

**RAFAELA FRANCO CLAUDINO**

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E MOLECULAR DOS  
MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EDEMA DE PATA INDUZIDO  
PELA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis - SC  
2006

CLAUDINO, Rafaela Franco. **Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) em camundongos.** Florianópolis, 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 21/02/2006.

A PGE<sub>2</sub> é sintetizada em vários tecidos e exerce inúmeras ações no organismo, especialmente no controle da dor e da inflamação. Apesar da importância da PGE<sub>2</sub> ser reconhecida no processo inflamatório, os subtipos de receptores e as vias de sinalização envolvidas nas ações inflamatórias da PGE<sub>2</sub> ainda não estão completamente elucidados. Este estudo avaliou alguns dos mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos. A injeção intraplantar (i.pl.) de PGE<sub>2</sub> produziu formação de edema de maneira dependente de dose e de tempo. O edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> foi inibido de maneira significativa pela co-injeção com o antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> L826266. Da mesma maneira, a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> parece decorrer, pelo menos em parte, da estimulação da proteína G<sub>i</sub>, da enzima fosfolipase C (PLC), da proteína quinase C (PKC) bem como das proteínas quinase ativadas por mitógenos: ERK, JNK e p-38 MAPK. A ativação de fibras sensoriais, do receptor TRPV1 e liberação de taquicininas, provavelmente SP, são eventos importantes na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Adicionalmente, a degranulação de mastócitos e síntese de eicosanóides parecem participar de maneira importante na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Nossos resultados contribuem para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias mediadas pela PGE<sub>2</sub> e sugerem o emprego de antagonistas seletivos para o receptor EP<sub>3</sub> como uma possível opção terapêutica para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

PGE<sub>2</sub>, edema de pata, Carragenina, Capsaicina, TRPV1, MAPKs, camundongos, inflamação

*" Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.  
Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida"*

*S. Carey*

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Renato e Goreti e a minha irmã Renata por todo o apoio, incentivo, dedicação, paciência e principalmente pelo amor, dedicados durante toda minha vida.

Ao professor Dr. João Batista Calixto, meu especial agradecimento pela inestimável orientação que possibilitou meu crescimento científico e, sobretudo pelo apoio, paciência, pela rigidez e incentivo constantes e pelo exemplo de competência, dedicação, determinação e perseverança.

Aos amigos Candida Kassuya e Juliano Ferreira, em reconhecimento pela orientação e valiosas sugestões oferecidas, fundamentais para a realização deste trabalho e principalmente pela amizade, essencial para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Jackson, pelo amor transmitido a cada dia, por dar significado à minha vida, pelo constante incentivo, apoio e companheirismo.

Ao Dariu, Elizabeth e Alexandre Carneiro que me acolheram em sua família com muito carinho, amizade e respeito.

Ao meu amigo Leandro Carneiro, pela amizade e pelos momentos, de muita descontração, regados a muitas risadas, imprescindíveis na vida cotidiana.

---

À Dra. Patrícia Stuelp Campelo, por ter despertado em mim o interesse pela ciência.

À tia Rosa e tio Celso, por me tratarem como uma filha, pelo respeito e admiração.

Aos alunos de pós-doutorado: Janice Koepp, Maria Martha Campos, Octávio Menezes e Tânia Mazzuco pela inestimável ajuda.

Aos grandes amigos Carlos e Allisson, pela amizade, apoio, pelos momentos de alegria, companheirismo e principalmente “suporte técnico” nesse tempo em que trabalhamos juntos. *“Sem vocês eu nada seria”*

Aos grandes amigos que aqui conquistei e que, com carinho, compreensão, amizade e amor, contribuíram para a realização desta etapa da minha vida: Ana Carolina, Andrey, Dani Leite, Edinéia, Eunice, Isa, Maria Fernanda e William.

Aos amigos “extra farmacologia”, que foram presença constante, por compartilhar os momentos de dificuldades bem como das minhas conquistas.

À grande amiga Joice pela simplicidade, carinho e companheirismo, que fazem você uma pessoa tão especial.

---

As meninas do “Lab Rosa” laboratório da professora Rosa, em especial às amigas Mariana, Sílvia e Sofia, por proporcionar muitos momentos de alegria e descontração que nunca esquecerei.

Aos meus colegas de laboratório: Aline, Ana Flávia, Betinha, Bruna, Cibele, Daniela Balz, Daniela Cabrini, Denise, Gabriel, Giselle, Gustavo, Jony, Juliana, Julio, Mariem, Marina, Martina, Michel, Nara, Niraldo, Patrícia, Robson, Rodrigo e Valfredo por tornarem o meu dia-a-dia um constante aprendizado e divertimento.

Aos colegas de turma de mestrado: Edinéia, Fabrício Pamplona, Fabrício do Monte, Inácio, Luciano, Marcília, Mariana, Patrícia e Rebeca.

Ao professor Dr. Giles por dar a oportunidade de continuar no meio científico, dentro do departamento de Farmacologia. Muito obrigada!

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia pela transmissão de conhecimentos.

Ao Pedro e toda a equipe do biotério. Ao pessoal da limpeza e da segurança. A eles agradeço por toda ajuda.

Aos funcionários da secretaria, Diana, Goretti e Rita, pela constante atenção e disponibilidade.

---

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),  
pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

Enfim,

A todos que de alguma forma participaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

---

---

Lista de abreviações.....	i
Lista de figuras.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
Enzima ciclooxigenase e PGE <sub>2</sub> .....	6
Receptores para os prostanóides.....	9
Vias de sinalização celular dos receptores EP.....	11
Receptores EP <sub>1</sub> .....	11
Receptores EP <sub>2</sub> .....	13
Receptores EP <sub>3</sub> .....	14
Receptores EP <sub>4</sub> .....	15
Receptores prostanóides na inflamação.....	17
OBJETIVOS.....	18
1. Objetivo geral.....	19
2. Objetos específicos.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
1. Animais.....	21
2. Procedimentos experimentais.....	21
2.1. Medida do edema de pata.....	21
2.2. Análise da participação dos subtipos de receptores EP.....	22
2.3. Análise da participação da proteína G do tipo inibitória (G <sub>i</sub> ) e da PLC.....	23
2.4. Análise da participação de algumas de proteínas quinases.....	23
2.5. Participação das fibras sensíveis a capsaicina.....	24
2.6. Análise da participação do receptor vanilóide 1 (TRPV1).....	25

---



---

2.7. Análise da participação das taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).....	25
2.8. Participação dos mastócitos .....	26
2.9. Análise da participação de produtos das ciclooxigenases (COX).....	26
2.10. Ativação de MAPKs e PKC após a injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	27
3. Drogas e reagentes.....	28
4. Análise estatística.....	29
RESULTADOS.....	31
1. Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	32
2. Efeito dos inibidores seletivos na indução funcional do receptor B <sub>1</sub> .....	33
3. Caracterização dos subtipos de receptores EP envolvidos na resposta edematogênica induzida pela carragenina na pata de camundongos.....	35
4. Participação da proteína G do tipo inibitória (G <sub>i</sub> ) e da PLC .....	37
5. Participação de proteínas quinases.....	38
6. Ativação da PKC- $\alpha$ após a injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	39
7. Ativação das MAPKs após a injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	41
8. Participação das fibras sensíveis a capsaicina.....	44
9. Participação do receptor vanilóide 1 (TRPV1).....	45
10. Participação das taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).....	47
11. Participação dos mastócitos.....	49
12. Participação de derivados de COX.....	50
DISCUSSÃO.....	51

---

REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO.....	99

---

**ABREVIações**

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>AMPc</b>	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DAG</b>	Diacil glicerol
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dose efetiva necessária para obter 50% do efeito máximo causado pelo agonista
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose necessária para inibir 50% do efeito máximo causado pelo agonista
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DNAc</b>	Ácido desoxiribonucléico complementar
<b>DP</b>	Receptores prostanóides (PGD <sub>2</sub> )
<b>EP</b>	Receptores prostanóides (PGE <sub>2</sub> )
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>ERK</b>	Proteína quinase regulada por estímulos extracelular
<b>FP</b>	Receptores prostanóides (PGF <sub>2α</sub> )
<b>GRD</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>GTP</b>	Guanosina 3,5-trifosfato cíclico
<b>HOX</b>	Hidroxiperoxidase
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IP</b>	Receptores prostanóides (PGI <sub>2</sub> )
<b>i.pl.</b>	Intraplantar

---

<b>JNK</b>	Proteína quinase c-Jun-N-terminal
<b>Kd</b>	Constante de dissociação
<b>LOX</b>	Lipooxigenase
<b>MAPKs</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>MAPKK</b>	MAPK quinases
<b>MAPKKK</b>	MAPK quinases quinases
<b>MEK 1</b>	Enzima regulatória da síntese da ERK
<b>NKA</b>	Neurocinina A
<b>NKB</b>	Neurocinina B
<b>NK1</b>	Receptor taquicinérgico tipo 1
<b>NK2</b>	Receptor taquicinérgico tipo 2
<b>NK3</b>	Receptor taquicinérgico tipo 3
<b>PAF</b>	Fator de ativação plaquetária
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGES</b>	Prostaglandina E sintetase
<b>PGES c</b>	Prostaglandina E sintetase citosólica
<b>PGES m</b>	Prostaglandina E sintetase associada a membrana
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub> (prostaciclina)
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol-4,5 bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinase A

<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLA<sub>2</sub> c</b>	Fosfolipase A <sub>2</sub> citosólica
<b>PLA<sub>2</sub> s</b>	Fosfolipase A <sub>2</sub> secretada
<b>PLA<sub>2</sub> i</b>	Fosfolipase A <sub>2</sub> citosólica independente de cálcio
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PLD</b>	Fosfolipase D
<b>PMA</b>	13-acetato-12-miristato-forbol
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>SAPK</b>	Proteínas quinase ativadas por estresse
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>SP</b>	Substância P
<b>TP</b>	Receptores prostanóides (TXA <sub>2</sub> )
<b>TRPV1</b>	Receptor vanilóide do tipo 1
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>

Figura 1 – Cascata da biossíntese de prostaglandinas.....	06
Figura 2 - Representação esquemática das isoformas do receptor EP <sub>3</sub> em camundongos e bovinos .....	15
Figura 3 - Edema de pata induzido pela PGE <sub>2</sub> .....	32
Figura 4 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP <sub>2</sub> , EP <sub>3</sub> e EP <sub>4</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE <sub>2</sub> na pata de camundongos .....	34
Figura 5 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP <sub>2</sub> , EP <sub>3</sub> e EP <sub>4</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela Carragenina na pata de camundongos.....	36
Figura 6 - Efeito da <i>toxina pertussis</i> sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE <sub>2</sub> na pata de camundongos .....	37
Figura 7 - Efeito dos inibidores seletivos de PKC, PKA e MAPKs sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE <sub>2</sub> .....	38
Figura 8 - Decurso temporal para a ativação da proteína quinase C (PKC- $\alpha$ ) após a injeção de PGE <sub>2</sub> (3 nmol/pata). Efeito do antagonista do receptor EP <sub>3</sub> sobre a ativação da PKC- $\alpha$ .....	40
Figura 9 – Decurso temporal para a ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos após a injeção de PGE <sub>2</sub> .....	42
Figura 10 - Efeito do antagonista do receptor EP <sub>3</sub> sobre a ativação das MAPKs ....	43
Figura 11 - Efeito do tratamento neonatal com veículo ou capsaicina sobre o edema de pata induzido pela PGE <sub>2</sub> .....	44
Figura 12 - Efeito dos antagonistas para o receptor TRPV1 sobre a resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> e capsaicina em camundongos.....	46
Figura 13 - Efeitos dos antagonistas seletivos para os receptores NK <sub>1</sub> , NK <sub>2</sub> , NK <sub>3</sub> na resposta edematogênica induzida pela PGE <sub>2</sub> e capsaicina.....	48
Figura 14 - Efeito do tratamento com cromoglicato de sódio sobre a resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	49

Figura 15 - Efeito dos inibidores seletivos das enzimas COX-1 e COX-2 sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>..... 50

Figura 16 - Mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>..... 69

**RESUMO**

As prostaglandinas, especialmente a PGE<sub>2</sub>, são importantes mediadores pró-inflamatórios e os seus papéis em muitos eventos do processo inflamatório, como a vasodilatação, eritema, aumento da permeabilidade e dor, têm sido extensivamente estudados. Apesar da importância da PGE<sub>2</sub> ser reconhecida no processo inflamatório, os subtipos de receptores e as vias de sinalização envolvidas nas ações inflamatórias da PGE<sub>2</sub> ainda não estão completamente elucidados. Este estudo avaliou alguns dos mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos. A injeção intraplantar (i.pl.) de PGE<sub>2</sub> (0,1-10,0) nmol/pata induziu formação de edema de maneira dependente de dose e tempo, com DE<sub>50</sub> de 0,42 nmol/pata. O edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, assim como o da carragenina, foi inibido de maneira significativa pela co-injeção com o antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> L826266 (10 nmol/pata), mas não dos receptores EP<sub>2</sub> AH6809 (10 nmol/pata) ou EP<sub>4</sub> L161982 (10 nmol/pata). Da mesma maneira, a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> foi inibida de modo marcante tanto pelo tratamento com a toxina pertussis como pelo inibidor da PLC U73122 (1 pmol/pata).

Outro aspecto investigado neste estudo foi a possível participação de alguns grupos de proteínas quinases no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Nossos resultados demonstraram que o inibidor seletivo da PKC GF109203X (3 nmol/pata), mas não da PKA H89 (3 nmol/pata), reduziu de maneira significativa o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Outra série de experimentos também demonstrou a relevante participação das MAPKs neste modelo, uma vez que os inibidores seletivos de JNK SP600125, ERK PD98059 ou p38



SB203580 (todos 30 nmol/pata) foram efetivos em reduzir, cada qual, a formação de edema. Esses resultados funcionais foram confirmados pela análise de *western blot*, que demonstrou que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> causou marcante ativação da PKC- $\alpha$  bem como das MAPK – ERK, JNK e p38 MAPK. Interessantemente, a ativação das MAPK induzida pela PGE<sub>2</sub> parece ser decorrente da ativação do receptor EP<sub>3</sub>, pois esta resposta foi quase que completamente prevenida pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub>.

Outro aspecto investigado foi a participação das fibras sensoriais no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. O tratamento dos animais no período neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) provocou redução significativa da resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Além disso, o tratamento dos animais com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1 SB366791 (1nmol/pata), ou para o receptor NK1 FK888 (1 nmol/pata), foi capaz de inibir significativamente o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Por outro lado, antagonistas seletivos de receptores NK2 (SR 48968), NK3 (142801) ou do receptor para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, CGRP<sub>8-37</sub>) não foram capazes de inibir o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. No entanto, estes antagonistas, nas mesmas doses utilizadas, foram capazes de inibir a resposta edematogênica induzida pela capsaicina (1 nmol/pata).

A importância da ativação dos mastócitos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> também foi avaliada. Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos camundongos com o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio (800  $\mu$ g/pata), 15 min antes da indução do edema, foi

capaz de reduzir a resposta induzida pela PGE<sub>2</sub>. Além disso, os metabólitos do ácido araquidônico produzidas pelas enzimas COX-1 e COX-2 parecem estar envolvidos no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, que foi inibido de maneira significativa pelo tratamento dos animais com inibidores seletivos das enzimas COX-1 ou COX-2, valeril salicilato e rofecoxib, respectivamente.

Este conjunto de resultados sugere que a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos parece ser mediada pela ativação do receptor EP<sub>3</sub>, associada à estimulação das vias de sinalização da PKC e das MAPKS, participação das fibras sensíveis à capsaicina e do receptor TRPV1. A liberação de taquicininas, provavelmente SP, atuando sobre o receptor NK<sub>1</sub> também parece estar envolvida. Além disso, a degranulação de mastócitos e a síntese de eicosanóides parecem participar de maneira importante na mediação da resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Nossos achados contribuem para a elucidação de alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias mediadas pela PGE<sub>2</sub> e sugerem o emprego de antagonistas seletivos para o receptor EP<sub>3</sub> como uma possível opção terapêutica para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

**ABSTRACT**

Prostaglandins, especially PGE<sub>2</sub>, are important pro-inflammatory mediators and their role has been extensively studied in several inflammatory events, such as vasodilatation, erythema, increase in vascular permeability and pain. In spite of the knowledge about the pivotal role of PGE<sub>2</sub> in inflammation, the receptor subtype and signaling pathways involved still remain not completely elucidated. The present study evaluated some of the mechanisms involved in PGE<sub>2</sub>-induced paw edema formation in mice. Intraplantar (i.pl.) injection of PGE<sub>2</sub> (0.1-10 nmol/paw) into mouse hind paw elicited a dose- and time-dependent edema formation, with mean ED<sub>50</sub> of 0.42 nmol/paw. PGE<sub>2</sub>; as well as carrageenan-induced paw edemas were significantly inhibited by the co-injection of a selective EP<sub>3</sub> receptor antagonist L826266 (10 nmol/paw). On the other hand, the edematogenic response evoked by these proinflammatory agents was not significantly affected by the co-administration of either EP<sub>2</sub> (AH6809, 10 nmol/paw) or EP<sub>4</sub> (L161982, 10 nmol/paw) receptor antagonists. PGE<sub>2</sub>-induced paw edema was also markedly reduced by the treatment with pertussis toxin or PLC inhibitor U73122 (1 μmol/paw).

Another aspect investigated in the present study was the possible participation of some groups of kinases in PGE<sub>2</sub>-induced paw edema. Our results clearly demonstrate that PGE<sub>2</sub>-induced paw edema was markedly prevented by the selective PKC blocker GF109203X (3 nmol/paw), but not the selective PKA blocker H89. Additional sets of experiments also indicated the relevance of MAPKs in this model, as the selective JNK SP600125, ERK PD98059 or p38 SB203580 inhibitors (all 30 nmol/paw), all markedly reduced PGE<sub>2</sub>-induced edema formation. These functional results were confirmed by

western blot analysis, which indicated that i.pl. injection of PGE<sub>2</sub> resulted in a marked activation of PKC- $\alpha$  as well as some MAPK family members – namely ERK, JNK and p38 MAPK. Of high interest, the increased expression of MAPK induced by PGE<sub>2</sub> seems to be mediated by the activation of EP<sub>3</sub> receptor subtype, as this response was almost completely prevented by the selective EP<sub>3</sub> receptor antagonist L826266.

Another aspect investigated in the present study was the possible participation of sensorial fibres in PGE<sub>2</sub>-induced paw edema. The neonatal treatment with capsaicin (50 mg/kg, s.c.) was able to reduce the edema formation induced by PGE<sub>2</sub>. Likewise, the treatment with the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (1nmol/paw) or with the NK1 receptor antagonist, FK888 (1 nmol/paw), significantly reduced PGE<sub>2</sub>-induced edema. Conversely, the co-injection of the selective NK<sub>2</sub> SR48968 (1 nmol/paw), NK<sub>3</sub> (SR14281 (0.5 nmol/paw) or CGRP (CGRP<sub>8-37</sub>, 0.5 nmol/paw) receptor antagonists had no significant effect on PGE<sub>2</sub>-induced paw edema. However, these antagonists, in the same doses, were able to produce a significant inhibition of capsaicin-induced paw edema (1 nmol/paw).

The relevance of mast cell activation for PGE<sub>2</sub>-induced paw edema was also evaluated. Our results demonstrated that pre-treatment with cromoglycate (800  $\mu$ g/paw), 15 min before PGE<sub>2</sub> injection, markedly reduced the edematogenic response evoked by PGE<sub>2</sub>. Additionally, COX-1 and -2 metabolites seem to be involved in PGE<sub>2</sub>-induced paw edema formation because PGE<sub>2</sub> response was markedly prevented by the selective COX-1 and COX-2 inhibitors, valeryl salicylate or rofecoxib, respectively.

Taken together, the present results indicate that PGE<sub>2</sub> induces paw edema in mice via stimulation of EP<sub>3</sub> receptors, in a process dependent on the activation of PKC and MAPKs, with participation of capsaicin-sensitive C fibers, and TRPV1 receptor. Tachykinins, probably SP, interacting with NK1 receptors also seems to be involved. Moreover, mast cell degranulation and eicosanoids synthesis seem to play an important role in PGE<sub>2</sub>-induced paw edema. These findings contribute to elucidate the possible mechanisms underlying PGE<sub>2</sub>-elicited inflammatory responses in mice and point out the EP<sub>3</sub> receptor antagonists as possible therapeutic options for the management of inflammatory disorders.

# INTRODUÇÃO

---

## **INTRODUÇÃO**

A inflamação pode ser definida como uma resposta do sistema imune a danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física. A resposta inflamatória tem como principal função proteger o organismo contra infecções, bem como reparar os tecidos após eventuais danos (Haanen e Vermes, 1995; Weiss, 2002). O processo inflamatório é caracterizado por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, dilatação venular e recrutamento de células para o sítio inflamatório. Estas alterações bioquímicas e celulares são reguladas por mediadores produzidos por células do sistema imune e células residentes no tecido. Na fase aguda da inflamação também existe o envolvimento de neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de monócitos migram para o sítio inflamatório (Huerre e Gounon, 1996). Estes mediadores em questão podem ser definidos como moléculas solúveis e difusíveis, e são representados por produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento, citocinas e óxido nítrico. Além destes, mediadores peptídicos (cininas, neurocininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)) e mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação plaquetária), também exercem um relevante papel no processo inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Os produtos da via metabólica do ácido araquidônico, também conhecidos como eicosanóides, possuem papel fisiológico relevante em vários sistemas como o nervoso, o cardiovascular, o gastrointestinal, o genitourinário,

o endócrino, o respiratório e o imune. Além das ações fisiológicas, os eicosanóides estão envolvidos em várias doenças inflamatórias como artrite reumatóide, asma, aterosclerose, choque endotóxico, colite ulcerativa e doença de Crohn e patologias do sistema nervoso central (Schreiber e Raedler, 1990; Heller et al., 1998; Bazan et al., 2002; Minghetti, 2004; Kojima et al., 2005).

Apesar de não se encontrarem pré-formados no interior das células, os prostanóides podem ser sintetizados rapidamente em resposta a diferentes estímulos. Os eicosanóides são considerados autacóides, ou seja, substâncias geradas localmente, que têm meia vida curta (segundos) e que exercem localmente os seus efeitos (Campbell e Halushka, 1996). Ao contrário de hormônios glicocorticóides, que apresentam efeitos sistêmicos mesmo sendo liberados em apenas um local do corpo, os prostanóides são sintetizados em uma série de tecidos e atuam como mediadores autócrinos ou parácrinos para sinalizar mudanças imediatas de função celular (Dubois et al., 1998; Hata e Breyer, 2004). Os eicosanóides compreendem quatro grupos de mediadores biológicos derivados do ácido araquidônico: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e produtos derivados de isoenzimas localizadas no citocromo P-450. O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado encontrado normalmente na forma esterificada em fosfolipídeos de membrana celular e se origina diretamente de fontes alimentares ou da conversão, nos mamíferos, a partir do ácido graxo essencial, o ácido linoléico (Wolfe e Horrocks, 1994). Através de estímulos físicos, mecânicos e/ou produzidos por diversos mediadores, o ácido araquidônico é liberado por diferentes fosfolipases (A, C e D) (Wolfe e Horrocks, 1994). As fosfolipases podem ser classificadas como dependentes ou independentes de íon cálcio. A via direta mais conhecida de



liberação do ácido araquidônico envolve a participação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Needleman et al., 1986; Akiba e Sato, 2004).

As enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) podem ser classificadas em três grupos: a PLA<sub>2</sub> citosólica (PLA<sub>2c</sub>), a PLA<sub>2</sub> secretada (PLA<sub>2s</sub>) e a PLA<sub>2</sub> citosólica independente de cálcio (PLA<sub>2i</sub>) (Yedgar et al., 2000; Chakraborti S, 2003). O ácido araquidônico livre é então metabolizado pelas enzimas ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX) para produzir prostanóides (prostaglandinas e tromboxano) e leucotrienos, respectivamente (Wong e Dennis, 1990; Yedgar et al., 2000).

A regulação da ativação da PLA<sub>2</sub> envolve processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas quinase, como PKA, PKC e MAPKs, que facilitam a translocação desta enzima do citosol para a região perinuclear do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e do envelope nuclear (Schievella et al., 1995; Glover et al., 1995; Hirabayashi et al., 1999; Chakraborti S, 2003; Simmons et al., 2004). As enzimas ciclooxigenases estão localizadas constitutivamente ou são expressas sob estimulação celular na região perinuclear. A compartimentalização celular destas enzimas facilita a eficiência da metabolização do ácido araquidônico (Hirabayashi e Shimizu, 2000).

A ciclooxigenase, também denominada como sintase da prostaglandina H<sub>2</sub> (PGHS), é uma enzima bifuncional que catalisa tanto a bis-oxigenação do ácido araquidônico para formar prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), quanto a subsequente redução peroxidativa da PGG<sub>2</sub> para formar PGH<sub>2</sub>, ambos compostos altamente instáveis (Smith e Marnett, 1991; Smith e DeWitt, 1996). A PGH<sub>2</sub> formada é o substrato para outras enzimas prostaglandina sintetases ou isomerases, que são as responsáveis pela produção de cinco principais

prostanóides bioativos gerados in vivo:  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  e  $\text{TXA}_2$ . As enzimas sintetases são expressas com alguma seletividade tecidual e geram diferentes prostaglandinas dependendo do tipo de célula (FitzGerald, 2003; Hata e Breyer, 2004). Por exemplo, na presença de PGE sintetase é gerada a  $\text{PGE}_2$ , enquanto outras sintetases específicas dão origem aos diferentes grupos de prostanóides. Desta maneira a figura 1 ilustra como, na presença de sintetases específicas, são gerados os diferentes prostanóides.

Após a sua liberação, os prostanóides podem interagir com receptores específicos, acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares, da família A ou da rodopsina. Dentro desta família, os receptores prostanóides constituem uma subfamília, que apresenta pouca homologia entre si. A nomenclatura dos receptores prostanóides é baseada no agonista endógeno que se liga preferencialmente ao receptor. Assim, os receptores DP, TP, IP, FP e EP possuem os respectivos ligantes:  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{PGE}_2$  (Coleman et al., 1994; Narumiya et al., 1999). Apesar de cada ligante se ligar com alta afinidade ao seu receptor preferencial, podem ocorrer interações cruzadas entre um prostanóide e outro receptor da mesma família (Breyer et al., 2001).

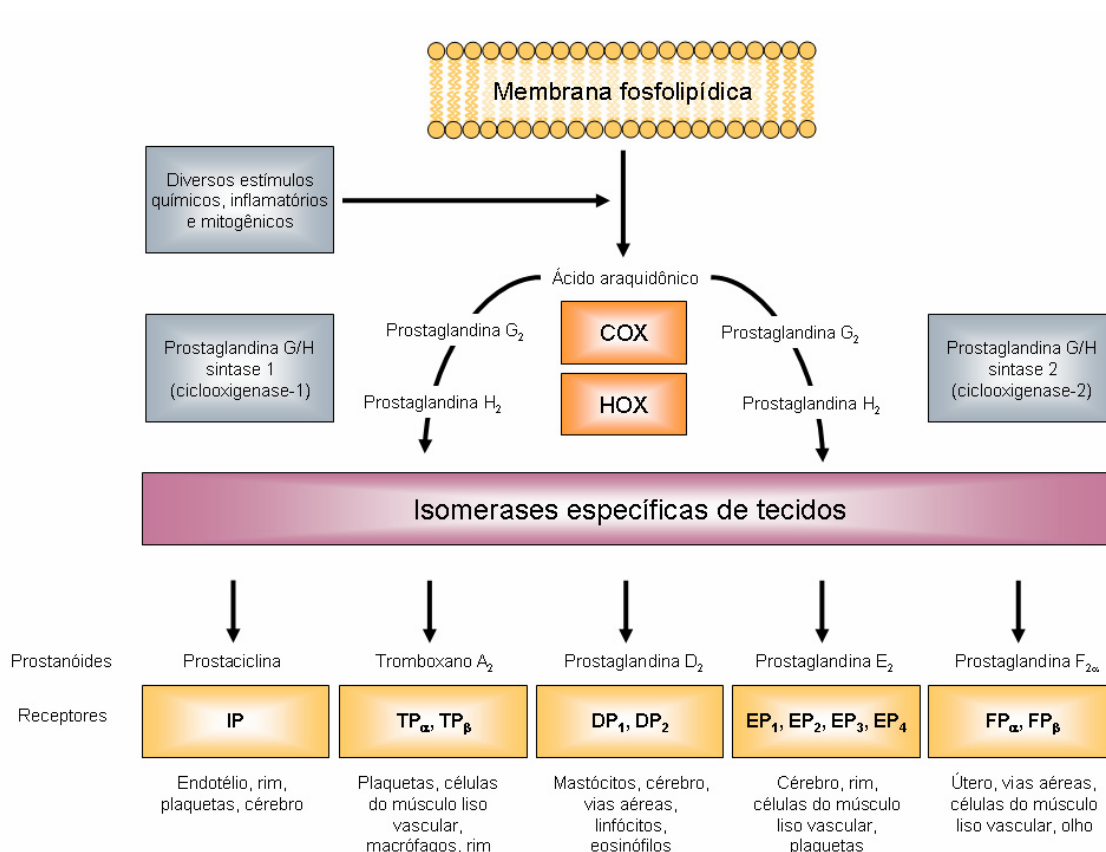


Figura 1. Cascata da biossíntese de prostaglandinas. Estímulos físicos e químicos mobilizam o ácido araquidônico a partir de fosfolípidios de membrana, e conseqüente metabolismo pela PGG<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> sintase. Estas enzimas possuem tanto atividade ciclooxigenase (COX) quanto hidroxiperoxidase (HOX) e catalizam a formação seqüencial de endoperóxidos. Estes são então metabolizados por isomerases e sintases (por exemplo, PGE sintase), que são expressas com alguma especificidade tecidual e geram diferentes prostaglandinas. Estas ativam receptores acoplados à proteína G e exercem suas ações biológicas. Adaptado de FitzGerald G.A., 2003.

### Enzima ciclooxigenase e PGE<sub>2</sub>

A enzima ciclooxigenase existe em duas principais isoformas (com aproximadamente 60% de homologia) e difere na distribuição e expressão nos tecidos (Dubois et al., 1998). Apesar de existirem exceções, a isoforma COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tecidos enquanto que a expressão de COX-2 é em geral induzida, particularmente em resposta a estímulos

inflamatórios. Assim, as prostaglandinas produzidas via COX-1 são usualmente relacionadas com um papel na homeostase fisiológica, enquanto que as sintetizadas via COX-2 geralmente estão envolvidas em processos inflamatórios (Smith et al., 2000; Simmons et al., 2004).

Recentemente foi sugerida a existência de outra isoforma de COX. A enzima recebeu erroneamente a designação de COX-3, pois na verdade trata-se de uma variante de splicing<sup>1</sup> da COX-1, que retém o íntron 1 do seu RNAm. Isto confere às proteínas COX-1 e COX-3 uma diferença de 30 a 34 aminoácidos, dependendo da espécie, dentro da região hidrofóbica (Mitchell e Warner, 2006). Esta isoforma foi inicialmente identificada em córtex cerebral de cães e em menores concentrações em outros tecidos. Em humanos, o RNAm para COX-3 foi encontrado principalmente no córtex cerebral e no coração. O papel funcional desta enzima não está totalmente elucidado, mas é pouco provável que a COX-3 apresente capacidade de sintetizar prostaglandinas em tecidos humanos devido a um deslocamento do frame de leitura da seqüência do RNAm causado pela retenção do íntron da COX-1 (Bazan e Flower, 2002; Chandrasekharan et al., 2002).

A PGE<sub>2</sub> é gerada a partir do intermediário PGH<sub>2</sub> sob ação da enzima PGES (prostaglandina E sintetase). Existem pelo menos três isoformas de PGES humanas clonadas e caracterizadas, como PGES associada à membrana (PGES-1m), PGES-2m, e PGES citosólica (PGESc) (Kojima et al., 2004). A PGESc dependente de glutathione, é expressa constitutivamente e é mais eficiente em metabolizar os produtos da COX-1 quando comparados aos da COX-2 (Claveau et al., 2003). Por outro lado, a expressão da PGESm é induzida principalmente por estímulos inflamatórios, tem sua expressão

<sup>1</sup> Splicing: Variantes de edição do RNA mensageiro.

reduzida por antiinflamatórios glicocorticóides e é funcionalmente acoplada à COX-2 (Kamei et al., 2004). Isto sugere que existe uma indução coordenada das enzimas COX-2 e mPGES em processos inflamatórios (Funk, 2001).

De fato, existem inúmeras evidências de que a produção de eicosanóides, como a PGE<sub>2</sub>, através da via da COX-2, tem um papel relevante no processo inflamatório. A COX-2 está expressa em muitos tecidos inflamados tais como a sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (Crofford et al., 1994), bem como em vários modelos experimentais de inflamação (Vane et al., 1994; Anderson et al., 1996). Por outro lado, altos níveis de PGE<sub>2</sub> são encontrados em exsudatos inflamatórios e a injeção de PGE<sub>2</sub> diretamente dentro do tecido produz uma série de sinais clássicos da inflamação (Williams e Higgs, 1988). Interessantemente, existe uma série de estudos que sugere que a PGE<sub>2</sub> atua sinergicamente com outros mediadores, como a histamina e bradicinina, especialmente na contribuição à dor e edema associados com processos inflamatórios (Kingston e Greaves, 1985; Williams e Higgs, 1988; Armstrong et al., 1995). Além dessas ações, a PGE<sub>2</sub> também pode regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em vários tipos celulares (Hinson et al., 1996; Fiebich et al., 1997; Williams e Shacter, 1997). Adicionalmente, anticorpos seletivos para a PGE<sub>2</sub> são capazes de bloquear a inflamação, hiperalgesia, assim como a produção de interleucina-6 (IL-6) na inflamação induzida pela carragenina na pata e na artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos (Portanova et al., 1996). Em conjunto, essas evidências mostram o importante papel exercido pela enzima COX-2 e pela produção de PGE<sub>2</sub> nos processos inflamatórios periféricos.

A PGE<sub>2</sub> é um prostanóide dotado de potente atividade vasodilatadora, sendo umas das substâncias responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema presentes na inflamação aguda (Solomon et al., 1968). No entanto, além das ações no processo inflamatório, a PGE<sub>2</sub> também está envolvida em diferentes funções fisiológicas. No trato gastrointestinal, a PGE<sub>2</sub> derivada da COX-1 apresenta um papel protetor na manutenção da integridade da mucosa gástrica (Woo et al., 1986; Warner et al., 1999). No aparelho urinário, a síntese de PGE<sub>2</sub> é crítica para um funcionamento normal dos rins por preservar o fluxo sanguíneo renal e os níveis de filtração glomerular em situações de estresse fisiológico, modulando o transporte de água e sais no túbulo distal e estimulando a liberação de renina das células justaglomerulares (Breyer e Breyer, 2001). Além disso, a PGE<sub>2</sub> também exerce papel relevante na manutenção da pressão arterial (Kennedy et al., 1999). No entanto, em algumas situações, a PGE<sub>2</sub> apresenta múltiplos efeitos funcionalmente inversos. Por exemplo, a PGE<sub>2</sub> é capaz de promover relaxamento e contração da musculatura lisa. Na traquéia de cachorros, a PGE<sub>2</sub> atua como dilatador, enquanto no íleo de cobaia atua como constritor (Gardiner, 1986). Da mesma maneira, a PGE<sub>2</sub> pode promover relaxamento ou contração da musculatura lisa vascular (Walch et al., 2001; Davis et al., 2004).

### **Receptores para os prostanóides**

Os receptores dos prostanóides pertencem à família A dos receptores acoplados a proteínas G (Kolakowski, 1994). Estudos filogenéticos dividiram a família A em cinco subgrupos conservados evolutivamente. Os receptores prostanóides foram enquadrados no grupo V, juntamente com receptores para

fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos como hormônios pituitários, hormônios glicoprotéicos, opióides e o fator de ativação plaquetária (PAF).

Dentro da subfamília dos receptores para prostanóides, existe cerca de 20-30% de homologia. Ao todo existem 65 resíduos de aminoácidos conservados dentro desta classe de receptores. Desses resíduos, 34 são idênticos dentro da família dos receptores prostanóides, sendo que destes, 14 resíduos são conservados em toda a família A dos receptores acoplados à proteínas G, restando apenas 20 resíduos conservados exclusivamente nos receptores prostanóides. A maioria destes encontra-se em regiões transmembranares, embora existam alguns resíduos na segunda alça extracelular do receptor (Audoly e Breyer, 1997).

Outra característica marcante dos receptores prostanóides é a existência de variantes de edição do RNA mensageiro (*splicing*), especificamente na região C-terminal intracelular. Essas variações de *splicing* parecem não afetar as propriedades de ligação do agonista ao receptor, mas interferem nas vias de transdução de sinal, assim como na fosforilação induzida por agonistas, na sua dessensibilização e internalização (Breyer et al. 2001; Bos et al., 2004).

De maneira bastante simples, os receptores prostanóides podem ser agrupados em três categorias, baseadas no tipo de proteína G à qual são acoplados, e conseqüentemente em função das respostas celulares evocadas. Como esperado, cada tipo de proteína G está relacionada com a região C-terminal dos receptores prostanóides. Na primeira categoria estão os receptores relacionados com atividade relaxante, IP, EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub> e DP, os quais geralmente ativam a subunidade  $\alpha$  da proteína G do tipo estimulatória (G<sub>s</sub>), com conseqüente estimulação da produção de AMPc pela adenilil ciclase (Adie

et al., 1992; Ichikawa et al., 1996). A segunda categoria é representada pelos receptores com atividade constritora como o TP, EP<sub>1</sub> e FP, os quais geralmente ativam a proteína G<sub>q</sub>, mediando o aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>+2</sup> (Watanabe et al., 1991; Watabe et al., 1993; Funk et al., 1993). O último grupo é representado unicamente pelo receptor EP<sub>3</sub>, o qual geralmente inibe a atividade da enzima adenilil ciclase via estimulação da proteína G do tipo inibitória (G<sub>i</sub>). Entretanto, essas vias de transdução de sinais são extremamente complexas e a natureza da proteína G, ativada por determinado receptor prostanóide, pode algumas vezes diferir entre tipos celulares, tecidos e espécies. Por exemplo, o receptor IP, que normalmente ativa a proteína G<sub>s</sub>, é capaz de ativar a G<sub>q</sub>, e em alguns casos pode ativar a G<sub>i</sub> (Schwaner et al., 1995). Além disso, os receptores EP acoplados à proteína G<sub>s</sub> podem ativar G<sub>q</sub> em determinados tipos de celulares.

### **Vias de sinalização celular dos receptores EP**

A diversidade de ações biológicas da PGE<sub>2</sub> em diferentes tecidos decorre da existência de receptores de superfície celular específicos. Esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e podem ser divididos em quatro subtipos (EP<sub>1-4</sub>), cada qual codificado por um gene distinto (Negishi et al., 1995).

### **Receptores EP<sub>1</sub>**

O receptor EP<sub>1</sub> foi originalmente descrito como constritor da musculatura lisa. O DNA complementar (DNAC) do receptor EP<sub>1</sub> já foi clonado em camundongos, ratos e humanos. O RNAm deste receptor é altamente expresso



nos rins, seguido pela mucosa gástrica e pela adrenal em camundongos (Watabe et al., 1993; Guan et al., 1998) e codifica um polipeptídeo de 405 aminoácidos (Watabe et al., 1993). O receptor EP<sub>1</sub> de ratos apresenta cerca de 96% de homologia com o receptor de camundongos e 83% de homologia com o receptor humano (Funk et al., 1993). Adicionalmente, o DNAC para o receptor EP<sub>1</sub> humano codifica um polipeptídeo com 402 aminoácidos (Funk et al., 1993).

Atualmente existem agonistas disponíveis para o receptor EP<sub>1</sub>, entretanto, também apresentam significativa afinidade por outros subtipos de receptores, como o suprostone (receptor EP<sub>3</sub>) ou o iloprost (receptor IP). Muitos antagonistas seletivos para os receptores EP<sub>1</sub> têm sido descritos, sendo importantes ferramentas farmacológicas utilizadas na caracterização dos efeitos mediados por este subtipo de receptor (Hallinan et al., 1993; Lanthorn et al., 1995). Estes antagonistas parecem apresentar atividade analgésica sem, no entanto, causar os efeitos adversos dos antiinflamatórios não esteroidais nos sistemas renal e gástrico. Estas evidências estimulam cada vez mais a pesquisa de drogas ativas que possam reduzir a dor sem causar efeitos indesejáveis (Hallinan et al., 1993).

O receptor EP<sub>1</sub> induz a mobilização de cálcio pela ativação da enzima fosfolipase C via proteína Gq. Existem relatos de que a ativação do receptor EP<sub>1</sub> leva à liberação de cálcio dependente da atividade da PLC e da ativação da PKC no tubo coletor de coelhos (Hebert et al., 1990). No entanto, Narumiya e colaboradores (1999) demonstraram que a estimulação do receptor EP<sub>1</sub> clonado de camundongos em células CHO produz aumento significativo nas concentrações intracelulares de Ca<sup>+2</sup>, no entanto com pequena geração de IP<sub>3</sub>

(Watabe et al., 1993), sugerindo a participação de outra (s) via (s) de sinalização causando mobilização do  $\text{Ca}^{+2}$ .

## **Receptores EP<sub>2</sub>**

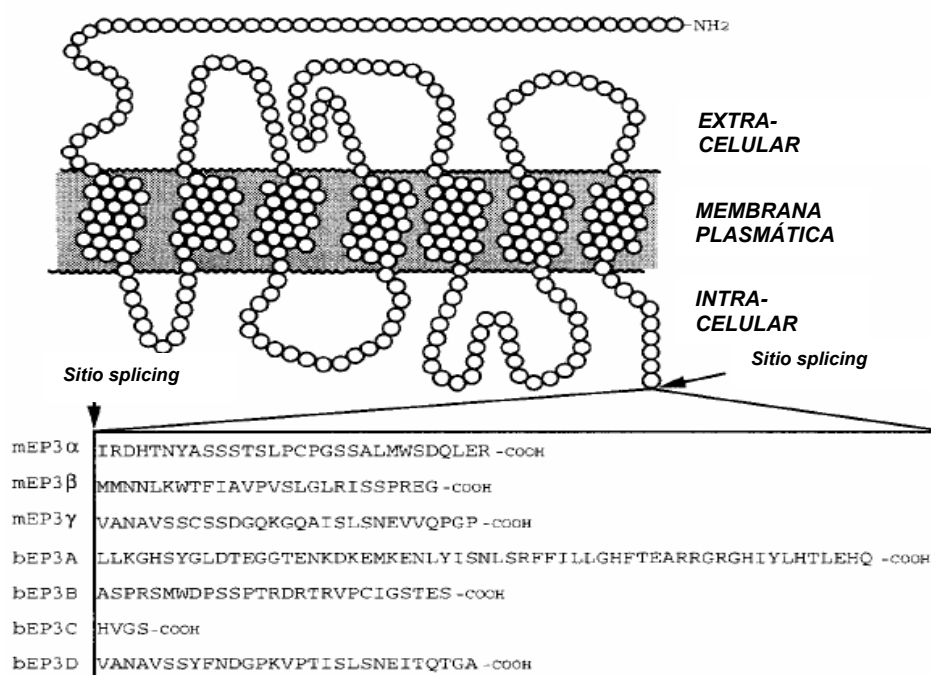
Inicialmente dois tipos de receptores foram reportados como sendo EP<sub>2</sub>, um foi originalmente clonado por Honda e colaboradores (1993) e o outro foi subsequentemente clonado por Regan e colaboradores (1994). Ambos os receptores eram capazes de ativar a adenilil ciclase. O receptor EP<sub>2</sub> é farmacologicamente definido por ser sensível ao butaprost. O clone de Regan et al. (1994) era sensível ao butaprost enquanto que o clone de Honda et al., (1993) era insensível ao butaprost. Posteriormente foi estabelecido que o receptor clonado por Honda et al (1993) foi erroneamente classificado como EP<sub>2</sub> e na verdade referia-se ao receptor EP<sub>4</sub> (Nishigaki et al., 1995).

O DNAc para o receptor EP<sub>2</sub> humano codifica uma cadeia polipeptídica de 358 aminoácidos (Regan et al., 1994). Este receptor estimula a proteína G<sub>s</sub>, levando a ativação da enzima adenilil ciclase e a consequente produção do segundo mensageiro AMPc (Nakao et al., 1989). O receptor EP<sub>2</sub> já foi clonado em camundongos, ratos, coelhos e vacas (Breyer et al., 2001). O RNA m deste receptor está presente em abundância no útero, pulmões e baço, mas apenas em baixos níveis nos rins (Regan et al., 1994; Katsuyama et al., 1995; Boie et al., 1997; Nemoto et al., 1997). Estudos funcionais têm sugerido que o EP<sub>2</sub> tem um importante papel na implantação uterina de ovócitos fecundados (Lim e Dey, 1997). Além disso, seu efeito relaxante nos bronquíolos sugere que agonistas do receptor EP<sub>2</sub> poderiam ser utilizados para o tratamento da asma e doenças pulmonares crônicas (Pavord et al., 1991; Kennedy et al., 1999).

### Receptores EP<sub>3</sub>

O receptor EP<sub>3</sub> foi originalmente identificado como constritor da musculatura (Coleman et al., 1994). Este receptor apresenta múltiplas variantes de *splicing* na região carboxi terminal (Sugimoto et al., 1993; Irie et al., 1993; Namba et al., 1993) (ver figura 2). Em humanos pelo menos oito variantes de *splicing* já foram identificadas e múltiplas variantes de *splicing* existem em outras espécies como camundongos, coelho e vacas (Breyer et al., 2001). Em camundongos, as três isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) apresentam afinidades aos agonistas idênticas, mas são funcionalmente diferentes na eficiência de ativação da proteína G (Sugimoto et al., 1993) e na susceptibilidade à dessensibilização induzida por agonistas (Negishi et al., 1993). Por exemplo, as isoformas EP3 $\alpha$  e EP3 $\beta$  se acoplam à proteína G<sub>i</sub>, mas a EP3 $\beta$  necessita de concentrações mais elevadas de agonista para a ativação da proteína G do que a EP3 $\alpha$ . Além disso, a isoforma EP3 $\alpha$ , mas não a EP3 $\beta$ , sofre dessensibilização induzida por agonista (Ichikawa et al., 1996).

