T.) = Não Testado

5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram que a endotelina-1 exibe propriedades nociceptivas na articulação de joelho de rato, bem como sugerem fortemente uma possível participação de endotelinas endógenas no aumento da nocicepção associada a determinadas condições inflamatórias articulares. A endotelina-1 produz, em doses elevadas (acima de 120 pmol), um efeito nociceptivo próprio quando administrada na articulação de joelho de rato. Talvez mais importante ainda é o fato de que a endotelina-1 também é capaz de potencializar a nocicepção inflamatória articular aguda induzida pela carragenina ou LPS em doses que, sozinhas, não evocam comportamento nociceptivo. Em contraste, a sarafotoxina S6c, um agonista seletivo de receptores ET_B, foi completamente inativa até a dose de 240 pmol, tanto em produzir nocicepção quanto hiperalgisia nos dois modelos testados. Por si só, estas primeiras evidências já sugerem que os efeitos nociceptivos e hiperalgésicos da endotelina-1 em articulações normais de ratos parecem ser mediados por receptores endotelinérgicos do tipo ET_A. Esta hipótese é corroborada, consideravelmente, pelo fato de que o tratamento prévio com injeção *i.v.* do antagonista não-peptídico misto de receptores ET_A/ET_B bosentan (CLOZEL et al., 1994), ou injeção *i.a.* do antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 (IHARA et al., 1992), são capazes de prevenir os

efeitos nociceptivos induzidos pela endotelina-1 (120 pmol), enquanto o tratamento semelhante com o BQ-788, um antagonista seletivo de receptores ET_B (ISHIKAWA et al., 1994), é inefetivo. Os efeitos hiperalgésicos da endotelina-1 detectados no presente estudo corroboram relatos anteriores nos quais a endotelina-1 também promoveu, em diferentes modelos experimentais, efeitos hiperalgésicos periféricos. Nesse sentido, já foi demonstrado que a endotelina-1 potencializa respostas evocadas por estimulação mecânica no antebraço do homem ou na pata de rato, causa contorções abdominais e aumenta a reatividade à formalina em camundongos (FERREIRA et al., 1989; PIOVEZAN et al., 1997), e sensibiliza a articulação fêmuro-tibial de cão para a incapacitação induzida por prostaglandina E₂ (FERREIRA et al., 1989). É interessante notar que ao ativar receptores ET_A, as endotelinas podem estimular a síntese de prostaglandina E₂ em osteoblastos, por mecanismo dependente da proteína tirosina quinase C (LEIS et al., 1998). Além disso, PIOVEZAN et al. (1998), também demonstraram que só os receptores de ET_A parecem mediar os efeitos hiperalgésicos da endotelina-1 no modelo da nocicepção induzida pela capsaicina na pata de camundongos. Quanto aos efeitos nociceptivos atribuídos à endotelina-1, nossa visão difere um pouco de estudos realizados utilizando o modelo das contorções abdominais em camundongos, pois RAFFA et al. (1996) sugeriram que tanto os receptores ET_A como ET_B estariam envolvidos nas

ações nociceptivas das endotelinas exógenas. Talvez tais diferenças estejam relacionadas a variações inter-espécie e/ou dos modelos de nocicepção considerados.

Além das evidências descritas anteriormente, que apontam para uma participação importante da endotelina-1 na nocicepção ou hiperalgisia articular, há relatos de que a administração intraplantar de substâncias nociceptivas como a carragenina aumenta os níveis locais de endotelina (BERTELLI et al., 1992), e que o LPS é um potente estímulo para produção e secreção do peptídeo *in vitro* e *in vivo* (SUGIURA et al., 1989; EHRENREICH et al., 1990; VEMULAPALLI et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1997). Contudo, o bosentan, um antagonista misto para receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , foi ineficaz em modificar as respostas nociceptivas induzidas pela carragenina ou LPS em articulações normais. Logo, a ativação do sistema endotelinérgico claramente não é um requisito essencial para a manifestação de todas as formas de nocicepção articular. Esta falta de efeitos do bosentan contra a nocicepção induzida pela carragenina ou LPS pode indicar que, normalmente, os tipos de células responsáveis pela produção de endotelinas podem estar ausentes da articulação ou as produzem em quantidades insuficientes para evocar nocicepção e/ou hiperalgisia.

A sensibilização prévia (72 h) da articulação com injeção *i.a.* de carragenina, que claramente aumenta de modo pronunciado as respostas

nociceptivas a si própria e ao LPS, pode constituir um modelo experimental mais interessante e pertinente de artrite do que aqueles que envolvem a estimulação inflamatória de articulações normais, pois sabe-se que a recorrência é uma característica comum de várias doenças artríticas (GUERNE e WEISMAN, 1992; KEEFE e VAN HORN, 1993). Além disso, a comprovação da exacerbação da artrite em ratos, induzida por agentes inflamatórios como a IL-1 ou LPS em articulações estimuladas previamente com polissacarídeo bacteriano (STIMPSON et al., 1987; 1988), bem como da presença importante do LPS nas articulações de pacientes com artrite reativa (GRANFORS et al., 1989; 1990; 1992; KEAT et al., 1987; SARTOR 1989;1997), reforçam essa nossa sugestão.

A diferença entre as respostas nociceptivas evocadas por estimulação de articulações normais ou previamente sensibilizadas com carragenina foi mais notável com o LPS do que com a carragenina. Possivelmente, isso se deva à redução marcante no período de latência para a obtenção do pico da resposta nociceptiva evocada pelo LPS em articulação previamente sensibilizada. Talvez a menor latência do LPS na indução da incapacitação, quando comparada à carragenina, possa se dever ao fato de que o LPS poderia transpor algumas etapas na liberação dos mediadores, ao induzir a formação de cininas (ROTHCHILD E GASCON, 1966) e estimular diretamente macrófagos a produzir citocinas hiperalgênicas como o TNF α e IL-1 β

(CUNHA et al., 1991), por meio dos receptores de superfície CR3, LFA-1 e p150,95 (UNKELESS e WIRTH, 1988).

No caso das articulações previamente sensibilizadas com carragenina, acredita-se que os macrófagos acumulam-se na articulação desde o primeiro estímulo inflamatório, permanecendo viáveis por muitos dias (VAN LENT et al., 1992). Portanto, é provável que o segundo estímulo encontre a população de macrófagos que haviam migrado em resposta ao primeiro estímulo ainda ativado, ou ainda que novas células possam ter migrado para a articulação durante este intervalo de tempo. Os macrófagos, as células mesenquimais sinoviais e os condrócitos articulares são os principais tipos de células ativadas pelo LPS e IL-1 após injeção intra-articular (SHIRAIISHI et al., 1997).

O LPS pode formar complexos com a proteína ligante de LPS presente no fluido sinovial, que por sua vez, liga-se aos sítios para CD14 da membrana de monócitos e macrófagos, levando à sua ativação (ULEVITCH e TOBIAS, 1994). A presença da proteína ligante de LPS resulta numa produção de citocinas, particularmente de TNF α e IL-6 (HEUMANN et al., 1992; HEUMANN et al., 1995), que é muito mais rápida e expressiva do que aquela estimulada pelo próprio LPS (SCHUMANN et al., 1990).

O LPS e a IL-1 β são potentes estímulos à liberação de endotelina-1 de células endoteliais (SUGIURA et al., 1989; YOSHIZUMI, et al., 1990). Por

sua vez, o TNF α pode aumentar a produção e/ou liberação de endotelina-1 tanto *in vivo*, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica induzida pelo LPS em ratos (HOHLFELD, 1995), como *in vitro*, em macrófagos (RUETTEN e THIEMERMANN, 1997) ou células endoteliais aórticas, arterias renais e capilares glomerulares bovinos (MARSDEN e BRENNER, 1992). Estes últimos autores demonstraram ainda que o TNF α efetivamente aumenta a transcrição do gene da endotelina-1. O TNF α também induz incapacitação articular dependente da síntese de leucotrienos no rato (TONUSSI, 1996).

Por outro lado, há várias evidências de que a endotelina-1 é um estímulo efetivo para a produção de TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, peptídeo quimiotático de monócitos-1 e fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos em cultura de macrófagos/monócitos humanos (HURIBAL et al., 1992; CUNNINGHAM et al., 1993; HELSET et al., 1993), IL-6 de monócitos humanos (McMILLEN, 1995), células da medula óssea (AGUI et al., 1994) ou células endoteliais de rato (XIN et al., 1995), bem como de TNF α , IL-1 e IL-6 de células endoteliais humanas (STANKOVA, et al., 1996). Juntos, estes dados apontam para uma potencial participação das endotelinas no desenvolvimento de processos inflamatórios. Certamente, novos estudos serão ainda necessários para esclarecer se e como as citocinas e endotelinas interagem na mediação de nocicepção inflamatória articular.

Outro dado interessante observado em nosso estudo diz respeito à capacidade do bosentan, um antagonista misto para receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , inibir, de forma prolongada e dependente da dose, as respostas nociceptivas induzidas pelo LPS em articulação de joelho de rato sensibilizadas 72 h antes com carragenina. Esse resultado parece refletir um verdadeiro efeito antinociceptivo do bosentan, porque a droga não modificou os valores do tempo de elevação da pata em ratos controle. Além disso, este efeito antinociceptivo do bosentan foi mimetizado pelo tratamento prévio da articulação com um antagonista seletivo de receptores ET_B (BQ-788), mas não de receptores de ET_A (BQ-123). Logo, as endotelinas endógenas, que não parecem exercer qualquer papel na nocicepção estimulada em articulações normais, parecem participar como determinantes importantes da nocicepção induzida pelo LPS em articulações sensibilizadas previamente com carragenina, através da ativação de receptores endotelinérgicos ET_B presentes na própria articulação. Colocando-se de outra forma, a sensibilização prévia da articulação com carragenina promove uma nítida mudança no padrão de células e/ou mediadores envolvidos nas respostas nociceptivas induzidas pelo LPS, ao incluir as endotelinas nesse processo.

