

ANA FLÁVIA PASZCUK

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS
E INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS PELA TRIPSINA NA PATA DE
CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Prof. Dra. Maria Martha Campos

Florianópolis

2007

PASZCUK, Ana Flávia. **Mecanismos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina na pata de camundongos.** Florianópolis, 2007, 109 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientadora: Dra. Maria Martha Campos

Defesa: 15/02/2007

A tripsina é uma protease capaz de gerar respostas nociceptivas e inflamatórias por ativar o receptor PAR-2, um membro dos receptores ativados por proteases (PARs). O objetivo do presente estudo foi analisar os mecanismos e mediadores envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina na pata de camundongos. A injeção intraplantar de tripsina produziu aumento tempo- e dose-dependente do volume da pata dos camundongos e nocicepção espontânea marcante. Os antagonistas seletivos dos receptores B₂ para cininas, CGRP, TRPV1, os inibidores das enzimas COX1/2, COX-2, o inibidor de síntese protéica dexametasona ou a deleção do receptor p55 do TNF α , reduziram significativamente a resposta edematogênica induzida pela tripsina. Esta resposta foi parcialmente inibida pelos antagonistas dos receptores B₁ para cininas, H₁ de histamina e de neurocininas, pelo inibidor da enzima COX-1, ou pelo depletor, composto 48/80, ou pelo estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio. Interessantemente, o edema de pata foi parcialmente reduzido em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2. Já a nocicepção induzida pela tripsina foi significativamente reduzida pelos antagonistas seletivos dos receptores B₂ para cininas, do TRPV1, dos receptores para os neurocininas ou CGRP, também pela degranulação e estabilização de mastócitos, além da deleção gênica do receptor p55 do TNF α . A nocicepção espontânea foi praticamente abolida em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2. A tripsina produziu aumento na atividade da enzima mieloperoxidase, o qual foi ausente em animais com deleção gênica para o PAR-2. A tripsina também induziu aumento tempo-dependente dos níveis das citocinas TNF α e IL-1 β na pata dos camundongos. O presente estudo mostra que a injeção intraplantar de tripsina na pata de camundongos produz respostas nociceptivas e inflamatórias marcantes que são mediadas pela geração de um conjunto de mediadores inflamatórios e, em grande parte, mas não exclusivamente, pela ativação do receptor PAR-2.

Palavras-chave: Tripsina; PAR-2, inflamação; edema; nocicepção; camundongo

"Quando ouvires os aplausos do triunfo, que ressoem também aos teus ouvidos os risos que provocaste com os teus fracassos."

Josemaria Escrivá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que é a razão da minha existência e minha fé. É nele que acredito e que confio todos os meus caminhos.

Ao professor Dr. João Batista Calixto, meu especial agradecimento por sua inestimável orientação, conhecimentos ofertados, constante incentivo, apoio, confiança e, principalmente, pelo grande exemplo de competência, dedicação e amor a ciência.

Aos meus pais Élcio e Jurema, meus irmãos Mariane e Eduardo e demais familiares, principalmente pelo apoio e amor depositados ao longo destes anos. Suportando a saudade, mas sempre me ajudando a vencer as dificuldades.

Ao meu querido e amado namorado Thiago, por todos os momentos de alegria, carinho e compreensão. Pela paciência e amor incondicional durante estes anos de distância.

Em especial a Dra. Maria Martha Campos, pela inestimável co-orientação e pela segurança, amizade e conhecimentos transmitidos durante toda a realização deste trabalho. Seus ensinamentos e seu auxílio foram fundamentais na conquista dos meus objetivos.

Queria agradecer a minha companheira de morada Nara Lins Meira Quintão pela amizade e companheirismo durante estes 2 anos de convivência, além de agradecer pelos conhecimentos transmitidos, paciência e incentivo constantes durante todo este tempo.

As minhas grandes amigas Aline, Juliana, Patricia, Beth e Giselle pela amizade, disposição e carinho. Os dias no laboratório não seriam os mesmos sem vocês.

Aos meus amigos Allisson, Alexandre, Andrey, Carlos Eduardo, Dani Hara, Dani Leite, Denise, Edinéia, Fernanda, Gustavo, Juliana Chaves, Marianne, Marina, Rafaela, Rodrigo, Robson e alunos do projeto “Novos Talentos”, em especial, Bruna, Luiz, Gabriel, Ismael e Jonny, e demais colegas de outros laboratórios pelo companheirismo, apoio, troca de informações e

momentos de descontração que foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Gostaria de agradecer a Prof. Dra. Nathalie Vergnolle que de grande coração aceitou realizar uma parte do trabalho em seu laboratório na Universidade de Calgary, Canadá. Os seus resultados foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo constante companheirismo e por terem compartilhado seus conhecimentos ao longo destes anos.

À Diana e ao Pedro, por sua disposição e boa vontade, que indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	i
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Edema de pata induzido pela tripsina	21
3.3. Nocicepção induzida pela tripsina	21
3.4. Análise dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina	22
3.5. Ensaio Bioquímicos	23
3.5.1. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)	23
3.5.2. Determinação dos níveis de citocinas na pata de camundongos	24
3.6. Drogas e reagentes	25
3.7. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Caracterização da resposta edematogênica induzida pela tripsina em camundongos	27
4.2. Mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	28

4.2.1. Envolvimento do sistema de cininas no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	29
4.2.2. Envolvimento dos mastócitos e dos produtos da degranulação no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	31
4.2.3. Participação das enzimas ciclooxigenase (COX) e síntese proteica no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	34
4.2.4. Participação das neurocininas e do CGRP no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	37
4.2.5. Participação do receptor TRPV1 no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	40
4.2.6. Possível envolvimento do óxido nítrico (NO) no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	41
4.2.7. Envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF α no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	43
4.2.8. Envolvimento do receptor PAR-2 no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos	43
4.3. Caracterização da resposta nociceptiva induzida pela tripsina em camundongos	44
4.4. Mecanismos envolvidos na nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos	46
4.4.1. Envolvimento do sistema de cininas na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	46
4.4.2. Envolvimento dos mastócitos e produtos da degranulação na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	47

4.4.3. Participação das enzimas ciclooxigenase (COX) e da síntese protéica na nocicepção espontânea induzida pela tripsina.....	49
4.4.4. Participação das neurocininas e do CGRP na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	50
4.4.5. Participação do receptor TRPV1 na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	52
4.4.6. Envolvimento do óxido nítrico (NO) na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	53
4.4.7. Envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF α na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	53
4.4.8. Envolvimento do receptor PAR-2 na nocicepção espontânea induzida pela tripsina	54
4.5. Medida da atividade da enzima MPO após a injeção de tripsina na pata de camundongos	55
4.6. Medida dos níveis de IL-1 β e TNF α após a injeção de tripsina na pata de camundongos	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. Mecanismo proposto para o edema de pata (a) e nocicepção espontânea (b) induzidos pela tripsina na pata de camundongos	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXO	109

LISTA DE ABREVIÇÕES

aa	Aminoácidos
AINEs	Antiinflamatórios não-estereoidais
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativada 1
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
°C	Graus centígrados
C57/Bl6	Animais controle selvagem
Ca ²⁺	Íon cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
e.p.m.	Erro padrão da média
g	Gramas
GR	Receptores de glicocorticóides
h	Hora
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
i.pl.	Intraplantar
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenoso
JNK	Quinase da porção terminal da c-jun
kg	Quilogramas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
mg	Miligramas
min	Minuto
ml	Mililitro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
Na ⁺	Íon sódio
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAR	Receptor ativado por proteases
PAR-2 ^{-/-}	Animais com deleção gênica para o receptor PAR-2
PG	Prostaglandina
PI ₃ K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
s	Segundos
s.c.	Subcutâneo
SFLLN	serina – fenilalanina – leucina – leucina - asparagina

SLIGKV	serina – leucina – isoleucina – glicina – lisina - valina
SLIGRL	serina – leucina – isoleucina – glicina – arginina - leucina
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TFLLR	treonina – fenilalanina – leucina – leucina - arginina
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNF α p55 ^{-/-}	Animal com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α
TRPV1	Receptor de potencial transitório 1
U	Unidades
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ativação dos receptores PARs.....	05
Figura 2. Padronização do modelo de edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	28
Figura 3. Efeito do tratamento sistêmico com os antagonistas seletivos para os receptores para cininas sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	30
Figura 4. Efeito do tratamento com o degranulador ou com o estabilizador de mastócitos sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. ...	32
Figura 5. Efeito do antagonista dos receptores H ₁ de histamina sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.....	33
Figura 6. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da enzima COX sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	34
Figura 7. Efeito do tratamento com inibidores seletivos das enzimas COX-1 e COX-2 sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	36
Figura 8. Efeito do tratamento com o inibidor de síntese protéica sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	37
Figura 9. Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor NK ₁ sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	38
Figura 10. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores NK ₂ e NK ₃ sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	39
Figura 11. Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor CGRP sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	40
Figura 12. Efeito do tratamento com o inibidor do receptor TRPV1 sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	41
Figura 13. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da NOS e da deleção gênica para a iNOS sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos.	42
Figura 14. Edema de pata induzido pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α	43
Figura 15. Edema de pata induzido pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor PAR-2.	44

Figura 16. Padronização do modelo de nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos.	45
Figura 17. Efeito do tratamento sistêmico com os antagonistas seletivos para os receptores para cininas sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos.	47
Figura 18. Efeito do tratamento com o degranulador ou com o estabilizador de mastócitos sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	48
Figura 19. Efeito do antagonista do receptor H ₁ de histamina sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	49
Figura 20. Efeito do tratamento com inibidores da enzima COX e da síntese protéica sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	50
Figura 21. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores NK ₁ , NK ₂ , NK ₃ e CGRP sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	51
Figura 22. Efeito do tratamento com o inibidor seletivo do receptor TRPV1 sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	52
Figura 23. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos	53
Figura 24. Nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α	54
Figura 25. Nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor PAR-2	55
Figura 26. Efeito tempo-dependente da injeção de tripsina sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata de camundongos suíços e camundongos PAR-2 ^{-/-}	56
Figura 27. Efeito tempo-dependente do tratamento com tripsina sobre os níveis de TNF α e IL-1 β na pata de camundongos.	58
Figura 28. Mecanismos envolvidos no edema de pata (a) e nocicepção espontânea (b) induzidos pela tripsina em camundongos	83

RESUMO

Além de funcionarem como enzimas de degradação, certas proteases atuam como moléculas de sinalização que regulam algumas atividades celulares por clivarem e ativarem membros da família de receptores acoplados à proteína G, os receptores ativados por proteases (PARs). A tripsina é uma protease capaz de gerar respostas nociceptivas e inflamatórias por ativar principalmente o receptor PAR-2. O objetivo do presente estudo foi analisar os mecanismos e mediadores envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina na pata de camundongos. A injeção intraplantar de tripsina produziu aumento tempo- e dose-dependente do volume da pata dos camundongos associado com nocicepção espontânea. A resposta edematogênica foi inibida pelo antagonista seletivo do receptor B₂ para as cininas FR173657 (48 ± 5 %), pelo inibidor não seletivo das enzimas COX1/2 indometacina (33 ± 3 %), pelo bloqueador da enzima COX-2 celecoxib (30 ± 5 %), pelo inibidor de síntese protéica dexametasona (30 ± 6 %), pelo antagonista do receptor de CGRP CGRP₈₋₃₇ (39 ± 6 %), pelo antagonista do TRPV1 SB366791 (49 ± 4 %) ou pela deleção do receptor p55 do TNF α (42 ± 6 %). Ademais, o antagonista do receptor B₁ para cininas SSR240612, o inibidor da enzima COX-1 SC560, o depletor de mastócitos composto 48-80, o estabilizador de mastócitos cromoglicato de sódio, o antagonista do receptor H₁ de histamina pirlamina ou os antagonistas seletivos para os receptores NK₁ FK888, NK₂ SR48968, NK₃ SR142801, foram todos capazes de reduzir o edema induzido pela tripsina. Ao contrário, o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS) L-NOARG ou a deleção gênica enzima NOS induzida não foram capazes de reduzir o edema de pata causado pela tripsina.

Interessantemente, o edema de pata foi significativamente reduzido em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2, apenas na primeira hora, mas não nos pontos tardios após a injeção de tripsina. Já a nocicepção induzida pela tripsina foi significativamente reduzida pelo FR173657 ($57 \pm 8 \%$), composto 48/80 ($56 \pm 6 \%$), cromoglicato de sódio ($47 \pm 7 \%$), SB366791 ($48 \pm 8 \%$), FK888 ($41 \pm 8 \%$), SR48968 ($60 \pm 3 \%$), SR142801 ($46 \pm 9 \%$), CGRP₈₋₃₇ ($35 \pm 5 \%$), em animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α ($38 \pm 6 \%$) ou em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2 ($85 \pm 3 \%$). Entretanto, as respostas nociceptivas induzidas pela tripsina não foram alteradas pelo tratamento com o SSR240612, indometacina, dexametasona, pirilamina ou L-NOARG. Além disso, a tripsina produziu aumento na atividade da enzima mieloperoxidase, o qual foi ausente em animais com deleção gênica para o PAR-2. A tripsina também induziu aumento tempo-dependente dos níveis das citocinas TNF α e IL-1 β na pata dos camundongos. O presente estudo mostra que a injeção intraplantar de tripsina na pata de camundongos produz respostas nociceptivas e inflamatórias marcantes que são mediadas pela geração de um conjunto de mediadores inflamatórios e, em grande parte, mas não exclusivamente, pela ativação do receptor PAR-2.

ABSTRACT

Besides degrading proteins, certain proteases act as signaling molecules that regulate cells by cleaving and activating members of a new family of G-protein coupled receptors, collectively known as proteinase-activated receptors (PARs). Trypsin is a protease able to cause nociceptive and inflammatory responses by activating protease-activated receptor-2 (PAR-2). The present study attempted to analyze some of the mechanisms involved in the inflammatory and nociceptive responses caused by trypsin in the mouse hind paw. Intraplantar trypsin injection produced dose- and time-related increases in mouse paw edema associated with spontaneous nociception. The edematogenic response was inhibited by the kinin B₂ receptor antagonist FR173657 (48 ± 5 %), the COX1/2 inhibitor indomethacin (33 ± 3 %), the COX-2 blocker celecoxib (30 ± 5 %), the protein synthesis inhibitor dexamethasone (30 ± 6 %), the CGRP antagonist CGRP₈₋₃₇ (39 ± 6 %), the TRPV1 antagonist SB366791 (49 ± 4 %) or by the deletion of the gene encoding the TNFα p55 receptor (42 ± 6 %). In addition, the kinin B₁ receptor antagonist SSR240612, the COX-1 inhibitor SC560, the mast-cell depletor compound 48/80, the mast-cell stabilizer cromolyn, the histamine H₁ receptor antagonist pyrilamine or the selective NK₁ FK888, NK₂ SR48968, NK₃ SR142801 receptor antagonists all partially reduced trypsin-induced edema. In contrast, non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NOARG or deletion of the gene encoding inducible NOS did not significantly affect the edema caused by trypsin. Trypsin-induced edema was significantly reduced in PAR₂-deficient mice compared to wild-type, at the early (first hour) but not later time-points after trypsin injection. On the

other hand, trypsin-induced nociception was diminished by FR173657 (57 ± 8 %), compound 48/80 (56 ± 6 %), cromolyn (47 ± 7 %), SB366791 (48 ± 8 %), FK888 (41 ± 8 %), SR48968 (60 ± 3 %), SR142801 (46 ± 9 %) or CGRP₈₋₃₇ (35 ± 5 %) and also in TNF α p55 receptor- deficient (38 ± 6 %) as well as in PAR₂-receptor deficient mice (85 ± 3 %). However, trypsin-induced nociceptive changes were not significantly altered by SSR240612, indomethacin, dexamethasone, pyrilamine or L-NOARG. Moreover, trypsin produced a marked increase of myeloperoxidase activity, an event which was absent in PAR₂-deficient mice, and produced a time-dependent release of IL-1 β and TNF α in the mouse paw. Therefore, these results demonstrate that intraplantar injection of trypsin into the mouse paw produces marked inflammatory and nociceptive responses that are mediated by a complex range of mediators and are largely, but not exclusively, related to the activation of PAR₂-receptors.

1. INTRODUÇÃO

Os genes responsáveis por codificar as enzimas proteolíticas compreendem aproximadamente 2 % do genoma humano (Southan, 2001). As enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases, são responsáveis pela quebra das ligações peptídicas em proteínas, e exercem importantes papéis em processos fisiológicos. Durante décadas, foram consideradas simplesmente enzimas de degradação, com funções essenciais no trato gastrointestinal e em sítios inflamatórios, sendo responsáveis pela hidrólise de restos celulares. Entretanto, atualmente, sabe-se que as proteases participam de inúmeros processos biológicos que envolvem desde a cascata da coagulação até o controle do ciclo celular (Cirino e Vergnolle, 2006). Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, além de mecanismos invasivos de tumores e no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microorganismos patogênicos.

As proteases constituem uma grande família, dividida em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas nas regiões N- ou C-terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidase) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidase). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C-terminal.

Atualmente as endopeptidases são divididas em 4 grupos: (1) as serino-proteases, as quais possuem resíduos de serina em seu sítio catalítico e compreendem principalmente enzimas digestivas como a quimotripsina e a tripsina, (2) as cisteíno-proteases, possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo, e como exemplo possuem a papaína e a bromelaina, (3) as aspartil-proteases, as quais requerem um resíduo de aspartato para que ocorra a reação catalítica, neste grupo estão presentes algumas enzimas digestivas como a pepsina e quimosina, e por fim (4) as metalo-proteases, que requerem um íon metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) para que a catálise ocorra, e estão envolvidas em um grande número de processos fisiológicos no organismo (Rawlings e Barret, 1993; Nagase, 1994; Krem *et al.*, 2000; Barret e Rawlings, 2001).

As proteases podem ativar diferentes tipos celulares por meio de vários mecanismos. Podem transformar um pró-receptor ou um pró-agonista em um receptor ou agonista ativo pela clivagem destas moléculas, respectivamente ou, atuarem como agonistas através da ligação no sítio não catalítico de um receptor (Vergnolle, 2005). De maneira interessante, estudos realizados nos últimos anos demonstraram que muitas proteases atuam como moléculas sinalizadoras, por interagirem com um grupo de receptores acoplados à proteínas G (GPCR), chamados de receptores ativados por proteases (PAR – *proteinase-activated receptors*) (Kawabata e Kuroda, 2000; Macfarlane *et al.*, 2001; Schmidlin e Bunnett, 2001; Ossovskaya e Bunnet, 2004). A identificação destes receptores ativados especificamente por proteases mostrou que as mesmas não são apenas enzimas de degradação, mas também importantes moléculas de sinalização.