Como citado anteriormente, uma característica marcante dos receptores EP<sub>3</sub> é a diversidade gerada por variantes de *splicing*. Estas variantes podem apresentar diferenças na fosforilação do receptor, dessensibilização do receptor e variações nas vias de transdução de sinais. Apesar dessas variantes geralmente inibirem a geração de AMPc via ativação da proteína G<sub>i</sub>, existem evidências de que outras vias de sinalização como G<sub>s</sub>, G<sub>13</sub> e mobilização de cálcio possam ser ativadas pelo receptor EP<sub>3</sub> (Hatae et al., 2002; Hata e Breyer, 2004).



**Figura 2.** Representação esquemática das isoformas do receptor EP<sub>3</sub> em camundongos e bovinos. cEP<sub>3 $\alpha$ - $\gamma$</sub>  (camundongos), bEP<sub>3A-D</sub> (bovino). Adaptado de Ichikawa et al., 1996.

O receptor EP<sub>3</sub> é expresso em muitos tecidos incluindo rins, útero, glândula adrenal e estômago (Breyer et al., 1994; Regan et al., 1994). Animais com deleção gênica para o receptor EP<sub>3</sub> não apresentam febre em resposta à PGE<sub>2</sub>, sugerindo que o antagonista do receptor EP<sub>3</sub> poderia ser efetivo como agente antipirético (Ushikubi et al., 1998). Recentemente, foi demonstrado que a via PGE<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub> tem uma participação importante no desenvolvimento de tumores e na angiogênese (Amano et al., 2003).

### Receptores EP<sub>4</sub>

Assim como no caso do receptor EP<sub>2</sub>, a via de sinalização do receptor EP<sub>4</sub> está relacionada com o aumento dos níveis de AMPc (Regan et al., 1994). O DNAc para o receptor EP<sub>4</sub> humano codifica uma cadeia polipeptídica de 488

aminoácidos. O receptor EP<sub>4</sub> é expresso no timo, no íleo, no pulmão, no baço, na adrenal e nos rins (Honda et al., 1993; Breyer et al., 1996; Bastien et al., 1997).

Apesar de ambos os receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> serem acoplados à proteína G<sub>s</sub> resultando em estimulação da adenilil ciclase e aumento dos níveis de AMPc (Honda et al., 1993; Regan et al., 1994), o receptor EP<sub>4</sub> se acopla mais fracamente à proteína G<sub>s</sub> do que o receptor EP<sub>2</sub> (Fujino et al., 2002). A estimulação dos receptores EP<sub>4</sub>, mas não dos receptores EP<sub>2</sub>, pela PGE<sub>2</sub> leva à fosforilação da ERK MAPK (proteína quinase regulada por sinal extracelular da família das proteínas quinase ativadas por mitógenos) (Fujino et al., 2003).

Os receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> diferem-se tanto na capacidade de ligação farmacológica como estruturalmente. O receptor EP<sub>4</sub> apresenta seqüência mais longa na cadeia C-terminal quando comparado com o receptor EP<sub>2</sub>, e contém 38 resíduos de serina e de treonina, que atuam como múltiplos sítios de fosforilação enquanto o receptor EP<sub>2</sub> apresenta uma pequena região C-terminal. Isto sugere que o receptor EP<sub>4</sub> pode ser um alvo para fosforilação dependente de agonistas bem como dessensibilização, enquanto que o receptor EP<sub>2</sub> é insensível a esses efeitos. De fato, Nishigaki e colaboradores (1996) demonstraram que o receptor EP<sub>4</sub>, mas não o receptor EP<sub>2</sub>, sofre rápida dessensibilização após estimulação por agonista. Estes estudos foram realizados em camundongos, mas análises subseqüentes do receptor EP<sub>4</sub> humano também identificaram resíduos de serina na região C-terminal que podem ser alvos para fosforilação e subseqüente dessensibilização (Bastepe e Ashby, 1999).

## **Receptores prostanóides na inflamação**

Como citado anteriormente dor, calor, rubor e tumor são sinais clássicos do processo inflamatório. Esses sintomas são causados pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular resultando na formação de edema. Estudos prévios demonstraram que as prostaglandinas são os primeiros mediadores envolvidos na vasodilatação que ocorre no processo inflamatório e sinergizam com outros mediadores como a histamina e bradicinina promovendo aumento na permeabilidade vascular e edema. Estes estudos também demonstraram que a  $PGE_2$  e a  $PGI_2$  são os prostanóides mais potentes, entre todos os prostanóides, além de estarem presentes em altas concentrações nos sítios de inflamação (Davies et al., 1984).

Apesar da importância da  $PGE_2$  ser reconhecida no processo inflamatório, os subtipos de receptores e as vias de sinalização envolvidas nas ações inflamatórias da  $PGE_2$  ainda não estão completamente elucidados. Neste estudo, nós investigamos, através da utilização de ferramentas farmacológicas e de biologia molecular, os subtipos de receptores EP, assim como algumas das vias de sinalização envolvidas na resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$  na pata de camundongos. Dentro do arsenal terapêutico para o tratamento de distúrbios inflamatórios, o medicamento ideal seria aquele com atividade antiinflamatória semelhante aos antiinflamatórios não esteroidais e com menos efeitos adversos. A compreensão dos mecanismos envolvidos na inflamação induzida pela  $PGE_2$  é de fundamental importância neste contexto.

# OBJETIVOS

---

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi analisar, através de estudos farmacológicos e de biologia molecular, alguns dos mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos.

### **2. Objetivos específicos**

2.1. Analisar, com o auxílio de antagonistas seletivos, a participação dos subtipos de receptores prostanóides na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> e carragenina na pata de camundongos.

2.2. Verificar o papel da proteína G do tipo inibitória (G<sub>i</sub>), da fosfolipase C e de algumas proteínas quinase sobre o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>.

2.3. Investigar o possível envolvimento das fibras aferentes sensíveis à capsaicina, de neuropeptídeos e do receptor vanilóide sobre o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>.

2.4. Avaliar a participação dos mastócitos sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>.

2.5. Analisar o envolvimento de produtos das ciclooxigenases sobre o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>.



# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Suíços machos (25-35g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os camundongos foram mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO), com temperatura e umidade controlada ( $22 \pm 2$  °C e 60-80%, respectivamente), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Os animais foram aclimatizados no laboratório durante um período de, pelo menos, 1 hora e os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 horas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as indicações para o cuidado com animais de laboratório e recomendações éticas para experimentos com animais conscientes (Zimmermann, 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número 262/CEAU e 23080.035334/2003-16/UFSC).

### **2. Procedimentos experimentais**

#### **2.1. Medida do edema de pata**

Os experimentos de edema de pata foram realizados conforme descrito por Campos e Calixto (1995), com pequenas modificações. Os animais receberam por via intraplantar, na pata direita, 20 µl de salina tamponada (PBS; composição em mmol/litro NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) contendo PGE<sub>2</sub> (0,1-10 nmol/pata), carragenina (300 µg/pata) ou capsaicina (1

nmol/pata). A pata esquerda recebeu o mesmo volume de PBS e foi utilizada como controle. O aumento do volume da pata foi medido pletismometricamente (Pletismômetro, Ugo Basile) em vários intervalos de tempo de acordo com cada agente flogístico (15, 30, 45 e 60 minutos; 30, 60, 120, 180 e 240; 10, 20, 30 e 60 minutos após a injeção de PGE<sub>2</sub>, carragenina e capsaicina, respectivamente). A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (μl) e tomada como índice de edema.

## **2.2. Análise da participação dos subtipos de receptores EP**

A fim de avaliar os subtipos dos receptores EP envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata), os animais receberam uma injeção intraplantar de AH6809 (um antagonista seletivo do receptor EP<sub>2</sub>, 10 nmol/pata), L826266 (um antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub>, 10 nmol/pata) ou L161982 (um antagonista seletivo do receptor EP<sub>4</sub>, 10 nmol/pata) contendo PGE<sub>2</sub>. Em outro grupo experimental, os animais receberam L826266 (0,1-10 nmol/pata) 30 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata).

Com o objetivo de verificar os subtipos de receptores EP envolvidos na resposta edematogênica induzida pela carragenina (300 μg/pata), os animais receberam uma injeção intraplantar de AH6809 (10 nmol/pata), L826266 (10 nmol/pata) ou L161982 (10 nmol/pata) contendo carragenina. Em outro grupo experimental, os animais receberam L826266 (10 nmol/pata) 120 minutos após a injeção de carragenina. As respostas inibitórias foram analisadas comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub> ou carragenina, na presença ou ausência dos antagonistas seletivos. As doses utilizadas dos inibidores foram escolhidas com base em experimentos preliminares (Kassuya et al., 2005).

### **2.3. Análise da participação da proteína G do tipo inibitória (G<sub>i</sub>) e da PLC**

Com o intuito de verificar se a proteína G sensível à toxina pertussis (G<sub>i</sub>) participa na formação do edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, os animais foram pré-tratados com toxina pertussis (10 ng/pata), 20 minutos antes da injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>. O grupo controle recebeu o mesmo volume (20 µl) de veículo, 20 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub>. A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub> em animais pré-tratados com toxinas pertussis em relação ao veículo.

Em outro grupo experimental, a fim de avaliar a participação da PLC na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>, os animais receberam injeção intraplantar de um inibidor seletivo da PLC, o U73122, na dose de 1 pmol/pata em associação com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub> na presença ou ausência deste inibidor. As doses utilizadas de toxina pertussis e do inibidor da PLC foram escolhidas com base em dados da literatura (Inoue et al., 2003, Ferreira et al., 2004).

### **2.4. Análise da participação de algumas de proteínas quinase**

Para investigar o envolvimento de algumas proteínas quinase sobre o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata), os animais receberam, em conjunto com a PGE<sub>2</sub>, inibidores seletivos das seguintes quinases: H89 (PKA, 3 nmol/pata), GF109203X (PKC, 3 nmol/pata), SP600125 (JNK, 30 nmol/pata), PD98059 (MEK, 30 nmol/pata) ou SB203580 (p38, 30 nmol/pata). As doses utilizadas dos inibidores foram escolhidas com base em dados da literatura ou

experimentos preliminares (Cunha et al. 2004; Ferreira et al., 2005; Kassuya et al., 2005).

## **2.5. Participação das fibras sensíveis à capsaicina**

A fim de avaliar o possível envolvimento das fibras sensoriais aferentes primárias sensíveis à capsaicina na formação do edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, os camundongos foram tratados durante o período neonatal (no segundo dia de vida) com capsaicina (50 mg/kg, s.c.). O tratamento foi realizado com o propósito de induzir degeneração irreversível de neurônios não-mielinizados aferentes, especialmente fibras C (Holzer, 1991). Animais do grupo controle receberam, através da mesma via de administração, volume similar de veículo utilizado para dissolver a capsaicina (etanol 10%, Tween-80 10% e PBS 80%) como descrito anteriormente por Gamse (1982). Os animais foram utilizados 6-7 semanas após o tratamento neonatal com capsaicina. Com o objetivo de comprovar se realmente ocorreu a degeneração das fibras C primárias sensíveis a capsaicina, os animais foram submetidos ao teste de limpeza dos olhos como descrito por Ikeda e colaboradores (2001). Resumidamente, 20 µl de uma solução de capsaicina 0,01% (p/v) foram instilados dentro de um dos olhos e foi contado o número de movimentos limpeza que ocorreram no período subsequente de 1 minuto. Os animais que limpam seus olhos no máximo 5 vezes foram considerados dessensibilizados. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) e medido como descrito anteriormente.

## **2.6. Análise da participação do receptor vanilóide 1 (TRPV1)**

Com o objetivo de verificar a possível participação do receptor vanilóide 1 na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>, os animais receberam injeção intraplantar dos antagonistas do receptor TRPV1 capsazepina (1 nmol/pata) ou de SB 366791 (1 nmol/pata) em associação à PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) ou à capsaicina (1 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub>, na presença ou ausência dos antagonistas. As doses utilizadas dos antagonistas foram escolhidas com base em dados da literatura (Ferreira et al., 2005).

## **2.7. Análise da participação das taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)**

Com o propósito de avaliar o envolvimento das taquicininas no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> e de capsaicina, os animais receberam os antagonistas seletivos dos subtipos dos receptores taquicininérgicos NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> ou NK<sub>3</sub>, respectivamente FK 888 (1 nmol/pata), SR 48968 (0,5 nmol/pata) ou SR 142801 (1 nmol/pata) em combinação com PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) ou capsaicina (1 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub> ou capsaicina na presença ou ausência dos antagonistas seletivos.

Para avaliar o envolvimento do CGRP no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> e da capsaicina, um grupo de animais foi tratado com um antagonista seletivo de receptores para CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (0,5 nmol/pata), em associação com PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) ou capsaicina (1 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub>, na

presença ou ausência do antagonista seletivo. As doses utilizadas dos antagonistas foram escolhidas com base em dados da literatura (Santos e Calixto, 1997; Beirith et al., 2003).

## **2.8. Participação dos mastócitos**

A participação da ativação dos mastócitos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> também foi avaliada. Para isso, os animais receberam o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio (800 µg/pata) ou veículo (PBS, 20 µl) 15 minutos antes da injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Em outro grupo experimental, o cromoglicato de sódio foi administrado 15 minutos antes da injeção do veículo (PBS, 20 µl). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub>, na presença ou ausência de cromoglicato de sódio. A dose utilizada do cromoglicato de sódio foi escolhida com base em dados da literatura (Parada et al., 2001).

## **2.9. Análise da participação de produtos das ciclooxigenases (COX)**

Com o propósito de avaliar se existe a participação de prostanóides no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, os animais receberam injeção intraplantar de valeril salicilato (10 nmol/pata), um inibidor seletivo da enzima COX-1, ou rofecoxib (10 nmol/pata), um inibidor seletivo da enzima COX-2 em associação com PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela PGE<sub>2</sub>, na presença ou ausência dos inibidores. As doses utilizadas para os inibidores foram escolhidas de acordo com dados da literatura (Bhattacharyya et al., 1995, Ferreira et al., 2005).

## 2.10. Ativação de MAPKs e PKC após a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>.

Com o objetivo de avaliar a possível ativação das MAPKs e da PKC após a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>, foi utilizada a técnica de *Western blot* como descrito previamente por Ferreira et al. (2005) e André et al. (2004) com pequenas modificações. Para tal, os animais receberam PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) na pata direita e os tecidos subcutâneos das patas injetadas foram removidos em diferentes intervalos de tempo. Em outro grupo experimental, a fim de avaliar se o pré-tratamento com o antagonista do receptor EP<sub>3</sub> L826266 era capaz de prevenir a ativação dessas proteínas quinase, os animais receberam injeção intraplantar de L826266 (10 nmol/pata) trinta minutos antes da administração de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Após 10 (ERK), 15 (JNK e p-38) ou 30 minutos (PKC- $\alpha$ ) da administração de PGE<sub>2</sub> na pata direita, os tecidos subcutâneos das mesmas foram removidos. Nos dois grupos experimentais os animais tratados com PBS foram utilizados como controle.

Nesta série de experimentos, os tecidos foram preparados como descrito por Ferreira et al. (2005). Brevemente, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão gelado contendo: tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 2mM, NaF 200 mM e inibidores de proteases (aprotinina 2  $\mu$ g/ml, fluoreto de fenilmetanosulfonila 0,1 mM, ortovanadato de sódio 2 mM). O homogenato foi submetido a uma primeira centrifugação a 1000 x g, por 10 minutos a 4 °C. O precipitado desta centrifugação foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 35000 x g, por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi considerado a fração citosólica e o precipitado a fração rica em membrana. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (*BioRad Protein Assay Kit*). As amostras foram estocadas a - 80 ° C até a utilização.



As amostras de proteínas (40 µg para JNK, 50 µg para PKC-α e 70 µg para ERK e p38 das frações citosólicas e 10 µg para a fração particulada de PKC-α) foram adicionadas em tampão contendo: Tris 200 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04% e, em seguida, foram fervidas durante 5 minutos. As proteínas, obtidas como descrito anteriormente, foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de acrilamida 10%, sendo logo depois eletrotransferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, a fim de evitar ligação não específica do anticorpo, a membrana foi incubada primeiramente com leite desnatado diluído em TBS, por um período de 60 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos para as proteínas de interesse: PKC-α, forma fosforilada para as proteínas p38, ERK e JNK (Santa Cruz Biotechnology). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunoreativas foram visualizadas utilizando-se *kit* de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech., EUA) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

### **3. Drogas e reagentes**

Foram utilizadas as seguintes drogas: AH6809 e valeril salicilato (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EUA); aprotinina, capsaicina, carragenina lambda, CGRP<sub>8-37</sub>, cromoglicato de sódio, EDTA, fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), fluoreto de sódio, glicerol, H89, ortovanadato de sódio, PGE<sub>2</sub>, tabletes de PBS, toxina pertussis, U73122 (Sigma, St. Louis, EUA); capsazepina, GF109203x, PD98059, SB203580, SB366791 e SP600125

(Tocris Cookson, Baldwin, EUA); tris-HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha);  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de bromofenol (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido); anticorpo policlonal anti-actina e anti-formas fosforiladas de PKC- $\alpha$ , JNK, p38 e ERK (Santa Cruz, Califórnia, EUA). FK888 foi gentilmente doado por Fujisawa Pharmaceutical (Osaka, Japão). SR48968 e SR142801 foram gentilmente cedidos pela Sanofi Recherche (Montpellier, França). L826266 e L161982 foram gentilmente doados pela Merck Froost (Kirkland, Canadá). O composto rofecoxib foi gentilmente doado pela Merck & Co. Inc. (Whitehouse Station, EUA). As soluções estoques da maioria das soluções foram preparadas em 100% de etanol, com exceção de cromoglicato de sódio, CGRP<sub>8-37</sub>, AH6809 que foram diluídos em água destilada, PBS e em uma solução de NaHCO<sub>3</sub> a 1%, respectivamente. Todas as drogas foram armazenadas em tubos siliconizados, mantidos a -20 °C até a utilização. Todas as drogas foram diluídas na concentração desejada, em solução de tampão fosfato (PBS) imediatamente antes do uso. A concentração final de etanol não excedeu 0,5%, a qual não apresenta efeito sobre a resposta edematogênica induzida pelos agentes flogísticos. Além disso, a solução de NaHCO<sub>3</sub> a 1%, por si só, não apresentou efeito sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> ou carragenina.

#### **4. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 7 animais por grupo, exceto os valores de DE<sub>50</sub> ou DI<sub>50</sub> (por exemplo: a dose do agonista necessária para produzir 50% da resposta edematogênica máxima ou a dose do antagonista necessária para reduzir a resposta do agonista em

50% em relação ao valor máximo do controle), que estão apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95%. Os valores de  $DE_{50}$  e  $ID_{50}$  foram calculados através do programa GraphPad Prism. As porcentagens de inibição representam a média das inibições obtidas para cada experimento individual no pico do edema (10, 30 e 120 minutos após a administração de capsaicina,  $PGE_2$  e carragenina, respectivamente). No edema de pata induzido pela carragenina, onde o antagonista L826266 foi administrado 120 minutos após a injeção do agente edematogênico, a porcentagem de inibição foi calculada com base nos resultados obtidos no tempo de 180 minutos após a carragenina. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste “t” de Student ou por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett ou Student-Newman-Keuls, quando apropriado. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância de estatística.

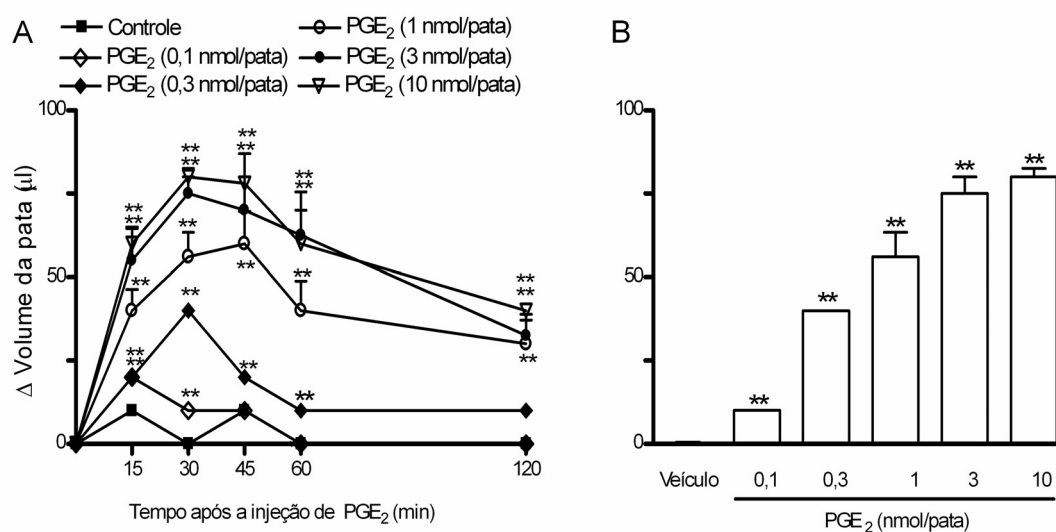
# RESULTADOS

---

## RESULTADOS

### 1. Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>

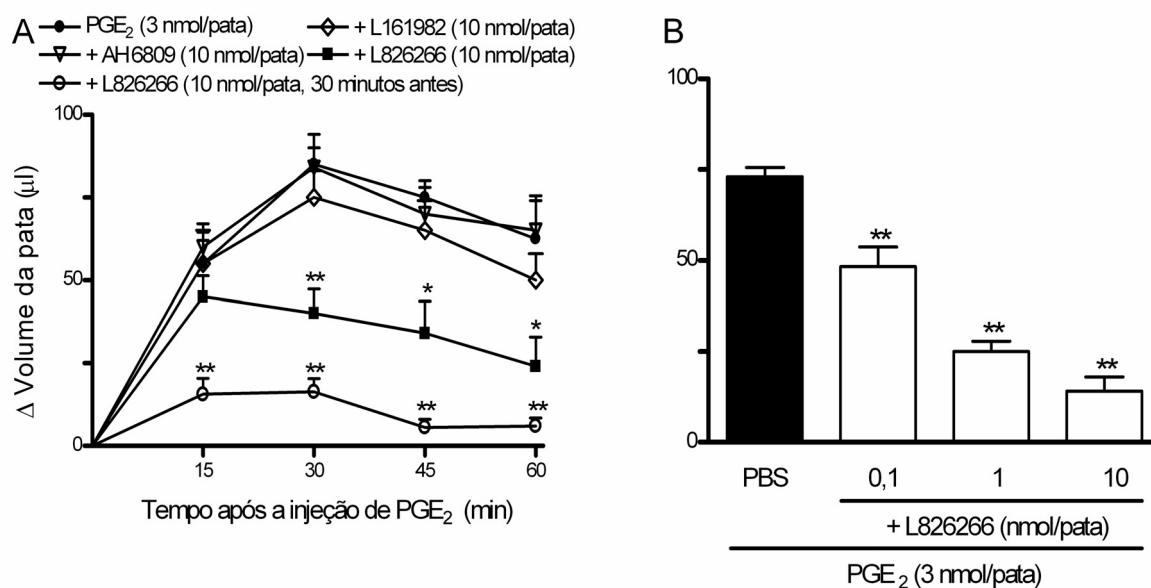
A injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (0,1-10 nmol/20µl) na pata traseira de camundongos induziu a formação de um edema local, de maneira dependente de tempo e de dose, que foi caracterizado pelo aumento no volume da pata injetada (Figuras 3Ae 3B). A resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> foi evidenciada após 15 min da aplicação, com resposta máxima em 30 minutos, diminuindo entre 30 e 120 minutos. O valor da DE<sub>50</sub> (e limite de confiança 95%) para este efeito foi 0,42 (0,29-0,54) nmol/pata e o efeito máximo foi 80,0 ± 3,0 µl (Figura 3).