Apesar disso, não há até o presente evidências da participação das endotelinas endógenas na mediação da dor associada a estados fisiopatológicos, pois há poucos estudos que analisaram este aspecto. Embora

o bosentan iniba a resposta neurogênica em vasos da dura mater de rato (BRÄNDLI et al., 1996), o antagonista não parece atenuar crises de enxaqueca no homem (MAY et al., 1996). Assim sendo, os achados deste trabalho constituem o primeiro registro de ações nociceptivas de endotelinas endógenas, visto que o trabalho de MAY et al. (1996), demonstrou apenas um efeito reflexo de ação vascular.

Outro aspecto interessante a ser comentado é o fato do estímulo prévio com carragenina também ter induzido sensibilização pronunciada da articulação tanto às ações nociceptivas da endotelina-1 como da sarafotoxina S6c. Nesta condição, doses normalmente ineficazes de cada um dos peptídeos evocam respostas nociceptivas significativas. Embora as potências nociceptivas da endotelina-1 e da sarafotoxina S6c sejam semelhantes, a primeira parece causar uma resposta nociceptiva máxima discretamente maior. Por um lado, esses achados indicam que a sensibilização com carragenina induz o surgimento de receptores endotelinérgicos ET_B na articulação, o que é confirmado pelo fato do BQ-788 ter antagonizado parcialmente o efeito nociceptivo da endotelina-1 nesta condição. Porém, como o BQ-123 também bloqueou parte da resposta nociceptiva à endotelina-1, a sensibilização prévia da articulação com carragenina parece alterar a população de receptores endotelinérgicos nociceptivos, que na articulação normal são predominantemente do tipo ET_A, para um padrão misto de

receptores ET_A e ET_B.

Tal constatação levanta uma questão intrigante. Afinal, qual seria a isoforma ou isoformas de endotelinas que estariam envolvidas na nocicepção induzida por LPS em articulações sensibilizadas com carragenina? Esta resposta nociceptiva ao LPS foi suscetível à inibição pelo BQ-788 mas não pelo BQ-123. Por outro lado, a endotelina-3 é a única isoforma identificada em mamíferos que exhibe alta afinidade por receptores endotelinérgicos ET_B, mas baixa afinidade para receptores ET_A (30-100 vezes menores do que para endotelina-1 ou endotelina-2; para revisão ver MASAKI et al., 1994). Assim sendo, nossos resultados funcionais sugerem que a endotelina-3 seja a isoforma com maiores chances de ser o mediador endotelinérgico nociceptivo nessa condição.

Pelo menos dois tipos de células poderiam ser possíveis fontes de endotelina-3 na articulação. O primeiro são os macrófagos que, em cultura primária, podem gerar quantias apreciáveis de endotelina-3 (EHRENREICH et al., 1990; KOBAYASHI et al., 1997) e são encontrados em número drasticamente aumentado nas superfícies sinoviais durante a artrite reumática (CUTOLO et al., 1993) ou depois da aplicação de estímulos inflamatórios em modelos experimentais de artrite (VAN LENT et al., 1995). O segundo tipo de célula são os neurônios pós-ganglionares simpáticos, que podem expressar quantidades consideráveis tanto de endotelina-3 como de endotelina-1

(Damon, 1998), liberar endotelina-3 rapidamente na circulação durante o exercício (MAEDA et al., 1997) e desempenham importante papel na nocicepção, extravasamento plasmático sinovial e dano articular em condições artríticas (LEVINE et al., 1986a,b; para revisão ver FITZGERALD, 1989; BASBAUM e LEVINE, 1991).

Ainda assim, há diversas evidências contrárias a quaisquer uma dessas possibilidades. A endotelina-1 tem sido, até agora, a única isoforma encontrada em ou produzida por tecidos articulares (ver Introdução para referências), e não há nenhum relato sobre sua expressão específica por macrófagos ou nervos sinoviais. Macrófagos humanos não-articulares secretam todas as 3 isoformas de endotelinas (KOBAYASHI et al., 1997), e a exposição de tais células ao LPS ou ao éster de forbol aumenta a produção de endotelina-1 6-10 vezes, sem que haja alteração na da endotelina-3 (EHRENREICH et al., 1990). Além disso, foi demonstrado que células cromafins adrenomedulares simpáticas expressam big-endotelina-3 (DAVENPORT et al., 1996), mas não há qualquer demonstração específica de que neurônios simpáticos possam efetivamente produzir endotelina-3, embora neurônios parassimpáticos o possam (SHINKAI-GOROMARU et al., 1997). As dificuldades na investigação das funções fisiológicas e fisiopatológicas das diversas endotelinas endógenas devem-se principalmente à escassez de informações comparativas das propriedades das endotelinas -2 e -3. Assim,

este aspecto permanece a ser esclarecido adequadamente por estudos adicionais utilizando abordagens bioquímicas, imuno-histoquímicas e de biologia molecular.

Os mecanismos celulares implicados nos efeitos nociceptivos das endotelinas na articulação não foram esclarecidos pelo presente trabalho. Contudo, poderiam incluir, entre várias possibilidades, a formação de eicosanóides (ver revisão de HYSLOP e DE NUCCI, 1992) ou de citocinas como o $TNF\alpha$, IL- 1β , IL-6 e IL-8 (HELSET et al., 1993; STANKOVA et al., 1996; CUNNINGHAM et al., 1997), todos bem conhecidos por induzir nocicepção e/ou hiperalgesia (CUNHA et al., 1992; para revisão ver WATKINS et al., 1995). Além disso, pelo fato de serem vasoconstritores extremamente potentes (para revisão ver WEBB, 1997), as endotelinas podem causar hipóxia na sinóvia, acarretando acidificação do tecido e marcada sensibilização de nociceptores (STEEN et al. 1996; CATERINA et al., 1997).

Os níveis de endotelina-1 alcançados no fluído sinovial após a injeção *i.a.* do peptídeo em doses nociceptivas não foram avaliadas no presente trabalho. Embora tais níveis possam ser muito mais elevados do que aqueles encontrados no fluído sinovial de articulações afetadas de pacientes artríticos (onde variam entre 1 a 10 pM; NAHIR et al., 1991; MIYASAKA et al., 1992), é importante considerar que a reversibilidade da interação das endotelinas com seus receptores pode ser notadamente lenta (WU-WONG et

al., 1995; CHIOU et al., 1997). Desse modo, a quantidade de ligante endógeno encontrada num determinado fluido pode ser substancialmente mais baixa do que aquela que esteja efetivamente atuando sobre o tecido por ele irrigado, conforme discutido por FRELIN e GUEDIN (1994). Além disso, ainda é desconhecida a relação entre as concentrações de endotelinas no fluido sinovial e nos tecidos articulares onde, supostamente, elas possam atuar para causar seus efeitos nociceptivos.

Concluindo, o presente estudo demonstra que a endotelina-1 induz nocicepção e hiperalgisia em articulações normais de rato. Normalmente o estes efeitos são deflagrados pela ativação de receptores ET_A, mas na articulação estimulada previamente com carragenina a nocicepção também envolve a ativação de receptores ET_B. Além disso, apresentamos evidências funcionais de que a nocicepção induzida pelo LPS em articulações de joelho de rato inflamadas previamente com carragenina é mediada em grande parte por liberação local de endotelinas endógenas e ativação de receptores ET_B. Sugerimos que a sensibilização prévia das articulações com a carragenina pode constituir um modelo experimental mais interessante e relevante de nocicepção articular do que aqueles que envolvem aplicação de agentes inflamatórios em articulações normais, pois a recorrência é uma característica comum de várias doenças artríticas no homem (GUERNE e WEISMAN, 1992; KEEFE e VAN HORN, 1993). Além disso, esta abordagem

experimental para avaliar a nocicepção articular parece menos estressante ao animal do que o modelo da poliartrite experimental induzida por adjuvante de Freud. Finalmente, nossos achados podem ser pertinentes à etiologia da dor de processos artríticos crônicos no homem, visto que uma grande proporção de pacientes com artrite reumatóide ou reativa apresentam inflamação intestinal oculta, com aumento da permeabilidade da mucosa para produtos bacterianos intestinais, incluindo o LPS (para revisão ver SARTOR, 1989), assim como níveis aumentados de proteína ligante para LPS no plasma e fluído sinovial (HEUMANN et al., 1995).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

1. A nocicepção induzida pela endotelina-1 em articulações normais de rato é mediada em grande parte pela ativação de receptores ET_A .
2. A sensibilização prévia das articulações induzida pela carragenina (72 h) aumenta a incapacitação evocada pela própria carragenina (300 μ g), LPS (1 μ g), ET-1 ou S6c (15 e 30 pmol).
3. Tanto receptores ET_A como ET_B parecem contribuir para a nocicepção induzida pela endotelina-1 em articulações sensibilizadas previamente com carragenina.
4. A nocicepção induzida pelo LPS em articulações de rato sensibilizadas previamente com carragenina é mediada em grande parte pela liberação de endotelinas endógenas e ativação de receptores ET_B na própria articulação.

7. PUBLICAÇÕES

Os dados apresentados neste trabalho deram origem às seguintes publicações:

De-MELO, J.D., TONUSSI, C.R., D'ORLÉANS-JUSTE, P. e RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on inflammatory incapacitation in the rat knee joint. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 31 (suppl.1): S518-S520, 1998.

De-MELO, J.D., TONUSSI, C.R., D'ORLÉANS-JUSTE, P. e RAE, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naïve and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain** (no prelo).