Quatro membros desta família de receptores foram clonados até o momento (PAR-1 ao PAR-4), a partir do genoma de roedores e humanos (Vu *et al.*, 1991; Bohm *et al.*, 1996; Ishihara *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Os PARs podem ser ativados por uma série de proteases. A trombina é uma das moléculas conhecidas por ativar os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4, apresentando, contudo, alta afinidade pelo receptor PAR-1 (Dery *et al.*, 1998; Coughlin, 1999; Hollenberg e Compton, 2002). Já os fatores da cascata de coagulação VIIa e Xa ativam os receptores PAR-1 e PAR-2, enquanto que a triptase liberada pelos mastócitos ativa somente o receptor PAR-2. A catepsina G de neutrófilos é um ativador do receptor PAR-4 (Dery *et al.*, 1998; Coughlin, 1999; Hollenberg e Compton, 2002) e, finalmente, a tripsina (de origem pancreática ou extra-pancreática) é capaz de ativar, preferencialmente, o receptor PAR-2 e, em menor grau, os receptores PAR-1 e PAR-4 (Corvera *et al.*, 1997; Macfarlane *et al.*, 2001; Schmidlin e Bunnett, 2001; Cotrell *et al.*, 2003, 2004). Com exceção do PAR-3, existem peptídeos sintéticos (PAR-APs) compostos por 5 ou 6 aminoácidos que mimetizam os efeitos dos ligantes endógenos do receptor (Hollenberg e Compton, 2002). Os diferentes PAR-APS constituem importantes ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para a caracterização dos receptores, sem o uso de proteases, permitindo assim a caracterização das funções biológicas desencadeadas por cada receptor PAR específico. Entretanto, estes peptídeos devem ser utilizados com cautela, pois alguns não são específicos (por exemplo, o peptídeo ativador do PAR-1 também ativa o PAR-2), embora existam análogos mais seletivos (TFLLR é seletivo para o PAR-1) (Schmidlin e Bunnett, 2001).

Os receptores PARs representam uma classe particular de receptores. Eles são ativados por um único processo que envolve o reconhecimento do receptor pelo agonista, seguido da clivagem hidrolítica de um sítio específico localizado na alça N-terminal do receptor e, finalmente, a exposição de um novo sítio N-terminal que atua como o ligante (geralmente composto por seis ou mais aminoácidos) (Figura 1) (Dery *et al.*, 1998; Macfarlane *et al.*, 2001; Schmidlin e Bunnett, 2001, Vergnolle, 2005). Uma vez exposto, o ligante endógeno interage com a alça extracelular do segundo domínio transmembrana do receptor, iniciando a ativação de cascatas de sinalização intracelular. A ativação dos receptores PARs pelas proteases é um processo irreversível e a ativação das vias de sinalização iniciada pelas mesmas é finalizada rapidamente por um mecanismo eficiente de internalização e dessensibilização do receptor (Cottrell *et al.*, 2003; Trejo, 2003; Ossovskaya e Bunnett, 2004; Kawabata e Kawao, 2005). Após ativação pelas proteases, os receptores PARs são fosforilados por quinases ligadas aos GPCR (GRKs) e pela proteína quinase C (PKC). Dentro de minutos, as β -arrestinas se deslocam do citoplasma até a membrana celular para se ligarem aos receptores fosforilados, mediando o desacoplamento e a dessensibilização dos mesmos, através do bloqueio da associação com as proteínas G. Estas acoplam os receptores às clatrininas, as quais são responsáveis pela endocitose dos mesmos. Uma vez internalizados, os receptores são degradados pela ação dos lisossomos (Dery *et al.*, 1999). Desta forma, as respostas induzidas pelas proteases requerem a síntese de novos receptores ou a mobilização de receptores pré-formados e estocados no complexo de Golgi para a membrana

celular (Schmidlin e Bunnett, 2001; Cottrell *et al.*, 2003; Ossovskaya e Bunnett, 2004). A importância destes mecanismos depende muito do tipo celular.

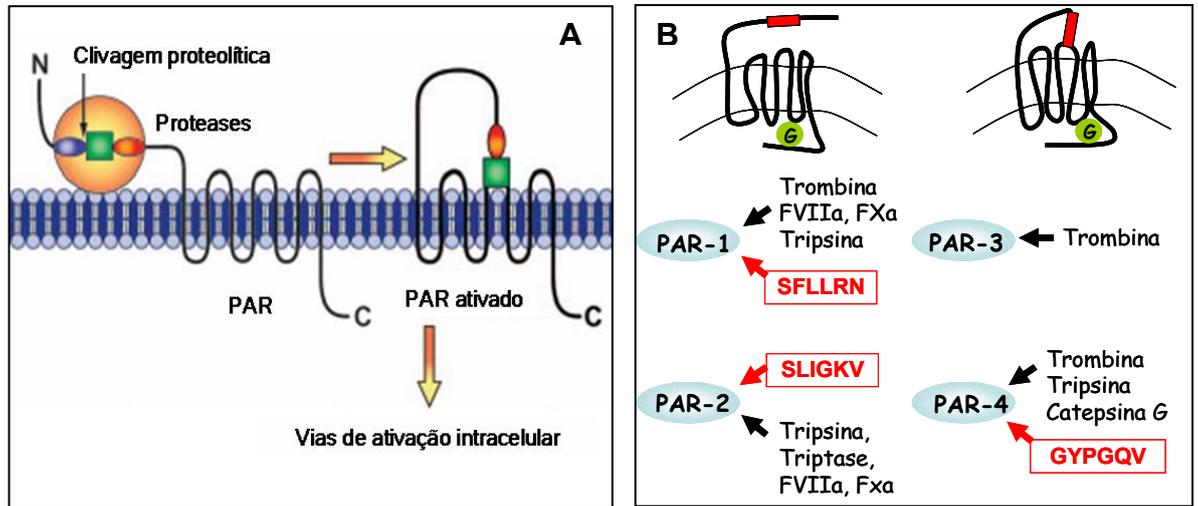


Figura 1. Mecanismo de ativação dos receptores PARs (A) (adaptado de Reed e Kita, 2004). Proteases responsáveis por ativar os PARs e peptídeos sintéticos (em vermelho) que também podem ativar os receptores (B) (adaptado de Vergnolle, 2005).

Depois de ativados, os receptores PARs podem ligar-se a inúmeras proteínas G e, por conseguinte ativar cascatas de sinalização que resultam em mudanças funcionais marcantes. O receptor PAR-1 se liga às proteínas $G_{12/13}$, G_q e G_i , ativando inúmeras enzimas de sinalização, tais como fosfolipase $C\beta$ ($PLC\beta$), $PLC\gamma$, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK; p38; quinase da porção terminal da *c-jun* (JNK) e p44/42), fosfatidilinositol-3-quinase (PI_3K) e membros da família quinase Src (receptores não tirosina quinase). O receptor PAR-2 pode, também, se ligar às proteínas $G_{12/13}$, G_q e G_i levando à ativação das vias da PLC e MAPK (Kanke *et al.*, 2000; Sabri *et al.*, 2000). Estas vias de sinalização podem interferir com inúmeras atividades celulares, incluindo proliferação, transcrição gênica, mudanças morfológicas, motilidade e sobrevivência celular, dentre outras (Coughlin, 2000; Macfarlane *et al.*, 2001).

Na última década, várias evidências têm demonstrado que os receptores PARs possuem um perfil de ativação distinto, dependendo do sistema biológico. Os receptores PAR-1 e PAR-2 são os mais estudados e os principais avanços nesta área foram alcançados através da avaliação da ação dos agonistas preferenciais destes receptores (trombina e tripsina ou triptase, respectivamente), ou pelo uso de agonistas sintéticos (PAR-APs) correspondentes aos sítios de ligação do receptor. O desenvolvimento de animais com deleção gênica para estes receptores tem favorecido ainda mais a compreensão da ação dos PARs (Cottrell *et al.*, 2003; Moffatt *et al.*, 2004; Hollenberg, 2005).

O receptor PAR-1 foi o primeiro a ser identificado e clonado, sendo inicialmente chamado de TRAP (receptor ativado pela protease trombina), uma vez que seu ativador principal é a trombina. Esta se liga a dois sítios localizados na seqüência N-terminal do receptor PAR-1 e cliva o receptor entre os aminoácidos Arg41 e Ser42, expondo o novo domínio N-terminal com a seqüência SFLLRN, o qual interage com a alça extracelular do segundo domínio transmembrana, levando a uma alteração da conformação do receptor, com a finalidade de permitir o acoplamento das proteínas G. A trombina foi inicialmente identificada como uma serino-protease (assim como a tripsina) produzida a partir da pró-trombina, por meio da ação do fator Xa, sendo responsável por converter o fibrinogênio em fibrina, durante a ativação da cascata da coagulação (Stubbs e Bode, 1993). A trombina é o principal exemplo de protease que cliva o receptor PAR-1, sendo que a maioria das respostas biológicas decorrentes da ligação da trombina a este receptor estão relacionadas com danos teciduais, inflamação e dor (Coughlin, 2000;

Macfarlane *et al.*, 2001). Em baixa concentração, a trombina promove agregação plaquetária, principalmente através da ativação do PAR-1, o qual possui grande afinidade pela mesma, devido à presença de uma seqüência de aminoácidos na porção C-terminal semelhante àquela do domínio de ligação à hirundina (um inibidor direto da trombina) (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000). A deleção do gene responsável por codificar a trombina (Sun *et al.*, 1998) ou o receptor PAR-1 (Hollenberg e Compton, 2002) em camundongos resulta em danos severos no desenvolvimento embrionário e neonatal, sugerindo que a trombina e seu receptor desempenhem importantes funções, além do inegável papel na cascata da coagulação. Nos tecidos vasculares, como em aorta de ratos (Hollenberg *et al.*, 1997), a ativação do PAR-1 causa vasodilatação dependente do endotélio, mediada pelo óxido nítrico. O PAR-1 também possui efeitos pró-inflamatórios resultantes da liberação de substância P (SP) a partir de fibras aferentes primárias (Cocks e Moffatt, 2000; de Garavilla *et al.*, 2001) e da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais pulmonares (Asokanathan *et al.*, 2002). No intestino, a ativação do receptor PAR-1 por seus agonistas resulta em inflamação caracterizada por edema e infiltração de granulócitos, além de exacerbar e prolongar os sintomas da inflamação em modelos de colite (Vergnolle *et al.*, 2004). Ademais, muitos estudos demonstram que a trombina e o receptor PAR-1 produzem efeitos diretos sobre outros tipos celulares, incluindo as células endoteliais, células imunes, fibroblastos, miócitos cardíacos, astrócitos, neurônios, dentre outros (Bar-Shavit *et al.*, 1983; Bizios *et al.*, 1986; Daniel *et al.*, 1986, Fang *et al.*, 2003; Riewald e Ruf, 2005).

A clonagem do receptor PAR-1 possibilitou a identificação e a clonagem subsequente dos outros membros da família dos PARs (Dery *et al.*, 1998; Couglin, 2000; Macfarlane *et al.*, 2001; Hollenberg e Compton, 2002). O PAR-3 foi clonado a partir de *primers* baseados nas seqüências conservadas dos receptores PAR-1 e PAR-2. Possui um sítio de ligação para a trombina, mas embora seja clivado pela mesma, o PAR-3 não produz influxo de cálcio, o que é consistente com a observação de que peptídeos sintéticos, que imitam a seqüência de ativação do receptor PAR-3, são inativos (Ishihara *et al.*, 1997). Sendo assim, ao invés de constituir um receptor funcional, o PAR-3 atua como um co-receptor para permitir a ligação da trombina ao receptor PAR-4, o qual possui baixa afinidade pela mesma (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000). O receptor PAR-3 é encontrado no coração, rins, pâncreas, timo, vias aéreas, intestino, linfonodos, olhos e cérebro (Dery *et al.*, 1998; Hollenberg *et al.*, 2002). O receptor PAR-4 foi o último a ser clonado e é ativado pelas proteases trombina (em alta concentração), tripsina e catepsina G de neutrófilos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos Arg47 e Gly48 para expor o domínio GYPGQV. O receptor PAR-4 é encontrado em vários tecidos como o intestino, pâncreas, testículos, próstata, útero, tireóide, fígado, olhos e cérebro (Dery *et al.*, 1998; Hollenberg *et al.*, 2002).

O receptor PAR-2 pode ser ativado pela tripsina, triptase e fatores VIIa e Xa da coagulação. A tripsina é uma das serino-proteases melhor caracterizadas e a principal ativadora do receptor PAR-2. É produzida inicialmente como zimogênio (tripsinogênio) nas células acinares do pâncreas, sendo posteriormente secretada dentro do duodeno e convertida em sua forma ativa por enteroquinases, atuando como uma enzima essencial no processo

digestivo (Dunn, 1989). Até o presente momento, quatro genes responsáveis por codificar a tripsina foram caracterizados em tecidos humanos: tripsinogênio I, II, III e IV. Os tripsinogênios I, II e III estão presentes como zimogênios no suco pancreático humano (Scheele *et al.*, 1981), enquanto o tripsinogênio IV, também chamado mesotripsina, foi encontrado no cérebro humano e em células endoteliais e epiteliais (Wiegand *et al.*, 1993; Minn *et al.*, 1998; Cottrell *et al.*, 2004). Alguns estudos demonstraram que a tripsina é produzida por células de vários tipos de câncer em humanos (estômago, ovário, pulmão, entre outros), podendo contribuir para a invasão tumoral e metástase, por degradar as proteínas da matriz extracelular e por ativar as formas latentes de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Koshikawa *et al.*, 1992, 1997; Matěj *et al.*, 2006). Embora a função da tripsina seja tradicionalmente relacionada à digestão, descobertas recentes sugerem que a tripsina é a principal ativadora fisiológica do receptor PAR-2 no intestino e no pâncreas (Ossovskaya e Bunnett, 2004). Neste caso, em concentrações fisiológicas, a tripsina pode ativar o receptor PAR-2 na membrana apical dos enterócitos para induzir a geração de prostaglandinas E_2 e $F_{1\alpha}$ com função protetora (Kong *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999). A tripsina pode ser encontrada em diversos tipos celulares, tais como células endoteliais vasculares humanas (Koshikawa *et al.*, 1997), células epiteliais da epiderme, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, pulmão, rins, fígado e ducto biliar (Koshikawa *et al.*, 1998). Sendo assim, pode-se dizer que as diferentes formas de tripsina possuem ampla distribuição e função em tecidos normais, além do trato gastrointestinal.

Os efeitos das proteases na inflamação e na dor são mediados, pelo menos em parte, através da ativação do receptor PAR-2. As proteases clivam

este receptor nos aminoácidos Arg36 e Ser37 para expor o novo domínio N-terminal - SLIGKV em humanos e o domínio SLIGRL em camundongos e ratos. O receptor PAR-2 é encontrado no trato gastrointestinal, pâncreas, rins, fígado, vias aéreas, próstata, ovário e olhos, além das células epiteliais, músculos lisos, fibroblastos, células endoteliais, células T, neutrófilos, células tumorais e neurônios (Dery *et al.*, 1998; Hollenberg *et al.*, 2002). Muitos estudos têm demonstrado os efeitos pró-inflamatórios dos agonistas do receptor PAR-2. A ativação do PAR-2 causa vasodilatação dependente do óxido nítrico, induz o extravasamento de proteínas plasmáticas, infiltração de neutrófilos e estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias em ratos (Vergnolle, 1999; Lindner *et al.*, 2000; Cenac *et al.*, 2002). Vergnolle e colaboradores (1999a) demonstraram que a injeção intraplantar do agonista peptídico do receptor PAR-2 produz edema e recrutamento de células inflamatórias na pata de rato. Esta mesma resposta inflamatória foi observada no lúmen intestinal, caracterizada por edema do endotélio intestinal, recrutamento de granulócitos, aumento da permeabilidade celular, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF α) (Cenac *et al.*, 2002). Por outro lado, tanto o tratamento agudo quanto o tratamento crônico com o agonista do receptor PAR-2 produzem efeitos protetores sobre o desenvolvimento de colite induzida por TNBS, além de reduzirem os níveis de citocinas pró-inflamatórias e a letalidade dos animais (Fiorucci *et al.*, 2001), sugerindo um papel controverso do PAR-2 no intestino. Nas vias aéreas, a ativação do receptor PAR-2 parece ser protetora devido à liberação de prostanóides broncodilatadores do epitélio pulmonar (Cocks e Moffatt, 2000). Entretanto, trabalhos recentes sugerem que este receptor

também está envolvido na inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas, as quais são características de várias doenças pulmonares crônicas (Cocks e Moffatt, 2001; Schmidlin *et al.*, 2002; Ebeling *et al.*, 2005; Gu e Li, 2006).

A observação de que em neurônios sensoriais, o receptor PAR-2 está expresso em neurônios sensoriais peptidérgicos sugere que a ativação deste receptor em neurônios sensoriais deve estar envolvida com os mecanismos da inflamação neurogênica (Steinhoff *et al.*, 2000; Vergnolle *et al.*, 2001; Hoogerwerf *et al.*, 2001). De fato, Steinhoff e colaboradores (2000) demonstraram que o edema de pata induzido pelo agonista PAR-2 é dependente da ativação de neurônios sensoriais e da liberação concomitante do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e da substância P (SP). Esta resposta edematogênica pode ser bloqueada por antagonistas dos receptores tanto para SP quanto para CGRP ou pelo pré-tratamento com a capsaicina (que causa depleção de fibras C). Tais efeitos estão ausentes em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2, para a SP ou para o receptor NK₁. Foi observado ainda que a administração intraplantar de tripsina ou do agonista peptídico do receptor PAR-2, em doses sub-inflamatórias, induz a expressão de *c-fos* nos neurônios espinhais de ratos e camundongos, resultando em hiperalgesia térmica e mecânica de longa duração (Vergnolle *et al.*, 2001). Estes efeitos estão ausentes em animais com deleção do gene que codifica o receptor PAR-2 ou a pré-pró-taquicinina-A (precursores da SP e da neurocinina A) e, são abolidos após a administração central, mas não periférica, de antagonistas do receptor NK₁ (Vergnolle *et al.*, 2001). Além disso, há relatos de que a ativação do receptor PAR-2 pode sensibilizar os neurônios do gânglio da raiz dorsal *in vitro*, contribuindo para a patogênese da

pancreatite, sendo o pâncreas um órgão no qual a inflamação resulta na ativação de proteases endógenas tais como a tripsina (Hoogerwerf *et al.*, 2001).

A inflamação é um processo fisiológico que ocorre nos tecidos em resposta a lesões traumáticas, pós-isquêmicas, tóxicas ou auto-imunes, além de processos infecciosos (Nathan, 2002; Philip *et al.*, 2004; Schmid-Schönbein, 2006). O processo inflamatório tem como objetivo proteger o organismo contra infecções, eliminar patógenos e reparar os tecidos, após eventuais danos (Weiss, 2002). Três eventos principais caracterizam a inflamação: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (Holzer, 1998). Os eventos vasculares são caracterizados pelo aumento no fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, responsável pelo edema local. Este evento permite o influxo de proteínas, fatores solúveis e células inflamatórias do compartimento intravascular para o interstício devido à ação de alguns mediadores inflamatórios como: histamina, bradicinina (BK), leucotrienos, componentes do sistema complemento, SP e fator de ativação plaquetária (PAF). A vasodilatação e o aumento na permeabilidade vascular são acompanhados pela marginação, adesão e migração de leucócitos para o sítio da lesão. Este influxo celular é regulado por moléculas solúveis e difusíveis, produzidas principalmente por células inflamatórias, plaquetas, células endoteliais e mastócitos (Sharma e Buchanan, 1994; Levy, 1996; Schmid-Schönbein, 2006).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos (e os mais abundantes) a atingirem o sítio da lesão (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Em seguida são recrutados os monócitos, que se diferenciam em macrófagos ao passarem dos

vasos para o tecido e, uma vez ativados são as principais fontes de fatores de crescimento e citocinas. Estas moléculas, quando agem sobre as células epiteliais, endoteliais e mesenquimais adjacentes ao dano celular, fazem com que mais mediadores inflamatórios e leucócitos sejam recrutados para o sítio da lesão (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Os mastócitos são importantes na inflamação aguda devido à liberação de mediadores inflamatórios estocados e recém-sintetizados, tais como histamina, BK, derivados do ácido araquidônico, citocinas e proteases, como a triptase (Parikh *et al.*, 2003; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A migração de diferentes tipos celulares para o sítio da lesão facilita a atividade microbicida, os mecanismos de defesa imunológica e o reparo da lesão e, está frequentemente acompanhada de dor e hipersensibilidade (Watkins e Maier, 2002).