**Figura 3.** Edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. (A) Efeito temporal da injeção intraplantar de diferentes doses de PGE<sub>2</sub> em camundongos. (B) Efeito dose-resposta 30 minutos após a injeção de PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos. Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 µl de PBS) e a pata tratada com PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Linhas de erro inaparentes encontram-se no interior dos símbolos. Difere significativamente do grupo controle (PBS) \*\*  $P < 0,01$ .

## 2. Caracterização dos subtipos de receptores EP envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos

Como pode ser observado na figura 4, o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> foi inibido de maneira significativa pela co-injeção do antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> L826266 (10 nmol/pata), com inibição de  $52,9 \pm 8,3\%$ . Por outro lado, a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> não foi alterada pela co-administração dos antagonistas seletivos dos receptores EP<sub>2</sub> AH6809 (10 nmol/pata) ou EP<sub>4</sub> L161982 (10 nmol/pata) (Figura 4A). Entretanto, o L826266 não foi capaz de inibir a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> no tempo de 15 minutos. A fim de verificar se a falta de inibição era devido a um lento início de ação do antagonista, os animais receberam localmente, 30 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub>, uma injeção intraplantar de L826266. Como pode ser observado nas figuras 4A e 4B, este pré-tratamento promoveu acentuada inibição ( $80,8 \pm 5,5\%$ ) no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> em camundongos, de maneira dose dependente. O valor médio da ID<sub>50</sub>, calculado utilizando os valores obtidos com o pré-tratamento, foi 0,36 (0,05 - 1,82) nmol/pata. Esses resultados indicam que a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> parece ser mediada principalmente pela ativação do subtipo de receptor EP<sub>3</sub>.

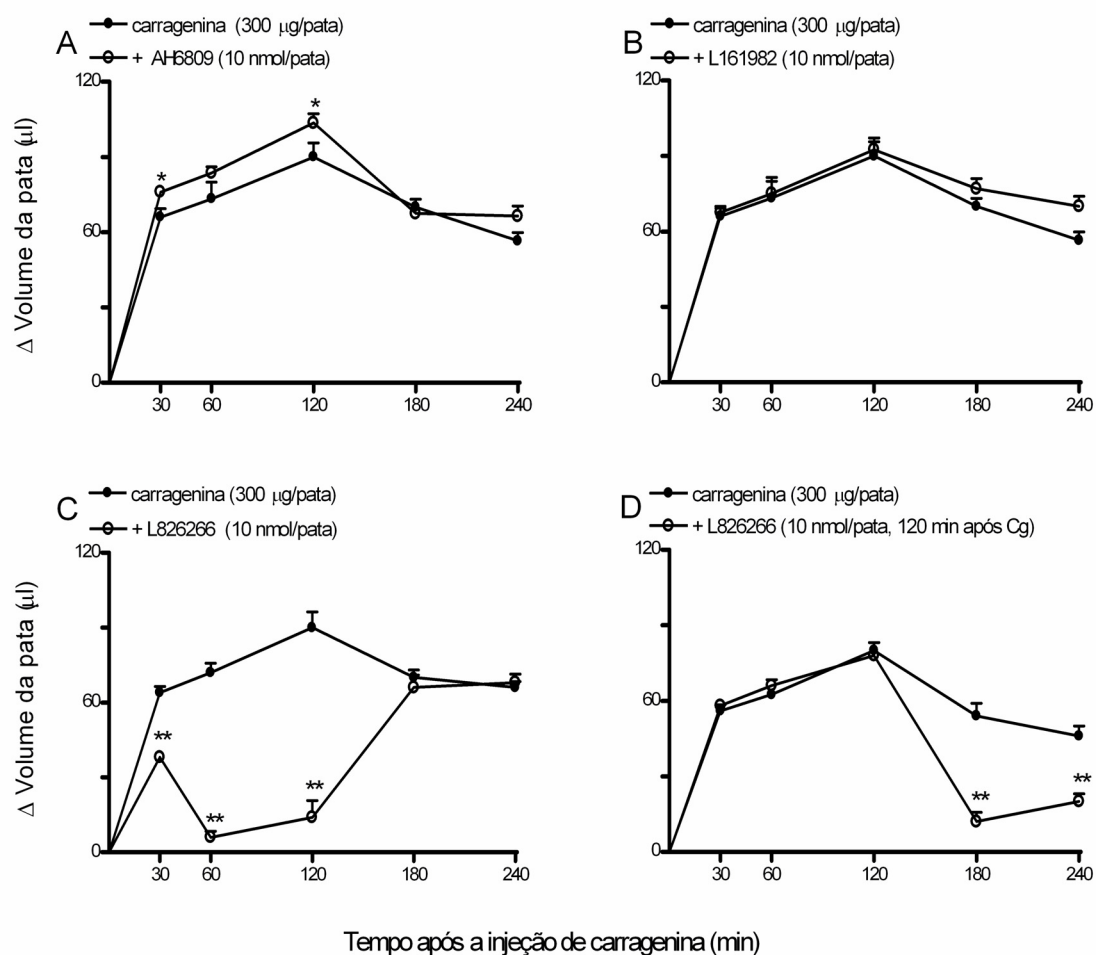


**Figura 4.** (A) Efeito dos antagonistas dos receptores EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos. O AH6809 (▽, antagonista do receptor EP<sub>2</sub>, 10 nmol/pata), o L826266 (■, antagonista do receptor EP<sub>3</sub>, 10 nmol/pata) e o L161982 (◊, antagonista do receptor EP<sub>4</sub> receptor, 10 nmol/pata) foram administrados juntamente com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). O antagonista do receptor EP<sub>3</sub> L826266 (○, 10 nmol/pata) também foi administrado 30 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub>. (B) Efeito dose resposta do antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos no tempo de 30 minutos. L826266 (0,1-10 nmol/pata) foi administrado localmente 30 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 μl de PBS) ou com PGE<sub>2</sub>+antagonistas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Linhas de erro inaparentes encontram-se no interior dos símbolos. Difere significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub>) \*\*  $P < 0,01$ .

### **3. Caracterização dos subtipos de receptores EP envolvidos na resposta edematogênica induzida pela carragenina na pata de camundongos**

A formação de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos foi inibida de forma marcante pela co-injeção do antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> L826266 (10 nmol/pata), com inibição de  $84,0 \pm 5,6\%$  (Figura 5C). Entretanto, o L826266 também foi capaz de inibir a resposta edematogênica induzida pela carragenina somente até o tempo de 120 minutos. Com o intuito de verificar se isto era decorrente da farmacocinética do antagonista ou se não estava mais ocorrendo a participação dos prostanóides na resposta edematogênica induzida pela carragenina, os animais receberam localmente, 120 minutos após a injeção de carragenina, uma injeção intraplantar de L826266 (10 nmol/pata). Como pode ser observado na figura 5D, este tratamento foi capaz de inibir de maneira significativa a resposta induzida pelo agente flogístico ( $77,8 \pm 6,9\%$ ) nos tempos de 180 e 240 minutos. Esse resultado sugere que a falta de inibição no tempo 120 minutos decorre do curto tempo de meia-vida do antagonista. Por outro lado, a resposta edematogênica induzida pela carragenina não foi alterada significativamente pela co-administração do antagonista do receptor EP<sub>4</sub> L161982 (10 nmol/pata) (Figura 5B). Além disso, a co-administração do antagonista do receptor EP<sub>2</sub> AH6809 (10 nmol/pata) aumentou discretamente o edema de para causado pela carragenina nos tempos de 30 a 120 minutos (Figura 5A).

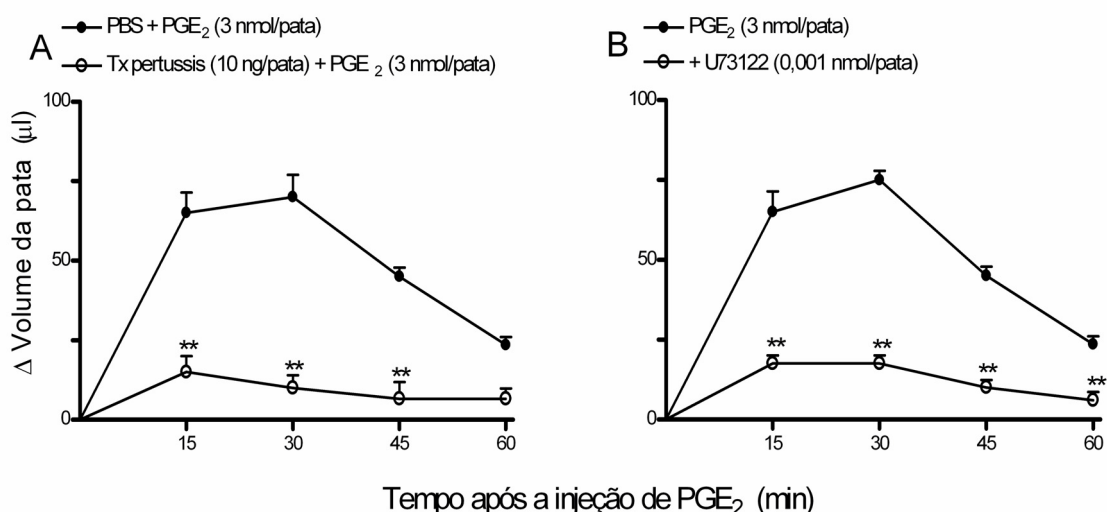




**Figura 5.** Efeito dos antagonistas dos receptores EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela carragenina na pata de camundongos. (A) AH6809 (antagonista do receptor EP<sub>2</sub>, 10 nmol/pata), (B) L161982 (antagonista do receptor EP<sub>4</sub> receptor, 10 nmol/pata) e (C) L826266 (antagonista do receptor EP<sub>3</sub>, 10 nmol/pata) foram administrados juntamente com a carragenina (300  $\mu$ g/pata). (D) O antagonista do receptor EP<sub>3</sub> L826266 (10 nmol/pata) foi administrado localmente 120 minutos após a injeção de carragenina. Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20  $\mu$ l de PBS) ou com carragenina+antagonistas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Linhas de erro inaparentes encontram-se no interior dos símbolos. Difere significativamente do grupo controle (Cg) \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4. Participação da proteína G do tipo inibitória ( $G_i$ ) e da PLC

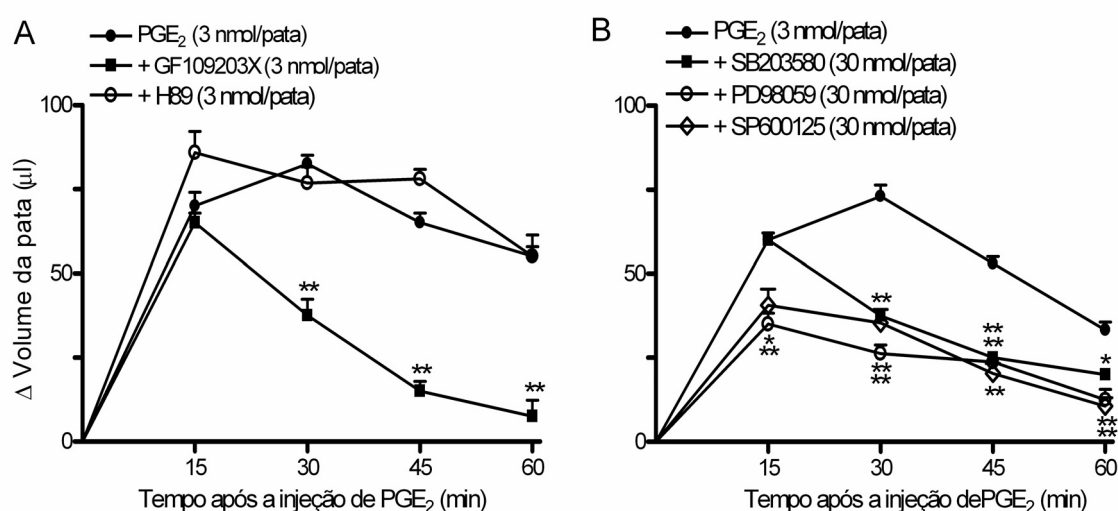
Os resultados da figura 6 A demonstram que o pré-tratamento dos animais com a toxina pertussis (10 ng/pata), 20 minutos antes da administração de  $PGE_2$ , foi capaz de inibir de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$  em  $85,7 \pm 5,8\%$ . Da mesma maneira, o edema de pata induzido pela  $PGE_2$  em camundongos foi significativamente reduzido pelo tratamento com o inibidor seletivo da PLC U73122, na dose de 1 pmol/pata, em  $76,6 \pm 3,3\%$ .



**Figura 6.** (A) Efeito da *toxina pertussis* sobre a resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$  na pata de camundongos. Os animais foram pré-tratados com toxina pertussis (10 ng/pata), 20 minutos antes da injeção intraplantar de  $PGE_2$ . O grupo controle recebeu o mesmo volume (20  $\mu$ l) de veículo, 20 minutos antes da injeção de  $PGE_2$ . (B) Efeito do inibidor da PLC sobre o edema de pata induzido pela  $PGE_2$ . Os animais receberam uma injeção intraplantar do inibidor seletivo da PLC (U73122, 1 pmol/pata) em associação com a  $PGE_2$  (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20  $\mu$ l de PBS) ou com as drogas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle ( $PGE_2$ ) \*\*  $P < 0,01$ .

## 5. Participação de proteínas quinase

O envolvimento da ativação das proteínas quinase foi inicialmente avaliado pelo uso de inibidores específicos. O tratamento combinado de PGE<sub>2</sub> com o inibidor da PKC, o GF109203X (3 nmol/pata), ou com os inibidores da JNK, o SP600125 (30 nmol/pata), da MEK1, o PD98059 (30 nmol/pata) ou da p38, o SB203580 (30 nmol/pata) foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos (Figura 7A e 7B). As inibições observadas, 30 minutos após a administração de PGE<sub>2</sub>, foram  $54,5 \pm 5,8\%$ ,  $51,5 \pm 4,9\%$ ,  $64,0 \pm 3,6\%$  e  $48,6 \pm 2,2\%$ , respectivamente. Por outro lado, o inibidor da PKA H89 (3 nmol/pata) não foi capaz de alterar de maneira significativa a resposta edematogênica mediada pela PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) (Figura 7A).



**Figura 7.** Efeito dos inibidores seletivos de (A) PKC e PKA e (B) MAPKs sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. H89 (inibidor da PKA, 3 nmol/pata), GF 109203X (inibidor da PKC, 3 nmol/pata), SP600125 (inibidor da JNK, 30 nmol/pata), PD98059 (inibidor da MEK, 30 nmol/pata), SB203589 (inibidor da p38, 30 nmol/pata) foram administrados em associação com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 µl de PBS) ou com as drogas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub>) \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

## 6. Ativação da PKC- $\alpha$ após a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>

Com o objetivo de confirmar a participação da PKC- $\alpha$  na reposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>, foi realizado o ensaio de *Western blot*. Os resultados da figura 8 demonstram que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) induz a translocação da isoforma PKC- $\alpha$  do citosol para a membrana, um indicativo de ativação desta proteína. O início do processo de ativação foi verificado aos 10 minutos após a administração de PGE<sub>2</sub> e a resposta máxima da ativação ocorreu em 30 min.

Além disso, a figura 8 demonstra que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> resultou em marcante ativação da PKC- $\alpha$ . No entanto, o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor EP<sub>3</sub>, 30 min antes da injeção de PGE<sub>2</sub>, não foi capaz de prevenir a ativação desta enzima.

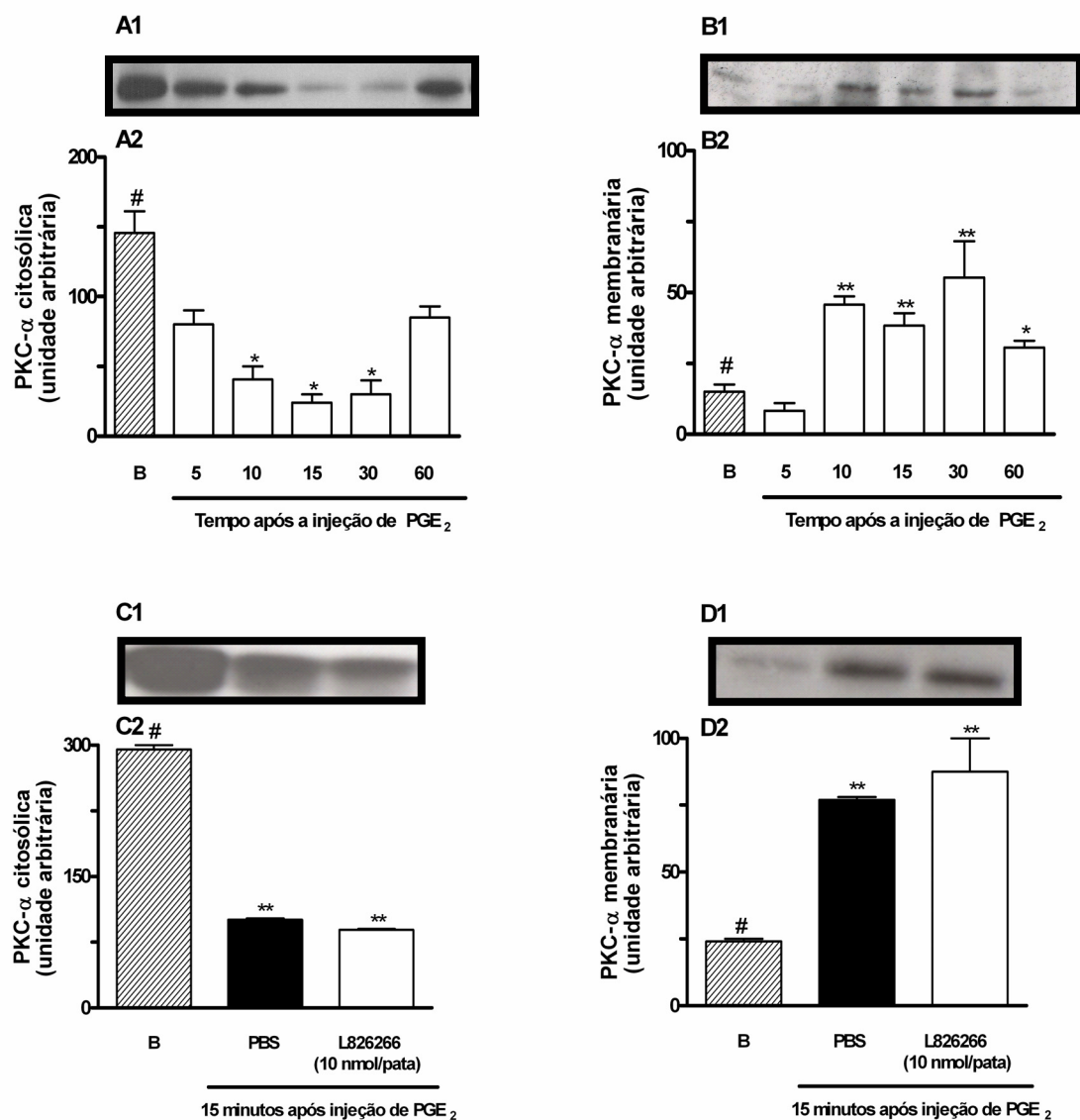
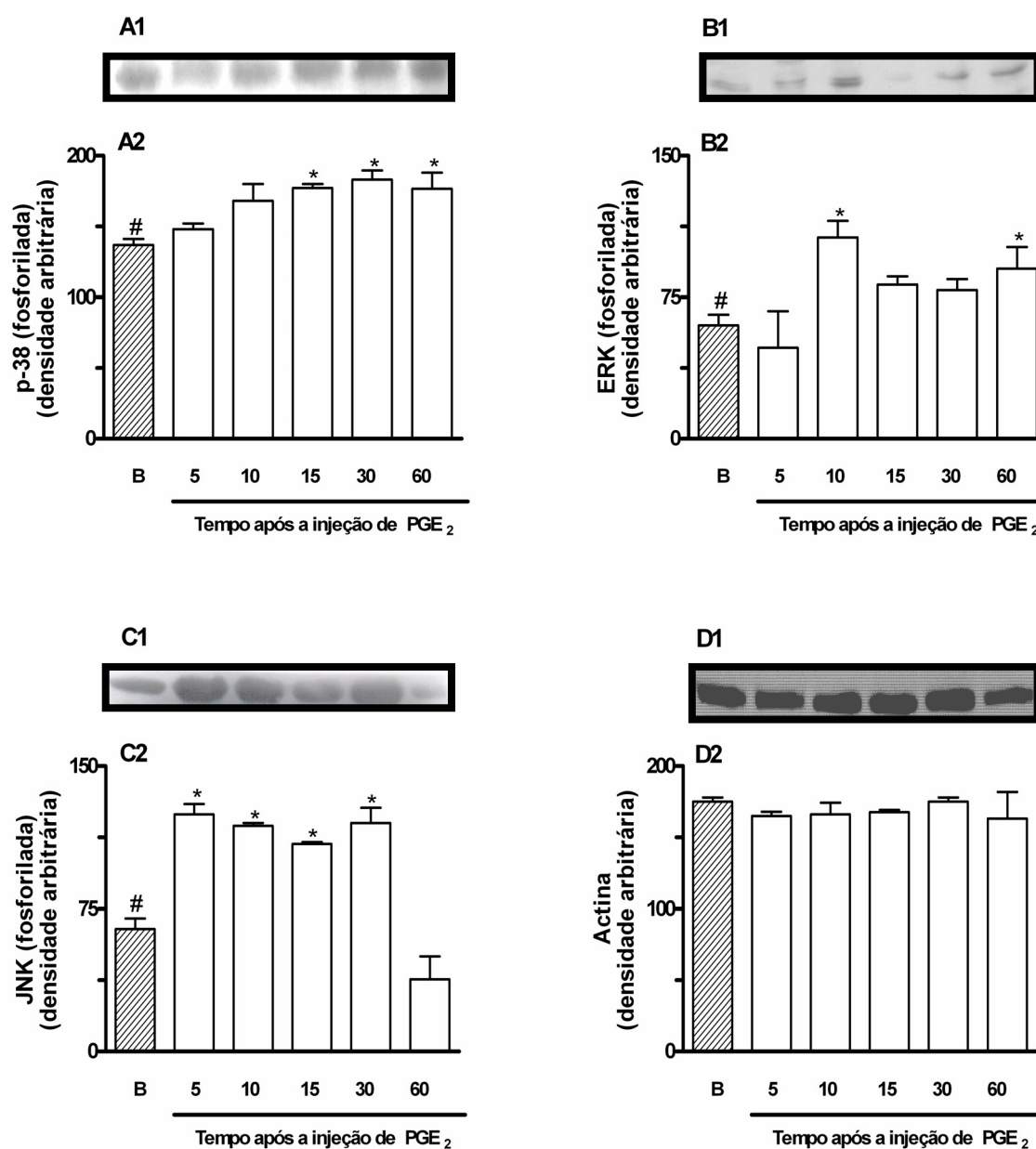