8. RESUMO

Este estudo avalia as possíveis propriedades locais nociceptiva e hiperalgésica da endotelina-1 (ET-1), bem como a possível participação das endotelinas endógenas na nocicepção induzida pela carragenina ou LPS no teste da incapacitação articular de joelho de rato. A nocicepção foi avaliada, colocando-se o animal durante 1 min a cada hora sobre um cilindro girando (3 r.p.m) e medindo-se o aumento do tempo em que a pata do membro afetado pela injeção intra-articular (*i.a.*) do agente nociceptivo, deixa de tocar sua superfície metálica (*i.e.* tempo de elevação da pata, TEP). Quando injetada em articulações normais, a carragenina (CG; 150 μ g or 300 μ g), o LPS de *E. coli* (1, 5 ou 10 μ g) ou a endotelina-1 (120 or 240 pmol), cada uma delas aumentou persistentemente o TEP, diferentemente da sarafotoxina S6c (15 – 240 pmol) ou do PBS. A endotelina-1 (15 ou 30 pmol, *i.a.*; 30 min antes) não causa incapacitação por si, mas potencializou o aumento do TEP induzido pela carragenina, aumentando a área sob a curva (ASC em unidades arbitrárias; 0 a 6 h) de 105 ± 9 to 165 ± 10 and 169 ± 25 , respectivamente. Em articulações normais, a endotelina-1 (120 pmol) aumentou a área sob a curva do TEP 0-6 h, de 61 ± 3 (controle) para 156 ± 12 . Este efeito nociceptivo foi reduzido pela injeção intravenosa (*i.v.*) prévia do antagonista misto de receptores ET_A/ET_B, o bosentan (de 54 e 72% com 10 e 30 mg/kg) ou

administração *i.a.* do antagonista seletivo de receptores ET_A, o BQ-123 (ciclo [D-Asp-Pro-D-Val-Leu]; em aproximadamente 48% com 10 nmol ou 30 nmol), mas não foi afetada pelo antagonista seletivo de receptores ET_B, o BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetil-piperidino-carbonil-L- γ -metil-leucil-D-1-metoxi-carbonil-triptofanil-D-norleucina; 10 nmol). O estímulo prévio da articulação (72 h) com carragenina (300 μ g) tornou a articulação mais sensível à nocicepção (*i.e.* sensibilização nociceptiva) induzida tanto pela endotelina-1 ou pela sarafotoxina S6c (15, 30 ou 60 pmol). As respostas induzidas pela endotelina-1 (30 pmol) nas articulações previamente sensibilizadas, foram sensíveis à inibição tanto pelo BQ-123 (79%) ou pelo BQ-788 (72%), cada qual na dose de 10 nmol. A sensibilização prévia também aumentou marcada e persistentemente, as respostas do TEP para a própria carragenina e para o LPS (1 μ g), aumentando a ASC 0-12 h de 241 ± 19 para 409 ± 50 e de 312 ± 40 para 466 ± 25 , respectivamente ($P < 0,05$), sem alterar as medidas após a injeção do veículo (de 121 ± 3 para 117 ± 4). O bosentan (até a dose de 30 mg/kg, *i.v.*) falhou em modificar a nocicepção causada pela carragenina ou pelo LPS em articulações normais, entretanto, foi inibida em 52-56% pelo bosentan (3 ou 10 mg/kg) ou 59% pela injeção local do antagonista seletivo de receptores ET_B, BQ-788 (10 nmol, *i.a.*), mas não foi afetada pelo antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123. Logo, a nocicepção induzida pela endotelina-1 em articulações normais é amplamente mediada por

receptores endotelinérgicos ET_A, ao passo que tanto receptores ET_A como ET_B contribuem para sua ação em articulação sensibilizada previamente com carragenina. Além disso, a nocicepção induzida pelo LPS em articulação sensibilizada previamente com carragenina é mediada em grande parte via liberação de endotelinas e ativação de receptores ET_B dentro da própria articulação. Estes achados podem ser relevantes para a etiologia da dor associada a doenças artríticas crônicas no homem.

9. SUMMARY

This study assesses the possible local nociceptive and hyperalgesic properties of endothelin-1, as well as the possible participation of endogenous endothelins in nociception induced by carrageenan or LPS in the rat knee-joint incapacitation test. Nociception was evaluated by placing the animal for 1 min each h on a revolving (3 r.p.m.) cylinder and measuring the increase in time the hindlimb affected by the intra-articular (*i.a.*) injection of the nociceptive agent failed to touch its metallic surface (*i.e.* paw elevation time, PET). When injected intra-articularly into the naïve knee-joint, carrageenan (CG; 150 or 300 μg), *E. coli* LPS (1, 5 ou 10 μg) and endothelin-1 (120 or 240 pmol) each increased PET persistently, unlike sarafotoxin S6c (15 – 240 pmol) or PBS. Endothelin-1 (15 ou 30 pmol, *i.a.*; 30 min beforehand) did not cause incapacitation *per se*, but potentiated PET increases induced by carrageenan, increasing the area under the curve (AUC in arbitrary units; 0 to 6 h) from 105 ± 9 to 165 ± 10 and 169 ± 25 , respectively. In naïve joints, endothelin-1 (120 pmol) increased the area under the PET curve 0-6 h, from 61 ± 3 (control) to 156 ± 12 . This nociceptive effect was reduced by prior intravenous (*i.v.*) injection of the mixed ET_A/ET_B receptor antagonist bosentan (by 54 and 72% with 10 and 30 mg/kg) or *i.a.* administration of the selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (cyclo [D-Asp-Pro-D-Val-Leu]; by $\cong 48\%$ with 10 or 30 nmol), but was unaffected by the selective ET_B receptor

antagonist BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimethyl-piperidinocarbonyl-L- γ -methyl-leucyl-D-1-methoxycarbonyl-tryptophanyl-D-norleucine; 10 nmol). Prior joint challenge with carrageenan (300 μ g) 72 h beforehand (*i.e.* priming) rendered the joint more sensitive to nociception induced by either endothelin-1 or sarafotoxin S6c (15, 30 and 60 pmol). Responses elicited by endothelin (30 pmol) in the primed joint were sensitive to inhibition by either BQ-123 (79%) or BQ-788 (72%) at 10 nmol. Priming also enhanced PET responses to carrageenan itself and to LPS (1 μ g) markedly and persistently, increasing the AUC from 241 ± 19 to 409 ± 50 and from 312 ± 40 to 466 ± 25 , respectively ($P < 0.05$), without changing that measured following vehicle injection (from 121 ± 3 to 117 ± 4). Bosentan (up to 30 mg/kg, *i.v.*) failed to modify nociception caused by carrageenan or LPS in naïve joints, by carrageenan in the primed joint, or control PET responses. LPS-induced nociception in the primed joint, however, was inhibited 52-56% by bosentan (3 or 10 mg/kg) or 59% by local injection of the selective endothelin ET_B receptor antagonist BQ-788 (10 nmol, *i.a.*), but was unaffected by the selective endothelin ET_A receptor antagonist BQ-123. Thus, nociception induced by endothelin-1 in the naïve joint is mediated largely via endothelin ET_A receptors, whereas both ET_A and ET_B receptors contribute to its action in the carrageenan-primed joint. Furthermore, LPS-induced nociception in the primed joint is mediated to a large extent via endothelin release and activation of ET_B receptors within the joint

itself. These findings may be relevant to the etiology of pain underlying chronic arthritic disease in humans.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHMAD, T.H. e RAO, G.S. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189: 994-1000, 1992.
- AGUI, T.; XIN, X.; CAI, Y.; SAKAI, T. e MATSUMOTO, K. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. **Blood**, 84: 2531-2538, 1994.
- 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.
- ATTAL, N.; KAYSER, V.; ESCHALIER, A; BENOIST, J.M. e GUILBAUD, G. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal anti-inflammatory agent, sodium diclofenac. **Pain**, 35: 341-348, 1988.
- BASBAUM, A.I. e LEVINE, J.D. The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 69: 647-651, 1991.
- BATTISTINI, B.; FORGET, M. e LAIGHT, D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. **Shock**, 3: 167-183, 1996.
- BEASLEY, I.; STANDEVEN, H. e MILLION, R. A traumatic knee injury. **Practitioner**, 235: 469-474, 1991.
- BECKER, A.; DOWDLE, E.B.; HECHLER, U.; KAUSER, K.; DONNER, P. e SCHLEUNING, W.D. Bibrotoxin, a novel member of the endothelin/sarafotoxin peptide family, from the venom of the burrowing asp *Atractaspis bibroni*. **FEBS Lett.**, 315: 100-103, 1993.
- BERTELLI, A.; CLERICO, A.; CHICCA, A.; GIOVANNINI, L.; GORIO, A. e ROMANO, M. A. Role of endothelin-1 in carrageenan-induced inflammation. **Int. J. Tissue React.**, 14: 225-230, 1992.
- BILEVICIUTE, I.; LUNDEBERG, T.; EKBLUM, A. e THEODORSSON, E. Bilateral changes of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. **Neurosci. Lett.**, 153: 37-40, 1993.
- BLEY, K.R.; HUNTER, J.C.; EGLIN, R.M. e SMITH, J.A M. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, 19: 141-147, 1998.
- BOMBARDIERI, S.; CATTANI, P.; CIABATTONI, G.; DI MUNNO, O.; PASERO, G.; PATRONO, C.; PINCA, E. e PUGLIESE, F. The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Br. J. Pharmacol.**, 73: 893-901, 1981.
- BRÄNDLI, P.; LOFFLER, B.M.; BREU, V.; OSTERWALDER, R.; MAIRE, J.P. e CLOZEL, M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. **Pain**, 64: 315-322, 1996.