O recrutamento de leucócitos e de outros tipos celulares é orquestrado pela ação de citocinas e outros mediadores, incluindo eicosanóides, componentes do sistema complemento, radicais livres e fatores de transcrição, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Okada, 2002; Nathan, 2002). As quimiocinas (pequenas proteínas quimioatraentes secretadas por diferentes tipos celulares) apresentam um interesse particular (Ransohoff, 2002), possuindo papel crucial no recrutamento de leucócitos frente a um dano tecidual, guiando os leucócitos provenientes da corrente sanguínea até o sítio inflamatório (Siebert *et al.*, 2000). A cascata da coagulação também está envolvida em respostas pró-inflamatórias através da síntese e liberação da protease trombina e fatores Xa e VIIa. Estes possuem ações pró-inflamatórias ao se ligarem aos receptores PARs e induzirem a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, como o $\text{TNF}\alpha$ e a $\text{IL-1}\beta$ (Pawlinski *et al.*, 2003). Estas citocinas

pró-inflamatórias são produzidas rapidamente e contribuem para a liberação de mais mediadores e outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-8 (Oh *et al.*, 2001; Watkins e Maier, 2002; Sommer, 2004). Elas também possuem efeitos pró-algésicos ao ativar (com conseqüente geração do potencial de ação) ou sensibilizar os neurônios nociceptivos, sem produzir, contudo, um potencial de ação diretamente, mas reduzindo o limiar necessário para que ele ocorra (Watkins e Maier, 2002; Sommer, 2004).

A inflamação é uma causa comum e complexa de dor clínica resultante de lesão ou degeneração tecidual. Quando um dano tecidual ocorre, a dor é frequentemente mais persistente e está associada à inflamação e hiperalgesia na região inflamada ou em áreas adjacentes. Acredita-se que estas alterações sejam provenientes da combinação do aumento da sensibilidade dos nociceptores aferentes primários no sítio da lesão, com o aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Handy e Moore, 1998). Muitos agentes biológicos produzidos pela inflamação, como fatores neurotróficos, prostanóides, BK e várias citocinas podem ativar e sensibilizar os nociceptores periféricos direta ou indiretamente (Dray, 1995, Couture *et al.*, 2001; Coutaux *et al.*, 2005). Este complexo sistema de ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos, por mediadores inflamatórios, produz mudanças significantes no sistema nervoso sensorial simpático, afetando os nervos periféricos, a medula espinhal e as estruturas supraespinhais, fazendo com que sinais oriundos de estímulos inócuos normais, como um leve toque, sejam percebidos como estímulos desagradáveis (Woolf *et al.*, 1991; Perkins e Dray, 1996).

O sistema sensorial tem o papel de informar ao cérebro sobre o estado dos ambientes externo e interno do organismo. A dor, por ser uma percepção, constitui um sistema de alarme que tem o papel de proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supraespinhais (Dray, 1995; Julius e Basbaum, 2001; Le Bars *et al.*, 2001). As terminações periféricas sensoriais livres encontradas em todas as partes do organismo têm a função de transmitir as informações nociceptivas da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal da medula, que as retransmitem, através das vias ascendentes da medula espinhal, para as áreas supraespinhais responsáveis pela codificação da informação nociceptiva (Millan, 1999). Os impulsos gerados nas terminações nervosas são propagados por quatro categorias de neurônios sensoriais (Millan, 1999). As fibras sensoriais primárias do tipo $A\alpha$ e $A\beta$ (Grupos I e II), que apresentam camada espessa de mielina, são responsáveis pela condução de alta velocidade (30 – 120 m/s) e pela transmissão das informações proprioceptivas, como toque leve e pressão (Torebjörk *et al.*, 1992). O Grupo III é formado pelas fibras $A\delta$, que possuem fina bainha de mielina, e caracterizadas por condução semi-rápida (aproximadamente 5 - 30 m/s). Finalmente, a categoria formada pelas fibras C amielinizadas possui corpos celulares de pequeno e médio diâmetro, sendo responsável pela condução lenta do impulso nervoso (aproximadamente 0,5 - 2 m/s). A maior parte das fibras nociceptivas são amielinizadas de pequeno e médio diâmetro, possuem receptores termosensíveis ativados por estímulos quentes e frios, mecanoreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algogênicas, tais como acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina,

prostaglandinas (PGs), SP e histamina. Muitas fibras C podem responder a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, e, por esta razão, são chamadas de polimodais (Almeida *et al.*, 2004). Os nociceptores polimodais, ao serem ativados, liberam como neurotransmissores o glutamato, a SP e o CGRP, dentre outros (Caviedes e Herranz, 2002), os quais são responsáveis por sensibilizar os neurônios secundários do corno dorsal da medula espinhal.

Como mencionado anteriormente, o processo inflamatório envolve a liberação de inúmeras substâncias, muitas destas são neuroativas. Estas substâncias estimulam os nociceptores quimiosensíveis, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da dor inflamatória. A liberação de trifosfato de inositol (ATP), íons de potássio e de hidrogênio após lesão tecidual, juntamente com a BK, são as únicas substâncias endógenas com efeitos excitatórios diretos. As outras substâncias, como derivados do ácido araquidônico, histamina e proteases, atuam principalmente sensibilizando os nociceptores (Coutaux *et al.*, 2005). No entanto, a amplificação das respostas nociceptivas está relacionada não somente às substâncias liberadas no sítio inflamatório, mas também envolve a ativação de fibras adjacentes por mediadores inflamatórios. Quando este fenômeno ocorre pela via axônio-reflexa, é conhecido como “inflamação neurogênica” (Coutaux *et al.*, 2005).

A inflamação neurogênica é definida como “o conjunto de sintomas da inflamação que resultam da liberação de mediadores dos terminais dos neurônios sensoriais primários”. A via envolvida neste mecanismo é composta principalmente pelos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro sensíveis à capsaicina (fibras C) (Holzer, 1988). Embora existam inúmeras substâncias liberadas por estes neurônios, muitos estudos sugerem que os neuropeptídeos

como a SP e o CGRP são os principais indutores da inflamação neurogênica (Holzer, 1988). Estas substâncias produzem os sintomas da inflamação neurogênica por interagirem com células endoteliais, mastócitos, células imunes e arteríolas (Maggi, 1995). A SP aumenta a permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de proteínas dos vasos sanguíneos para o tecido, causa o recrutamento de leucócitos e degranulação de mastócitos com conseqüente produção de citocinas e outros mediadores (Lembeck *et al.*, 1992; Baluk *et al.*, 1995; Pintér *et al.*, 2002; Yaraee *et al.*, 2003). O CGRP é um potente vasodilatador que atua sobre os vasos sanguíneos de maior diâmetro e na microvasculatura (Brain *et al.*, 1985). A sua liberação ocorre concomitantemente com a da SP e provavelmente exerce os mesmos efeitos.

Muitos estudos demonstram que o receptor PAR-2 está envolvido na nocicepção (Vergnolle *et al.*, 2001) e na inflamação neurogênica (Steinhoff *et al.*, 2000). Alguns desses efeitos estão relacionados à co-expressão do receptor PAR-2 juntamente com a SP e o CGRP em neurônios sensoriais do tipo C (Steinhoff *et al.*, 2000), indicando que a ativação deste receptor causa a liberação de neuropeptídeos, resultando na inflamação neurogênica (Steinhoff *et al.*, 2000) e subseqüente nocicepção e hiperalgesia (Hoogerwerf *et al.*, 2001; Kawabata *et al.*, 2001; Vergnolle *et al.*, 2001). No entanto, as vias de ativação deste receptor não estão bem compreendidas. Como discorrido anteriormente, os PARs são uma nova classe de receptores, e as ações mediadas pela ativação destes receptores são relativamente pouco conhecidas. Dentro do cenário inflamatório são produzidos e liberados inúmeros mediadores e, dentre eles, muitas proteases. No entanto, poucas proteases foram identificadas como agonistas dos receptores PARs. A tripsina é o principal ativador do receptor

PAR-2. No entanto, pouco se sabe a respeito das funções e da regulação da tripsina extrapancreática e suas ações sobre este receptor. Em decorrência, outros possíveis agonistas do receptor PAR-2 homólogos da tripsina têm sido sugeridos. Como por exemplo, pode-se destacar a MSP (protease específica do mieloencéfalo), há pouco tempo clonada a partir do cérebro de ratos, que apresenta alta homologia com a tripsina e possui seqüência de clivagem semelhante ao peptídeo ativador do PAR-2 (Scarlsbrick *et al.*, 1997). Além disso, foi descoberta uma serino-protease semelhante à tripsina, sensível ao seu inibidor e capaz de ativar o receptor PAR-2 em células de glioblastoma (Sawada *et al.*, 2000). Por conseguinte, outras serino-proteases (triptase e fatores da coagulação) podem ser liberadas durante o processo inflamatório e, desta forma, parecem contribuir para a ativação do receptor PAR-2. Neste contexto, o melhor conhecimento das proteases responsáveis por ativar os PARs e da cascata celular iniciada pela interação entre proteases e PARs pode representar um campo interessante de pesquisa, permitindo a elucidação de inúmeros mecanismos envolvidos na inflamação e em processos dolorosos (Schmidlin e Bunnett, 2001; Ossovskaya e Bunnet, 2004).

Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações inflamatórias (edema, migração celular e síntese de citocinas) e nociceptivas induzidas pela tripsina, quando injetada na pata de camundongos, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos nestas respostas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar, através de estudos farmacológicos e bioquímicos, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina na pata de camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar o modelo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tripsina em camundongos.
- Padronizar o modelo de nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de tripsina em camundongos.
- Caracterizar, através do uso de diferentes grupos de inibidores e antagonistas, os possíveis mecanismos envolvidos no edema de pata e na nocicepção espontânea induzidos pela injeção intraplantar de tripsina na pata de camundongos.
- Determinar o efeito da injeção intraplantar de tripsina em camundongos sobre a atividade da MPO.
- Analisar o efeito da injeção intraplantar de tripsina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos Swiss, machos, pesando entre 20 e 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em alguns experimentos foram utilizados camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α (TNF α p55^{-/-}) ou para a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}), obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte) e criados no Departamento de Farmacologia da UFSC. Os animais normais da linhagem C57/BL6 foram utilizados como controle e são provenientes da UFMG. Em outro grupo de experimentos foram utilizados animais com deleção gênica para o receptor PAR-2 (PAR-2^{-/-}) e seus respectivos controles (camundongos da linhagem C57/BL6), oriundos da RW Johnson, criados e mantidos na Universidade de Calgary (Canadá).

Os camundongos foram mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO), com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60 - 80 %) controladas, em um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais foram aclimatizados no mínimo 1 h antes do início dos experimentos e utilizados apenas uma única vez.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e com as diretrizes éticas para a investigação de dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983). O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou os protocolos experimentais descritos neste trabalho (número do protocolo: 262/CEUA e 23080.035334/2003-16/UFSC). O número de animais e a intensidade dos

estímulos nocivos utilizados foi o mínimo necessário para demonstrar os efeitos consistentes do tratamento com as drogas.

A maior parte dos experimentos foi realizada no Laboratório do Professor João Batista Calixto, Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Os experimentos empregando animais com deleção gênica para os receptores PAR-2 foram realizados pela Dra. Nathalie Vergnolle no Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade de Calgary, Calgary, Alberta, Canadá.

3.2. Edema de pata induzido pela tripsina

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os procedimentos descritos para ratos (Campos *et al.*, 1996) e adaptados para camundongos (da Cunha *et al.*, 2004). Para a indução do edema, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano e receberam, na pata traseira direita, uma injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µl de solução salina (NaCl 0,9 %) contendo tripsina (3 - 300 µg/pata). A pata contralateral (pata esquerda) recebeu o mesmo volume de salina e foi utilizada como controle. O edema foi medido utilizando o pletismômetro (Ugo Basile) em diferentes intervalos de tempo (10 - 50 min e 1 - 6 h), após a injeção de tripsina. O edema foi expresso em µl, através da diferença entre as patas direita e esquerda.

3.3. Nocicepção induzida pela tripsina

Após o período de adaptação, cada camundongo recebeu 20 µl de solução salina (NaCl 0,9 %) contendo tripsina (30 - 600 µg/pata) por via i.pl. na

pata direita, traseira. Os animais controle receberam o mesmo volume de salina (20 μ l/pata, i.pl.). Os camundongos foram observados individualmente, imediatamente após a injeção de tripsina, por um período de 10 min. O tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção espontânea.

3.4. Análise dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina

Para avaliar o possível envolvimento das cininas nas respostas induzidas pela tripsina, alguns grupos de camundongos foram pré-tratados com os antagonistas seletivos não-peptídicos para o receptor B₁, SSR240612 (1 mg/kg) (Gougat *et al.*, 2004) ou B₂, FR173657 (30 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.) (Ueno *et al.*, 1999). Para avaliar a participação do óxido nítrico, outro grupo de animais recebeu N ω -nitro-L-arginina (L-NOARG, 20 mg/kg, i.p.) (Okva *et al.*, 2004), ou foram utilizados animais com deleção gênica para a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). O possível envolvimento das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) ou -2 (COX-2) foi avaliado através do tratamento com o inibidor não seletivo indometacina (2 mg/kg, i.p.) (Campos *et al.*, 1998), com o inibidor seletivo da COX-1, SC560 (5 mg/kg, i.p.) (Takeeda *et al.*, 2003) ou com o inibidor seletivo da COX-2, celecoxib (30 mg/kg, i.p.) (Siqueira-Júnior *et al.*, 2003). Para verificar se os receptores vanilóides poderiam estar envolvidos nas respostas induzidas pela tripsina, os animais foram pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor TRPV1, o SB366791 (500 μ g/kg, i.p.) (Varga *et al.*, 2005). O envolvimento da histamina foi avaliado pelo pré-tratamento dos animais com o inibidor seletivo do receptor H₁, a

pirilamina (10 mg/kg, i.p.) (Girard *et al.*, 2004). Todas as drogas citadas anteriormente foram administradas 30 min antes da injeção de tripsina. A fim de verificar o envolvimento de síntese protéica, outro grupo de animais foi tratado com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) (Campos *et al.*, 1998). Para analisar a relevância dos neuropeptídeos no edema e na nocicepção induzidos pela tripsina, os animais foram tratados com os antagonistas seletivos dos receptores NK₁ - FK888 (1 mg/kg) (Inoue *et al.*, 1996), NK₂ - SR48968 (1 mg/kg) (Veronesi *et al.*, 1995), NK₃ - SR140821 (3 mg/kg), (Inoue *et al.*, 1996) e CGRP - CGRP₈₋₃₇ (300 µg/kg) (Holland *et al.*, 2005), todos administrados por via intravenosa (i.v.), 15 min antes da aplicação de tripsina. Para induzir a depleção de mastócitos, outro grupo de animais foi tratado com o composto 48/80, injetado por via i.pl. por 4 dias (1, 3, 10 e 10 µg/sítio, respectivamente), sempre na mesma pata (Piovezan *et al.*, 2004). Em um outro grupo experimental, os animais foram tratados com cromoglicato de sódio, um estabilizador de mastócitos (8 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, durante 6 dias (Samoszuk e Corwin, 2003). Para investigar a participação de citocina pró-inflamatória TNF α , animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α foram utilizados. Os grupos controles receberam solução salina (NaCl 0,9 %) nos mesmos intervalos de tempo e pelas mesmas vias de administração. Os parâmetros inflamatórios e nociceptivos foram avaliados como descrito anteriormente.

3.5. Ensaio Bioquímicos

3.5.1. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) tecidual, segundo método descrito por Campos *et al.* (2002), com algumas modificações. Os animais receberam na pata direita 20 µl de tripsina (30 µg/pata). Após vários intervalos de tempo (1 - 12 h), os animais foram sacrificados e tiveram o tecido subcutâneo das patas injetadas removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C. Patas tratadas com solução salina foram utilizadas como controle. Os tecidos foram homogeneizados a 5 % (peso/volume) em tampão EDTA/NaCl (pH 4.7) e centrifugados a 10.000 rpm, por 15 min a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspensão em tampão 1 gelado (pH 7,4; NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M). Adicionou-se então, NaCl 0,2 % gelado e após 30 segundos, NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi ressuspensão em tampão 2 gelado (pH 5,4; NaPO₄ 0,5 M e hexadeciltrimetilamônio - HTAB 0,5 %) e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 rpm, por 15 min, a 4 °C e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), NaPO₄ (80 mM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 0,3 mM). A absorbância foi medida em 650 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica por mg de tecido ou em unidades por miligrama de tecido.

3.5.2. Determinação dos níveis de citocinas na pata de camundongos

Os níveis de IL-1 β e de TNF α teciduais foram avaliados utilizando o método previamente descrito por Fernandes *et al.* (2005). Os animais receberam na pata direita 20 μ l de tripsina (30 μ g/sítio), sendo sacrificados após vários intervalos de tempo (0,25 - 12 h). O tecido subcutâneo das patas injetadas foi removido e as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C. Os tecidos foram homogeneizados em salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4; NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5mM, filtrado a 0,2 μ m) contendo: NaCl 0,4 M, PMSF 0,1 M, EDTA 10 Mm, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA e 2 μ g/ml de aprotinina A. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 g, por 10 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido utilizado para o ensaio. Os níveis de IL-1 β e de TNF α foram medidos através de Kit de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems®). Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido.

3.6. Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: SSR240612, SR48968 e SR142801 foram gentilmente fornecidas pela Sanofi Recherche (Moontpellier, France). FR173657 e FK888 foram gentilmente doados pela Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan). Tripsina, indometacina, pirilamina, dexametasona, N ω -nitro-L-arginina (L-NOARG), SC560, composto 48/80, cromoglicato de sódio, celecoxib, fragmento 8-37 do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP₈₋₃₇), SB366791, albumina sérica bovina (BSA), aprotinina A, cloreto de benzametônio, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), peróxido de hidrogênio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB),

fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), tetrametilbenzidina (TMB) e Tween-20 (todos obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.). H₂O₂, NaCl, Na₂HPO₄, NaPO₄, e glicose (todos da Merck, Haar, Germany).