Figura 8. (A e B) Decurso temporal (min) para a ativação da proteína quinase C (PKC- $\alpha$ ) após a injeção de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). (C e D) Efeito do antagonista do receptor EP<sub>3</sub> sobre a ativação da PKC- $\alpha$ . Trinta minutos antes da administração de PGE<sub>2</sub>, os animais receberam uma injeção intraplantar de L826266 (10 nmol/pata). Nos dois grupos experimentais as amostras foram preparadas 30 min após a injeção de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Painéis 1 (A1-D1): fotografias das bandas imunoreativas para a PKC- $\alpha$ . Painéis 2 (A2-D2): análise densitométrica das bandas imunoreativas. (B) = basal (animais tratados com PBS). As barras correspondem à média de três experimentos  $\pm$  E.P.M. Significativamente diferentes do grupo Basal, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

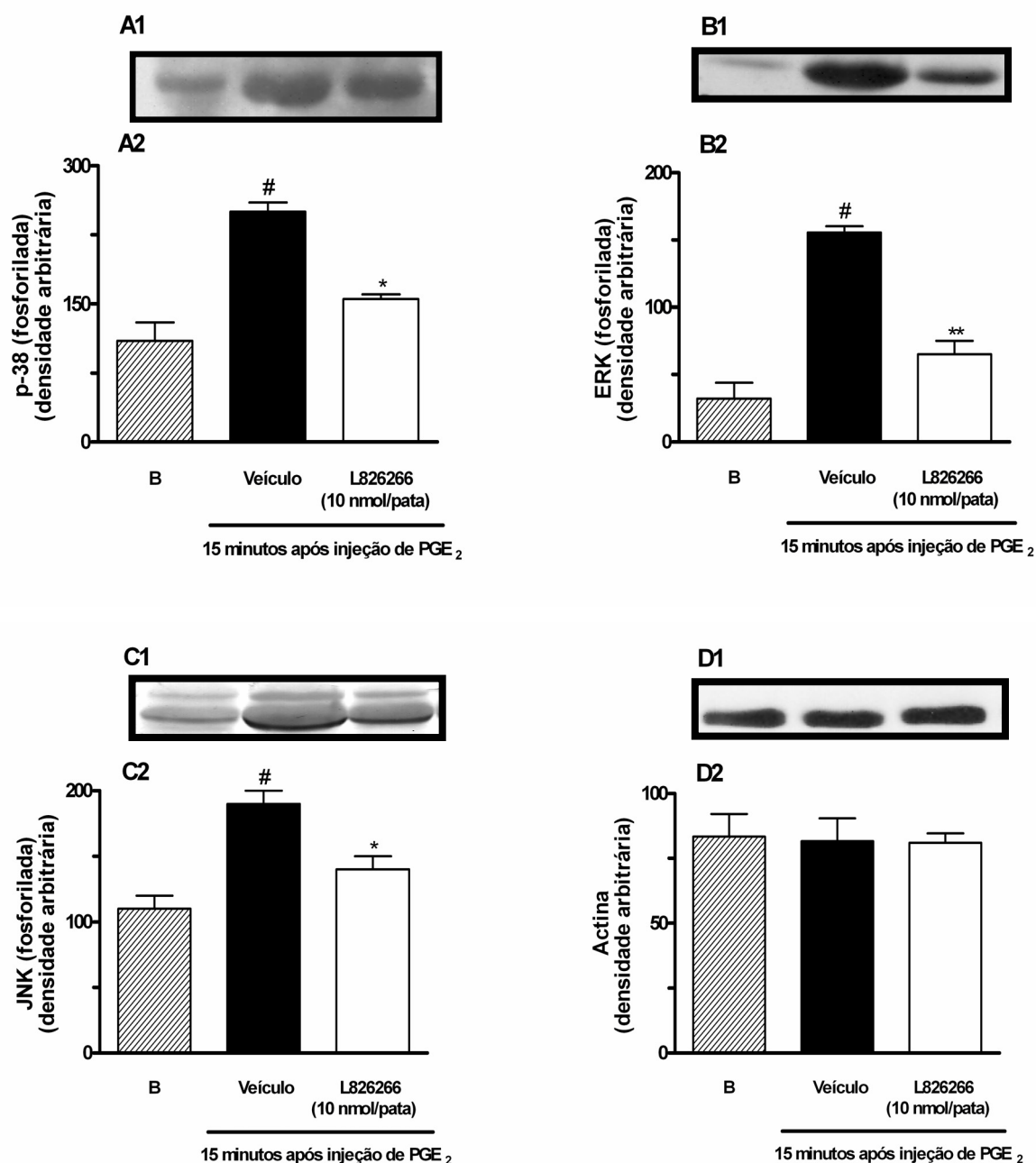
## 7. Ativação das MAPKs após a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>

Com o objetivo de confirmar o possível envolvimento das MAPK na resposta edematogênica causada pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>, foi realizado o ensaio de *Western blot* para a forma fosforilada (forma ativa) destas enzimas. Os resultados mostrados na figura 9 indicam que um baixo nível de ativação dessas proteínas é observado em condições basais. A injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> resulta em aumento marcante no nível de fosforilação das proteínas quinase p38 MAPK, ERK e JNK. O início do processo de ativação dessas proteínas foi verificado aos 5 minutos após a administração de PGE<sub>2</sub>. A resposta máxima de fosforilação da p38 MAPK ocorreu em 30 min, para a JNK ocorreu em 5 min, enquanto que para a ERK o pico de resposta ocorreu em 10 minutos.

Os resultados apresentados na figura 10 demonstram que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> resultou em uma ativação marcante da ERK (4.8 vezes), JNK (1.8 vezes) e p38 MAPK (2.3 vezes) nos tempos de 10 (ERK) e 15 (JNK e p38 MAPK) minutos após a administração de PGE<sub>2</sub>. Além disso, pode ser observado que o pré-tratamento dos animais com o antagonista do receptor EP<sub>3</sub>, 30 min antes da injeção de PGE<sub>2</sub>, foi capaz de prevenir de maneira marcante a ativação dessas enzimas. As inibições observadas foram  $73.3 \pm 8.1\%$ ,  $62.5 \pm 12.5\%$  e  $67.8 \pm 3.5\%$ , para ERK, JNK e p38 MAPK, respectivamente. Adicionalmente, a ativação dessas proteínas foi muito mais pronunciada nesses experimentos em relação aos resultados demonstrados acima (Figura 9). Essa diferença de resposta pode ser decorrente da utilização de diferentes grupos de animais.



**Figura 9.** Decurso temporal (min) para a ativação das proteínas quinase ativadas por mitógenos após a injeção de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Painéis 1: fotografias das bandas imunorreativas para as MAPKs e actina. Painéis 2: análise densitométrica das bandas imunorreativas. As barras correspondem à média de três experimentos  $\pm$  E.P.M. Significativamente diferentes do grupo Basal, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ . (A) p38 MAPK fosforilada, (B) ERK fosforilada, (C) JNK fosforilada e (D) actina.

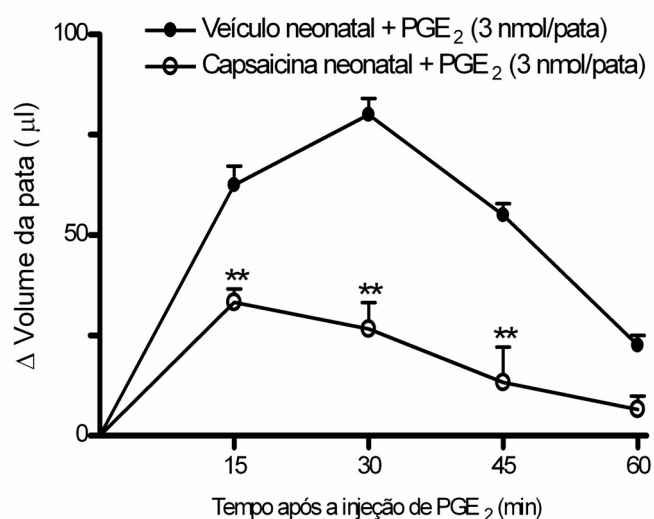


**Figura 10.** Efeito do antagonista do receptor EP<sub>3</sub> sobre a ativação das MAPKs. Trinta minutos antes da administração de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata), os animais receberam uma injeção intraplantar de L826266 (10 nmol/pata). As amostras foram preparadas após 10 (ERK) ou 15 min (JNK e p-38) da injeção do agente flogístico em questão. Painéis 1: fotografias das bandas imunorreativas para as MAPKs e actina. Painéis 2: análise densitométrica das bandas imunorreativas. As barras correspondem à média de três experimentos ± E.P.M. Significativamente diferentes do grupo Controle (PGE<sub>2</sub>), \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ . (A) p38 MAPK fosforilada, (B) ERK fosforilada, (C) JNK fosforilada e (D) actina.



## 8. Participação das fibras sensíveis à capsaicina

Os resultados mostrados na figura 11 indicam que o tratamento neonatal dos animais com a capsaicina (50 mg/kg, s.c.) inibiu em  $66,6 \pm 6,6\%$  a resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$  (3 nmol/pata). Além disso, o tratamento neonatal com o veículo utilizado para dissolver a capsaicina não causou efeito significativo sobre o edema de pata induzido pela  $PGE_2$  (Figura 11).

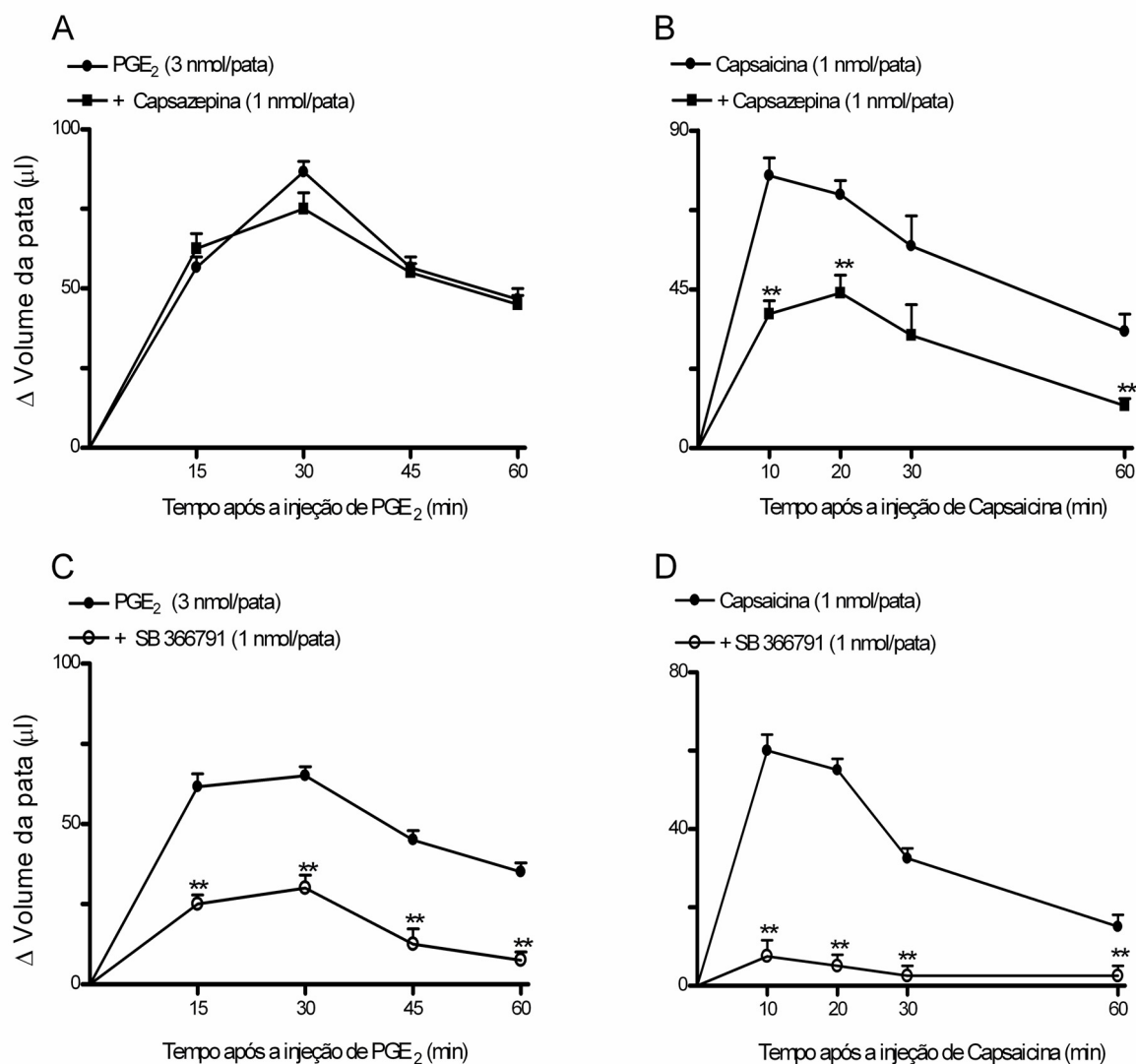


**Figura 11.** Efeito do tratamento neonatal (2 dias) com veículo (1 ml/kg, s.c.) ou capsaicina (50 mg/kg, s.c.) sobre o edema de pata induzido pela  $PGE_2$  (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20  $\mu$ l de PBS) ou com  $PGE_2$ . Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle ( $PGE_2$ ). \*\*  $P < 0,01$ .

### **9. Participação do receptor vanilóide 1 (TRPV1)**

De maneira semelhante à PGE<sub>2</sub>, a injeção intraplantar de capsaicina na pata traseira de camundongos foi capaz de induzir aumento no volume da pata. A resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina atingiu sua maior magnitude no tempo de 10 minutos.

Como pode ser observado na figura 12, o tratamento com o antagonista seletivo do receptor TRPV1 (SB 366791, 1 nmol/pata) foi capaz de inibir de maneira marcante tanto a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata), quanto a induzida pela capsaicina. As porcentagens de inibição foram de  $53,8 \pm 4,1\%$  e  $90,6 \pm 5,4\%$ , respectivamente. Por outro lado, o tratamento com o antagonista do receptor TRPV1 capsazepina (1 nmol/pata) não foi capaz de inibir a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. No entanto, a administração de capsazepina na dose de 1 nmol/pata inibiu a resposta edematogênica induzida pela capsaicina (1 nmol/pata) em  $50,7 \pm 4,8\%$ .

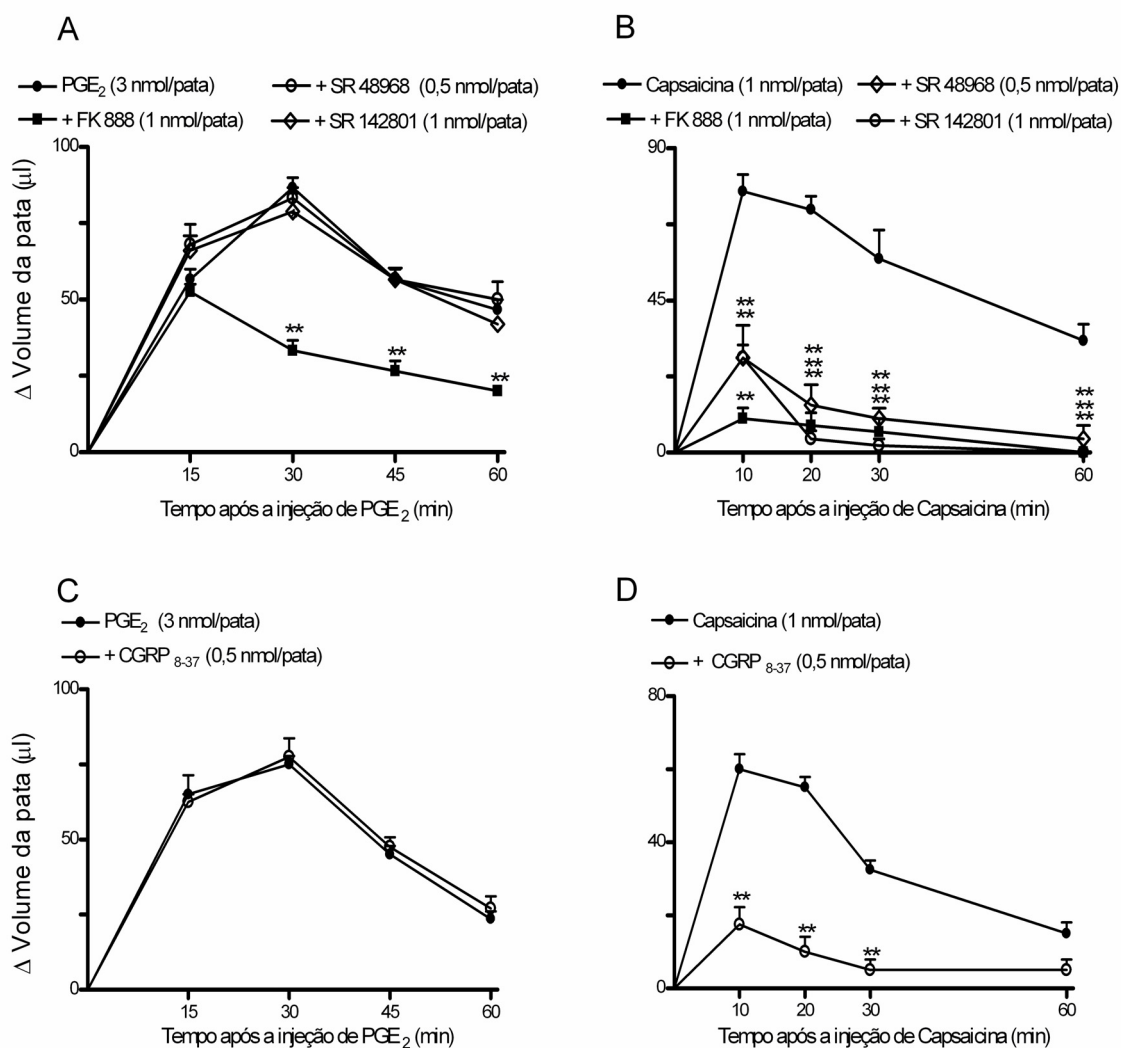


**Figura 12.** Efeito dos antagonistas para o receptor TRPV1 sobre a resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> e capsaicina em camundongos. Capsazepina (antagonista do TRPV1, 1 nmol/pata) foi co-administrada com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) (A) ou capsaicina (1 nmol/pata) (B). SB 366791 (antagonista do TRPV1, 1 nmol/pata) foi administrado em associação com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) (C) ou capsaicina (1 nmol/pata) (D). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 μl de PBS) ou com as drogas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub> ou capsaicina) \*\*  $P < 0,01$ .

## 10. Participação das taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

Como pode ser observado na figura 13, quando administrado intraplantarmente, o FK 888 (1 nmol/pata), antagonista do receptor NK1, causou inibição significativa da resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) em 61,5 ± 3,8%. Por outro lado, o tratamento com antagonistas seletivos dos receptores NK2 (SR 48968, 0,5 nmol/pata), NK3 (SR 142801, 1 nmol/pata) ou para o CGRP (CGRP<sub>8-37</sub>, 0,5 nmol/pata) em combinação com PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata), não foi capaz de inibir esta resposta edematogênica.

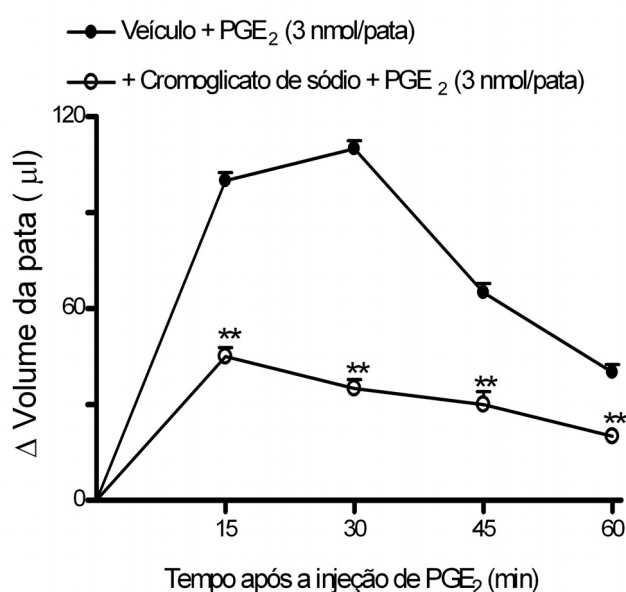
Como pode ser observado nas figuras 13 C e 13 D, os antagonistas dos receptores NK1, NK2 e NK3, (FK 888, SR48968 ou SR 142801, respectivamente) ou para o CGRP (CGRP<sub>8-37</sub>), nas mesmas doses utilizadas no edema induzido pela PGE<sub>2</sub>, causaram inibição significativa da formação de edema de pata após injeção intraplantar de capsaicina (1 nmol/pata). As inibições observadas foram 86,1 ± 4,4%, 61,1 ± 13%, 61,2 ± 5,2% e 81,8 ± 7,4%, respectivamente.



**Figura 13.** Efeitos dos antagonistas seletivos para os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> (A) e capsaicina (B). FK888 (antagonista do receptor NK<sub>1</sub>, 1 nmol/pata), SR48968 (antagonista do receptor NK<sub>2</sub>, 0,5 nmol/pata) e SR142801 (antagonista do receptor NK<sub>3</sub>, 1 nmol/pata) foram co-administrados com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) ou capsaicina (1 nmol/pata). Efeito do antagonista seletivo de receptores para o CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub> sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> (C) ou capsaicina (D). CGRP<sub>8-37</sub> (0,5 nmol/pata) foi administrado em associação com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata) ou capsaicina (1 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 μl de PBS) ou com as drogas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub> ou capsaicina) \*\*  $P < 0,01$ .

## 11. Participação dos mastócitos

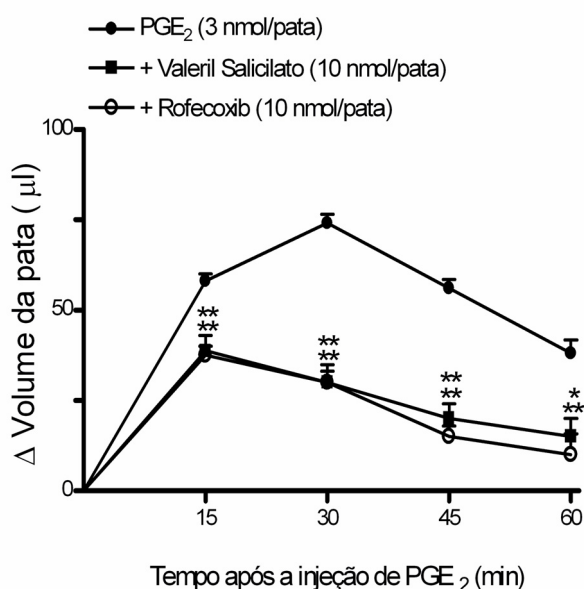
A possível contribuição da ativação dos mastócitos no edema de pata induzido pela  $PGE_2$  foi avaliada. O pré-tratamento dos camundongos com o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio (800  $\mu\text{g/pata}$ ), 15 minutos antes da indução do edema, foi capaz de reduzir em  $63,6 \pm 2,5\%$  a resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$ .



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento com cromoglicato de sódio sobre a resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar de  $PGE_2$  no tempo de 30 minutos. Os animais receberam o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio (800  $\mu\text{g/pata}$ ) ou veículo (PBS, 20  $\mu\text{l}$ ) 15 minutos antes da injeção intraplantar de  $PGE_2$  (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20  $\mu\text{l}$  de PBS) ou com cromoglicato de sódio com a tratada com  $PGE_2$ . Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Difere significativamente do grupo controle (Veículo+ $PGE_2$ ) \*\*  $P < 0,001$ .