- BRODIE, M.J. HENSBY, C.N. PARKE, A. e GORDON. Prostacyclin the major pro-inflammatory prostanoid in joint fluid? **Life Sci.**, 27: 603-608, 1980.
- CALVINO, B.; BESSON, J.M.; BOEHRER, A e DEPAULIS, A Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. **Neuroreport.**, 7: 581-584, 1996.
- CALVINO, B.; CREPON-BERNARD, M.O e LE BARS, D. Parallel clinical and behavioural studies of adjuvant-induced arthritis in the rat: possible relationship with 'chronic pain'. **Behav. Brain Res.**, 24: 11-29, 1987.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D. e JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824, 1997.
- CHIOU, W.J.; MAGNUSON, S.R.; DIXON, D.; SUNDY, S.; OPGENORTH, T.J. e WU-WONG, J.R. Dissociation characteristics of endothelin receptor agonists and antagonists in cloned human type-B endothelin receptor. **Endothelium**, 5: 179-189, 1997.
- CHU, C.Q.; FIELD, M.; FELDMANN, M. e MAINI, R.N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 34: 1125-1132, 1991a.
- CHU, C.Q.; FIELD, M.; ABNEY, E.; ZHENG, R.Q.; ALLARD, S.; FELDMANN, M. e MAINI, R.N. Transforming growth factor-beta 1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage/pannus junction. **Clin. Exp. Immunol.**, 86: 380-386, 1991b.
- CLOZEL, M.; BREU, V.; GRAY, G.A.; KALINA, B.; LÖFFLER, B.M.; BURRI, K.; CASSAL, J.M.; HIRTH, G.; MÜLLER, M.; NEIDHART, W. e RAMUZ, H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 270: 228-235, 1994.
- CODERRE, T.J.; ABBOTT, F.V. e MELZACK, R. Effects of peripheral antisympathetic treatments in the tail-flick, formalin and autotomy tests. **Pain**, 18: 13-23, 1984.
- COLPAERT, F.C. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. **Pain**, 28: 201-222, 1987.
- CROFFORD, L.J.; WILDER, R.L.; RISTIMAKI, A P., SANO, H.; REMMERS, E.F.; EPPS, H.R.; HLA, T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.** 93: 1095-1101, 1994.
- CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. e FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, 104: 765-767, 1991.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 660-664, 1992.
- CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN M.A. Endotoxin-stimulated monocytes produce endothelin. **FASEB J.**, 8: A214, 1991.
- CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN M.A. Endothelin-stimulated monocyte produce IL-1 β , IL-8 and GM-CSF. **Mol. Biol. Cell.**, 4: 415A, 1993.

- CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M.; BALA, R.J. e MCMILLEN, M.A. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. **Crit. Care Med.**, 25: 958-964, 1997.
- CUSH, J.J. e LIPSKY, P. E. "The spondylarthropathies". In: **Cecil Textbook of Medicine**, J.C. Bennet and F. Plum (Eds.), 20a. edição, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1466-1472, 1996.
- CUTOLO, M.; SULLI, A.; SERIOLO, B. e ACCARDO, S. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol.**, 11: 331-339, 1993.
- DAHLOF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, T.; JERN, S. e HANSSON, L. Regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reaction. **J. Hypertens.**, 8: 811-817, 1990.
- D'AMICO, M.; BERRINO, L.; MAIONE, S.; FILIPPELLI, A.; de NOVELIS, V. e ROSSI, F. Endothelin-1 in periaqueductal gray area of mice induces analgesia via glutamatergic receptors. **Pain**, 65: 205-209, 1996.
- DAMON, D.H. Postganglionic sympathetic neurons express endothelin. **Am. J. Physiol.**, 274: R873-R878, 1998.
- DARDICK, S.J.; BASBAUM, A.I. e LEVINE, J.D. The contribution of pain to disability in experimentally induced arthritis. **Arthr. Rheum.**, 29: 1017-1022, 1986.
- DAVENPORT, A.P.; HOSKINS, S.L.; KUC, R.E. e PLUMPTON, C. Differential distribution of endothelin peptides and receptors in human adrenal gland. **Histochem. J.**, 28: 779-789, 1996.
- DAVIDSON, E.M.; RAE, S.A. e SMITH, M.J. Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 42: 677-679, 1983.
- DAVIES, P.; BAILEY, P.J.; GOLDENBERG, M.M. e FORD-HUTCHINSON, A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annu. Ver. Immunol.**, 2: 335-357, 1984
- DAVIS, A J.e PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 63-68, 1994.
- DAYER, J.M.; KRANE, S.M.; RUSSELL, R.G.; ROBINSON, D.R. Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 73: 945-949, 1976.
- DE BRUM-FERNANDES, A.J.; COSSERMELLI, W. e JANCAR, S. Antigen-induced arthritis in rabbits: a suitable experimental model for the study of arachidonic acid metabolites in articular inflammatory processes. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.**, 43: 142-145, 1988.
- DE BRUM-FERNANDES, A.J.; LAPORTE, S.; HEROUX, M.; LORA, M.; PATRY, C.; MENARD, H.A.; DUMAIS, R. e LEDUC, R. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 198: 955-960, 1994.

- DE CASTRO COSTA, M.; DE SUTTER, P.; GYBELS, J. e VAN HEES, J. Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, 10: 173-185, 1981.
- DE PAULIS, A.; MARINO, I.; CICCARELLI, A.; DE CRESCENZO, G.; CONCARDI, M.; VERGA, L.; ARBUSTINI, E. e MARONE, G. Human synovial mast cells. I. Ultrastructural in situ and in vitro immunologic characterization. **Arthritis Rheum.**, 39: 1222-1233, 1996.
- DECKER, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). **Eur. J. Biochem.**, 192: 245-261, 1990.
- DELEURAN, B.W.; CHU, C.Q.; FIELD, M.; BRENNAN, F.M.; KATSIKIS, P.; FELDMANN, M. e MAINI, R.N. Localization of interleukin-1 alpha, type 1 interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, 31: 801-809, 1992.
- DENAULT, J.B.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; SAKAMURA, T.; KIDO, T.; MASAKI, T. e LEDUE, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. **FEBS Lett.**, 362:276-280, 1995.
- DICK, W.C. e GRENNAN, D.M. Studies on the relative effects of prostaglandins, bradykinin, 5-hydroxytryptamine and histamine on the synovial microcirculation in dogs. **Br. J. Pharmacol.**, 56: 313-316, 1976.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TELEMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M. e YANO M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET1 receptors in the rat perfused lung. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 773-775, 1992.
- DRAY, A.; PATEL, I.A.; PERKINS, M.N. e RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 1129-1134, 1992.
- DREHER, R. Origin of synovial type A cells during inflammation, na experimental approach. **Immunobiol.**, 161: 232-245, 1982.
- EGG, D. Concentrations of prostaglandins D₂, E₂, F_{2α}, 6-keto-F_α and tromboxane B₂ in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and oestoarthritis. **Z. Rheum.**, 43: 89-96, 1984.
- EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E.; KEHRL, J.H. e FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoconstrictive properties, are produced by human macrophages. **J. Exp. Med.**, 172: 1741-1748, 1990.
- EHRENREICH, H.; RIECKMANN, P.; SINOWATZ, F.; WEIH, K.A.; ARTHUR, L.O.; GOEBEL, F.D.; BURD, P.R.; COLIGAN, J.E. e CLOUSE, K.A. Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. **J. Immunol.**, 150: 4601-4609, 1993.
- EMORI, T.; HIRATA, Y.; OHTA, K.; KANNO, K.; EGUCHI, S.; IMAI, T.; SHICHIRI, M. e MARUMO, F. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. **Hypertension** 18: 165-170, 1991.

- EMORI, T.; HIRATA, Y.; IMAI, T.; OHTA, K.; KANNO, K.; EGUCHI, S. e MARUMO, F. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. **Biochem. Pharmacol.**, 44: 2409-2411, 1992.
- FAIRES, S.J. e McCARTY, J.D. Acute arthritis in man and dogs after intra-synovial injection of sodium urate crystals. **Lancet**, 11: 682-684, 1962.
- FERREIRA, S.H. Site of analgesic action of aspirin-like drugs and opioids. In: **Mechanisms of pain and analgesic compounds**. R.F. Beers and E.G. Basset (Eds.). Raven Press, New York. pp. 309-321, 1979.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F. e POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, 334: 698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M. e DE NUCCI G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain, **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13 (Suppl. 5): 220-222, 1989.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. e POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1227-1231, 1993.
- FERREL, W.R. e CANT. R. Vasodilatation of articular blood vessels induced by antidromic electrical stimulation of joint C-fibres. In: **Fine Nerve Fibres and Pain.**, Schmid, R.F.; SCHAIBLE, H.G. e VAHLE-HINZ, C. (Eds.) pp. 187-192, 1987.
- FERREL, W.R. e RUSSEL, N.J.W. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetised cat. **J. Physiol.**, 379: 407-416, 1986.
- FIELD, M. e CLINTON, L. Expression of GM-CSF receptor in rheumatoid arthritis. **Lancet**, 342: 1244, 1993.
- FILEP, J.G.; BATTISTINI, B.; SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. **Br. J. Pharmacol.** 103: 1633-1640, 1991.
- FILEP, J.G.; FOURNIER, A. e FOLDES-FILEP, E. Endothelin-1-induced myocardial ischaemia and oedema in the rat: involvement of the ETA receptor, platelet-activating factor and thromboxane A2. **Br. J. Pharmacol.**, 112: 963-971, 1994.
- FITZGERALD, M. Arthritis and the nervous system, **Tr. Neurosci.**, 12: 86-87, 1989.
- FOGH, K.; HANSEN, E.S.; HERLIN, T.; KNUDSEN, V.; HENRIKSEN, T.B.; EWALD, H.; BUNGER, C. e KRAGBALLE, K. 15-Hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE) inhibits carrageenan-induced experimental arthritis and reduces synovial fluid leukotriene B4 (LTB4). **Prostaglandins**, 37: 213-228, 1989.
- FRELIN, C. e GUEDIN, D. Why are circulating concentrations of endothelin-1 so low? **Cardiovasc. Res.**, 28: 1613-1622, 1994.
- GARDNER, D.L. production of arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide caragheenin. **Ann. Rheum. Dis.**, 19: 369-376, 1960.
- GASSON, J.C. Molecular physiology of granulocyte macrophage colony stimulating factor. **Blood**, 77: 1131-1145, 1991.