3.7. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DE₅₀ (doses que produziram 50 % da resposta máxima), que são apresentados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos limites de confiança (95 %). As porcentagens de inibição estão apresentadas como a média \pm erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual. O efeito antiedematogênico foi expresso com base na área sob a curva tempo-resposta (10 min – 6 h). A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Em alguns casos, foi utilizado o teste *t* de Student não-pareado ou ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,05 (*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa *GraphPad Prism*® 4.02.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da resposta edematogênica induzida pela tripsina em camundongos

A injeção intraplantar de tripsina (3 - 300 µg/pata) na pata direita traseira de camundongos resultou em aumento marcante no volume da pata dos animais. A resposta máxima foi observada no intervalo de 10 a 40 min, após a administração da tripsina, diminuindo gradualmente, mas permanecendo significativa por até 6 h (Figura 2A), com DE₅₀ de 23 (12 - 43) µg/pata. Assim, a dose adotada para os experimentos subseqüentes foi de 30 µg/pata. A Figura 2B demonstra o efeito edematogênico expresso com base na área sob a curva temporal (0 - 6 h) após a injeção de tripsina (3 - 300 µg/pata) na pata de camundongos.

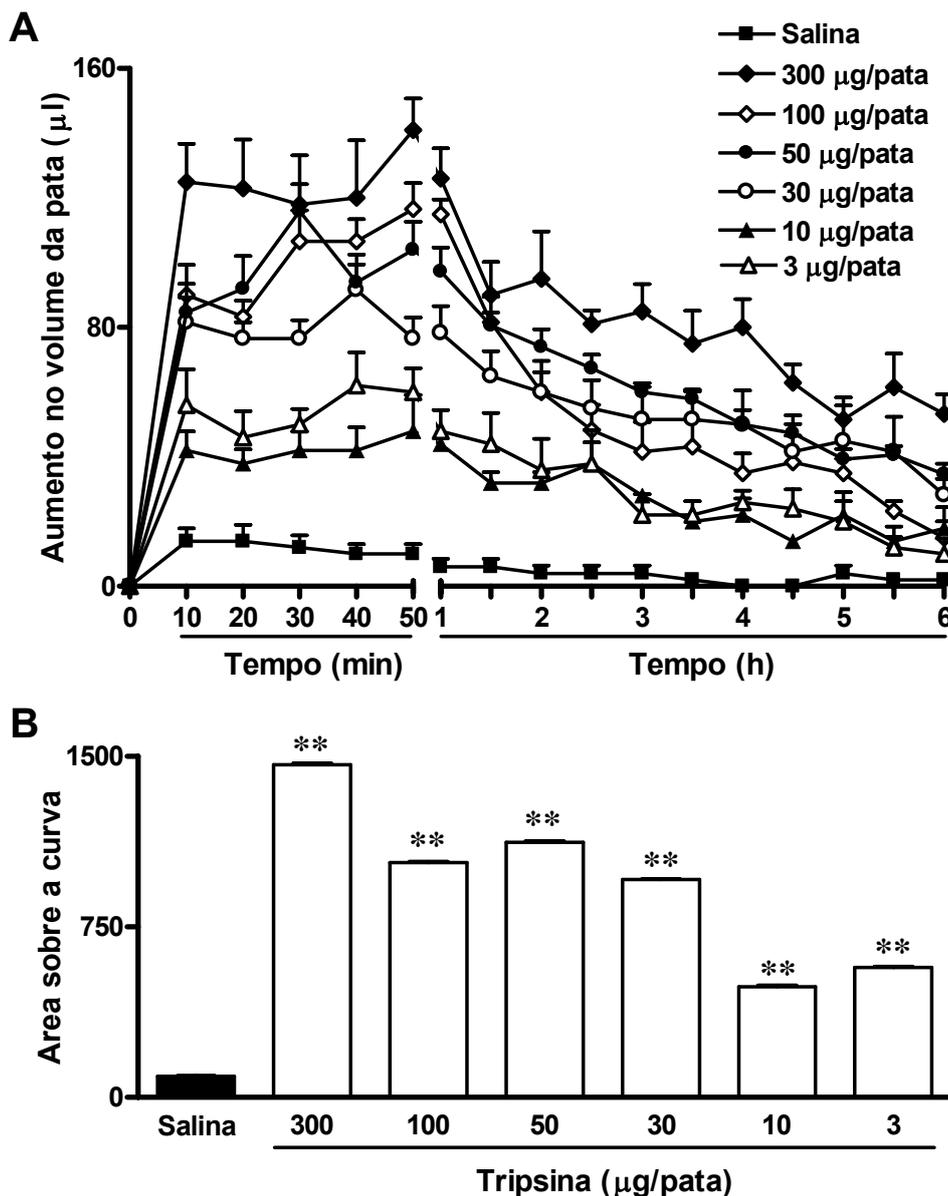


Figura 2. Padronização do modelo de edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. (A) Efeito temporal e dose-resposta da injeção intraplantar de diferentes doses de tripsina (3 - 300 $\mu\text{g/pata}$) no edema de pata em camundongos. (B) Efeito edematogênico expresso com base na área sob a curva temporal (AUC 0 - 6 h) após a injeção de tripsina (3 - 300 $\mu\text{g/pata}$). Cada ponto representa a média de 4–6 animais e as linhas verticais os e.p.m.

4.2. Mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

4.2.1. Envolvimento do sistema de cininas no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

O aumento da resposta edematogênica induzida pela tripsina (30 µg/pata) foi parcialmente inibido pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores B₁, o SSR240612 (1 mg/kg, i.p., 30 min), com porcentagem de inibição (AUC 0 – 6 h) de 29 ± 5 % (Figura 3A). Por outro lado, o edema de pata induzido pela tripsina foi consistentemente inibido pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores B₂, o FR173657 (30 mg/kg, i.p., 30 min), com porcentagem de inibição igual a 48 ± 5 % (Figura 3B).

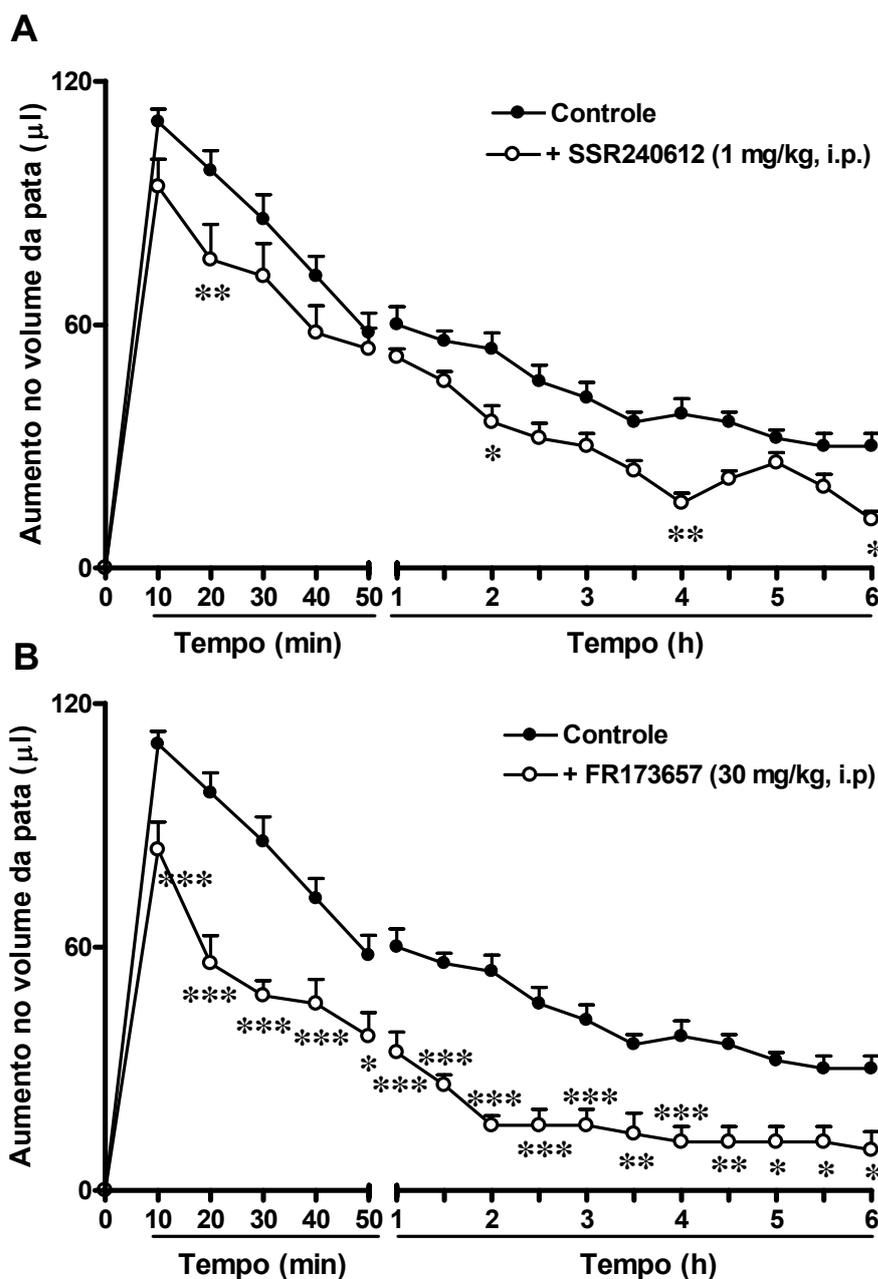


Figura 3. Efeito do tratamento sistêmico com os antagonistas seletivos para os receptores para cininas sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com os antagonistas seletivos e não-peptídicos para os receptores B_1 (SSR240612, 1 mg/kg, i.p.) (A) e B_2 (FR173657, 30 mg/kg, i.p.) (B) para cininas 30 min antes da indução do edema de pata pela tripsina (30 μg /pata). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.2. Envolvimento dos mastócitos e dos produtos da degranulação no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

O papel dos mastócitos foi avaliado pelo uso do degranulador de mastócitos, o composto 48/80 ou do estabilizador de mastócitos, o cromoglicato de sódio, no edema de pata induzido pela tripsina. Os dados da Figura 4A demonstram que o tratamento crônico com o composto 48/80 (1 - 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.pl.) produziu inibição parcial, porém significativa, do edema de pata causado pela tripsina, com inibição de $27 \pm 9 \%$. De maneira similar, a administração diária do cromoglicato de sódio (8 mg/kg , i.p.) reduziu significativamente a resposta edematogênica induzida pela tripsina, com inibição igual a $30 \pm 10 \%$ (Figura 4B).

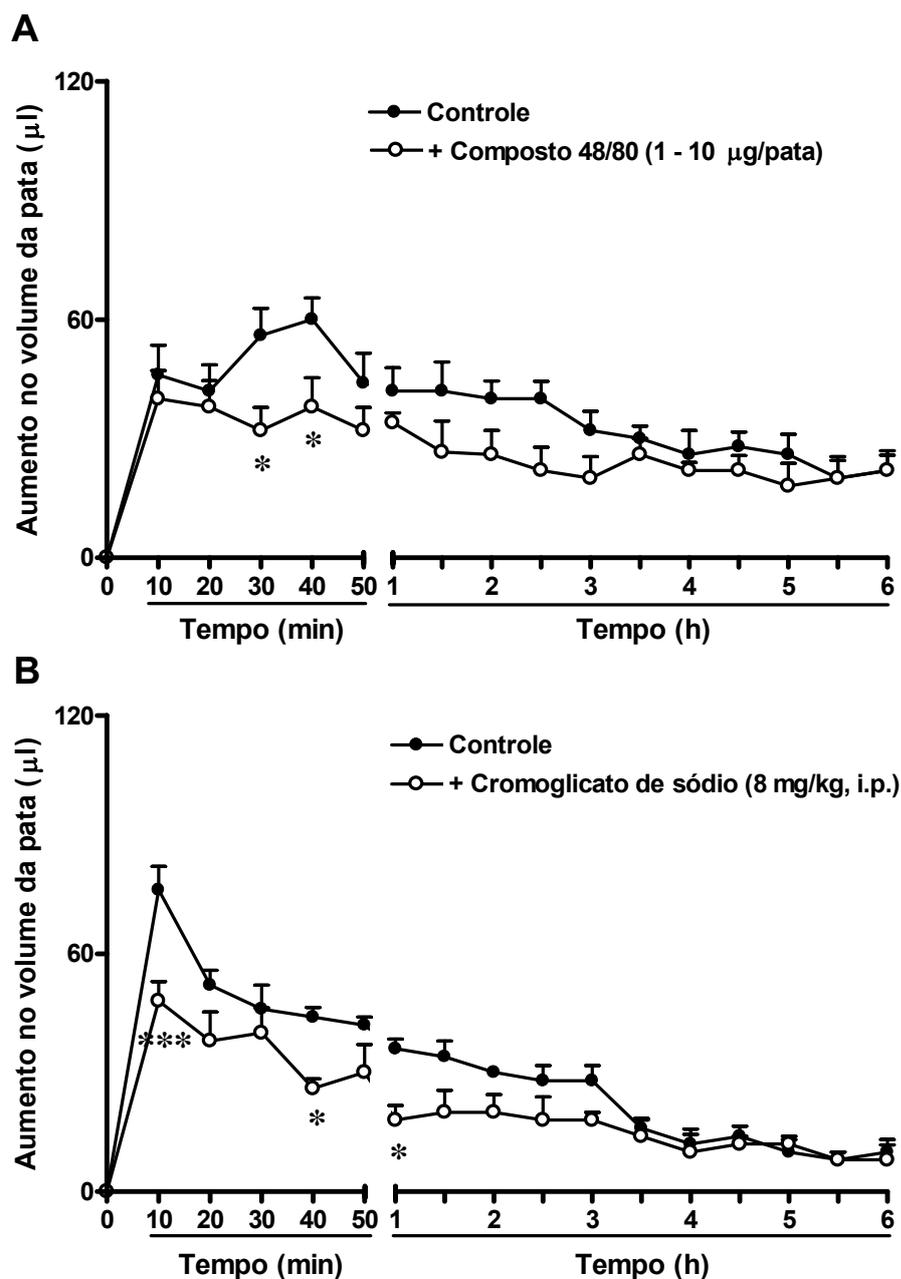


Figura 4. Efeito do tratamento com o degranulador ou com o estabilizador de mastócitos sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. O degranulador de mastócitos, composto 48/80, foi administrado i.p. durante 4 dias nas doses de 1, 3, 10 e 10 $\mu\text{g/pata}$ (A), e o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio foi administrado i.p. durante 6 dias na dose de 8 mg/kg (B), antes da indução do edema de pata pela tripsina (30 $\mu\text{g/pata}$). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Para verificar o envolvimento da histamina, um mediador inflamatório liberado pela degranulação dos mastócitos, no edema de pata induzido pela tripsina, os camundongos foram tratados com o antagonista seletivo para o receptor H_1 de histamina, a pirilamina (10 mg/kg, i.p., 30 min). O resultado da Figura 5 mostra que o tratamento com a pirilamina foi capaz de diminuir significativamente o edema de pata induzido pela tripsina (30 μ g/pata), com inibição de $31 \pm 6 \%$.

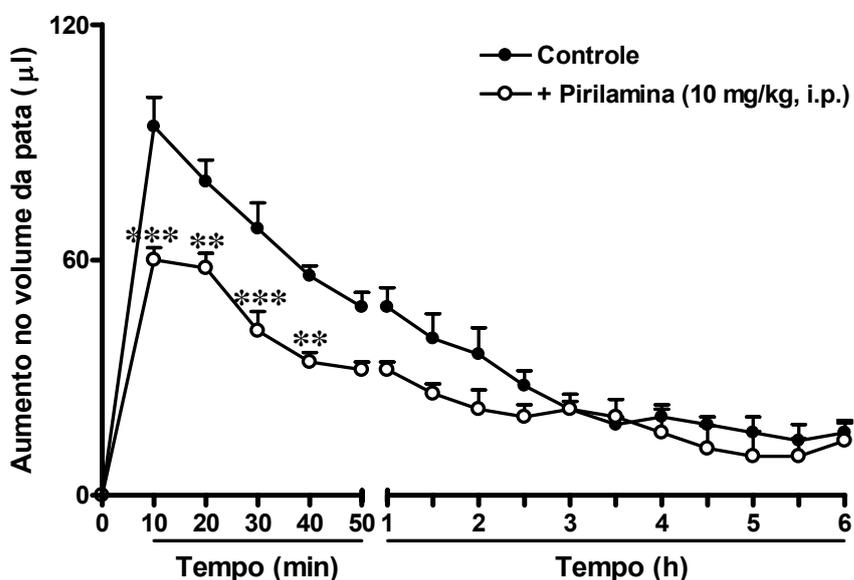


Figura 5. Efeito do antagonista dos receptores H_1 de histamina sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais receberam o inibidor do receptor H_1 para histamina, a pirilamina (10 mg/kg, i.p.) e, após 30 minutos, receberam a injeção i.pl. de tripsina (30 μ g/pata). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0.01; ***P < 0.001.

4.2.3. Participação das enzimas ciclooxigenase (COX) e síntese proteica no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

O resultado da Figura 6 demonstra que o tratamento sistêmico dos animais com o inibidor não-seletivo das enzimas COX-1 e COX-2, a indometacina (2 mg/kg, i.p., 30 min), inibiu de maneira significativa ($33 \pm 3 \%$) o edema de pata induzido pela tripsina.

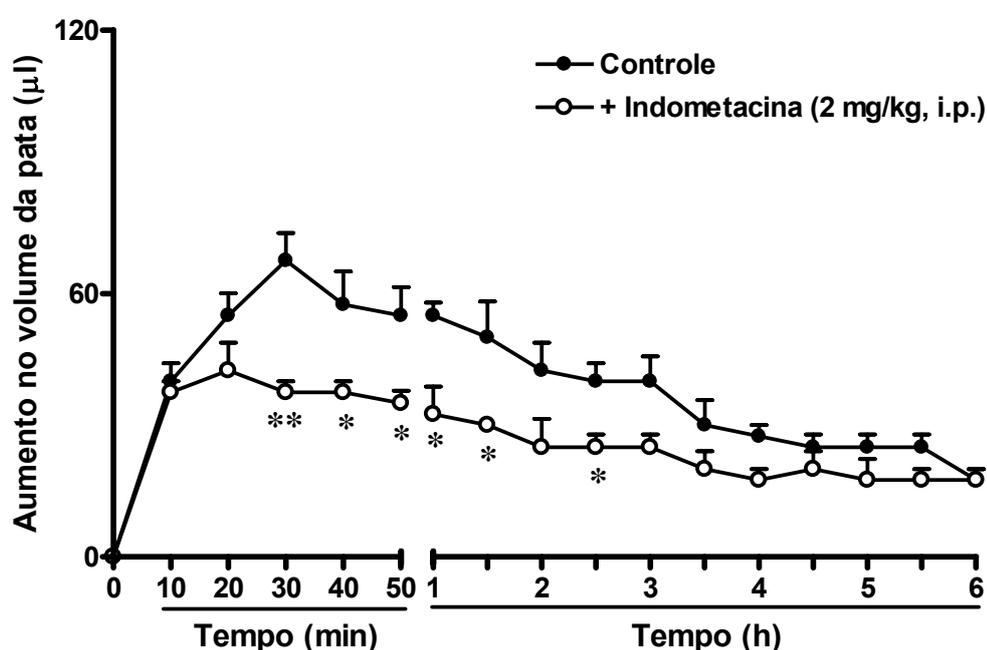


Figura 6. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da enzima COX sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com o antagonista não seletivo para as enzimas COX-1 e COX-2, indometacina (2 mg/kg, i.p.) e, após 30 min, receberam a injeção i.pl. de tripsina (30 µg/pata). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; **P < 0,01.