## 12. Participação de derivados de COX

Como pode ser observado na figura 15, a injeção de valeril salicilato (10 nmol/pata) um inibidor seletivo da enzima COX-1, ou rofecoxib, um inibidor seletivo da enzima COX-2 em associação com PGE<sub>2</sub>, foi capaz de inibir de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. As inibições foram de 59,5 ± 6,6% e 59,5 ± 4,3%, respectivamente.



**Figura 15.** Efeito dos inibidores seletivos das enzimas COX-1 e COX-2 sobre a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Valeril salicilato (inibidor seletivo da enzima COX-1, 10 nmol/pata) ou Rofecoxib (inibidor seletivo da enzima COX-2, 10 nmol/pata) foram administrados em associação com a PGE<sub>2</sub> (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença de volume (em microlitros) entre as patas tratadas com veículo (20 μl de PBS) ou com as drogas. Cada ponto representa a média de 4-7 animais e as linhas verticais, os e.p.m. Diferença significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub>) \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

# DISCUSSÃO

---



## **DISCUSSÃO**

As prostaglandinas, especialmente a PGE<sub>2</sub>, são importantes mediadores pró-inflamatórios, como demonstram muitos estudos sobre os seus papéis em muitos eventos do processo inflamatório, como a vasodilatação, eritema, aumento da permeabilidade e dor (Solomon et al., 1968; Juhlin e Michaelsson, 1969; Ikeda et al., 1975; Flower et al., 1976; Raul, 1990). De fato, a injeção de PGE<sub>2</sub> produz vasodilatação (Solomon et al., 1968; Juhlin e Michaelsson, 1969) e aumento da permeabilidade vascular na pele de ratos, coelhos e humanos (Williams e Morley, 1973; Ikeda et al., 1975; Flower et al., 1976; Raul, 1990). Além dessas ações, sabe-se que a injeção intradérmica de PGE<sub>2</sub> potencializa o aumento da permeabilidade vascular induzido tanto pela bradicinina como histamina em coelhos e ratos, assim como potencializa o edema de pata induzido pela carragenina (Williams, 1979; Kingston e Greaves, 1985; Williams e Higgs, 1988).

Apesar de se conhecer a importância da PGE<sub>2</sub> no processo inflamatório, os subtipos de receptores e as vias de sinalização envolvidas nas ações inflamatórias da PGE<sub>2</sub> ainda não estão completamente elucidados. Neste estudo, investigou-se, através da utilização de ferramentas farmacológicas e de biologia molecular, os subtipos de receptores EP, assim como algumas das vias de sinalização, envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos.

## **Estudo dos receptores prostanóides envolvidos no edema induzido pela PGE<sub>2</sub>**

Inicialmente, os estudos para elucidar os subtipos de receptores EP envolvidos nas ações da PGE<sub>2</sub> eram realizados utilizando-se agonistas não-seletivos para os receptores EPs (Armstrong et al., 1995; Shimazaki et al, 2000). Nestes estudos, foi sugerido que agonistas não seletivos para o receptor EP<sub>2</sub> produziam exsudação na pele de coelhos e que agonistas não seletivos para os receptores EP<sub>3</sub> eram capazes de aumentar a exsudação induzida pela bradicinina (Armstrong et al., 1995). Além disto, foi sugerido que a exsudação causada pela PGE<sub>2</sub> estava relacionada com uma vasodilatação local (Williams, 1979). Também utilizando agonistas não seletivos, Coleman e colaboradores (1987, 1990) demonstraram que o efeito vasodilator da PGE<sub>2</sub> na musculatura lisa vascular era mediado predominantemente pelo receptor do tipo EP<sub>2</sub>. Entretanto, a utilização desses agonistas não seletivos como ferramentas farmacológicas para caracterizar receptores é de alcance limitado, pois ocorrem interações cruzadas entre esses compostos com outros receptores prostanóides (Gallant et al., 2002).

Posterior ao uso de agonistas, animais nocautes para os receptores EP têm sido gerados e utilizados como uma importante ferramenta a fim de se elucidar os papéis fisiopatológicos dos prostanóides. Estudos prévios, utilizando animais com deleção gênica para cada um dos quatro subtipos de receptores específicos da PGE<sub>2</sub>, demonstraram que somente os animais nocautes para o receptor EP<sub>3</sub> apresentaram significativa redução na formação do edema e no extravasamento plasmático induzidos pela aplicação tópica de AA na orelha de camundongos (Goulet et al, 2004). Yuhki *et al.* (2004)

demonstraram que os receptores IP, EP<sub>2</sub> e EP<sub>3</sub>, mas não EP<sub>1</sub> ou EP<sub>4</sub>, eram os receptores envolvidos na formação de exsudato, mas não na migração celular, observada no modelo de pleurisia induzido pela carragenina em camundongos. Entretanto, a utilização de animais nocautes apresenta alguns problemas como, por exemplo, o surgimento de mecanismos compensatórios envolvendo outros genes que acabam por mascarar o efeito da deleção (Lariviere et al., 2001). Desta forma, o desenvolvimento de antagonistas seletivos para os receptores EP tem sido importante à caracterização farmacológica dos receptores envolvidos nas ações da PGE<sub>2</sub>. Os antagonistas dos receptores EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> utilizados no presente estudo apresentam afinidades aproximadamente 100 a 200 vezes maiores para os receptores EP<sub>3</sub> ou EP<sub>4</sub>, respectivamente, quando comparados com outros receptores prostanóides (Michel Gallant, resultados não publicados).

Nossos resultados demonstram claramente que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> produz formação de edema de maneira dose e tempo dependente. Interessantemente, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, assim como o induzido pela carragenina, são mediados, principalmente, ainda que talvez não inteiramente, pela ativação dos receptores EP<sub>3</sub>. Esta conclusão baseia-se no fato de que o antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub> L826266, mas não dos receptores EP<sub>2</sub> AH6809 ou EP<sub>4</sub> L161982, foi capaz de reduzir a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> e da carragenina na pata de camundongos. Estes resultados estão de acordo com os estudos acima descritos, os quais demonstraram que o receptor EP<sub>3</sub> medeia tanto o edema de orelha induzido pelo AA, assim como a pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. De fato, Portanova e

colaboradores (1996) já tinham relatado a importância da PGE<sub>2</sub> na cascata de inflamação envolvida na formação de edema induzido pela injeção de carragenina na pata de ratos. Esses autores observaram que o tratamento dos animais com indometacina ou com o anticorpo monoclonal contra a PGE<sub>2</sub> produziu redução significativa do edema de pata. Nossos dados demonstram que a PGE<sub>2</sub> endógena ativa receptores EP<sub>3</sub> para produzir edema. Porém como no presente estudo o antagonista EP<sub>3</sub> não bloqueou a formação de edema e um antagonista seletivo de receptores EP<sub>1</sub> não foi testado, não se pode excluir completamente uma pequena participação do receptor EP<sub>1</sub> neste processo.

Outro dado interessante do nosso estudo foi a potencialização, pelo antagonista EP<sub>2</sub>, do edema de pata causado pela carragenina. De fato, inúmeras evidências têm demonstrado que as prostaglandinas também apresentam ações antiinflamatórias. Por exemplo, tanto a PGE<sub>2</sub> quanto a PGI<sub>2</sub> “in vitro” são capazes de inibir a liberação de mediadores inflamatórios em granulócitos (Weissmann et al., 1980; Camussi et al., 1981), mastócitos (Loeffler et al., 1971; Kaliner e Austen, 1974) e em celular pulmonares (Walker, 1973; Hitchcock, 1978). Raud e colaboradores (1988, 1989 e 1990) demonstraram que a administração tópica de PGE<sub>2</sub>, em concentrações vasodilatadoras, foi capaz de reduzir a liberação de histamina e o extravasamento plasmático no modelo da bolsa jugal de hamsters. Interessantemente, Armstrong e colaboradores (1995) demonstraram que a ativação do receptor EP<sub>2</sub> nas células endoteliais é capaz de inibir a formação de edema por aumentar a permeabilidade da membrana. Adicionalmente, Kay e colaboradores (2006) demonstraram que a ativação do receptor EP<sub>2</sub> é capaz de inibir a liberação de histamina em mastócitos de células pulmonares

humanas. A injeção intraplantar de carragenina libera inúmeros mediadores que podem ter efeitos sinérgicos entre si. Isto pode explicar o fato do antagonista do receptor EP<sub>2</sub> ter aumentado somente a resposta edematogênica induzida pela carragenina, mas não da PGE<sub>2</sub>. Além disso, existem relatos de que a PGE<sub>2</sub> suprime a inflamação em pacientes humanos asmáticos (Gauvreau et al., 1999; Pavord et al., 1993). As diferenças existentes nas respostas aos prostanóides em diferentes tecidos, espécies e modelos podem ser decorrentes da diferença de densidade dos subtipos de receptores que medeiam efeitos opostos. Além disso, essas diferenças podem ser decorrentes das diferentes sensibilidades de diferentes tipos celulares envolvidos no processo inflamatório à PGE<sub>2</sub>, visto que ela apresenta maior afinidade pelos receptores EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> ( $K_d < 1$  nM), do que pelos receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>2</sub> ( $K_d > 10$  nM).

### **Estudo das vias de sinalização envolvidas no edema causado pela PGE<sub>2</sub>**

Inúmeras evidências têm sugerido que o receptor EP<sub>3</sub>, bem como seu RNAm, são amplamente distribuídos em praticamente todos os tecidos dos camundongos (Narumiya et al., 1999). As variantes de *splicing* dos receptores EP<sub>3</sub> são capazes de induzir uma série de efeitos (Bos et al., 2004). Em camundongos, os receptores EP<sub>3 $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$</sub>  geralmente ativam proteínas G do tipo inibitória, mas eles podem também estar acoplados a proteínas do tipo G<sub>s</sub> e G<sub>13</sub> (Hatae et al., 2002; Hata e Breyer, 2004). Originalmente foi descrito que o receptor EP<sub>3</sub> era capaz de diminuir a atividade da adenilato ciclase (reduzindo a produção de AMP<sub>c</sub>), através da interação com a subunidade G $\alpha_i$ . Estudos subsequentes demonstraram que o receptor EP<sub>3</sub> é capaz de ativar a PLC

através da subunidade  $G_{\beta\gamma}$  da proteína  $G_i$ . A PLC é uma enzima localizada na membrana celular que promove a hidrólise do fosfolipídio de membrana fosfoinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ). Essa hidrólise origina dois importantes segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) (Ochocka e Pawelczyk, 2003). O  $IP_3$  promove mobilização de  $Ca^{+2}$  do retículo endoplasmático e o DAG liga-se à PKC, estimulando sua atividade catalítica (Irie et al., 1994). Nossos resultados confirmam e estendem esses dados, uma vez que o tratamento com a toxina pertussis, foi capaz de inibir a resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$ , demonstrando a participação da proteína G sensível à toxina pertussis ( $G_i$ ) na formação do edema. Além disso, o inibidor seletivo da PLC, U73122 também foi capaz de reduzir esta resposta edematogênica. Portanto, podemos sugerir que a via de sinalização da proteína  $G_i$  com decorrente ativação da PLC é responsável pela resposta edematogênica induzida pela  $PGE_2$  após sua interação com o receptor  $EP_3$ .

Outro aspecto investigado neste estudo foi a possível participação de alguns grupos de proteínas quinase no edema de pata induzido pela  $PGE_2$ . As proteínas quinase constituem uma das principais vias de transdução de sinal em animais superiores. Essas proteínas são enzimas que transferem um grupo fosfato, de um ATP ou GTP, de maneira covalente para o grupo hidroxila dos resíduos de serina, treonina ou tirosina de proteínas intracelulares específicas que constituem seus substratos. (Sridhar, 2000; Johnson, 2002). Através da fosforilação de resíduos específicos, essas proteínas regulam a atividade enzimática, a interação com outras proteínas ou moléculas, sua localização celular e a propensão à degradação de seus substratos que incluem outras proteínas quinase, fosfolipases, fatores transcricionais e proteínas do

citoesqueleto (Levitzki e Gazit, 1995; King et al., 1997; Johnson, 2002). A proteína quinase C (PKC) é capaz de modular a atividade de inúmeros processos celulares que são importantes para a produção da inflamação, como a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Existem aproximadamente 12 isoformas de PKC, classificadas em três famílias de acordo com a sensibilidade ao cálcio e a lipídios (Vlahos et al., 2003). As isoformas clássicas de PKC (PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta_1$ , PKC- $\beta_2$  e PKC- $\gamma$ ) são ativadas pelo  $\text{Ca}^{+2}$  e diacilglicerol (DAG). As PKCs novas (PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\eta$ , PKC- $\theta$  e PKC- $\mu$ ) são independentes de  $\text{Ca}^{+2}$  mas requerem DAG, enquanto que as formas atípicas (PKC- $\zeta$ , PKC- $\iota$  e PKC- $\lambda$ ) são insensíveis ao  $\text{Ca}^{+2}$  e não podem ser reguladas pelo DAG (Poole et al., 2004; Parker e Murray-Rust, 2004). Nossos resultados demonstram claramente que o inibidor seletivo da PKC GF109203X reduziu de maneira significativa o edema de pata induzido pela  $\text{PGE}_2$ . Esses resultados funcionais foram confirmados pela análise de *Western blot*, que demonstrou que a injeção intraplantar de  $\text{PGE}_2$  resulta em marcante ativação da PKC- $\alpha$  na pata de camundongos. O fato do antagonista do receptor  $\text{EP}_3$  não ter inibido a ativação da PKC- $\alpha$  não descarta a hipótese de que o receptor  $\text{EP}_3$  possa ativar outras isoformas de PKC. Adicionalmente, sabe-se que a via de sinalização do receptor  $\text{EP}_1$  é capaz de ativar a PKC e por isso não se pode excluir completamente a participação deste receptor nesta resposta.

As proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) são proteínas que fosforilam resíduos de serina ou de treonina de seus substratos e regulam várias atividades celulares, incluindo expressão gênica, mitose, metabolismo e morte celular programada (Johnson e Lapadat, 2002; Edmunds e Mahadevan, 2004). Existem três subfamílias de MAPKs amplamente caracterizadas: ERK,

JNK e p38 MAPK (Whitmarsh e Davis, 1996). A ativação das MAPKs segue uma cascata de fosforilação que se inicia com a ativação das MAPKKK, que fosforilam MAPKK, que por sua vez, adicionam grupamentos fosfato às MAPKs, ativando-as (Garrington e Johnson, 1999). A ativação da ERK ocorre principalmente em resposta a estímulos mitóticos, enquanto que a ativação das proteínas JNK e p38 MAPKs ocorre principalmente em resposta a estímulos inflamatórios e infecciosos, sendo por esta razão também denominadas de proteínas quinase ativadas por estresse (SAPK) (Cohen, 1997; Kyriakis e Avruch, 2001; Yang et al., 2003). Nossos experimentos também demonstram a participação relevante das MAPKs no modelo de edema induzido pela PGE<sub>2</sub> em camundongos, pois os inibidores seletivos de JNK SP600125, ERK PD98059 ou p38 SB203580 foram efetivos em reduzir a formação de edema. Esses resultados funcionais foram confirmados por experimentos com a técnica de *Western blot*, que demonstraram que a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> resulta em ativação marcante das MAPKs na pata de camundongos. Interessantemente, a ativação das MAPKs induzida pela PGE<sub>2</sub> parece ser decorrente da ativação do receptor EP<sub>3</sub>, pois esta resposta foi quase que completamente prevenida pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor EP<sub>3</sub>. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Burkey et al. (1995), que utilizando células COS-7 transfectadas com o receptor humano EP<sub>3A</sub>, demonstraram que a ativação das MAPKs ocorria através da geração da subunidade βγ da proteína do tipo G<sub>i</sub>, envolvendo a ativação da p21<sup>ras</sup>. A via de sinalização das MAPKs é conhecida por exercer um importante papel no controle de todos os estágios do processo inflamatório (Waetzig e Schreiber, 2003). Nossos resultados confirmam e estendem os



dados existentes na literatura, que indicam que muitos inibidores das MAPKs são potentes drogas antiinflamatórias em modelos animais. Alguns desses inibidores estão sendo testados em estudos clínicos quanto ao potencial para o tratamento de psoríase e artrite reumatóide (English e Cobb, 2002; Waetzig e Schreiber, 2003).

Existem relatos na literatura demonstrando que a estimulação da PKC é capaz de ativar a via de sinalização das MAPKs (Qiu e Leslie, 1994; Vlahos et al., 2003; Salamanca e Khalil, 2005). Com base nestes resultados, nós sugerimos que a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos é mediada pelo receptor EP<sub>3</sub>, e que a subunidade βγ da proteína do tipo G inibitória é responsável pela ativação da PLC. A ativação da PLC por sua vez, promoveria a ativação da PKC com conseqüente ativação das MAPKs. Além disso, podemos sugerir, com base em dados da literatura que a subunidade βγ da proteína G<sub>i</sub> poderia estimular a atividade da p21<sup>ras</sup> e conseqüente ativação da MAPKs (Burkey e Regan, 1995).

### **Estudo dos tipos celulares envolvidos no edema causados pela PGE<sub>2</sub>**

Relatos da literatura indicam que o aumento no fluxo sanguíneo e da permeabilidade da microcirculação que resulta na formação de edema são sinais clássicos de lesão tecidual (Warren et al., 1993). Tem sido demonstrado que a PGE<sub>2</sub> produz eritema na pele de humanos e aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático em ratos e camundongos, efeito este relacionado à ação direta da PGE<sub>2</sub> nos vasos (Williams e Morley, 1973; Flower et al., 1976). De fato, a PGE<sub>2</sub> pode causar dilatação tanto de artérias como de vênulas através da ativação dos receptores EP<sub>2</sub>, e por outro lado constrição

das vênulas através da interação com o receptor EP<sub>3</sub> na mucosa gástrica de ratos (Ohno et al., 1999). É pouco provável que as ações vasodilatadoras da PGE<sub>2</sub> sejam mediadas pelo receptor EP<sub>3</sub>, pois este receptor pode ativar diferentes vias de sinalização, como G<sub>i</sub> (inibição da formação intracelular de AMP<sub>c</sub>) e G<sub>q</sub> (estimulação da liberação de Ca<sup>+2</sup> intracelular) e estes segundos mensageiros promovem vasoconstrição ao invés de vasodilatação (Coleman et al., 1994; Audoly et al., 1999; Goulet et al., 2005). Além dessas ações, a PGE<sub>2</sub> pode melhorar significativamente o aumento da permeabilidade vascular induzida por outros mediadores pró-inflamatórios, com uma relação direta entre a potencialização do edema e o aumento no fluxo sanguíneo (Armstrong et al., 1995).

O edema também pode ser potencializado por neuropeptídeos vasodilatadores. Existem relatos de que, a injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> induz hiperemia neurogênica na pele de ratos, um efeito mediado pela liberação de neuropeptídeos das fibras aferentes perivasculares (Holzer et al., 1995). No presente estudo, avaliamos a possível participação das fibras sensoriais no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> uma vez que se sabe que o RNAm para o receptor EP<sub>3</sub>, e em menor extensão, para o EP<sub>1</sub> e o EP<sub>4</sub> e as suas respectivas proteínas são encontradas nos corpos celulares dos neurônios sensoriais de ratos e camundongos (Sugimoto et al., 1994; Oida et al., 1995; Nakamura et al., 2000). Adicionalmente, o receptor EP<sub>3</sub> é expresso tanto nas terminações nervosas quanto nas fibras sensoriais onde é co-localizado com os neuropeptídeos (Kopp et al., 2004).

As fibras sensoriais primárias sensíveis à capsaicina são extremamente importantes na geração da inflamação neurogênica (Holzer, 1998). Para avaliar

o papel desempenhado pela liberação de neuropeptídeos das fibras sensoriais no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>, um grupo de camundongos foi tratado durante o período neonatal com capsaicina, utilizando uma dose da neurotoxina conhecida por produzir degeneração seletiva das fibras C e algumas Aδ e que depleta irreversivelmente neuropeptídeos destas fibras (Holzer, 1991). O tratamento neonatal com capsaicina inibiu significativamente, mas não aboliu, a resposta edematogênica mediada pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos. Este resultado sugere que a estimulação das terminações nervosas sensoriais primárias parece ser um importante mecanismo, mas não o único, na formação do edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Além disso, este resultado reforça o conceito de que os neuropeptídeos, neste caso provavelmente a SP, liberados de fibras aferentes sensoriais à capsaicina, principalmente do tipo C, desempenham papel crítico nesta resposta edematogênica.

A ativação das terminações das fibras sensoriais, especialmente fibras C, libera substâncias bioativas como as taquicinas e o CGRP, periféricamente e no corno dorsal da medula espinhal (Holzer, 1988). Estes mediadores inflamatórios, especialmente a SP e o CGRP, atuam em células alvo na periferia produzindo os sinais inflamatórios clássicos, um fenômeno conhecido como inflamação neurogênica (Holzer, 1988; Richardson e Vasko, 2002). A substância P (SP) apresenta maior afinidade pelo receptor NK1, enquanto que a neurocinina (NKA) e neurocinina B (NKB) se ligam preferencialmente aos receptores NK2 e NK3, respectivamente (Regoli et al., 1994). Estudos demonstram que a SP, quando injetada na pele humana produz calor, rubor, dor e inchaço. Na pele de rato, a SP induz vasodilatação mediada por

receptores do tipo NK1 (Maggi, 1995). Em condições experimentais foi demonstrado que a SP causa vasodilatação, por mecanismo dependente do endotélio vascular. Além disso, a SP é muito eficaz em causar extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema local na pele de várias espécies incluindo o homem, um efeito que decorre da interação da SP com o receptor NK1 no endotélio venular (Alves et al., 1999; Brain, 1996; Holzer, 1992). Os resultados do presente estudo demonstram que as neurocininas, provavelmente a SP, atuando em receptores NK1, estão envolvidas na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Ao contrário, o SR 48968 e o SR 142801, um antagonista seletivo para os receptores NK2 e NK3, respectivamente, falharam em interferir nesta resposta edematogênica. As doses utilizadas dos antagonistas dos receptores NK1, NK2 e NK3 foram capazes de reduzir de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela capsaicina. De fato, White e colaboradores (1996) demonstraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de promover a liberação de SP em cultura de neurônios sensoriais de ratos. Além disso, os resultados deste trabalho sugerem que o neuropeptídeo CGRP, que co-existe com a SP em terminais sensoriais e participa de maneira importante na resposta inflamatória (Brain et al., 1985; Brain e Williams, 1989), parece não exercer papel relevante na resposta edematogênica mediada pela PGE<sub>2</sub>. Esta conclusão está baseada nos resultados indicando que o antagonista seletivo de receptores do CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub>, falhou em interferir com as respostas mediadas pela PGE<sub>2</sub>, na mesma dose em que foi efetivo em reduzir a resposta edematogênica induzida pela capsaicina. Este resultado está de acordo com Jenkins e colaboradores (2001), os quais demonstraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de

promover a liberação de CGRP, de maneira dependente do cálcio extracelular, no entanto esta resposta parece envolver predominantemente o receptor EP<sub>2</sub>.