- GAY, S. AND GAY, R.E. "Connective tissue structure and function". In: **Cecil Textbook of Medicine**, J.C. Bennet and F. Plum (Eds.), 20a. edição, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1443-1448, 1996.
- GOMEZ-GARRE, D.; GUERRA, M.; GONZALEZ, E.; LOPEZ-FARRE, A.; RIESCO, A.; CAMELO, C.; ESCANERO, J. e EGIDO, J. Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. **Eur. J. Pharmacol.**, 224: 167-172, 1992.
- GORDON, D.A. "Approach to the patient with musculoskeletal disease". In: **Cecil Textbook of Medicine**, J.C. Bennet and F. Plum (Eds.), 20a. edição, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1440-1443, 1996.
- GOTO, K.; KASUYA, Y.; MATSUKI, N.; TAKUWA, Y.; KURIHARA, H.; ISHIKAWA, T.; KIMURA, S.; YANAGISAWA, M. e MASAKI, T. Endothelin activates the dihydropyridine sensitive, voltage dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 3915-3918, 1989.
- GOTO, K.; HAMA, H. e KASUYA, Y. Molecular pharmacological significance of endothelin. **Jpn. J. Pharmacol.**, 72: 261-290, 1996.
- GRANFORS, K.; OGASAWARA, M.; HILL, J.L.; LAHESMAA-RANTALA, R.; TOIVANEN, A. e YU D.T. Analysis of IgA antibodies to lipopolysaccharide in Yersinia-triggered reactive arthritis. **J. Infect. Dis.**, 159: 1142-1147, 1989.
- GRANFORS, K.; JALKANEN, S.; LINDBERG, A.A.; MAKI-IKOLA, O.; VON ESSEN, R.; LAHESMAA-RANTALA, R.; ISOMAKI, H.; SAARIO, R.; ARNOLD W.J. e TOIVANEN, A. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. **Lancet**, 335: 685-688, 1990.
- GRANFORS, K.; JALKANEN S.; TOIVANEN, P.; KOSKI, J. e LINDBERG, A.A. Bacterial lipopolysaccharide in synovial fluid cells in Shigella triggered reactive arthritis. **J. Rheumatol.**, 19: 500, 1992.
- GRIENDLING, K.K.; TSUDA, T. e ALEXANDER, R.W. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in culture vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, 264: 8237-8240, 1989.
- GUERNE, P.A. e WEISMAN, M.H. Palindromic rheumatism: part of or apart from the spectrum of rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, 93: 451-460, 1992.
- GURSEL, T.; FIRAT, S. e ERCAN, Z.S. Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 56: 205-207, 1997.
- GUTIERREZ, S.; PALACIOS, I.; EGIDO, J.; GOMEZ-GARRE, D.; HERNANDEZ, P.; GONZALEZ, E. e HERRERO-BEAUMONT, G. Endothelin-1 induces loss of proteoglycans and enhances fibronectin and collagen production in cultured rabbit synovial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 302: 191-197, 1996.
- HANESH, U.; PFOMMER, U.; GRUBB, B.D. e SCHAIBLE H.G. Acute and chronic phases of unilateral inflammation in rat's ankle joint are associated with an increase in the proportion of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive dorsal root ganglion cells. **Eur. J. Neurosci.**, 5: 154, 1993.

- HANOSCH, U.; HEPPELMANN B. e SCHMIDT, R.F. Acute monoarthritis of the cat's knee joint alters the proportion of CGRP-immunoreactive articular afferents. **Neuropeptides**, (Suppl.1): 57, 1996.
- HARGREAVES, K.M.; TROULLOS, E.S.; DIONNE, R.A.; SCHMIDT, E.A.; SCHAFER, S.C. e JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 44: 613-621, 1988.
- HAY, D.W.; LUTTMANN, M.A.; HUBBARD, W.C. e UNDEM, B.J. Endothelin receptor subtypes in human and guinea-pig pulmonary tissues. **Br. J. Pharmacol.** 110: 1175-1183, 1993.
- HAYNES, W.G. e WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? **Clin. Sci.**, 84: 485-500, 1993.
- HELSET, E.; KJAEVE, J. e HAUGE, A. Endothelin-1-induced increases in microvascular permeability in isolated, perfused rat lungs requires leukocytes and plasma. **Circ. Shock**, 39: 15-20, 1993.
- HENDERSON, B. e HIGGS, G.A. Synthesis of arachidonate oxidation products by synovial joint tissues during the development of chronic erosive arthritis. **Arthritis Rheum.**, 30: 1149-1156, 1987.
- HENDERSON, B. The synovial lining cell and synovitis. **Scand. J. Rheumatol.**, 76: 33-38, 1988.
- HEUMANN, D.; GALLAY, P.; BARRAS, C.; ZAECH, P.; ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S.; GLAUSER, M.P. e BAUMGARTNER, J.D. Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. **J. Immunol.**, 148: 3505-3512, 1992.
- HEUMANN, D.; BAS, S.; GALLAY, P.; LE ROY, D.; BARRAS, C.; MENSİ, N.; GLAUSER, M.P. e VISCHER, T. Lipopolysaccharide binding protein as a marker of inflammation in synovial fluid of patients with arthritis: correlation with interleukin 6 and C-reactive protein. **J. Rheumatol.**, 22: 1224-1229, 1995.
- HOHLFELD, T.; KLEMM, P.; THIEMERMANN, C.; WARNER, T.D.; SCHRÖR, K. e VANE J.R. The contribution of tumor necrosis factor- α and endothelin-1 to the increase of coronary resistance in hearts from rats treated with endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 3309-3315, 1995.
- HURIBAL, M.; KUMAR, R.; CUNNINGHAM, M.; SUMPIO B.E. e McMILLEN M.A. Endothelin causes production of interleukin 6 but not interleukin 1 by human monocytes. **FASEB J.**, 6: A1613, 1992.
- HYSLOP, S. e DE NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. **Pharmacol. Res.**, 26: 223-242, 1992.
- IHARA, M.; ISHIKAWA, K.; FUKURODA, T.; SAEKI, T.; FUNABASHI, K.; FUKAMI, T.; SUDA, H. e YANO, M. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ET_A receptor. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 12 (Suppl. 12): S11-S14, 1992.

- IKEDA, S.; AWANE Y.; KUSUMOTO, K.; WAKIMASU, M.; WATANABE, T. e FUJINO, M. A new endothelin receptor antagonist TAK-044, shows long-lasting inhibition of both ET_A and ET_B-mediated blood pressure responses in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 270: 728-733, 1994.
- IMAI, T.; HIRATA, Y.; EMORI, T.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; e MARUMO, F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. **Hypertension**, 19: 753-757, 1992.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S., KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K. e MASAKI, T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separated genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 2863-2867, 1989.
- INOUE, Y.; OIKÉ, M.; NAKAO, K.; KITAMURA, K. e KURIYAMA, H. Endothelin augments unitary calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea pig portal vein. **J. Physiol.**, 423: 171-191, 1990.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). Ethical guidelines of investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109-110, 1983.
- ISHIKAWA, K.; IHARA, M.; NOGUCHI, K.; MASE T.; MINO, N.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; FUKAMI, T.; OZAKI, S.; NAGASE, T.; NISHIKIBE, M. e YANO M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 4892-4896, 1994.
- JANCSO, N.; JANCSO-GABOR, A. e SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol.**, 31: 138-151, 1967.
- KAMEI, J.; HITOSUGI, H.; KAWASHIMA, N.; MISAWA, M. e KASUYA, Y. Antinociceptive effects of intrathecally administered endothelin-1 in mice. **Neurosci. Lett.**, 153: 69-72, 1993.
- KANAAN, S.A.; SAADE, N.E.; HADDAD, J.J.; ABDELNOOR, A.M.; ATWEH, S.F.; JABBUR, S.J. e SAFIEH-GARABEDIAN, B. Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain. **Pain**, 66: 373-379, 1996.
- KANAAN, S.A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B., HADDAD, J.J.; ATWEH, S.F.; ABDELNOOR A.M.; JABBUR, S.J. e SAADE, N.E. Effects of various analgesic and anti-inflammatory drugs on endotoxin-induced hyperalgesia in rats and mice. **Pharmacology**, 54:285-297, 1997.
- KAPLAN, R.A.; CURD, J.G.; DEHEER, D.H.; CARSON, D.A.; PANGBURN, M.K.; MULLER-EBERHARD, H.J. e VAUGHAN, J.H. Metabolism of C4 and factor B in rheumatoid arthritis. Relation to rheumatoid factor. **Arthritis Rheum.**, 23: 911-920, 1980.
- KARNE, S.; JAYAWICKREME, C.K. e LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, 268: 19126-19133, 1993.