Com o intuito de verificar qual a isoforma da enzima ciclooxigenase estaria envolvida no edema de pata induzido pela tripsina, os animais foram pré-tratados com o SC560 (5 mg/kg, i.p., 30 min), um inibidor seletivo da

enzima COX-1 (Figura 7A) ou com o celecoxib (30 mg/kg, i.p., 30 min), um inibidor seletivo da enzima COX-2 (Figura 7B). Ambas as drogas foram capazes de reduzir significativamente o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos, com porcentagens de inibição de $20 \pm 5 \%$ e $30 \pm 5 \%$, respectivamente.

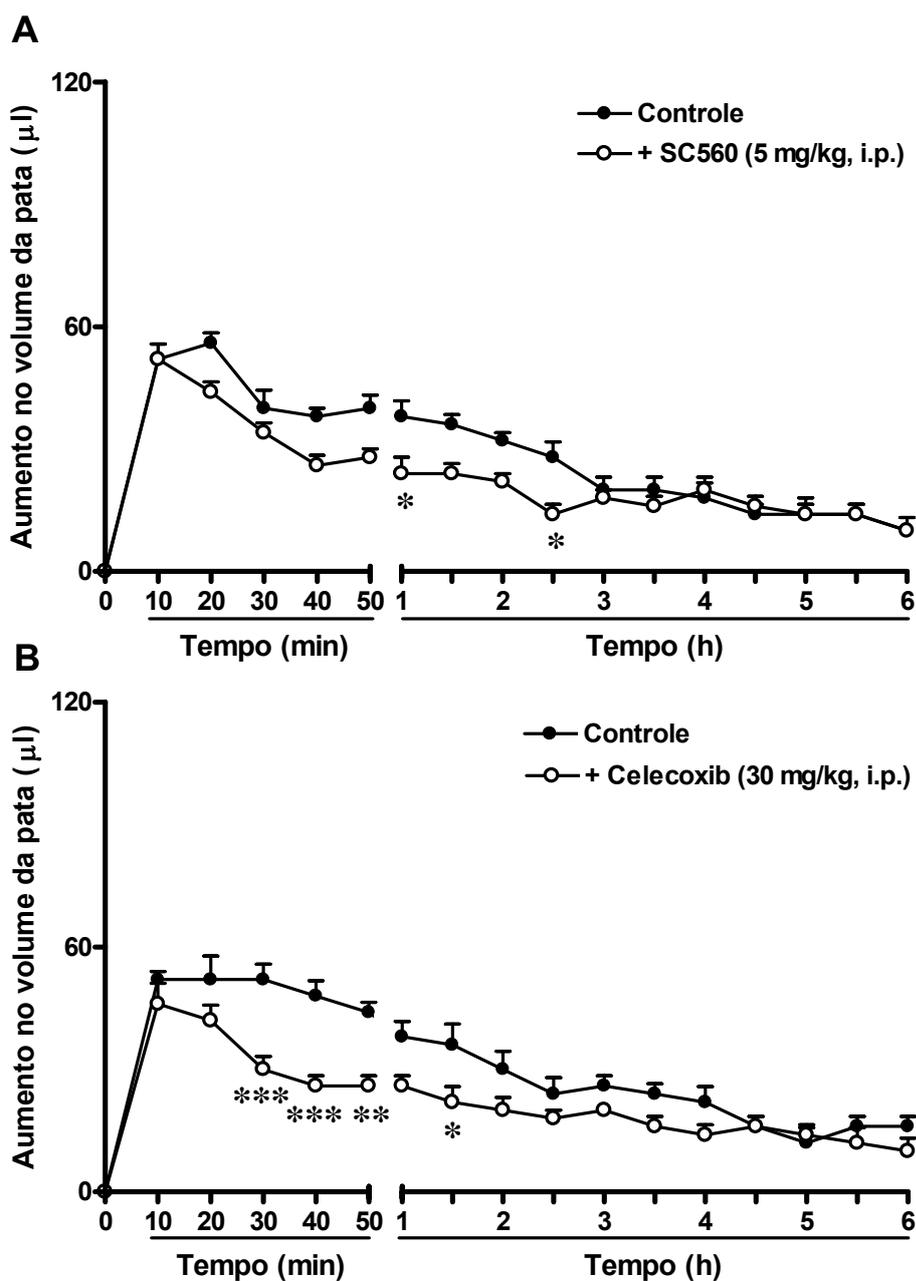


Figura 7. Efeito do tratamento com inibidores seletivos das enzimas COX-1 e COX-2 sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com o antagonista seletivo para a enzima COX-1, SC560 (5 mg/kg, i.p.) (A) ou com o antagonista seletivo para a enzima COX-2, celecoxib (30 mg/kg, i.p.) (B) e 30 min após receberam a injeção de tripsina (30 μg /pata) em camundongos. Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

O resultado da Figura 8 demonstra que o tratamento sistêmico com o glicocorticoide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) também diminuiu significativamente o edema de pata induzido pela tripsina, com inibição de $30 \pm 6\%$.

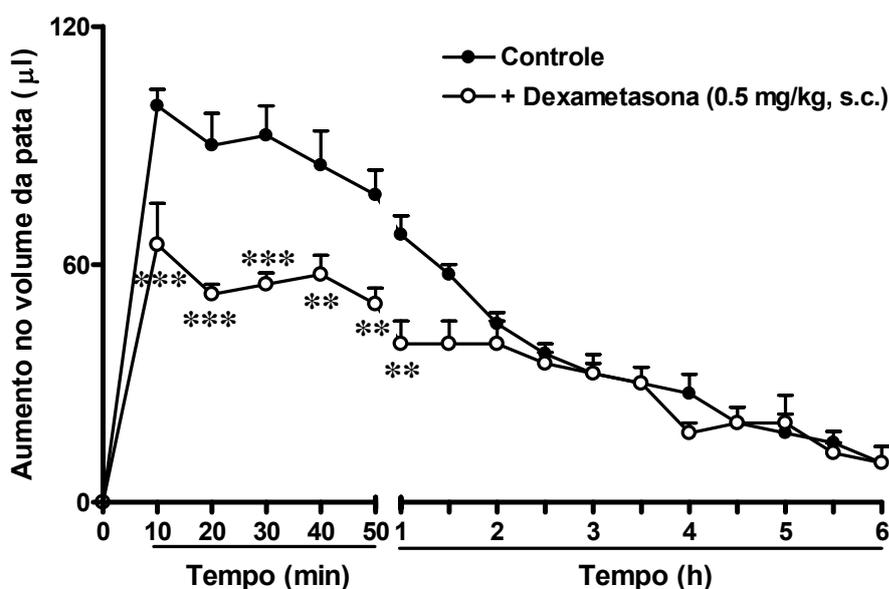


Figura 8. Efeito do tratamento com o inibidor de síntese protéica sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais receberam o glicocorticoide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) e após 4 h o edema foi induzido pela tripsina (30 µg/pata) em camundongos. Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2.4. Participação das neurocininas e do CGRP no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

Para verificar a participação das neurocininas e do CGRP no edema de pata induzido pela tripsina, os animais foram pré-tratados com antagonistas para os receptores NK₁, NK₂, NK₃ ou com o CGRP₁. O tratamento com os antagonistas dos receptores NK₁ (FK888, 1 mg/kg, i.v., Figura 9), NK₂ (SR48968, 3 mg/kg, i.v., Figura 10A) ou NK₃ (SR142801, 1 mg/kg, i.v., Figura

10B), 15 min antes da injeção de tripsina, causou redução significativa do edema de pata, com inibições iguais a $24 \pm 5 \%$, $15 \pm 2 \%$ e $31 \pm 5 \%$, respectivamente. Da mesma forma, o pré-tratamento com o antagonista do receptor para o CGRP (CGRP₈₋₃₇, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v., 15 min) reduziu de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela tripsina, com inibição igual a $39 \pm 6 \%$ (Figura 11).

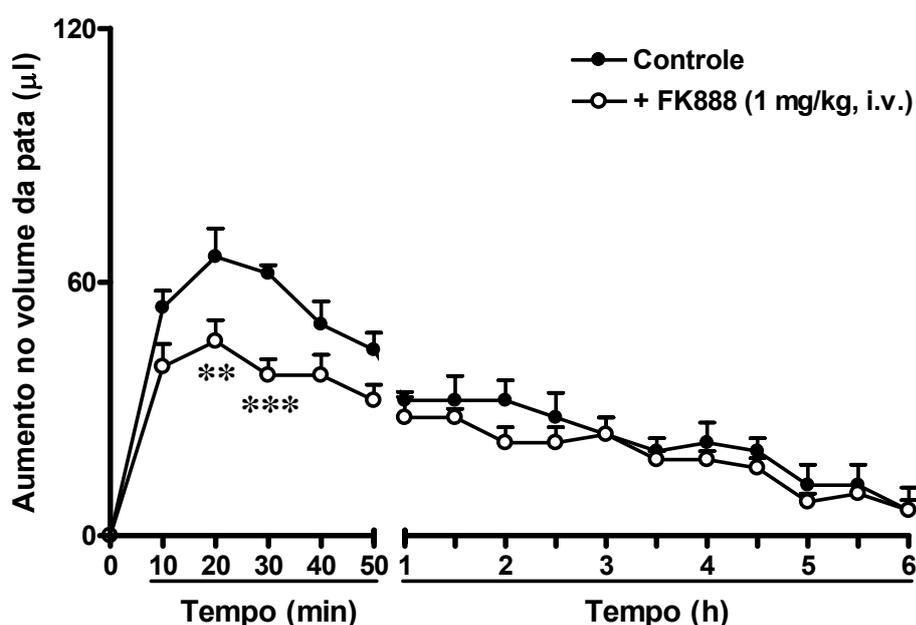


Figura 9. Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor NK₁ sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com o FK888 (1 mg/kg, i.v.) e após 15 min receberam a injeção de tripsina (30 $\mu\text{g}/\text{pata}$). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01; ***P < 0,001.

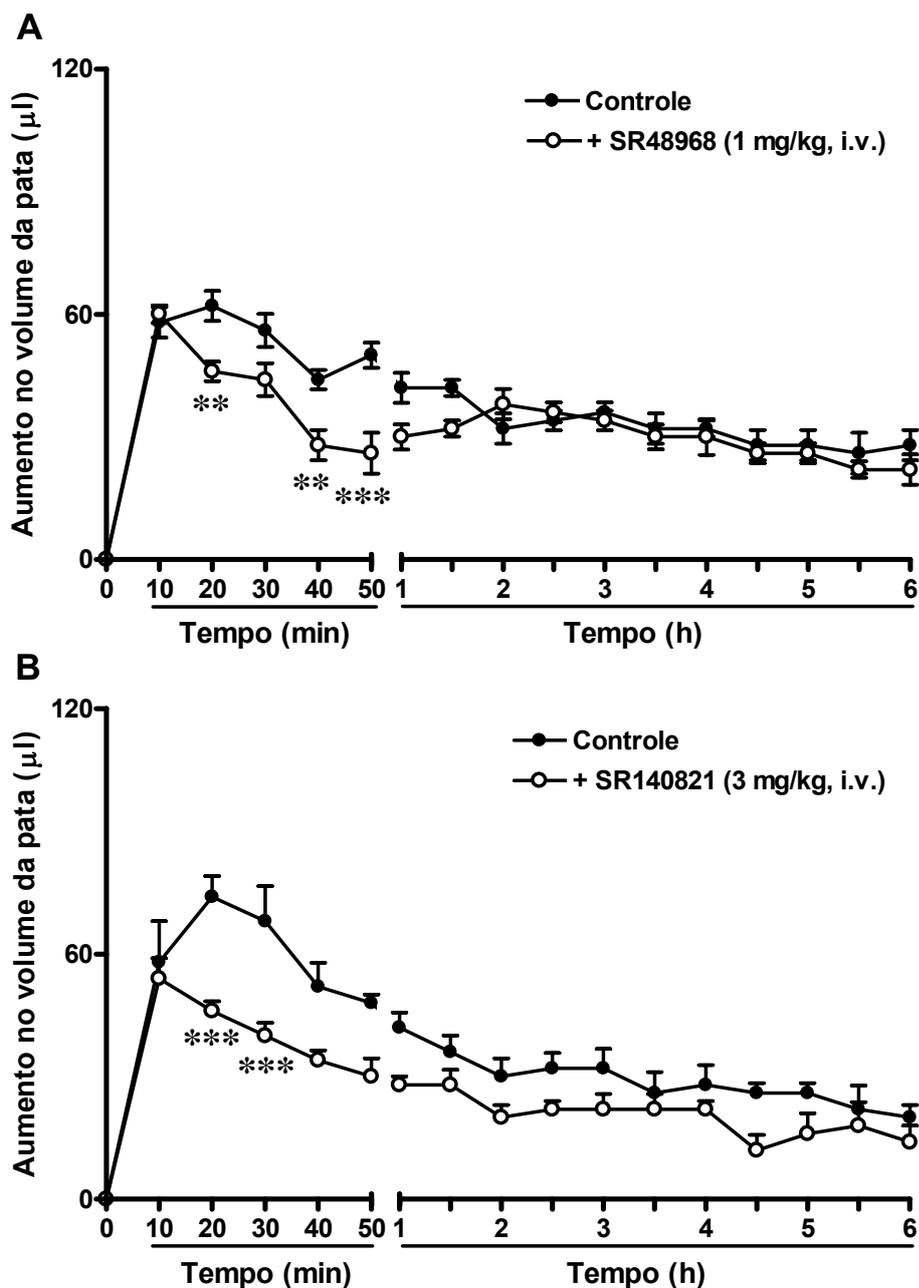


Figura 10. Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores NK_2 e NK_3 sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os antagonistas seletivos para o receptor NK_2 , SR48968 (1 mg/kg, i.v.) (A) e para o receptor NK_3 , SR142801 (3 mg/kg, i.v.) (B) foram administrados 15 min antes da injeção de tripsina (30 μg /pata) em camundongos. Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01; ***P < 0,001.

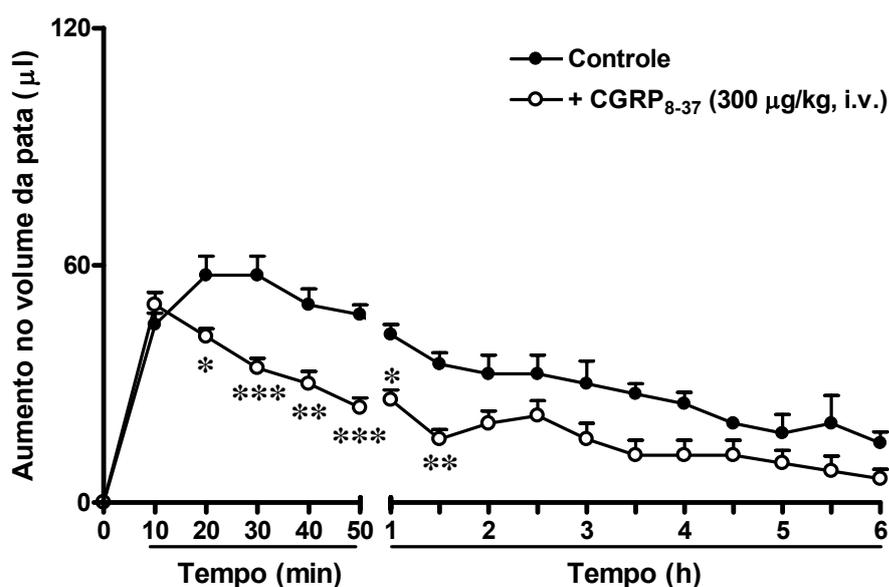


Figura 11. Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor CGRP sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os camundongos foram tratados com o antagonista seletivo para o receptor CGRP, CGRP₈₋₃₇ (300 µg/kg, i.v.) e 15 min após receberam a injeção i.pl. de tripsina (30 µg/pata). Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2.5. Participação do receptor TRPV1 no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

Com o objetivo de avaliar o envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina os animais foram pré-tratados com o inibidor do receptor TRPV1. Como pode ser observado na Figura 12, o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1 (SB366791, 500 µg/kg, i.p., 30 min) inibiu de maneira marcante a resposta edematogênica induzida pela tripsina, com inibição de 49 ± 4 %.

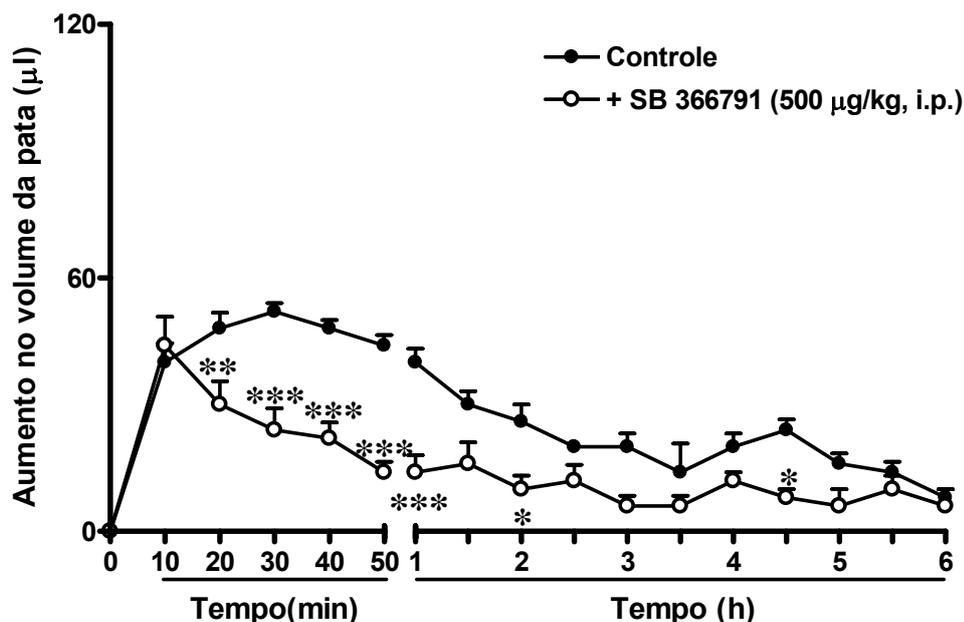


Figura 12. Efeito do tratamento com o inibidor do receptor TRPV1 sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com o inibidor seletivo do receptor TRPV1, SB366791 (500 µg/kg, i.p.) e receberam a injeção de tripsina (30 µg/pata) 30 min após. Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.2.6. Possível envolvimento do óxido nítrico (NO) no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

O possível envolvimento do óxido nítrico foi avaliado através do tratamento com o inibidor não seletivo da enzima NOS, o L-NOARG (20 mg/kg, i.p., 30 min), ou com o uso de animais com deleção gênica para a isoforma induzida da enzima NOS (iNOS). As Figuras 13A e B demonstram que o edema de pata induzido pela tripsina não sofreu alteração significativa, após o pré-tratamento com a L-NOARG ou nos animais com deleção gênica para a enzima iNOS.