Um importante modulador da liberação de neuropeptídeos sensoriais é a ativação do receptor TRPV1. O receptor TRPV1 é um canal catiônico não-seletivo expresso predominantemente nas fibras sensoriais de pequeno diâmetro. Este receptor é ativado exogenamente pela substância pungente derivada de plantas, a capsaicina, mas também pode ser por altas temperaturas (>43 °C), por prótons (pH < 6,5) e por alguns mediadores derivados de lipídeos (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Chuang et al., 2001; Prescott e Julius, 2003). Sabe-se que a ativação do receptor TRPV1 aumenta a liberação de neuropeptídeos de maneira dependente de cálcio dentro das células (Bevan e Geppetti, 1994; Kessler et al., 1999; Vasko et al., 1999). Neste estudo, observou-se o co-tratamento com um antagonista seletivo do receptor TRPV1 (SB366791), mas não com a capsazepina, reduziu de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos, sugerindo que a mesma poderia, pelo menos em parte, estar associada com a ativação do TRPV1, esta resposta. Este resultado pode ser explicado pelo fato da capsazepina ser um antagonista relativamente fraco, capaz de inibir somente a resposta de influxo de cálcio evocado pela capsaicina, mas não pelo pH, calor ou por ativação da PKC (Correll et al., 2004). Por outro lado, o SB366791 é um potente e seletivo antagonista do TRPV1, que ao contrário da capsazepina, é efetivo em inibir o TRPV1 quando ativado por diferentes estímulos (Gunthorpe et al., 2004). Dados semelhantes foram obtidos por Ferreira e colaboradores (2005) que demonstraram que o

---

SB-366791, mas não a capsazepina, reduziu a resposta nociceptiva induzida pela estimulação periférica de PKC *in vivo*.

Evidências recentes sugerem que a regulação e a ativação do TRPV1 é definida por diversos mecanismos como a inibição do receptor mediada por fosfolipídeos e a estimulação mediada pela fosforilação (Premkumar e Ahern, 2000; Chuang et al., 2001). O TRPV1 pode ser fosforilado pela PKA e PKC, o que sensibiliza o receptor à ação dos agonistas e reduz sua dessensibilização (Lopshire e Nicol 1998; Cesare et al., 1999). Existem relatos na literatura demonstrando que a estimulação do TRPV1 pela capsaicina em neurônios sensoriais de ratos e em células transfectadas é potencializada pela PGE<sub>2</sub> por ativação da PKA (Lopshire e Nicol, 1998; Smith et al., 2000; Gu et al., 2003). Entretanto, além da PKA, o receptor TRPV1 pode ser modulado por fosforilação induzida pela PKC (Cesare et al., 1999). Interessantemente, foi recentemente demonstrado que a interação funcional do receptor TRPV1 com a PGE<sub>2</sub> ocorre através da via de sinalização da PKC, no entanto, pelo acoplamento ao receptor EP<sub>1</sub> (Moriyama et al., 2005). Com base nos resultados demonstrados no presente estudo, sugerimos que a PGE<sub>2</sub> pode modular o TRPV1 através de um mecanismo dependente da ativação da PKC. Um mecanismo alternativo de estimulação do TRPV1 pela PGE<sub>2</sub> pode ser mediado pela degradação de fosfolipídios de membrana, como o fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), os quais exercem efeito inibitório na ativação do TRPV1 (Chuang et al., 2001). De fato, a PGE<sub>2</sub> pode aumentar a atividade da PLC em neurônios sensoriais (Smith et al., 1998) e o inibidor da PLC reduziu o edema induzido pela PGE<sub>2</sub> em nosso estudo. Outro ponto interessante é que a ativação do TRPV1 pode estimular a p38 MAPK em neurônios do GRD

(Sweitzer et al., 2004). Assim, a ativação desta quinase observada neste estudo também poderia ser indiretamente mediada pela estimulação do TRPV1.

Outro aspecto investigado neste trabalho foi a participação dos mastócitos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>, pois sabe-se que os mastócitos são importantes mediadores da resposta inflamatória e expressam múltiplas isoformas variantes dos receptores EP<sub>3</sub> (Nguyen et al., 2002). Além disso, Williams (1973) sugeriu que o aumento na permeabilidade vascular induzida pela PGE<sub>2</sub> na pele humana e de ratos parece ser um efeito indireto decorrente da degranulação de mastócitos. Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos camundongos com o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio (800 µg/pata), 15 minutos antes da indução do edema, foi capaz de reduzir a resposta induzida pela PGE<sub>2</sub>. Estes resultados estão de acordo com Nguyen e colaboradores (2002), os quais demonstraram recentemente, utilizando cultura de células de mastócitos a partir de animais nocaute para os receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, que a PGE<sub>2</sub> isoladamente não é capaz de iniciar a degranulação de mastócitos, mas que na presença de PMA (um ativador da PKC) a PGE<sub>2</sub> induz degranulação. Isto sugere que a PKC parece contribuir para a degranulação de mastócitos mediada pelo receptor EP<sub>3</sub>. Além disso, esta resposta também depende da mobilização de Ca<sup>+2</sup> e diminuição dos níveis de AMPc ambos efeitos mediados pelo receptor EP<sub>3</sub>. Estes resultados são consistentes com de outros estudos farmacológicos que sugerem a participação tanto do receptor EP<sub>3</sub> quanto do EP<sub>1</sub> na ativação dos mastócitos (Nishigaki et al., 1993; Gomi et al., 2000; Nakayama et al., 2006). Os mastócitos estão presentes em praticamente todos

os órgãos e tecidos, inclusive na derme, onde se situam próximos aos neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina (Skofitsch et al., 1985; Toyoda et al., 2000). Dentre os neuropeptídeos presentes nessas terminações nervosas, a SP é um dos principais iniciadores da resposta inflamatória e é um dos inúmeros compostos capazes de ativar os mastócitos. Além disso, foi demonstrado que ao degranular, o mastócito é capaz de liberar mediadores inflamatórios como a SP, que ao ser liberada estimula ainda mais a degranulação de mastócitos, promovendo uma retroalimentação positiva, perpetuando desta maneira a resposta inflamatória (Skofitsch et al., 1985; Erin et al., 2004). Além da PKC, outras proteínas quinase parecem estar envolvidas na degranulação de mastócitos. De fato, Ishizuka e colaboradores (1999) demonstraram que a ativação da MEK1 (enzima regulatória da síntese da ERK) e ERK também parece estar envolvida neste processo. Com base nessas evidências, podemos sugerir que a via de sinalização da PKC e das MAPKs, assim como a SP podem contribuir para o papel do mastócito na resposta edematogênica mediada pela PGE<sub>2</sub>.

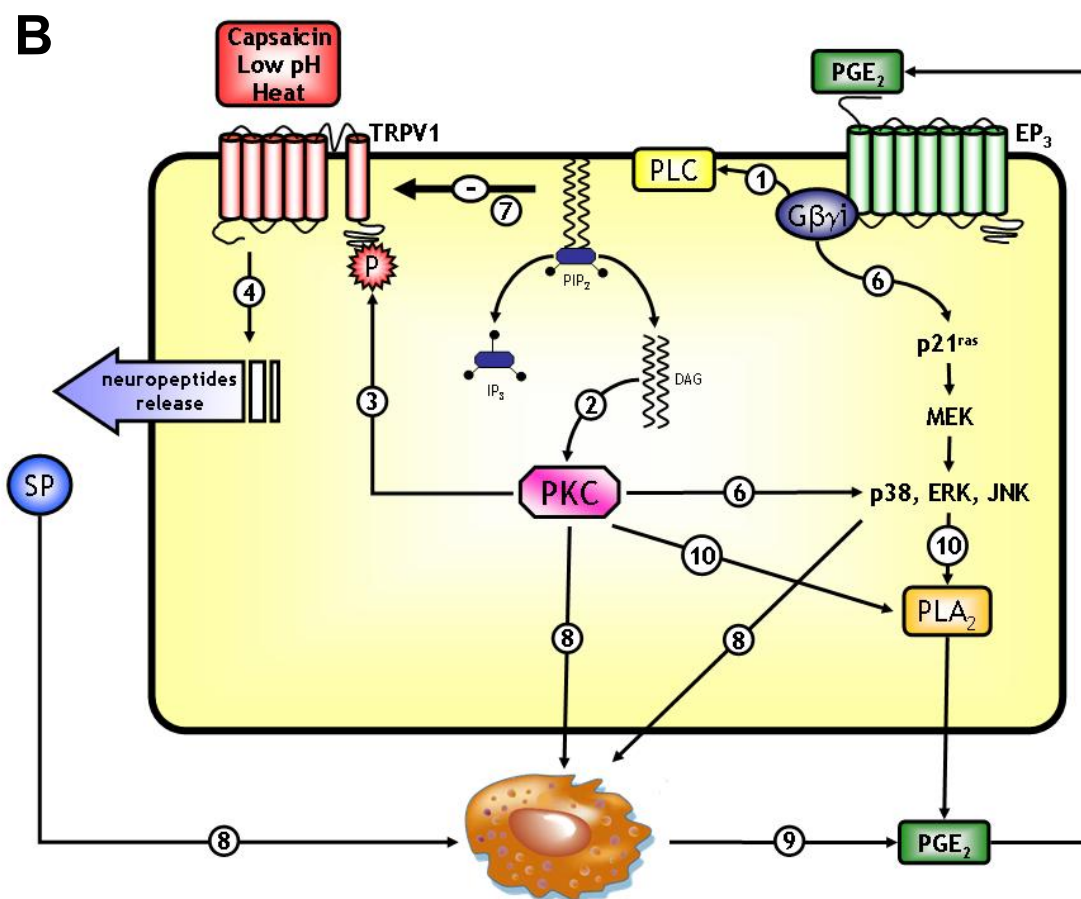
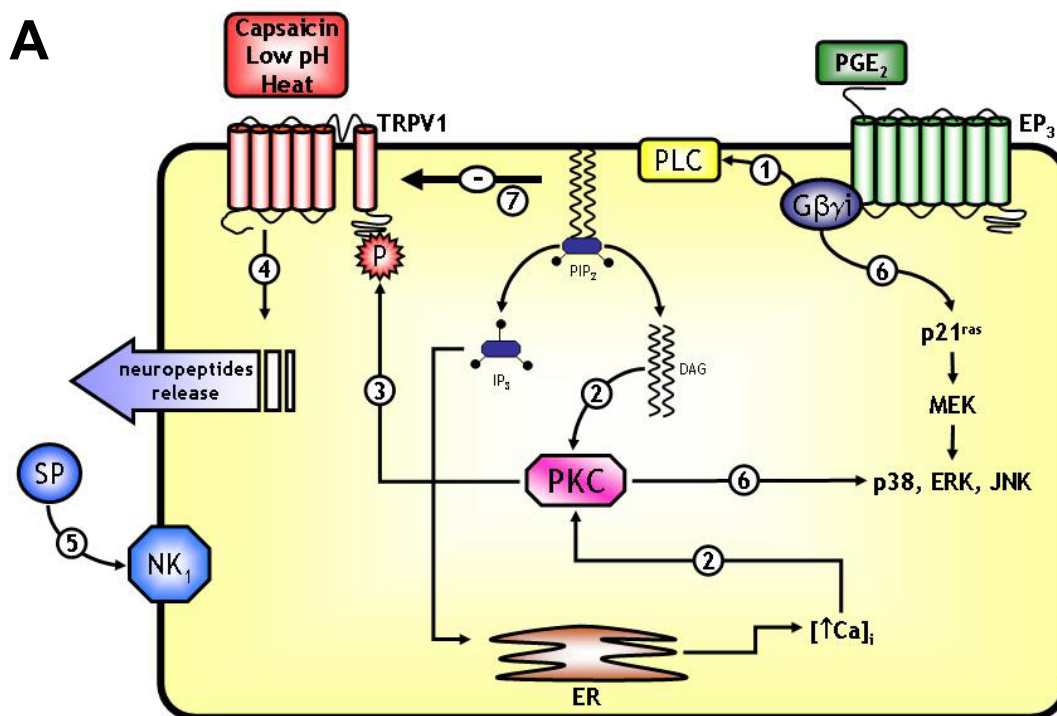
O último aspecto analisado no presente trabalho foi avaliar a participação dos derivados do ácido araquidônico, especificamente, os metabólitos formados por via das enzimas COX-1 e COX-2 no edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Os nossos resultados demonstram que tanto o inibidor seletivo da enzima COX-1 quanto o da COX-2, valeril salicilato e rofecoxib, respectivamente, foram capazes de inibir de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Isto sugere que a PGE<sub>2</sub> administrada exogenamente é capaz de induzir a síntese de metabólitos da COX. Existem duas hipóteses para explicar estes resultados. A primeira seria que juntamente



com a degranulação, a estimulação de mastócitos poderia levar à produção de eicosanóides (Nguyen et al., 2002). A segunda seria que um dos mecanismos de regulação da PLA<sub>2</sub> (enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico que se encontra normalmente esterificado a fosfolípidos de membrana) seria por fosforilação mediada por proteínas quinase como PKC, PKA e MAPKs (Chakraborti S, 2003; Flower RJ, 2003). Com base nessas evidências, podemos sugerir que a ativação de mastócitos, assim como a das proteínas quinase PKC e MAPK, podem contribuir para a liberação de eicosanóides no modelo aqui descrito.

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo permitem a proposição de um modelo para explicar os mecanismos da resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata de camundongos. Por este modelo, ilustrado na figura 16, a resposta parece ser mediada pela ativação do receptor EP<sub>3</sub>, associado com a estimulação das vias de sinalização da PKC e das MAPKS, participação das fibras sensíveis à capsaicina e do receptor TRPV1. A liberação de taquicininas, provavelmente SP, atuando sobre o receptor NK<sub>1</sub> também parece estar envolvida. Adicionalmente, a degranulação de mastócitos e síntese de eicosanóides parecem participar de maneira importante na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Nossos resultados contribuem para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias mediadas pela PGE<sub>2</sub> e sugerem o emprego de antagonistas seletivos para o receptor EP<sub>3</sub> como uma possível opção terapêutica para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

Mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>



**Figura 16.** Mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Como discutido, os presentes resultados fornecem consistentes evidências *in vivo* que suportam que, ao menos em parte, o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub> é indiretamente mediado pela ativação do TRPV1 e conseqüente liberação de SP. (1) A PGE<sub>2</sub>, atuando no receptor EP<sub>3</sub>, é capaz de estimular a enzima PLC, através da subunidade G<sub>βγi</sub>. (2) A formação de DAG e o aumento nas concentrações intracelulares de Ca<sup>+2</sup> induzido pelo IP3 são capazes de ativar a PKC. (3) A PKC ativada induz a fosforilação de alvos chaves como o receptor TRPV1. (4) O TRPV1 é um importante modulador da liberação de neuropeptídeos sensoriais como SP. (5) SP, atuando no receptor NK1 no endotélio venular promove vasodilatação e extravasamento plasmático de proteínas. (6) A liberação da subunidade βγ da proteína G<sub>i</sub> pode ativar a p21<sup>ras</sup>, que ativaria a via de sinalização das MAPKs. Além disso, a ativação da PKC e do TRPV1, pelo receptor EP<sub>3</sub>, pode também estimular a via das MAPKs. (7) A estimulação da PLC, induzida pela PGE<sub>2</sub>, promove a hidrólise do PIP<sub>2</sub>, que exerce um efeito inibitório sobre o TRPV1. (8) A ativação das proteínas quinase PKC e MAPKs, assim como a liberação de SP poderiam estimular a degranulação de mastócitos. (9) A degranulação de mastócitos promove a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, dentre eles, os eicosanóides. (10) As proteínas quinase PKC e MAPKs fosforilam a enzima PLA<sub>2</sub> ativando-a, com conseqüente síntese de eicosanóides.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adie, E.J., Mullaney, I., McKenzie, F.R., Milligan, G. Concurrent down-regulation of IP prostanoid receptors and the alpha-subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein (Gs) during prolonged exposure of neuroblastoma x glioma cells to prostanoid agonists. Quantification and functional implications. **Biochem. J.**, 285 (Pt 2):529-536, 1992.
- Akiba, S., Sato, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. **Biol. Pharm. Bull.**, 27(8):1174-1178, 2004.
- Alves, R.V., Campos, M.M., Santos, A.R., Calixto, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. **Peptides**, 20(8):921-927, 1999.
- Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., Majima, M. Host prostaglandin E(2)-EP<sub>3</sub> signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. **J. Exp. Med.**, 197(2):221-232, 2003.
- Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C., Gregory, S.A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **J. Clin. Invest.**, 97(11):2672-2679, 1996.
- Andre, E., Ferreira, J., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimantal in rats. **Neuropharmacology**, 46(4):590-597, 2004.
- Armstrong, R.A., Marr, C., Jones, R.L. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. **Prostaglandins**, 49(4):205-224, 1995.

- Audoly, L.P., Tilley, S.L., Goulet, J., Key, M., Nguyen, M., Stock, J.L., McNeish, J.D., Koller, B.H., Coffman, T.M. Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE<sub>2</sub>. **Am. J. Physiol.**, 277(3 Pt 2):H924-930, 1999.
- Audoly, L., Breyer, R.M. Substitution of charged amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 affect ligand binding and signal transduction of the prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor. **Mol. Pharmacol.**, 51(1):61-68, 1997.
- Bhattacharyya, D.K., Lecomte, M., Dunn, J., Morgans, D.J., Smith, W.L. Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, 317(1):19-24, 1995.
- Bastepe, M., Ashby, B. Identification of a region of the C-terminal domain involved in short-term desensitization of the prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor. **Br. J. Pharmacol.**, 126(1):365-371, 1999.
- Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K.M., Adam, M. Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> subtype. **J. Biol. Chem.**, 269(16):11873-11877, 1994.
- Bazan, N.G., Colangelo, V., Lukiw, W.J. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, 68-69:197-210, 2002.
- Bazan, N.G., Flower, R.J. Medicine: lipid signals in pain control. **Nature**, 420(6912):135-138, 2002.
- Beirith, A., Santos, A.R., Calixto, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, 969(1-2):110-116, 2003.

- Bevan, S., Geppetti, P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. **Trends Neurosci.**, 17(12):509-512, 1994.
- Boie, Y., Stocco, R., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Ungrin, M.D., Neuschafer-Rube, F., Puschel, G.P., Metters, K.M., Abramovitz, M. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E<sub>2</sub> prostanoid receptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.**, 340(2-3):227-241, 1997.
- Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P., Versteeg, H.H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 36(7):1187-1205, 2004.
- Brain, S.D. Sensory neuropeptides in the skin. In **Neurogenic Inflammation**. Geppetti, P., Holzer, P. (eds), Boca Raton: CRC Press., p:229-244, 1996.
- Brain, S.D., Williams, T.J. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, 97(1):77-82, 1989.
- Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., MacIntyre, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature**, 313(5997):54-56, 1985.
- Breyer, R.M., Emeson, R.B., Tarng, J.L., Breyer, M.D., Davis, L.S., Abromson, R.M., Ferrenbach, S.M. Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E<sub>2</sub> receptor. **J. Biol. Chem.**, 269(8):6163-6169, 1994.
- Breyer, R.M., Davis, L.S., Nian, C., Redha, R., Stillman, B., Jacobson, H.R., Breyer, M.D. Cloning and expression of the rabbit prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor. **Am. J. Physiol.**, 270(3 Pt 2):F485-493, 1996.
- Breyer, M.D., Breyer, R.M. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. **Annu. Rev. Physiol.**, 63:579-605, 2001.

- Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., Breyer, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 41:661-690, 2001.
- Burkey, T.H., Regan, J.W. Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP3A receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 211(1):152-158, 1995.
- Campbell, W.B., Halushka, P.V. Lipid-derived autacoids. Eicosanoids and Platelet-activation. In: **The Pharmacological Basic of Therapeutics**, Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. (eds), New York: McGraw-Hill., p:601-616, 1996.
- Campos, M.M., Calixto, J.B. Involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, 114(5):1005-1013, 1995.
- Camussi, G., Tetta, C., Segoloni, G., Chiara Deregibus, M., Bussolino, F. Neutropenia induced by platelet-activating factor (PAF-acether) released from neutrophils: the inhibitory effect of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). **Agents Actions**, 11(6-7):550-553, 1981.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389(6653):816-824, 1997.
- Cesare, P., Dekker, L.V., Sardini, A., Parker, P.J., McNaughton, P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, 23(3):617-624, 1999.
- Chakraborti, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal.**, 15(7):637-665, 2003.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by



acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 99(21):13926-13931, 2002.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. **Nature**, 411(6840):957-962, 2001.

Claveau, D., Sirinyan, M., Guay, J., Gordon, R., Chan, C.C., Bureau, Y., Riendeau, D., Mancini, J.A. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production in the rat adjuvant-induced arthritis model. **J. Immunol.**, 170(9):4738-4744, 2003.

Cohen, D.M. Mitogen-activated protein kinase cascades and the signaling of hyperosmotic stress to immediate early genes. **Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.**, 117(3):291-299, 1997.

Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, 46(2):205-229, 1994.

Coleman, R.A., Kennedy, I., Humphrey, P.P.A., Bunce, K., Lumley, P. Prostanoids and their receptors. In: **Comprehensive Medicinal Chemistry**. Emmett J.C. (ed), New York: Pergamon Press., 3:644-706, 1990.

Coleman, R.A., Kennedy, I., Sheldrick, R.L. New evidence with selective agonists and antagonists for the subclassification of PGE<sub>2</sub>-sensitive (EP) receptors. **Adv. Prostaglandin. Thromboxane. Leukot. Res.**, 17A:467-470, 1987.

Coleman, R.A., Kennedy, I., Sheldrick, R.L.G. Evidence for the existence of three subtypes of PGE sensitive (EP) receptors. **Br. J. Pharmacol. Proc. Suppl.**, 91:323P, 1987.

- Correll, C.C., Phelps, P.T., Anthes, J.C., Umland, S., Greenfeder, S. Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. **Neurosci. Lett.**, 370(1):55-60, 2004.
- 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(3):1095-1101, 1994.
- da Cunha, J.M., Rae, G.A., Ferreira, S.H., Cunha, F de Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **Eur. J. Pharmacol.**, 501(1-3):87-94, 2004.
- Davies, P., Bailey, P.J., Goldenberg, M.M., Ford-Hutchinson, A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, 2:335-357, 1984.
- Davis, R.J., Murdoch, C.E., Ali, M., Purbrick, S., Ravid, R., Baxter, G.S., Tilford, N., Sheldrick, R.L., Clark, K.L., Coleman, R.A. EP<sub>4</sub> prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol.**, 141(4):580-585, 2004.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B, Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, 12(12):1063-1073,1998.
- Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. **J. Cell Sci.**, 117(Pt 17):3715-3723, 2004.
- English, J.M., Cobb, M.H. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. **Trends Pharmacol. Sci.**, 23(1):40-45, 2002.

- Erin, N., Ersoy, Y., Ercan, F., Akici, A., Oktay, S. NK-1 antagonist CP99994 inhibits stress-induced mast cell degranulation in rats. **Clin. Exp. Dermatol.**, 29(6):644-648, 2004.
- Ferreira, J., Triches, K.M., Medeiros, R., Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, 117(1-2):171-181, 2005.
- Ferreira, J., da Silva, G.L., Calixto, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 141(5):787-794, 2004.
- Fiebich, B.L., Hull, M., Lieb, K., Gyufko, K., Berger, M., Bauer, J. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. **J. Neurochem.**, 68(2):704-709, 1997.
- FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat. Ver. Drug. Discov.**, 2(11):879-890, 2003.
- Flower, R.J. The development of COX-2 inhibitors. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 2(3):179-191, 2003.
- Flower, R.J., Harvey, E.A., Kingston, W.P. Inflammatory effects of prostaglandin D<sub>2</sub> in rat and human skin. **Br. J. Pharmacol.**, 56(2):229-233, 1976.
- Fujino, H., West, K.A., Regan, J.W. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> prostanoid receptors by prostaglandin E<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, 277(4):2614-2619, 2002.
- Fujino, H., Xu, W., Regan, J.W. Prostaglandin E<sub>2</sub> induced functional expression of early growth response factor-1 by EP<sub>4</sub>, but not EP<sub>2</sub>, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. **J. Biol. Chem.**, 278(14):12151-12156, 2003.