- KEAT, A.; THOMAS, B.; DIXEY, J.; OSBORN, M.; SONNEX, C. e TAYLOR-ROBINSON D. Chlamydia trachomatis and reactive arthritis: the missing link. **Lancet**, 1: 72-74, 1987.
- KEEFE, F.J. e VAN HORN, Y. Cognitive-behavioral treatment of rheumatoid arthritis pain: maintaining treatment gains. **Arthr. Care Res.**, 6: 213-222, 1993.
- KESTER, M.; CORONEOS, E.; THOMAS, P.J. e DUNN, M.J. Endothelin stimulates prostaglandin endoperoxide synthase-2 mRNA expression and protein synthesis through a tyrosine kinase-signaling pathway in rat mesangial cells. **J. Biol. Chem.**, 269: 22574-22580, 1994.
- KHATIB, A.M.; LOMRI, A.; MOLDOVAN, F.; FIET, J. e MITROVIC, D.R. Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. **Cytokine**, 9: 556-562, 1997.
- KLEMM, P.; WARNER, T.D.; CORDER, R. e VANE, J.R. Endothelin-1 mediates coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26 (Supl. 3): S410-S421, 1995.
- KNOTT, I.; DIEU, M.; BURTON, M.; HOUBION, A.; REMACLE, J. e RAES, M. Induction of cyclooxygenase by interleukin 1: comparative study between human synovial cells and chondrocytes. **J. Rheumatol.**, 21: 462-466, 1994.
- KOBAYASHI, Y.; SAKAMOTO, Y.; SHIBASAKI, M.; KIMURA, I. e MATSUO, H. Human alveolar macrophages synthesize endothelins by thrombin. **J. Immunol.**, 158: 5442-5447, 1997.
- KOCHVA, E.; BDOLAH, A. e WOLLBERG, Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. **Toxicol.**, 31: 541-568, 1993.
- LAM, F.Y. e FERRELL W.R. Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser Doppler perfusion imaging. **Neuroscience**, 52: 443-449, 1993.
- LANDIS, C.A.; ROBINSON, C.R. e LEVINE, J.D. Sleep fragmentation in the arthritic rat. **Pain**, 34: 93-99, 1988.
- LANGFORD, L.A. e SCHMIDT, R.F. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. **Anat. Rec.**, 206: 71-78, 1983.
- LARSEN, J.J. e ARNT, J. Reduction in locomotor activity of arthritic rats as parameter for chronic pain: effect of morphine, acetylsalicylic acid and citalopram. **Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)**, 57: 345-351, 1985.
- LARSSON, J.; EKBLUM, A., HENRIKSSON, K.; LUNDEBERG, T. e THEODORSSON, E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, 20: 326-335, 1991.
- LEIS, H.J.; ZACH, D.; HUBER, E.; WINDISCHHOFER, W. Prostaglandin endoperoxide synthase-2 contributes to the endothelin/sarafotoxin-induced prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1): evidence for a protein tyrosine

- kinase-signaling pathway and involvement of protein kinase C. **Endocrinology**, 139: 1268-1277, 1998.
- LEMBECK, F.; DONNERER, L. e COLPAERT, F.C. Increase of substance P in primary afferent nerves during chronic pain. **Neuropeptides**, 1: 170-175, 1991.
- LEVINE, J.D.; DARDICK, S.J.; ROIZEN, M.F.; HELMS, C. e BASBAUM, A.I. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. **J. Neurosci.**, 6: 3423-3429, 1986a.
- LEVINE, J.D.; FYE, K.; HELLER, P.; BASBAUM, A.I. e WHITING-O'KEEFE, Q. Clinical response to regional intravenous guanethidine in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, 13: 1040-1043, 1986b.
- LEVINE, J.D.; CODERRE, T.I.; HELMS, C. e BASBAUM, A.I. Beta-2 adrenergic mechanisms in experimental arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 4549-4553, 1990.
- LONCHAMPT, M.O.; PINELIS, S.; GOULIN, J.; CHABRIER, P.E. e BRAQUET, P. Proliferation and Na^+/H^+ exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Hypert.**, 4: 776-779, 1991.
- LOPEZ-BELMONTE, J. e WHITTLE, B.J. Endothelin-1 induces neutrophil-independent vascular injury in the rat gastric microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**, 278: R7-R9, 1995.
- LYGREN, I.; OSTENSEN, M.; BURHOL, P.G. e HUSBY, G. Gastrointestinal peptides in serum and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. **Ann. Rheum. Dis.**, 45: 637-640, 1986.
- LYONS-GIORDANO, B.; PRATTA, M.A.; GALBRAITH, W.; DAVIS, G.L. e ARNER, E.C. Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. **Exp. Cell. Res.**, 206: 58-62, 1993.
- MAEDA, S.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K. e MATSUDA, M. Differences in the change in the time course of plasma endothelin-1 and endothelin-3 levels after exercise in humans. The responses to exercise of endothelin-3 is more rapid than that of endothelin-1. **Life Sci.**, 61: 419-425, 1997.
- MAEMURA, K.; KURIHARA, H.; MORITA, T.; OH-HASHI, Y. e YAZAKI, Y. Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. **Gerontology**, 38 (Suppl 1): 29-35, 1992.
- MAIER, S.F.; WIERTELAK, E.P.; MARTIN, D. e WATKINS, L.R. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. **Brain Res.**, 623: 321-324, 1993.
- MALCANGIO, M. e BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol. Sci.**, 17: 457-462, 1996.
- MALMBERG, A.B. e YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, 257: 1276-1279, 1992.

- MAPP, P.I.; KIDD, B.L.; GIBSON, S.J.; TERRY, J.M.; REVELL, P.A.; IBRAHIM, N.B.; BLAKE, D.R. e POLAK, J.M. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. **Neuroscience** 37: 143-153, 1990.
- MAPP, P.I.; WALSH, D.A.; GARRETT, N.E.; KIDD, B.L.; CRUWYS, S.C.; POLAK, J.M. e BLAKE, D.R. Effect of three animal models of inflammation on nerve fibres in the synovium. **Ann. Rheum. Dis.**, 53: 240-246, 1994.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D. e GIROUD, J.P. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. **Gen. Pharmacol.**, 14: 209-229, 1983.
- MARSDEN, P.A.; DORFMAN, D.M.; COLLINS, T.; BRENNER, B.M.; ORKIN, S.H. e BALLERMANN, B.J. Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, 261: F117-F125, 1991.
- MARSDEN, P.A.; BRENNER, B.M. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. **Am. J. Physiol.** 262: C854-C861, 1992.
- MASAKI, T.; VANE, J.R. e VANHOUTTE, P.M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol. Rev.**, 46: 137-142, 1994.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K.M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C. e SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 3228-3232, 1994.
- MAY, A.; GIJSMAN, H.J.; WALLNOFER, A.; JONES, R.; DIENER, H.C. e FERRARI, M.D. Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine. **Pain**, 67: 375-378, 1996.
- McGUIRE, M.K.; MEATS, J.E.; EBSWORTH, N.M.; HARVEY, L.; MURPHY, G.; RUSSELL, R.G. e REYNOLDS, J.J. Properties of rheumatoid and normal synovial tissue in vitro and cells derived from them. Production of prostaglandins and collagenase in response to factors derived from cultured blood mononuclear cells and from synovium. **Rheumatol. Int.**, 2: 113-120, 1982.
- McMILLEN, M.A.; HURIBAL, M.; CUNNINGHAM, M.E.; KUMAR, R. e SUMPIO, B.E. Endothelin-1 increases intracellular calcium in human monocytes and causes production of interleukin-6. **Crit. Care Med.**, 23: 34-40, 1995.
- MELZACK, H. e WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, 150: 971-979, 1965.
- MENDELL, L.M. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. **Exp. Neurol.** 16: 316-332, 1966.
- MICAN, J.M. e METCALF, D.D. Arthritis and mast cell activation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 86: 677, 1990.

- MINAMI, M.; KURAIISHI, Y.; KAVAMURA, M.; YAMAGUSHI, T.; MASU, Y.; NAKANISHI, S. e SATOH, M. Enhancement of preprotakinin A gene expression by adjuvant-induced inflammation in the rat spinal neurons in nociception. **Neurosc. Lett.**, 98: 99-105, 1990.
- MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 11693-11697, 1993.
- MIYASAKA, N.; HIRATA, Y.; ANDO, K.; SATO, K.; MORITA, H.; SHICHIRI, M.; KANNO, K.; TOMITO, K. e MARUMO, F. Increased production of endothelin-1 in patients with inflammatory arthritides. **Arthr. Rheumat.**, 35: 397-400, 1992.
- MOILANEN, E. Effects of diclofenac, indomethacin, tolfenamic acid and hydrocortisone on prostanoid production in healthy and rheumatic synovial cells. **Agents Actions**, 26: 342-349, 1989.
- MORITOKI, H.; MIYANO, H.; TAKEUCHI, S.; YAMAGUCHI, M.; HISAYAMA, T. e KONDOH, W. Endothelin-3-induced relaxation of rat thoracic aorta: a role for nitric oxide formation. **Br.J. Pharmacol.**, 108: 1125-1130, 1993.
- MURATA, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; HIRATA, M.; YAMASAKI, A.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; AZE, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; UENO, A.; OH-ISHI, S. e NARUMIYA, S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. **Nature**, 388: 678-682, 1997.
- NAHIR, A.; HOFFMAN A.; LORBER M. e KEISER H.R. Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. **J. Rheumatol.**, 18: 678-680, 1991.
- NIKOLOV, R.; SEMKOVA, I.; MASLAROVA, J. e MOYANOVA, S. Antinociceptive effect of centrally administered endothelin-1 and endothelin-3 in the mouse. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, 15: 447-453, 1993.
- NINOMIYA, H.; UCHIDA, Y.; SAOTOME, M.; NOMURA, A.; OHSE, H.; MATSUMOTO, H.; HIRATA, F.; HASEGAWA, S. Endothelins constrict guinea pig tracheas by multiple mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 262: 570-576, 1992a.
- NINOMIYA, H.; YU, X.Y.; HASEGAWA, S.; SPANNHAKE, E.W. Endothelin-1 induces stimulation of prostaglandin synthesis in cells obtained from canine airways by bronchoalveolar lavage. **Prostaglandins** 43: 401-411, 1992b.
- NOGUCHI, K.; MORITA, Y.; KIYAMA, H.; ONO, K. e TOHYAMA, M. A noxious stimulus induces the preprotachykinin-A gene expression in the rat dorsal root ganglion: a quantitative study using in situ hybridization histochemistry. **Brain Res.**, 464: 31-35, 1988.
- OHLSTEIN, E.H.; ELLIOT, J.D.; FEUERSTEIN, G.Z. e RUFFOLO Jr., R.R. Endothelin receptors: receptor classification, novel receptors antagonists, and potential therapeutic targets. **Med. Res. Reviews**, 16: 365-390, 1996.
- OKA, T.; AOU, S. e HORI, T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. **Brain Res.**, 624: 61-68, 1993.