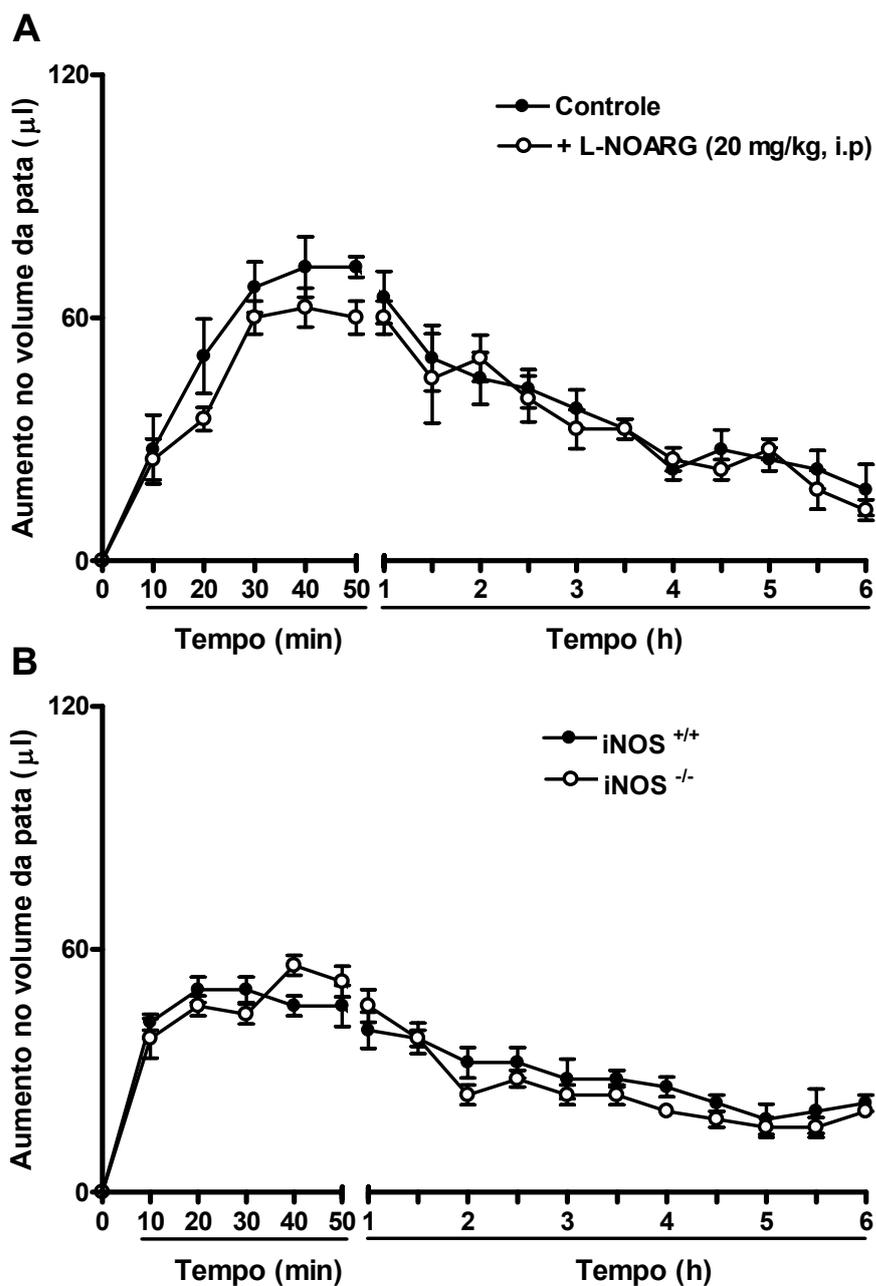


Figura 13. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da NOS e da deleção gênica para a iNOS sobre o edema de pata induzido pela tripsina em camundongos. Os animais foram tratados com o antagonista não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NOARG (20 mg/kg, i.p., 30 min) (A) e receberam a injeção de tripsina (30 μg /pata) 30 min após. Em outro grupo experimental (B), o edema de pata induzido pela tripsina (30 μg /pata) foi avaliado em animais com deleção gênica para a iNOS. Cada ponto representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m.

4.2.7. Envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF α no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

Para verificar o possível envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF α , no edema de pata induzido pela tripsina, foram utilizados animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . O edema de pata foi significativamente reduzido nestes animais, com percentagem de inibição de $42 \pm 6\%$ (Figura 14).

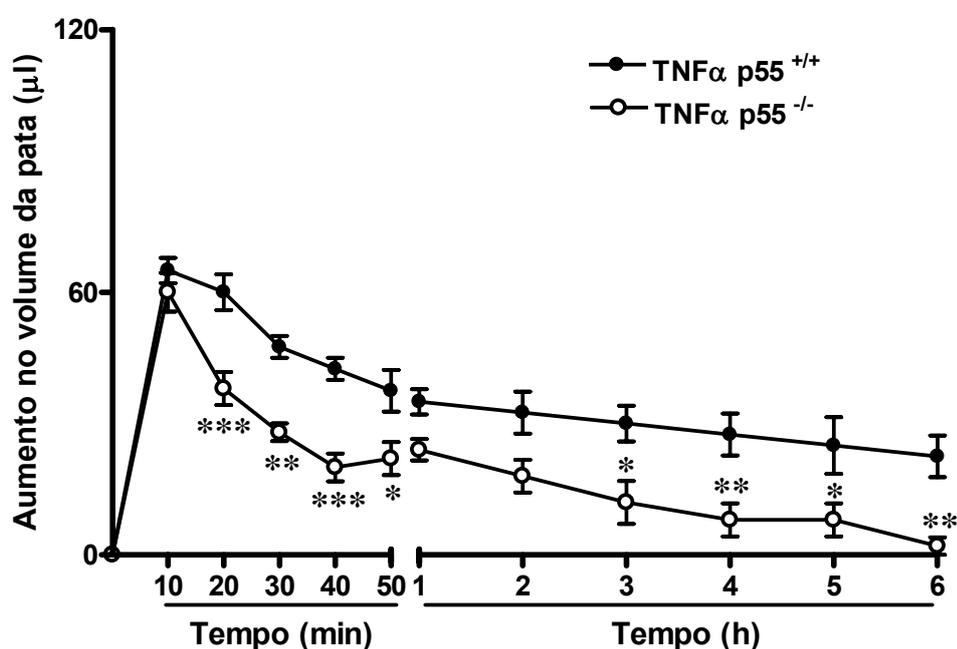


Figura 14. Edema de pata induzido pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . Edema de pata em animais controle C57/BL6 (TNF α p55^{+/+}) ou TNF α p55^{-/-}, após a injeção de tripsina (30 μ g/pata). Cada coluna representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; **P < 0,01 e ***P < 0,001.

4.2.8. Envolvimento do receptor PAR-2 no edema de pata induzido pela tripsina em camundongos

Para confirmar se o edema de pata induzido pela tripsina é dependente da ativação do receptor PAR-2, foram utilizados animais com deleção gênica para este receptor. Como pode ser observado na Figura 15, o edema de pata induzido pela tripsina (30 µg/pata) foi reduzido de forma parcial nos animais nocaute para o receptor PAR-2, com inibição de $26 \pm 3 \%$.

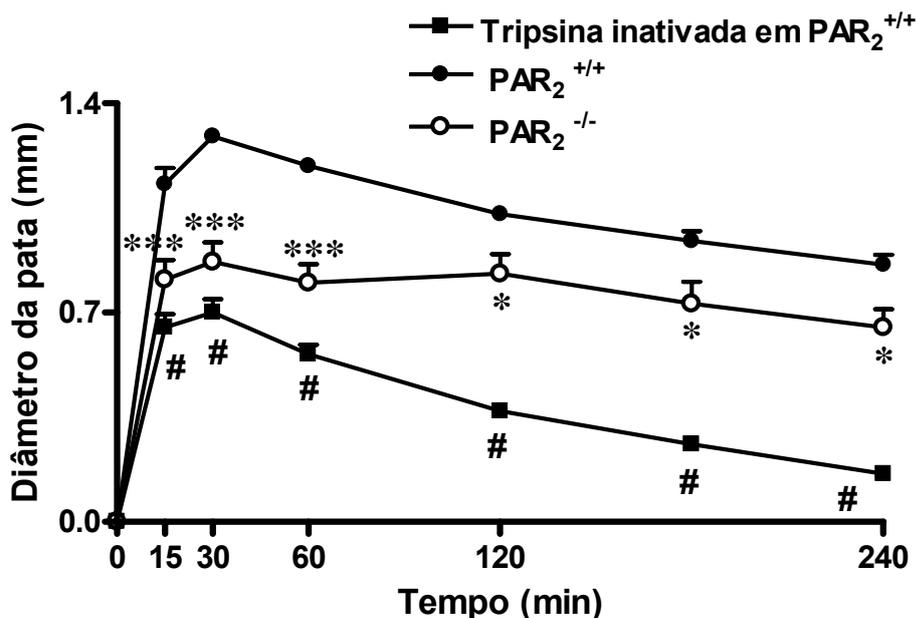


Figura 15. Edema de pata induzido pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor PAR-2. Edema de pata em camundongos controle PAR-2^{+/+} (C57/BL6) e com deleção gênica para o receptor de PAR-2 (PAR-2^{-/-}) induzido pela injeção i.pl. de tripsina (30 µg/pata), e edema em animais controle PAR-2^{+/+} (C57/BL6) induzido pela injeção de tripsina inativada (30 µg/pata). Cada coluna representa a média de 4-6 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; ***P < 0,001 e #P < 0,001.

4.3. Caracterização da resposta nociceptiva induzida pela tripsina em camundongos

A Figura 16A demonstra que a tripsina (300 µg/pata) produziu nocicepção espontânea marcante e dependente do tempo, quando injetada na pata direita de camundongos, sendo esta resposta mais acentuada durante os 10 min iniciais, diminuindo gradualmente até 60 min, após sua administração.

Desta forma, nos experimentos subseqüentes, a resposta nociceptiva foi analisada durante os primeiros 10 min, após a injeção de tripsina. Na figura 16B pode se observar que a injeção de tripsina (30 – 600 $\mu\text{g/pata}$) causa um aumento da resposta nociceptiva dependente da dose, sendo o valor estimado da DE_{50} igual a 204 (158 - 263) $\mu\text{g/pata}$. Cabe destacar que a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na dose de 600 $\mu\text{g/pata}$ produziu uma resposta edematogênica acentuada, associada com hemorragia. Por este motivo, os experimentos de nocicepção espontânea foram realizados com a dose de 300 $\mu\text{g/pata}$.

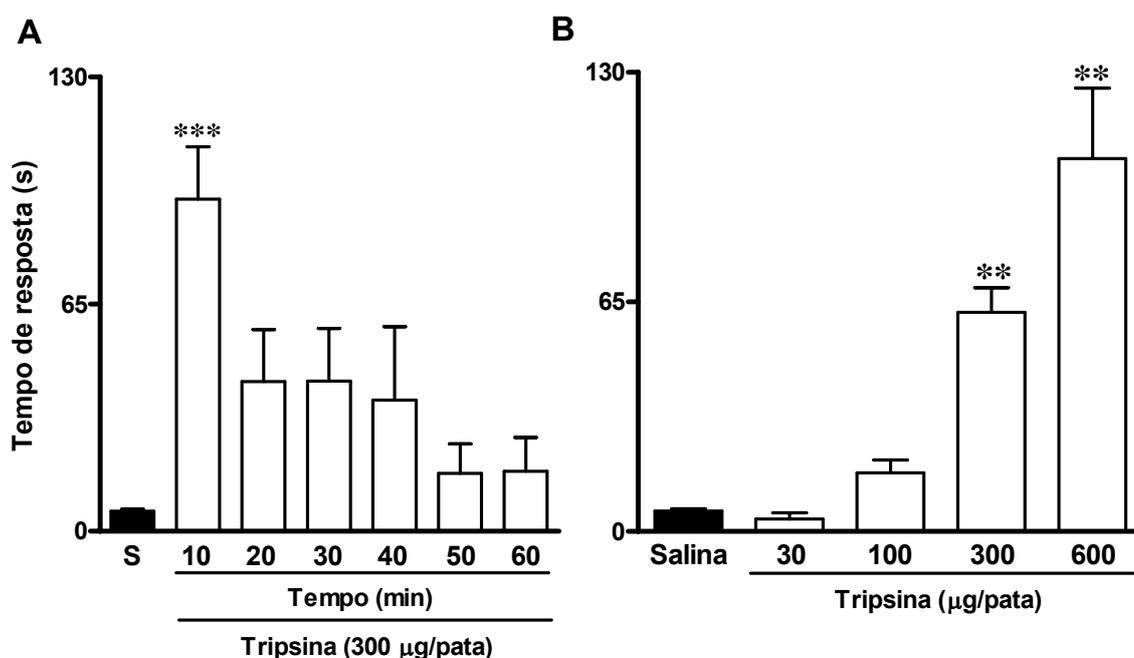


Figura 16. Padronização do modelo de nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. (A) Decurso temporal da nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 $\mu\text{g/pata}$) na pata de camundongos. (B) Curva dose-resposta para o efeito nociceptivo da tripsina (30 - 600 $\mu\text{g/pata}$) medido nos primeiros 10 min após a administração. Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos indicam os níveis de significância em comparação ao grupo salina (S) ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.4. Mecanismos envolvidos na nociceção espontânea induzida pela tripsina em camundongos

4.4.1. Envolvimento do sistema de cininas na nociceção espontânea induzida pela tripsina

Para avaliar a participação do sistema de cininas na nociceção induzida pela tripsina em camundongos, os animais foram pré-tratados com o antagonista seletivo e não-peptídico para o receptor B₁ das cininas, o SSR240612 (1 mg/kg, i.p., 30 min) ou com o antagonista seletivo e não-peptídico para o receptor B₂ das cininas, o FR173657 (10 ou 30 mg/kg, i.p., 30 min). Os resultados da Figura 17A demonstram que o tratamento prévio com o SSR240612 não foi capaz de produzir alteração significativa da nociceção espontânea induzida pela injeção de tripsina (300 µg/pata). Por outro lado, o FR173657 (30 mg/kg) reduziu de maneira significativa a nociceção espontânea induzida pela injeção i.pl. de tripsina, com porcentagem de inibição de $57 \pm 8 \%$ (Figura 17B).

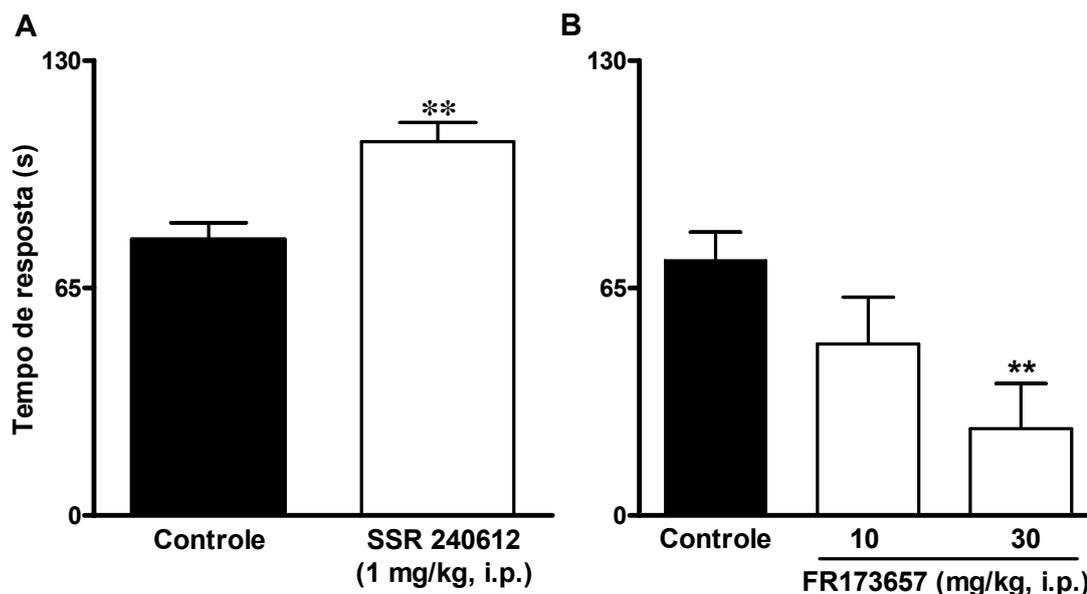


Figura 17. Efeito do tratamento sistêmico com os antagonistas seletivos para os receptores para cininas sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. O antagonista seletivo para o receptor B₁, SSR240612 (1 mg/kg, i.p.) (A) ou para o receptor B₂, FR173657 (10 ou 30 mg/kg, i.p.) (B) foram administrados 30 min antes da injeção de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01.

4.4.2. Envolvimento dos mastócitos e produtos da degranulação na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

Com o objetivo de investigar o envolvimento dos mastócitos na nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/pata), os animais foram tratados por via i.pl. com o degranulador de mastócitos, o composto 48/80 (durante 4 dias, nas doses de 1, 3, 10 e 10 µg/sítio, respectivamente), ou com o estabilizador de mastócitos, o cromoglicato de sódio (8 mg/kg, i.p., 1 vez ao dia, durante 6 dias). Os dados da Figura 18A e B mostram que o pré-tratamento com o composto 48/80 ou com o cromoglicato de sódio reduziu

significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de tripsina, com porcentagens de inibição de $56 \pm 6\%$ e $47 \pm 7\%$, respectivamente.

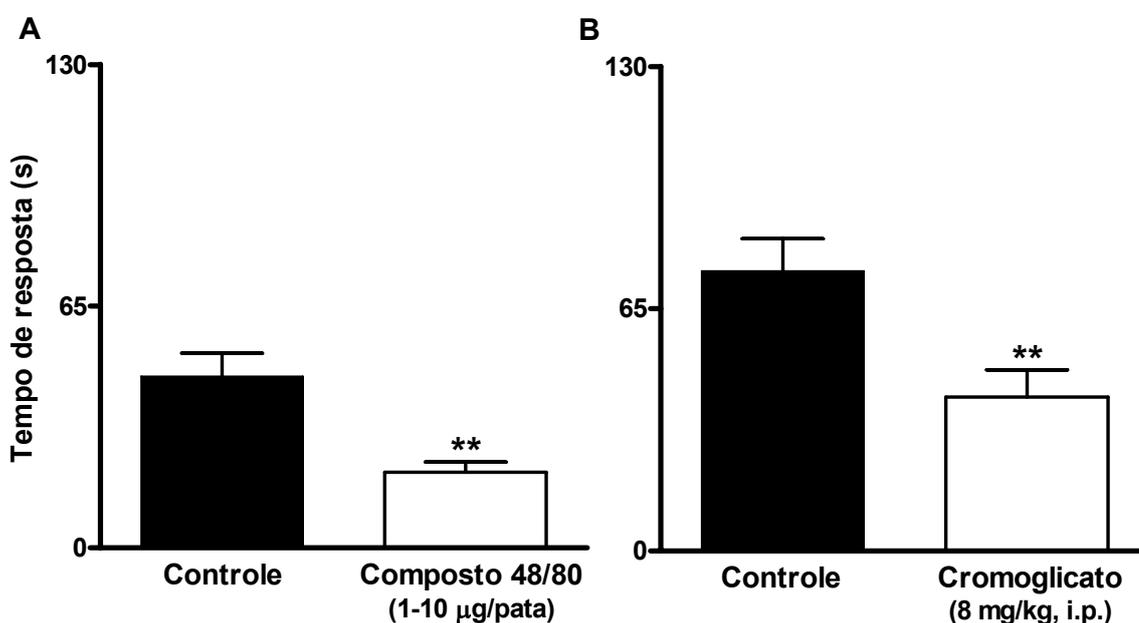


Figura 18. Efeito do tratamento com o degranulador ou com o estabilizador de mastócitos sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. O degranulador de mastócitos, composto 48/80, foi administrado i.pl. durante 4 dias nas doses de 1, 3, 10 e 10 µg/kg (A), e o estabilizador de mastócitos, cromoglicato de sódio, foi administrado i.p. durante 6 dias na dose de 8 mg/kg (B), antes da indução da nocicepção espontânea pela tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01.