- Funk, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, 294(5548):1871-1875, 2001.
- Funk, C.D., Furci, L., FitzGerald, G.A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovitz, M., Adam, M., Metters, K.M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype. **J. Biol. Chem.**, 268(35):26767-26772, 1993.
- Gallant, M., Carriere, M.C., Chateauneuf, A., Denis, D., Gareau, Y., Godbout, C., Greig, G., Juteau, H., Lachance, N., Lacombe, P., Lamontagne, S., Metters, K.M., Rochette, C., Ruel, R., Slipetz, D., Sawyer, N., Tremblay, N., Labelle, M. Structure-activity relationship of biaryl acylsulfonamide analogues on the human EP(3) prostanoid receptor. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 12(18):2583-2586, 2002.
- Gamse, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 320(3):205-216, 1982.
- Gardiner, P.J. Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (psi) using a highly selective agonist, TR4979. **Br. J. Pharmacol.**, 87(1):45-56, 1986.
- Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 11(2):211-218, 1999.
- Gauvreau, G.M., Watson, R.M., O'Byrne, P.M. Protective effects of inhaled PGE<sub>2</sub> on allergen-induced airway responses and airway inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 159(1):31-36, 1999.
- Glover, S., de Carvalho, M.S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C.C., Gelb, M.H. Translocation of the 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub> from cytosol to the

nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. **J. Biol. Chem.**, 270(25):15359-15367, 1995.

Gomi, K., Zhu, F.G., Marshall, J.S. Prostaglandin E<sub>2</sub> selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. **J. Immunol.**, 165(11):6545-6552, 2000.

Goulet, J.L., Pace, A.J., Key, M.L., Byrum, R.S., Nguyen, M., Tilley, S.L., Morham, S.G., Langenbach, R., Stock, J.L., McNeish, J.D., Smithies, O., Coffman, T.M., Koller, B.H. E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E<sub>2</sub> in acute cutaneous inflammation. **J. Immunol.**, 173(2):1321-1326, 2004.

Gu, Q., Kwong, K., Lee, L.Y. Ca<sup>2+</sup> transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE<sub>2</sub> in vagal sensory neurons: role of cAMP/PKA signaling pathway. **J. Neurophysiol.**, 89(4):1985-1993, 2003.

Guan, Y., Zhang, Y., Breyer, R.M., Fowler, B., Davis, L., Hebert, R.L., Breyer, M.D. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP<sub>1</sub> receptor. **J. Clin. Invest.**, 102(1):194-201, 1998.

Gunthorpe, M.J., Rami, H.K., Jerman, J.C., Smart, D., Gill, C.H., Soffin, E.M., Luis Hannan, S., Lappin, S.C., Egerton, J., Smith, G.D., Worby, A., Howett, L., Owen, D., Nasir, S., Davies, C.H., Thompson, M., Wyman, P.A., Randall, A.D., Davis, J.B. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. **Neuropharmacology**, 46(1):133-149, 2004.

Haanen, C., Vermes, I. Apoptosis and inflammation. In: **Mediators of inflammation**. Haanen, C., Vermes, I., (eds), Oxford, London: Rapid communications of Oxford Ltd., p:5-15, 1995.

- Hallinan, E.A., Hagen, T.J., Husa, R.K., Tsymbalov, S., Rao, S.N., vanHoeck, J.P., Rafferty, M.F., Stapelfeld, A., Savage, M.A., Reichman, M. N-substituted dibenzoxazepines as analgesic PGE<sub>2</sub> antagonists. **J. Med. Chem.**, 36(22):3293-3299, 1993.
- Hata, A.N., Breyer, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol. Ther.**, 103(2):147-166, 2004.
- Hatae, N., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Prostaglandin receptors: advances in the study of EP<sub>3</sub> receptor signaling. **J. Biochem. (Tokyo)**, 131(6):781-784, 2002.
- Hebert, R.L., Jacobson, H.R., Breyer, M.D. PGE<sub>2</sub> inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation. **Am. J. Physiol.**, 259(2 Pt 2):F318-25, 1990.
- Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., Van Ackern, K. Lipid mediators in inflammatory disorders. **Drugs**, 55 (4):487-496, 1998.
- Hinson, R.M., Williams, J.A., Shacter, E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E<sub>2</sub> in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93(10):4885-4890, 1996.
- Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., Shimizu, T. Critical duration of intracellular Ca<sup>2+</sup> response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, 274(8):5163-5169, 1999.
- Hirabayashi, T., Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). **Biochim. Biophys. Acta.**, 1488(1-2):124-138, 2000.
- Hitchcock, M. Effect of inhibitors of prostaglandin synthesis and prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub>alpha on the immunologic release of mediators of inflammation

from actively sensitized guinea-pig lung. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 207(2):630-640, 1978.

Holzer, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmacol.**, 30(1):5-11, 1998.

Holzer, P., Jovic, M., Peskar, B.A. Mediation by prostaglandins of the nitric oxide-induced neurogenic vasodilatation in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, 116(5):2365-2370, 1995.

Holzer, P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, 121:49-146, 1992.

Holzer, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43(2):143-201, 1991.

Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, 24(3):739-768, 1988.

Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype. **J. Biol. Chem.**, 268(11):7759-7762, 1993.

Hylden, J.L., Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** 67(2-3):313-6, 1980.

Huerre, M.R., Gounon, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res. Immunol.**, 147(7):417-434, 1996.

- Ichikawa, A., Sugimoto, Y., Negishi, M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.**, 14(1-3):83-87, 1996.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-ishi, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, 69(24):2911-2919, 2001.
- Ikeda, K., Tanaka, K., Katori, M. Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increase by prostaglandin E<sub>2</sub> and arachidonic acid in rabbit skin. **Prostaglandins**, 10(5):747-758, 1975.
- Inoue, M., Kawashima, T., Allen, R.G., Ueda, H. Nocistatin and prepronociceptin/orphanin FQ 160-187 cause nociception through activation of Gi/o in capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 306(1):141-146, 2003.
- Irie, A., Segi, E., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Negishi, M. Mouse prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype mediates calcium signals via G<sub>i</sub> in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 204(1):303-309, 1994.
- Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP<sub>3</sub> subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. **Eur. J. Biochem.**, 217(1):313-8, 1993.
- Ishizuka, T., Chayama, K., Takeda, K., Hamelmann, E., Terada, N., Keller, G.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W. Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. **J. Immunol.**, 162(4):2087-2094, 1999.



- Jenkins, D.W., Feniuk, W., Humphrey, P.P. Characterization of the prostanoid receptor types involved in mediating calcitonin gene-related peptide release from cultured rat trigeminal neurones. **Br. J. Pharmacol.**, 134(6):1296-1302, 2001.
- Johnson, G.L., Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, 298:1911-1912, 2002.
- Juhlin, L., Michaelsson, G. Cutaneous vascular reactions to prostaglandins in healthy subjects and in patients with urticaria and atopic dermatitis. **Acta Derm. Venereol.**, 49(3):251-261, 1969.
- Kaliner, M., Austen, K.F. Cyclic AMP, ATP, and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells. **J. Immunol.**, 112(2):664-674, 1974.
- Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-Ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M., Kudo, I. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. **J. Biol. Chem.**, 279(32):33684-33695, 2004.
- Kassuya, C.A.L., Ferreira, J., Claudino, R.F., Calixto, J.B. **Peripheral PGE<sub>2</sub> causes stimulus-dependent and -independent nociception: The role of distinct prostanoid receptors and protein kinases.** (submetido à publicação).
- Katsuyama, M., Nishigaki, N., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. The mouse prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. **FEBS Lett.**, 372(2-3):151-156, 1995.

- Kay, L.J., Yeo, W.W., Peachell, P.T. Prostaglandin E<sub>2</sub> activates EP<sub>2</sub> receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. **Br. J. Pharmacol.**, 1-7, 2006.
- Kennedy, C.R., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C.D., Magnuson, M.A., Oates, J.A., Breyer, M.D., Breyer, R.M. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP<sub>2</sub> receptor. **Nat. Med.**, 5(2):217-220, 1999.
- Kessler, F., Habelt, C., Averbek, B., Reeh, P.W., Kress, M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. **Pain**, 83(2):289-295, 1999.
- King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tsichlis, P.N., Brugge, J.S. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. **Mol. Cell. Biol.**, 17(8):4406-4418, 1997.
- Kingston, W.P., Greaves, M.W. Actions of prostaglandin E<sub>2</sub> metabolites on skin microcirculation. **Agents Actions**, 16(1-2):13-14, 1985.
- Kojima, F., Naraba, H., Miyamoto, S., Beppu, M., Aoki, H., Kawai, S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. **Arthritis Res. Ther.**, 6(4):R355-365, 2004.
- Kojima, F., Kato, S., Kawai, S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 19(3):255-261, 2005.
- Kolakowski, L.F. Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. **Receptors Channels**, 2(1):1-7, 1994.
- Kopp, U.C., Cicha, M.Z., Nakamura, K., Nusing, R.M., Smith, L.A., Hokfelt, T. Activation of EP<sub>4</sub> receptors contributes to prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated

- stimulation of renal sensory nerves. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, 287(6):F1269-1282, 2004.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, 81(2):807-869, 2001.
- Lanthorn, T., Bianchi, R., Perkins, W. EP<sub>1</sub> receptor antagonist blocks the diarrheagenic, but not cytoprotective, actions of a synthetic prostaglandin. **Drug Dev. Res.**, 34:35–38, 1995.
- Lariviere, W.R., Chesler, E.J., Mogil, J.S. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 297(2):467-473, 2001.
- Levitzki, A., Gazit, A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. **Science**, 267(5205):1782-1788, 1995.
- Lim, H., Dey, S.K. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>2</sub> gene expression in the mouse uterus coincides with differentiation of the luminal epithelium for implantation. **Endocrinology**, 138(11):4599-4606, 1997.
- Loeffler, L.J., Lovenberg, W., Sjoerdsma, A. Effects of dibutyl-3',5'-cyclic adenosine monophosphate, phosphodiesterase inhibitors and prostaglandin E<sub>1</sub> on compound 48-80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, 20(9):2287-2297, 1971.
- Lopshire, J.C., Nicol, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E<sub>2</sub> enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. **J. Neurosci.**, 18(16):6081-6092, 1998.
- Maggi, C.A. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. **Regul. Pept.**, 70(2-3):75-90, 1997.

- Minghetti, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 63(9):901-910, 2004.
- Mitchell, J.A., Warner, T.D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 5: 75-86.
- Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., Tominaga, M. Sensitization of TRPV1 by EP<sub>1</sub> and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol. Pain**, 1(1):1-13, 2005.
- Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., Negishi, M. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat nervous system. **J. Comp. Neurol.**, 421(4):543-569, 2000.
- Nakao, A., Allen, M.L., Sonnenburg, W.K., Smith, W.L. Regulation of cAMP metabolism by PGE<sub>2</sub> in cortical and medullary thick ascending limb of Henle's loop. **Am. J. Physiol.**, 256(3 Pt 1):C652-C657, 1989.
- Nakayama, T., Mutsuga, N., Yao, L., Tosato, G. Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **J. Leukoc. Biol.**, 79(1):95-104, 2006.
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. **Nature**, 365(6442):166-170, 1993.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol. Rev.**, 79(4):1193-1226, 1999.

- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., Lefkowitz, J.B. Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, 55:69-102, 1986.
- Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S., Ichikawa, A. Two isoforms of prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. Different COOH-terminal domains determine sensitivity to agonist-induced desensitization. **J. Biol. Chem.**, 268(13):9517-9521, 1993.
- Negishi, M., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. Prostaglandin E receptors. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.**, 12(2-3):379-391, 1995.
- Nemoto, K., Pilbeam, C.C., Bilak, S.R., Raisz, L.G. Molecular cloning and expression of a rat prostaglandin E<sub>2</sub> receptor of the EP<sub>2</sub> subtype. **Prostaglandins**, 54(4):713-725, 1997.
- Nguyen, M., Solle, M., Audoly, L.P., Tilley, S.L., Stock, J.L., McNeish, J.D., Coffman, T.M., Dombrowicz, D., Koller, B.H. Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production. **J. Immunol.**, 169(8):4586-4593, 2002.
- Nishigaki, N., Negishi, M., Ichikawa, A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub>, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. **Mol. Pharmacol.**, 50(4):1031-1037, 1996.
- Nishigaki, N., Negishi, M., Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Narumiya, S., Ichikawa, A. Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells EP<sub>4</sub> subtype. **FEBS Lett.**, 364(3):339-341, 1995.
- Nishigaki, N., Negishi, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Narumiya, S., Ichikawa, A. Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNu-2cl3. **Biochem. Pharmacol.**, 46(5):863-869, 1993.

- Ochocka, A.M., Pawelczyk, T. Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C and their role in signal transduction in the cell. **Acta Biochim. Pol.**, 50(4):1097-1110, 2003.
- Ohno, T., Katori, M., Majima, M., Saeki, T., Boku, K., Nishiyama, K., Hayashi, H., Saigenji, K. Dilatation and constriction of rat gastric mucosal microvessels through prostaglandin EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 13(9):1243-1250, 1999.
- Oida, H., Namba, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Ichikawa, A., Narumiya, S. In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. **Br. J. Pharmacol.**, 116(7):2828-2837, 1995.
- Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, 102(4):937-944, 2001.
- Parker, P.J., Murray-Rust, J. PKC at a glance. **J. Cell. Sci.**, 117(Pt 2):131-132, 2004.
- Pavord, I.D., Wong, C.S., Williams, J., Tattersfield, A.E. Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on allergen-induced asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 148(1):87-90, 1993.
- Pavord, I.D., Wisniewski, A., Mathur, R., Wahedna, I., Knox, A.J., Tattersfield, A.E. Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on bronchial reactivity to sodium metabisulphite and methacholine in patients with asthma. **Thorax**, 46(9):633-637, 1991.
- Premkumar, L.S., Ahern, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, 408(6815):985-990, 2000.

- Prescott, E.D., Julius, D. A modular PIP<sub>2</sub> binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. **Science**, 300(5623):1284-1288, 2003.
- Poole, A.W., Pula, G., Hers, I., Crosby, D., Jones, M.L. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, 25(10):528-535, 2004.
- Portanova, J.P., Zhang, Y., Anderson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L., Seibert, K., Gregory, S.A., Isakson, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, 184(3):883-891, 1996.
- Qiu, Z.H., Leslie, C.C. Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, 269(30):19480-19487, 1994.
- Raud, J. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 99(3):449-454, 1990.
- Raud, J., Dahlen, S.E., Smedegard, G., Hedqvist, P. An intravital microscopic model for mast cell-dependent inflammation in the hamster cheek pouch. **Acta Physiol. Scand.** 135(2):95-105, 1989.
- Raud, J., Lindbom, L., Dahlen, S.E., Hedqvist, P. Periarteriolar localization of mast cells promotes oriented interstitial migration of leukocytes in the hamster cheek pouch. **Am. J. Pathol.**, 134(1):161-169, 1989.
- Raud, J., Dahlen, S.E., Sydbom, A., Lindbom, L., Hedqvist, P. Enhancement of acute allergic inflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E<sub>2</sub>: apparent correlation with in vivo modulation of mediator release. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 85(7):2315-2319, 1988.

- Regan, J.W., Bailey, T.J., Donello, J.E., Pierce, K.L., Pepperl, D.J., Zhang, D., Kedzie, K.M., Fairbairn, C.E., Bogardus, A.M., Woodward, D.F. Molecular cloning and expression of human EP<sub>3</sub> receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini. **Br. J. Pharmacol.**, 112(2):377-385, 1994.
- Regan, J.W., Bailey, T.J., Pepperl, D.J., Pierce, K.L., Bogardus, A.M., Donello, J.E., Fairbairn, C.E., Kedzie, K.M., Woodward, D.F., Gil, D.W. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. **Mol. Pharmacol.**, 46(2):213-220, 1994.
- Regoli, D., Boudon, A., Fauchere, J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.**, 46(4):551-599, 1994.
- Richardson, J.D., Vasko, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 302(3):839-845, 2002.
- Salamanca, D.A., Khalil, R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem. Pharmacol.**, 70(11):1537-1547, 2005.
- Santos, A.R., Calixto, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, 31(4):381-389, 1997.
- Schreiber, S., Raedler, A. The role of arachidonic acid metabolism in the pathophysiology of chronic inflammatory intestinal diseases. **Immun. Infekt.**, 18(4):115-120, 1990.
- Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., Lin, L.L. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, 270(51):30749-30754, 1995.



- Schwaner, I., Offermanns, S., Spicher, K., Seifert, R., Schultz, G. Differential activation of G<sub>i</sub> and G<sub>s</sub> proteins by E- and I-type prostaglandins in membranes from the human erythroleukaemia cell line, HEL. **Biochim. Biophys. Acta**, 1265(1):8-14, 1995.
- Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18(3):385-405, 2004.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, 56(3):387-437, 2004.
- Skofitsch, G., Savitt, J.M., Jacobowitz, D.M. Suggestive evidence for a functional unit between mast cells and substance P fibers in the rat diaphragm and mesentery. **Histochemistry**, 82(1):5-8, 1985.
- Sridhar, R., Hanson-Painton, O., Cooper, D.R. Protein kinases as therapeutic targets. **Pharm. Res.** 17:1345-1353, 2000.
- Shimazaki, Y., Kameo, K., Tanami, T., Tanaka, H., Ono, N., Kiuchi, Y., Okamoto, S., Sato, F., Ichikawa, A. Synthesis and structure-activity relationships of a new class of selective EP<sub>3</sub> receptor agonist, 13,14-didehydro-16-phenoxy analogues of prostaglandin E<sub>1</sub>. **Bioorg. Med. Chem.**, 8(2):353-362, 2000.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, 56(3):387-437, 2004.
- Smith, J.A., Davis, C.L., Burgess, G.M. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. **Eur. J. Neurosci.**, 12(9):3250-3258, 2000.

- Smith, J.A., Amagasu, S.M., Eglen, R.M., Hunter, J.C., Bley, K.R. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. **Br. J. Pharmacol.**, 124(3):513-523, 1998.
- Smith, W.L., Marnett, L.J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1083(1):1-17, 1991.
- Smith, W.L., Dewitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv. Immunol.**, 62:167-215, 1996.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, 69:145-182, 2000.
- Solomon, L.M., Juhlin, L., Kirschenbaum, M.B. Prostaglandin on cutaneous vasculature. **J. Invest. Dermatol.**, 51(4):280-282, 1968.
- Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S., Ichikawa, A. Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> in the mouse nervous system. **Neuroscience**, 62(3):919-928, 1994.
- Sugimoto, Y., Negishi, M., Hayashi, Y., Namba, T., Honda, A., Watabe, A., Hirata, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. Two isoforms of the EP<sub>3</sub> receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with G<sub>i</sub> proteins. **J. Biol. Chem.**, 268(4):2712-2718, 1993.
- Sweitzer, S.M., Peters, M.C., Ma, J.Y., Kerr, I., Mangadu, R., Chakravarty, S., Dugar, S., Medicherla, S., Protter, A.A., Yeomans, D.C. Peripheral and central p38 MAPK mediates capsaicin-induced hyperalgesia. **Pain**, 111(3):278-285, 2004.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D. The cloned capsaicin

- receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, 21(3):531-543, 1998.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. **Nature**, 395(6699):281-284, 1998.
- Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., Willoughby, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91(6):2046-2050, 1994.
- Vasko, M.R., VanLooy, J.W., Rang, H.P. Heat and protons stimulate neuropeptide release from rat sensory neurons in culture. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 25:1441, 1999.
- Vlahos, C.J., McDowell, S.A., Clerk, A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 2(2):99-113, 2003.
- Waetzig, G.H., Schreiber, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 18(1):17-32, 2003.
- Walch, L., de Montpreville, V., Brink, C., Norel, X. Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. **Br. J. Pharmacol.**, 134(8):1671-1678, 2001.
- Walker, J.L. The regulatory function of prostaglandins in the release of histamine and SRS-A from passively sensitized human lung tissue. In: **Advances in the Biosciences**. Bergström, S., Bernhard, S. (ed), New York: Pergamon Press., 9:235-240.

- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., Vane, J.R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96(13):7563-7568, 1999.
- Warren, J.B., Wilson, A.J., Loi, R.K., Coughlan, M.L. Opposing roles of cyclic AMP in the vascular control of edema formation. **FASEB J.**, 7(14):1394-1400, 1993.
- Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., Ichikawa, A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP<sub>1</sub> subtype of prostaglandin E receptor. **J. Biol. Chem.**, 268(27):20175-20178, 1993.
- Watanabe, T., Yatomi, Y., Sunaga, S., Miki, I., Ishii, A., Nakao, A., Higashihara, M., Seyama, Y., Ogura, M., Saito, H. Characterization of prostaglandin and thromboxane receptors expressed on a megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01s. **Blood**, 78(9):2328-2336, 1991.
- Weiss, U., Editorial nature insight: Inflammation. **Nature**, 420:845, 2002.
- Weissmann, G., Smolen, J.E., Korchak, H. Prostaglandins and inflammation: receptor/cyclase coupling as an explanation of why PGEs and PGI<sub>2</sub> inhibit functions of inflammatory cells. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, 8:1637-1653, 1980.
- White, D.M. Mechanism of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced substance P release from cultured sensory neurons. **Neuroscience**, 70(2):561-565, 1996.
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. **J. Mol. Med.**, 74(10):589-607, 1996.

- Williams, J.A., Shacter, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E<sub>2</sub>. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, 272(41):25693-25699, 1997.
- Williams, K.I., Higgs, G.A. Eicosanoids and inflammation. **J. Pathol.**, 156(2):101-110, 1988.
- Williams, T.J. Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 65(3):517-524, 1979.
- Williams, T.J., Morley, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, 246(5430):215-217, 1973.
- Woo, S.K., Roszkowski, P., Waterbury, L.D., Garay, G.L. Gastric mucosal binding studies with enprostil: a potent anti-ulcer prostaglandin. **Prostaglandins**, 32(2):243-257, 1986.
- Wolfe, S.L., Horrocks, L.A. Eicosanoids. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Siegel, G.L., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Molinoff, P.B. et al., (eds), New York: Raven Press Ltd, p.475-498, 1994.
- Wong, P.Y.K., Dennis, E.D. Phospholipase A<sub>2</sub>: Role and function in inflammation. Wong, P.Y.K., Dennis E.D. (eds), New York: Plenum Press, p. 83-103, 1990.
- Yang, S.H., Sharrocks, A.D., Whitmarsh, A.J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. **Gene**, 320:3-21, 2003.
- Yedgar, S., Lichtenberg, D., Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. **Biochim. Biophys. Acta.**, 31;1488(1-2):182-187, 2000.
- Yuhki, K., Ueno, A., Naraba, H., Kojima, F., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oh-ishi, S. Prostaglandin receptors EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, and IP mediate exudate formation in

carrageenin-induced mouse pleurisy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 311(3):1218-1224, 2004.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16(2):109-110, 1983.

**ANEXOS**

---

## **ANEXO**

**A maioria destes resultados foi aceito à publicação:**

CLAUDINO, R.F., KASSUYA, C.A.L., FERREIRA, J., CALIXTO, J.B.  
Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in  
prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-induced mouse paw edema. **J. Pharmacol. Exp.  
Ther. (no prelo).**