- O'NEILL, L.A. e LEWIS G.P. Inhibitory effects of diclofenac and indomethacin on interleukin-1-induced changes in PGE2 release. A novel effect on free arachidonic acid levels in human synovial cells. **Biochem. Pharmacol.**, 38: 3707-3711, 1989.
- OPGENORTH, T.J.; KIMURA, S. e WU-WONG, J.R. Characterization of endothelin-converting enzymes. **Meth. Neurosci.**, 23: 251-265, 1995.
- PAIRET, M. e ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 10: 1-17, 1996.
- PALMER, J.L.; BERTONE, A.L. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. **Equine Vet. J.**, 26: 492-495, 1994.
- PARDO, E.G. e RODRIGUEZ, R. Reversal by acetylsalicylic acid of pain induced functional impairment. **Life Sciences**, 5: 775-781, 1966.
- PERKINS, S.L.; SARRAJ, E.; KLING, S.J.; KOHAN, D.E. Endothelin stimulates osteoblastic production of IL-6 but not macrophage colony-stimulating factor. **Am. J. Physiol.**, 272: E461-E468, 1997.
- PIOVEZAN, A.P. Influência da endotelinas sobre a resposta nociceptiva do camundongo à formalina e à capsaicina. Florianópolis, 1997, 84p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R. e RAE, G.A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 75: 596-600, 1997.
- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R. e RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.** (In Press).
- PIRCIO, A W.; FEDELE, C.T. e BIERWAGEN, M.E. A new method for the evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 31: 207-215, 1975.
- POLACEK, P. Receptors of the joints: their structure, variability and classification. **Acta Facultat. Med Universitat Brunensis**, 23:1-107, 1966.
- POULTER, C.W.; DUKE, O. e HOBBS S. Histochemical discrimination of hLA. DR positive-cell populations in the normal and arthritic synovial lining. **Clin. Exp. Immunol.**, 48: 381-388, 1982a.
- POULTER, L.W.; DUKE, O.; HOBBS, S.; JANOSSY, G. e PANAYI, G. Histochemical discrimination of HLA-DR positive cell populations in the normal and arthritic synovial lining. **Clin. Exp. Immunol.**, 48: 381-388, 1982b.
- PRETE, P.E. e GURAKAR-OSBORNE, A. The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. **Prostaglandins**, 54: 689-698, 1997.
- PROUD, D. e KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Annu. Ver. Immunol.**, 6: 49-83, 1988.
- RAE, G.A. e HENRIQUES, M.G.M.O. Endothelins in inflammation. In: S. Said (Ed.), *Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Peptides*, Marcel Dekker, New York, 1998, pp.163-202.

- RAE, S.A.; DAVIDSON, E.M. e SMITH, M.J. Leukotriene B₄, an inflammatory mediator in gout. **Lancet**, 2: 1122-1124, 1982.
- 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.
- RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J.; MARTINEZ, R.P. e JACOBY H.I. Endothelin-1-induced nociception. **Life Sci.**, 49: PL61-PL65, 1991.
- RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J.; LEE, D.K. e JACOBY, H.I. Characterization of endothelin-induced nociception in mice: evidence for a mechanistically distinct analgesic model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278: 1-7, 1996.
- REGOLI, D. e BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32: 1-46, 1980.
- RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE T.; SCHADE F.U.; MAMAT U.; SCHMIDT G., LOPPNOW H.; ULMER A.J.; ZHRINGER U.; SEYDEL U.; DI PADOVA F.; SCHRIER, M. e BRADE H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.**, 8: 217-225, 1994.
- ROBINSON, D.R. e LEVINE, L. Prostaglandin concentrations in synovial fluid in rheumatic diseases: action of indomethacin and aspirin. In: H.J. Robinson and J.R. Vane (Eds.). *Prostaglandin Synthetase Inhibitors*. Raven Press, New York, pp. 223-228, 1973.
- ROBINSON, D.R.; TASHJIAN Jr, A H. e LEVINE, L. Prostaglandin-induced bone resorption by rheumatoid synovia. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, 88: 146-160, 1975.
- ROCHA, F.A.; ANDRADE, L.E.; RUSSO, M. e JANCAR, S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal**, 16: 1-10, 1997.
- ROSENTHALE, M.E.; KASSARICH, J. e SCHENEIDER Jr., F. effect of anti-inflammatory agents on acute experimental synovitis in dogs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 122: 693-696, 1966.
- ROTHENBERG, R.J. Modulation of prostaglandin E₂ synthesis in rabbit synoviocytes. **Arthritis Rheum.**, 30: 266-274, 1987.
- ROTHCHILD, A.M. e GASCON, L.A. Sulphuric esters of polysaccharides as activators of a bradykinin-forming system in plasma. **Nature**, 212: 1364, 1966.
- RUBANYI, G.M. e POLOKOFF, M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. **Pharmacol. Rev.**, 46: 325-415, 1994.
- RUDDY, S. e COLTEN, H.R. Rheumatoid arthritis. Biosynthesis of complement proteins by synovial tissues. **N. Engl. J. Med.**, 290: 1284-1288, 1974.
- RUDDY, S.; BRITTON, M.C.; SCHUR, P.H. e AUSTEN, K.F. Complement components in synovial fluid: activation and fixation in seropositive rheumatoid arthritis. **Ann. Acad. Sci. N. Y.**, 168: 161-172, 1969.

- RUETTEN, H. e THIEMERMANN, C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. **J. Physiol. Pharmacol.**, 48: 675-688, 1997.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J. e WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 115: 1265-1275, 1995.
- 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.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; INOUE, A.; RYAN, U.S.; KIMURA, S.; MITSUI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 175: 44-47, 1991.
- SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M. e MASAKI, T. Molecular characterization of endothelin receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 13: 103-108, 1992.
- SALMON, J.A.; HIGGS, G.A.; VANE, J.R.; BITENSKI, I.; CHAYEN, I.; HENDERSON, B. e CASHMAN, B. Synthesis of arachidonate cyclooxygenase products by rheumatoid and nonrheumatoid synovial lining in nonproliferative organ culture. **Ann. Rheum. Dis.**, 42: 36-39, 1983.
- SAMPAIO, A. L. F.; RAE, G. A.; D'ORLEANS-JUSTE, P. E HENRIQUES, M. G. M. O. ET_A receptor antagonists inhibit allergic inflammation in the mouse. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26 (suppl. 3): 416-418, 1995.
- SANO, H.; HLA, T.; MAIER, J.A.; CROFFORD, L.J.; CASE, J.P.; MACIAG, T. e WILDER, R.L. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. **J. Clin. Invest.**, 89: 97-108, 1992
- SANTER, V.; SRIRATANA, A. e LOWTHER, D.A. Carrageenin-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, 13: 160-168, 1983.
- SARTOR, R.B. Importance of intestinal mucosal immunity and luminal bacterial cell wall polymers in the aetiology of inflammatory joint diseases. **Baillieres Clin. Rheumatol.**, 3: 223-245, 1989.
- SARTOR, R.B. Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 11 (Suppl. 3): 17-22, 1997.
- SCHAIBLE, H-G. e GRUBB B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, 55: 5-54, 1993.
- SCHAIBLE, H-G. e SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. **J. Physiol. (Lond)**, 403: 91-104, 1988.
- SCHLETTER, J.; HEINE, H.; ULMER, A.J. e RIETSCHER, E.T. Molecular mechanisms of endotoxin activity. **Arch. Microbiol.**, 164: 383-389, 1995.

- SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H.O. e TOREBJORK, H.E. Sensitization of insensitive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiol.** (Lond), 480: 389-394, 1994.
- SHOWELL, H.J.; CONKLYN, M.J.; ALPERT, R.; HINGORANI, G.P.; WRIGHT, K.F. SMITH, M.A.; et al. The preclinical pharmacological profile of the potent and selective leukotriene B4 antagonist CP-195543. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 285: 946-954, 1998.
- SCHUMACHER, H.R. e KITRIDOU R.C. Synovitis of recent onset. A clinical pathologic study during the first months of disease. **Arthritis Rheum.**, 15: 465-485, 1972.
- SCHUMACHER JR., H.R, "Rheumatoid Arthritis- effects on a joint". In: **Primer on the Rheumatic Diseases**, H. R. Schumacher, Jr. (Ed.), Arthritis Foundation, Georgia, 1996.
- SCHUMANN, R.R.; LEONG, S.R.; FLAGGS, G.W.; GRAY, P.W.; WRIGHT, S.D.; MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S. e ULEVITCH, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**, 249: 1429-1431, 1990
- SCHWARTING, A.; SCHLAAK, J.; LOTZ, J.; PFERS, I., MEYER-ZUMBUSCHENFELDE, K.H. e MAYET, W.J. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). **Scand. J. Rheumatol.**, 25: 246-256, 1996.
- SEABROOK, G.R.; BOWERY, B.J.; HILL, R.G. Bradykinin receptors in mouse and rat isolated superior cervical ganglia. **Br. J. Pharmacol.** 115: 368-372, 1995.
- SESSA, W.C.; KAW, S.; HECKER M. e VANE, J.R. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 174: 613-618, 1991.
- SHAGRA-LEVINE, Z.; GALRON, R. e SOKOLOVSKI, M. Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. **Biochemistry**, 33: 14656-14659, 1994.
- SHARMA, J.N. e BUCHANAN, W.W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. **Exp. Toxicol. Pathol.**, 46: 421-433, 1994.
- SHINKAI-GOROMARU, M.; SAMEJIMA, H. e TAKAYANAGI, I. The significant role of endothelin-3 in potentiating electrically stimulated contractions of the rat iris sphincter. **Gen. Pharmacol.**, 28: 365-369, 1997.
- SHIRAIISHI, A.; DUDLER, J. e LOTZ, M. The role of IFN regulatory factor-1 in synovitis and nitric oxide production. **J. Immunol.**, 159: 3549-3554, 1997.
- SHOWELL, H.J.; CONKLYN, M.J.; ALPERT, R.; HINGORANI, G.P.; WRIGHT, K.F., et al. The Preclinical Pharmacological Profile of the Potent and Selective Leukotriene B4 Antagonist CP-195543. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 285: 946-954, 1998.
- SIDDALL, P.J. e COUSINS, M.J. Pain mechanisms and management: an update. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 22: 679-688, 1995.