O envolvimento de mediadores liberados através da degranulação de mastócitos foi avaliado pelo tratamento dos animais com o antagonista seletivo para o receptor H₁ de histamina, a pirilamina (10 mg/kg, i.p., 30 min). A Figura 19 demonstra que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor H₁ não foi capaz de interferir significativamente na resposta nociceptiva induzida pela tripsina (300 µg/pata).

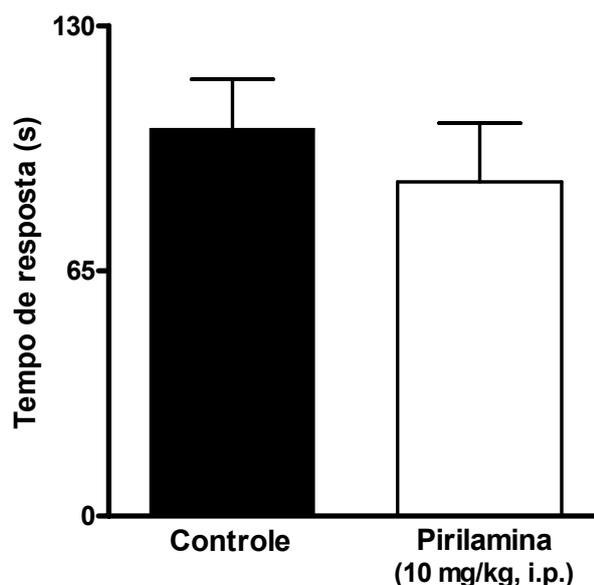


Figura 19. Efeito do antagonista do receptor H₁ de histamina sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. Os animais receberam o inibidor do receptor H₁ para histamina, a pirilamina (10 mg/kg, i.p.) e após 30 min receberam a injeção i.pl. de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m.

4.4.3. Participação das enzimas ciclooxigenases (COX) e da síntese protéica na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

Para avaliar o possível envolvimento das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) na nocicepção espontânea induzida pela tripsina, os animais foram pré-tratados com o antiinflamatório não-esteroidal indometacina (2 mg/kg, i.p., 30 min). Como pode ser observado na Figura 20A, a indometacina não alterou de forma significativa a resposta nociceptiva causada pela tripsina (300 µg/pata). Da mesma maneira, o tratamento com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) também não foi capaz de prevenir a nocicepção espontânea induzida pela tripsina (Figura 20B).

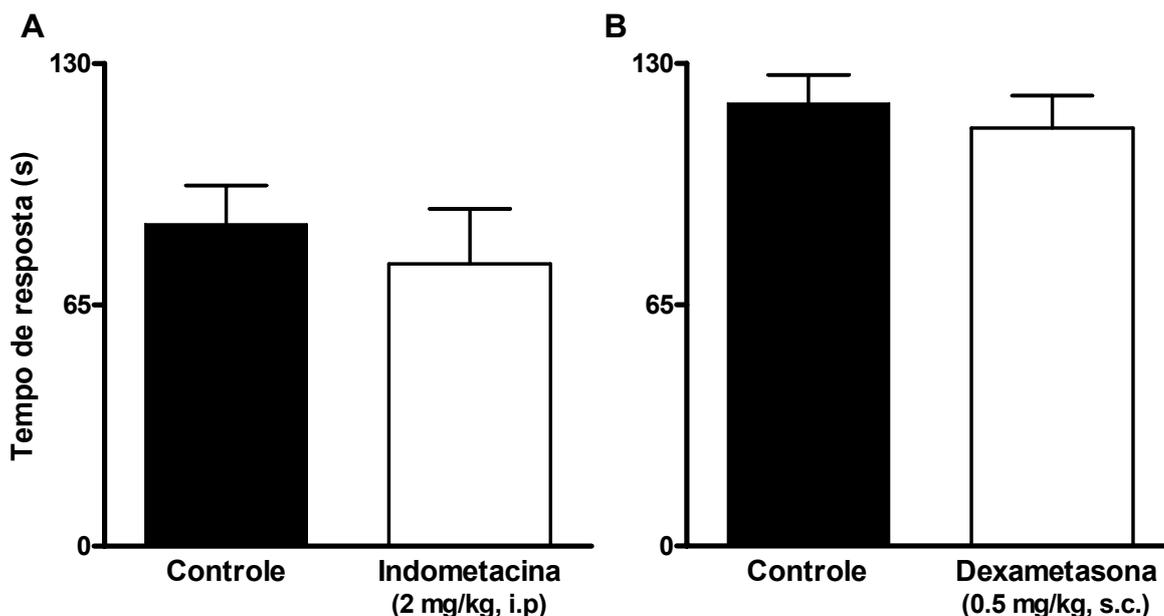


Figura 20. Efeito do tratamento com inibidores da enzima COX e da síntese protéica sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. Os animais foram tratados com o inibidor não seletivo das enzimas ciclooxigenases 1 e 2, indometacina (2 mg/kg, i.p.) (A) e com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) (B) 30 min e 4 h antes da injeção de tripsina (300 µg/pata), respectivamente. Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m.

4.4.4. Participação das neurocininas e do CGRP na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

A fim de verificar o envolvimento das neurocininas e do CGRP na nocicepção induzida pela tripsina (300 µg/pata), os animais foram tratados com os antagonistas seletivos para os receptores NK₁, NK₂, NK₃, ou para o receptor do CGRP. Como pode ser observado na Figura 21, a nocicepção espontânea induzida pela tripsina foi significativamente reduzida pela administração dos antagonistas seletivos para os receptores NK₁, o FK888 (1 mg/kg, i.v., Figura 21A), para o receptor NK₂, o SR48968 (1 mg/kg, i.v., Figura 21B), e para o receptor NK₃, o SR142801 (3 mg/kg, i.v., Figura 21C), ou ainda para o receptor do CGRP, o fragmento CGRP₈₋₃₇ (300 µg/kg, i.v., Figura 21D), quando

administrados 15 min antes da injeção da tripsina, com porcentagens de inibição de $41 \pm 8 \%$, $60 \pm 3 \%$, $46 \pm 9 \%$ e $35 \pm 5 \%$, respectivamente.

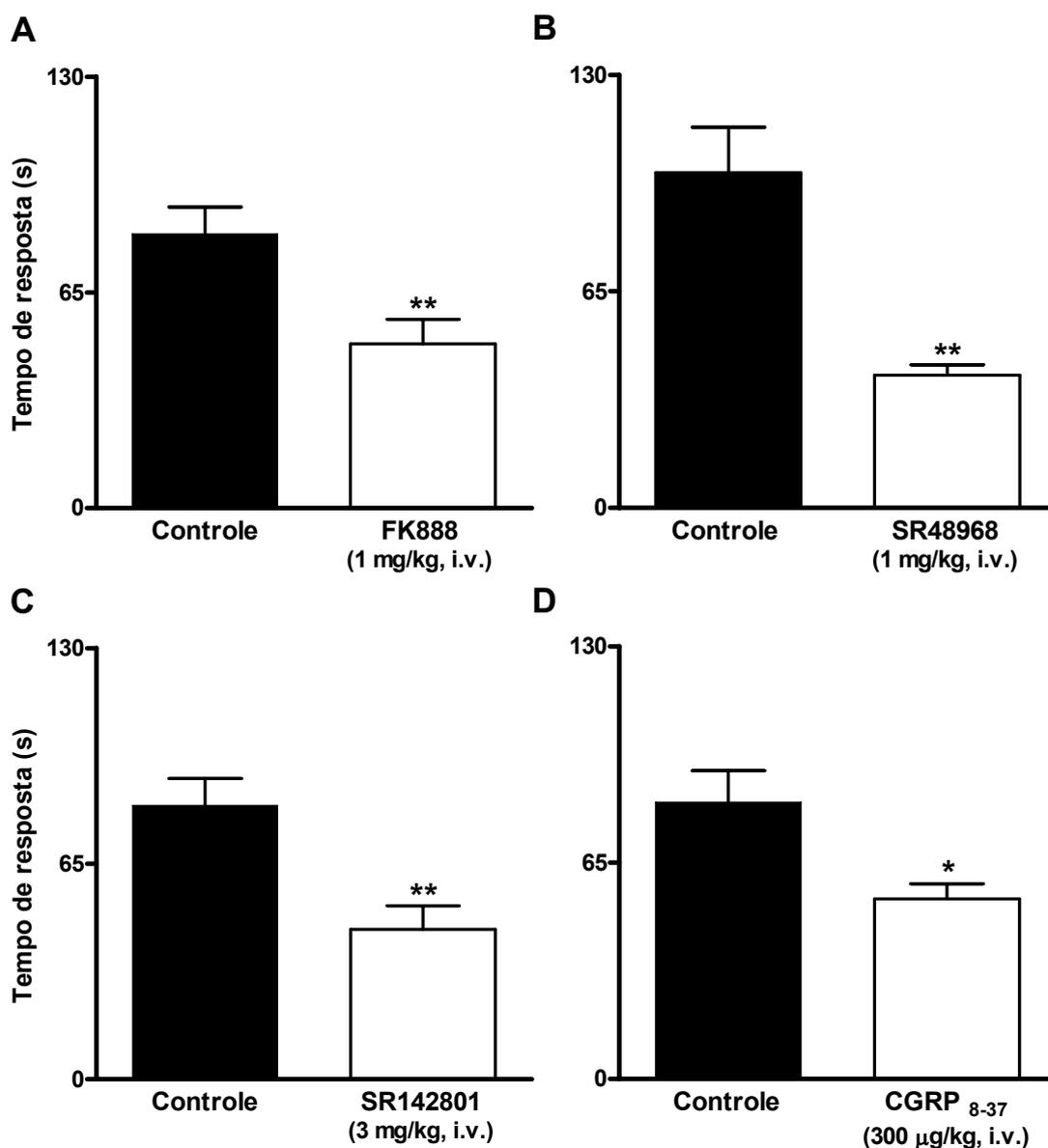


Figura 21. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores NK_1 , NK_2 , NK_3 e CGRP sobre a nociceção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. Os animais foram tratados com os antagonistas seletivos para (A) o receptor NK_1 , FK888 (1 mg/kg), (B) receptor NK_2 , SR48968 (1 mg/kg), (C) receptor NK_3 , SR142801 (3 mg/kg) e (D) receptor CGRP, CGRP₈₋₃₇ (300 µg/kg) pela via endovenosa 15 min antes da injeção de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05, **P < 0,01.

4.4.5. Participação do receptor TRPV1 na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

Para investigar a participação do receptor TRPV1 na nocicepção espontânea induzida pela tripsina, outro grupo de animais foi pré-tratado com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1, o SB366791 (500 µg/kg, i.p., 30 min). Como pode ser observado na Figura 22, o tratamento com o SB366791 produziu inibição significativa da nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/pata), com porcentagem de inibição igual a $48 \pm 8 \%$.

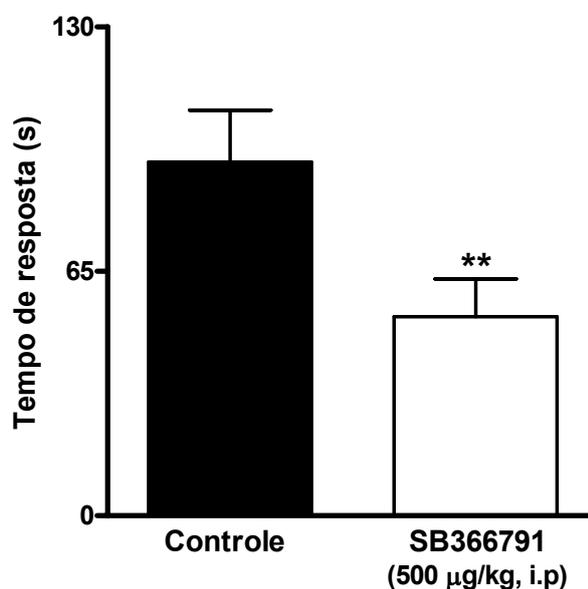


Figura 22. Efeito do tratamento com o inibidor seletivo do receptor TRPV1 sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. Os animais receberam o antagonista seletivo do receptor TRPV1, SB366791 (500 µg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. **P < 0,01.

4.4.6. Envolvimento do óxido nítrico (NO) na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

Como apresentado na Figura 23, o tratamento com o inibidor não seletivo da enzima NOS, o L-NOARG (20 mg/kg, i.p., 30 min), não foi capaz de alterar de forma significativa a nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/pata).

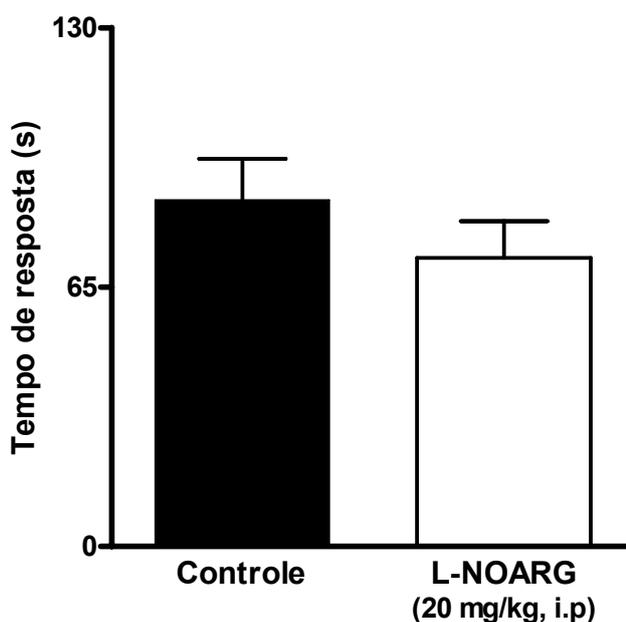


Figura 23. Efeito do tratamento com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina na pata de camundongos. Os animais foram tratados com a L-NOARG (20 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m.

4.4.7. Envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF α na nocicepção espontânea induzida pela tripsina

Para verificar a possível participação da citocina pró-inflamatória TNF α na nocicepção espontânea induzida pela tripsina, foram utilizados animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . A resposta nociceptiva causada

pela tripsina foi significativamente diminuída nestes animais, com percentagem de inibição de $38 \pm 6 \%$ (Figura 24).

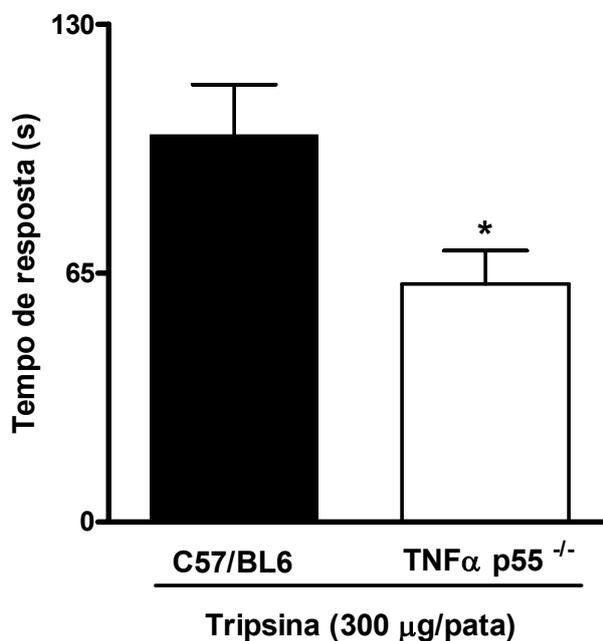


Figura 24. Nociceção espontânea induzida pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . Nociceção espontânea em animais controle C57/BL6 (TNF α p55^{+/+}) ou TNF α p55^{-/-} após a injeção de tripsina (300 μ g/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05.

4.4.8. Envolvimento do receptor PAR-2 na nociceção espontânea induzida pela tripsina

Para verificar o envolvimento do receptor PAR-2 na nociceção espontânea induzida pela tripsina, foram utilizados camundongos com deleção gênica para o receptor PAR-2. Como apresentado na Figura 25, a nociceção espontânea induzida pela injeção de tripsina (300 μ g/pata) foi praticamente abolida nos animais nocaute, com percentagem de inibição igual a $85 \pm 3 \%$.

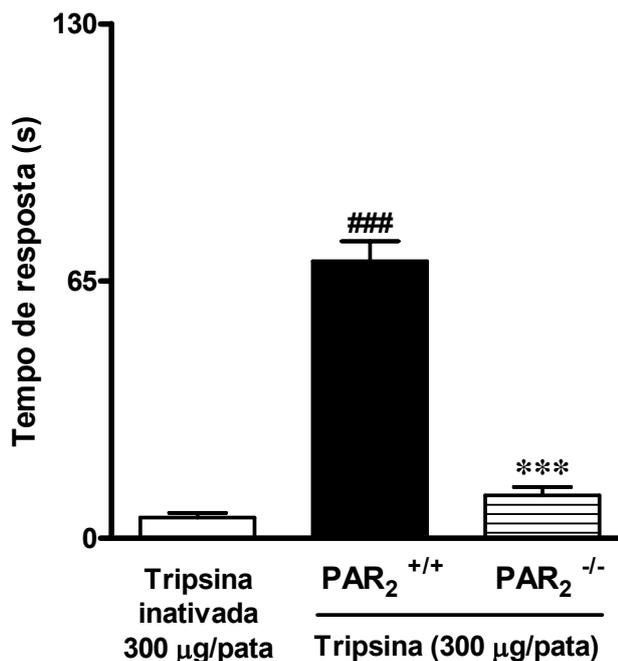


Figura 25. Nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos com deleção gênica para o receptor PAR-2. Nocicepção espontânea em animais PAR-2^{+/+} (C57/BL6) após a injeção de tripsina inativada, ou em animais PAR-2^{+/+} (C57/BL6) ou PAR-2^{-/-} após a injeção de tripsina (300 µg/pata). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo PAR-2^{+/+}. ***P < 0,001. E ###P < 0,001 representam os níveis de significância em comparação ao grupo tripsina inativada.