- SILBERBERG, S.D.; PODER, T.C. e LACERDA, A. Endothelin increases single channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells. **FEBS Lett.**, 247: 68-72, 1989.
- SILVERI, F.; DE ANGELIS, R.; ARGENTATI, F.; BRECCIAROLI, D., MUTI, S. e CERVINI, C. Hypertrophic osteoarthropathy: endothelium and platelet function. **Clin. Rheumatol.**, 15: 435-439, 1996.
- SIMONSON, M.S.; JONES, J.M. e DUNN, M.J. Differential regulation of fos and jun gene expression and AP-1 cis-element activity by endothelin isopeptides. Possible implications for mitogenic signaling by endothelin. **J. Biol. Chem.**, 267: 8643-8649, 1992.
- SIROIS, M.G.; FILEP, J.G.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; PLANTE, G.E. e SIROIS, P. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A2. **Eur. J. Pharmacol.**, 214: 119-125, 1992.
- SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 15: 561-571, 1995.
- STANKOVA, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P. e ROLA-PLESZCZYNSKI, M. ET-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. **Am. J. Physiol.**, 271: C1073-C1078, 1996.
- STEEN, K.H.; STEEN, A.E.; KREYSEL, H.W. e REEH, P.W. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. **Pain**, 66: 163-170, 1996.
- STIMPSON, S.A.; ESSER, R.E.; CARTER, P.B.; SARTOR, R.B.; CROMARTIE, W.J. e SCHWAB, J.H. Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. **J. Exp. Med.**, 165: 1688-1702, 1987.
- STIMPSON, S.A.; DALLDORF, F.G.; OTTERNESS, I.G. e SCHWAB, J.H. Exacerbation of arthritis by IL-1 in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. **J. Immunol.**, 140: 2964-2969, 1988.
- STOJILKOVIC, S.S.; VUKICEVIC, S. e LUYTEN, F.P. Calcium signaling in endothelin- and platelet-derived growth factor-stimulated chondrocytes. **J. Bone Miner. Res.**, 9: 705-714, 1994.
- STURGE, R.A.; YATES, D.B.; GORDON, D.; FRANCO, M.; PAUL, W.; BRAY, A. e MORLEY, J. Prostaglandin production in arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 37: 315-320, 1978.
- SUGIURA, M.; INAGAMI, T. e KON, V. Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 161: 1220-1227, 1989.
- TAKASAKI, C.; TAMIYA, N.; BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z. e KOCHVA, E. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. **Toxicon.**, 26: 543-548, 1988.

- TOKUNAGA, M.; OHUCHI, K.; YOSHIZAWA, S.; TSURUFUJI, S.; RIKIMARU, A. e WAKAMATSU, E. Change of prostaglandin E level in joint fluids after treatment with flurbiprofen in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 40: 462-465, 1981.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenan incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48: 421-427, 1992.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, 251: 173-179, 1994.
- TONUSSI, C.R. Estudo dos mediadores periféricos da nocicepção inflamatória em articulações estimuladas uma única vez ou re-estimuladas. Ribeirão Preto, 1996, 106p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B₂ receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B₁ receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 326: 61-65, 1997.
- TRANG, L.E.; GRANSTROM, E. e LOVGREN, O. Levels of prostaglandins F₂ alpha and E₂ and thromboxane B₂ in joint fluid in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, 6: 151-154, 1977.
- TURNER, A.J.; e MURPHY, L.J. Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. **Biochem. Pharmacol.**, 51: 91-102, 1996.
- UCHIDA, Y.; HAMADA, M.; KAMEYAMA, M.; OHSE, H.; NOMURA, A.; HASEGAWA, S. e HIRATA, F. ET-1 induced bronchoconstriction in the early phase but not late phase of anesthetized dogs is inhibited by indomethacin and ICI 198615. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 183: 1197-1202, 1992a.
- UCHIDA, Y.; NINOMIYA, H.; SAKAMOTO, T.; LEE, J.Y.; ENDO, T.; NOMURA, A.; HASEGAWA, S. e HIRATA, F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189: 1196-1201, 1992b.
- ULEVITCH, R.J. e TOBIAS, P.S. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. **Curr. Opin. Immunol.**, 6: 125-130, 1994.
- UNKELESS, J.C. e WRITH, S.D. Phagocytic cells: Fcγ and complement receptors. In: **Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates**, Gallin J., Goldstein, I.M. e Snyderman R. (Eds.) Raven Press, New York, pp.343-362, 1988.
- USLU, T.; EREM, C.; TOSUM, M. e DEGER, O. Plasma endothelin-1 levels in Behcet's disease. **Clin. Rheumatol.**, 16: 59-61, 1997.
- VAN ARMAN, G.G.; CARLSON, R.P.; RISLEY, E.A., THOMAS, R.H. e NUSS, G.W. Inhibitory effects os indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 175: 459-468, 1970.
- VAN LENT, P.L., HOLTHUYSEN, A.E., VAN DEN BERSSELAAR, L., VAN ROOIJEN, N., VAN DE PUTTE, L.B. e VAN DEN BERG, W.B. Role of macrophage-like synovial lining cells in localization and expression of experimental arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, 101: 83-89, 1995.

- VAN LENT, P.L.; VAN DEN HOEK, A.; VAN DEN BERSSELAAR, L.; DIJKSTRA, C.D.; VAN ROOIJEN, N. e VAN DEN BERG, W.B. Role of synovial macrophages in experimental arthritis. **Res. Immunol.**, 143: 229-234, 1992.
- VEMULAPALLI, S.; CHIU, P.J.; RIVELLI, M.; FOSTER, C.J. e SYBERTZ, E., J. Modulation of circulating endothelin levels in hypertension and endotoxemia in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 18 (Suppl. 6) 895-903, 1991.
- WANG, Y.; ROSE, P.M.; WEBB, M.L. E DUNN, M.J. Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ET_A or ET_B. **Am. J. Physiol.**, 267: C1130-C1135, 1994.
- WARTHON, J.; RUTHERFORD, R.A.; WALSH, D.A.; MAPP, P.I.; KNOCK, G.A.; BLAKE, D.R. e POLAK, J.M. Autoradiographic localization and analysis of endothelin-1 binding sites in human synovial tissues. **Arthr. Rheum.**, 35: 894-899, 1992.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. e GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, 63: 289-302, 1995.
- WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E.P.; GOEHLER, L.E.; SMITH, K.P.; MARTIN, D. e MAIER, S.F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, 654: 15-26, 1994.
- WEBB, D.J. Endothelin: from molecule to man. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 44: 9-20, 1997.
- WEBB, M.L. e MEEK, T.D. Inhibitors of endothelin. **Med. Res. Rev.**, 17: 17-67, 1997.
- WEISSMAN, G. "Tissue injury in rheumatic diseases". In: **Cecil Textbook of Medicine**, J.C. Bennet and F. Plum (Eds.), 20a. edição, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1448-1454, 1996.
- WENG, H.R.; LAIRD, J.M.; CERVERO, F. e SCHOUENBORG, J. GABA_A receptor blockade inhibits A beta fibre evoked wind-up in the arthritic rat. **Neuroreport**, 9: 1065-1069, 1998.
- WOOD, N.C.; SYMONS, J.A. DICKENS, E. e DUFF, G.W. In situ hybridization of IL-6 in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, 87: 183-189, 1993.
- WU, T.; RIEVES, R.D.; LARIVÉE, P.; LOGUN, C.; LAWRENCE, M.G. e SHELHAMER, J.H. Production of eicosanoids in response to endothelin-1 and identification of specific endothelin-1 binding sites in airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 8: 282-290, 1993.
- WU-WONG, J.R.; CHIOU, W.J.; DIXON, D.B. e OPGENORTH, T.J. Dissociation characteristics of endothelin ET_A receptor agonists and antagonists. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26 (Suppl. 3): S380-S384, 1995.
- XIN, X.; CAI, Y.; MATSUMOTO, K.; AGUI, T. Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells. **Endocrinology**, 136: 132-137, 1995.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; ASANO, H. e MIZUGUCHI, T. Analysis of the role of endothelin-A and endothelin-B receptors on nociceptive information transmission in the spinal cord with FR139317, an endothelin-A receptor antagonist, and sarafotoxin S6c, an endothelin-B receptor agonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 271: 156-163, 1994.

- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by Bvascular endothelial cells. **Nature**, 332: 411-415, 1988.
- YOSHIDA, H.; OHHARA, M. e OHSUMI, K. Production of endothelin-1 by cultured human synoviocytes. **Clin. Chim. Acta**, 259: 187-189, 1997.
- YOSHIDA, H.; IMAFUKU, Y.; OHHARA, M.; MIYATA, M.; KASUKAWA, R.; OHSUMI, K. e HORIUCHI, J. Endothelin-1 production by human synoviocytes. **Ann. Clin. Biochem.**, 35: 290-294, 1998.
- YOSHISAWA, T.; KIMURA, S.; KANASAWA, I.; UCHIYAMA, Y.; YANAGISAWA, M. e MASAKI, T. Endothelin localized in the dorsal horn and acts on the spinal neurons: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. **Neurosci. Lett.**, 102: 179-184, 1989.
- YOSHIZUMI, M.; KURIHARA, H.; MORITA, T.; YAMASHITA, T.; OH-HASHI, Y.; SUGIYAMA, T.; TAKAKU, F.; et al. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 166: 324-329, 1990.
- ZOPPI, M. e CHRUBASIK. Neural control of joint pain. **Rheum. Pain**, 1: 2-8, 1997.