4.5. Medida da atividade da enzima MPO após a injeção de tripsina na pata de camundongos

Com o objetivo de avaliar a migração celular na pata de camundongos tratados com tripsina, foram quantificados os níveis da enzima MPO em diferentes intervalos de tempo, após a injeção de tripsina. A Figura 26A mostra que a tripsina (30 µg/pata) promoveu aumento marcante e tempo-dependente da migração de neutrófilos, conforme indicado pelo aumento de aproximadamente 4 vezes da atividade da MPO comparado ao grupo injetado com salina. O aumento máximo da migração de neutrófilos foi observado 3 h após a injeção de tripsina. Nos animais com deleção gênica para o receptor

PAR-2, o aumento nos níveis de MPO foi praticamente abolido, apresentando níveis menores que os produzidos pela injeção i.pl da tripsina inativada (Figura 26B).

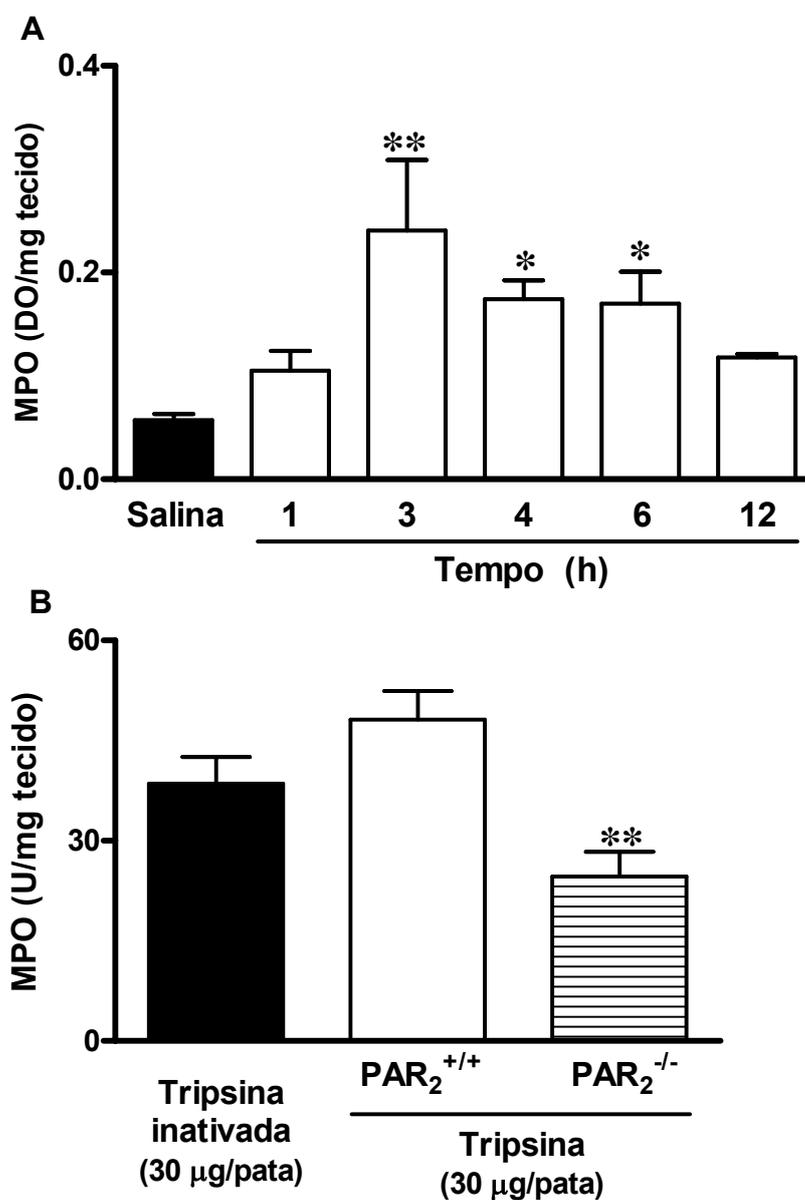


Figura 26. Efeito tempo-dependente da injeção de tripsina sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata de camundongos suíços e camundongos PAR-2^{-/-}. Aumento dos níveis da enzima MPO após a injeção de tripsina (30 µg/pata) em camundongos suíços (A) e em camundongos C57/BL6 (PAR-2^{+/+}) e PAR-2^{-/-} (B). Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; **P < 0,01.

4.6. Medida dos níveis de IL-1 β e TNF α após a injeção de tripsina na pata de camundongos

Os resultados da Figura 27 demonstram que a injeção de tripsina (30 $\mu\text{g/pata}$) induziu aumento significativo dos níveis de TNF α e IL-1 β no tecido subcutâneo da pata de camundongo (2 e 2,5 vezes quando comparado ao grupo salina, respectivamente). O aumento da produção de TNF α foi significativo 6 h após o tratamento com a tripsina (Figura 27A), enquanto, os níveis máximos de IL-1 β foram observados 3 h após a injeção de tripsina (Figura 27B).

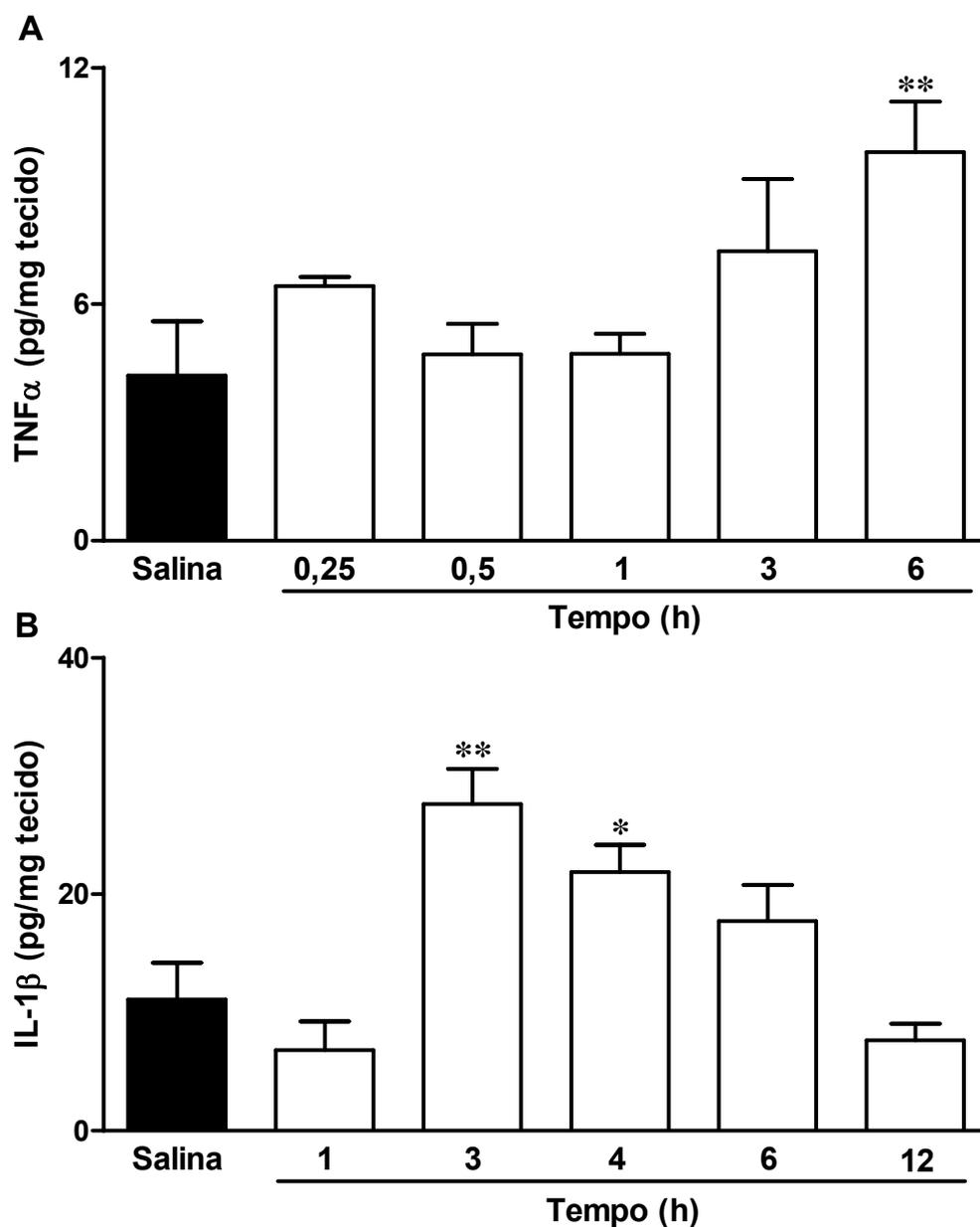


Figura 27. Efeito tempo-dependente do tratamento com tripsina sobre os níveis de TNF α e IL-1 β na pata de camundongos. Aumento dos níveis de TNF α (A) e IL-1 β (B) induzido pela tripsina (30 μ g/pata) na pata de camundongos. Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos representam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. *P < 0,05; **P < 0,01.

5. DISCUSSÃO

A clonagem e a posterior caracterização funcional dos receptores PARs contribuíram para o estabelecimento de novas perspectivas acerca do papel fisiológico e patofisiológico das proteases no organismo. As proteases, como a trombina e a tripsina, podem modular diversos processos inflamatórios, tanto em humanos quanto em roedores. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo estabelecimento destas respostas ainda não estão totalmente esclarecidos (Vergnolle *et al.*, 2003; Steinhoff *et al.*, 2003). Dentre as proteases capazes de ativar os receptores PAR-2, apenas a triptase liberada pelos mastócitos parece atuar como agonista endógeno, induzindo inflamação neurogênica, *in vivo* (Steinhoff *et al.*, 1999; 2003). Já a tripsina, em sua forma pancreática, parece contribuir para a etiologia da pancreatite, dermatite perianal e peristomal (Buckingham e Berg, 1986; Andersen *et al.*, 1994), enquanto a tripsina extrapancreática está associada ao desenvolvimento de eczema de contato (Bjelland *et al.*, 1989), invasão tumoral e metástase (Sorsa *et al.*, 1997). A tripsina ativa o receptor PAR-2 *in vitro* (Alm *et al.*, 2000), podendo ser um agonista potencial do receptor PAR-2 *in vivo* (Steinhoff *et al.*, 1999; Alm *et al.*, 2000; Cotrell *et al.*, 2004). Além do pâncreas, a tripsina foi identificada em vários tipos de células, como em queratinócitos (Babiarz-Magee *et al.*, 2004), endotélio (Shpacovitch *et al.*, 2002), neurônios sensoriais (Koshikawa *et al.*, 1998), dentre outros. Níveis elevados desta protease estão presentes em patologias como inflamação, dano tecidual e desenvolvimento tumoral (Sorsa *et al.*, 1997; Shpacovitch *et al.*, 2002; Meyer-Hoffert *et al.*, 2004; Obreja *et al.*, 2006).

A capacidade das proteases de regular as funções celulares, através da interação com os receptores PARs, tem gerado novas evidências sobre as funções fisiológicas potenciais destas enzimas. Os PARs pertencem a uma grande família de receptores acoplados à proteína G (PAR1 – PAR4) que estão localizados em diferentes tecidos (Macfarlane *et al.*, 2001; Schimidlin e Bunnett, 2001). O PAR-1 foi descoberto em um estudo com a finalidade de identificar o receptor responsável pelas ações celulares da trombina, incluindo a agregação plaquetária e a regulação das células endoteliais, o que sugeriu uma importante ação fisiológica para o receptor PAR-1 na homeostase sanguínea. Além disso, os PARs parecem estar envolvidos com o sistema de defesa do organismo em resposta a um dano tecidual ou após invasão de patógenos (Hollenberg, 1996; Vergnolle, 2000). No entanto, grande interesse tem sido dado ao envolvimento dos PARs na inflamação e nocicepção (Hollenberg *et al.*, 1997; Vergnolle, 1999; Lindner *et al.*, 2000; de Garavila *et al.*, 2001; Cenac *et al.*, 2002), devido aos sinais clássicos da inflamação (dor, calor, edema e vermelhidão) que são observados após a ativação desses receptores, *in vivo*.

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que a injeção intraplantar de tripsina resulta em nocicepção espontânea marcante e dose-dependente na pata de camundongos. De maneira interessante, a nocicepção espontânea induzida pela tripsina foi substancialmente reduzida em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2. Tal fato sugere que a resposta nociceptiva causada pela tripsina depende em grande parte da ativação do receptor PAR-2. Resultados semelhantes foram obtidos por Kawabata e colaboradores (2002) ao demonstrar que a injeção de agonistas do

receptor PAR-2 na pata de camundongos produz aumento de comportamentos nociceptivos, como lambar e morder a pata injetada (nocicepção espontânea). Outras evidências experimentais também mostraram que proteases (triptase e tripsina) e agonistas sintéticos do receptor PAR-2 são capazes de estimular neurônios nociceptivos primários, produzindo hiperalgisia térmica e mecânica duradouras (Vergnolle *et al.*, 2001). As doses de tripsina capazes de causar hiperalgisia são muito menores do que a dose utilizada para a indução da nocicepção espontânea. A hiperalgisia é caracterizada por uma sensibilização dos nociceptores por diferentes mediadores inflamatórios liberados no sítio inflamado, como prótons, BK, ATP, PGs, neuropeptídeos, dentre outros. Esta sensibilização causa uma diminuição no limiar de ativação destes neurônios, fazendo com que se tornem responsivos a estímulos de baixa intensidade (Coutaux *et al.*, 2005). A dose de tripsina utilizada para induzir a nocicepção espontânea deve ativar diretamente os nociceptores devido à degranulação de mastócitos e liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, resultando em uma nocicepção aguda pronunciada. No entanto, doses de tripsina, cerca de 100 vezes menores do que a utilizada para a nocicepção espontânea, são capazes de apenas sensibilizar os nociceptores devido a liberação de alguns mediadores inflamatórios e, com isso, produzir hiperalgisia duradoura (Vergnolle *et al.*, 2001).

Os dados do presente estudo também demonstram que a injeção de tripsina na pata de camundongos produz resposta inflamatória aguda, tempo e dose-dependente, avaliada através da medida do edema de pata. A resposta edematogênica causada pela tripsina teve seu pico entre 10 e 40 min e durou por cerca de 6 horas. Resultados semelhantes foram obtidos por Vergnolle e

colaboradores (1999a), mostrando que a injeção de agonistas do receptor PAR-2 na pata de ratos resultou na formação de um edema marcante, com efeito máximo em 1 h, que persistiu até 6 h após a injeção. Contudo, os resultados do presente estudo sugerem que outros mecanismos, além da ativação do receptor PAR-2, estejam envolvidos na resposta edematogênica induzida pela tripsina, pois este evento foi apenas parcialmente reduzido em animais com deleção gênica para o receptor PAR-2. Esta seria uma forte evidência de que mecanismos diferentes são responsáveis pelas respostas nociceptivas e inflamatórias causadas pela tripsina na pata de camundongos. Para verificar se o edema e a nocicepção estariam relacionando com a atividade proteolítica da tripsina, a enzima foi aquecida (100 °C durante 20 min) para sofrer desnaturação e, conseqüente, inativação. Quando injetada nas mesmas doses na pata de camundongos, a tripsina inativada ao calor não foi capaz de produzir um aumento da resposta nociceptiva. Por outro lado, a tripsina inativada causou um aumento significativo no volume da pata dos camundongos, confirmando a participação de outros mediadores nesta resposta. Estes resultados sugerem que a atividade proteolítica da tripsina está diretamente envolvida com o desenvolvimento da resposta nociceptiva e, em parte, envolvida no processo inflamatório.

Estudos *in vivo* têm demonstrado algumas funções fisiológicas do receptor PAR-2, como regulação da pressão arterial e do tônus vascular (Cocks e Moffatt, 2000). Por exemplo, o receptor PAR-2 pode ser super-expresso na artéria carótida de ratos em resposta a danos vasculares (Damiano *et al.*, 1999a), sugerindo um possível efeito vasodilatador compensatório deste receptor em resposta ao dano cardiovascular. Outros

estudos sugerem ainda um papel protetor dos receptores PARs no epitélio das vias aéreas, uma vez que tanto o agonista peptídico do receptor PAR-1 quanto o agonista peptídico do receptor PAR-2 podem causar relaxamento das vias aéreas através da indução da liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂), resultando em broncodilatação (Cocks *et al.*, 1999). A presença dos PARs na superfície de células de uma variedade de tecidos, desde os vasos sanguíneos até o trato gastrointestinal, sugere que estes receptores exercem um possível papel fisiológico e protetor em diferentes órgãos.

Apesar das evidências convincentes acerca de um papel protetor dos PARs, muitos estudos têm mostrado efeitos pró-inflamatórios envolvendo a ativação destes receptores (Kawabata *et al.*, 1998; Vergnolle *et al.*, 1999a). Neste contexto, foi demonstrado que a ativação do receptor PAR-2 aumenta a permeabilidade vascular (Kawabata *et al.*, 1998; Vergnolle *et al.*, 1999a), produz relaxamento do músculo liso (Al-Ani *et al.*, 1995), causa hipotensão sistêmica (Hwa *et al.*, 1996; Damiano *et al.*, 1999b), broncoconstrição (Ricciardolo *et al.*, 2000) e marginação e infiltração de leucócitos (Al-Ani *et al.*, 1995; Vergnolle, 1999). Além do mais, o receptor PAR-2 está expresso em grandes quantidades na superfície de células inflamatórias como neutrófilos e mastócitos, onde deve exercer um papel crucial na ativação e degranulação destas células (Howells *et al.*, 1997; Vergnolle, 2000). Por conseguinte, a presença do receptor PAR-2 na superfície das células inflamatórias pode estar relacionada à resposta edematogênica duradoura e à intensa infiltração de neutrófilos que ocorre quando agonistas dos receptores PAR-1 e PAR-2 são injetados na pata de ratos (Vergnolle, 1999; Vergnolle *et al.*, 1999a, 1999b; Steinhoff *et al.*, 2000). Estes resultados suportam a hipótese de que a ativação

do receptor PAR-2 está associada com respostas inflamatórias e sugere um papel dual para os receptores localizados no endotélio, não apenas como um elemento protetor, mas também como potencial fator pró-inflamatório (Vergnolle *et al.*, 2001).

Durante o desenvolvimento do processo inflamatório ocorre a produção e a liberação de inúmeros mediadores, como a histamina, cininas, leucotrienos, entre outros, que permitem o influxo de proteínas, fatores solúveis e células inflamatórias do compartimento intravascular para o interstício. As cininas constituem uma família de peptídeos envolvidos em uma série de processos fisiológicos e patofisiológicos (Bascands *et al.*, 2003). São formadas no plasma e em tecidos periféricos por moléculas precursoras chamadas de cininogênios, através da ação das enzimas calicreínas, especialmente em resposta a infecção, dano tecidual ou respostas inflamatórias (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola *et al.*, 2001; Couture *et al.*, 2001; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Os efeitos das cininas são mediados pela ativação de dois receptores acoplados à proteína G, chamados B₁ e B₂. Os receptores do tipo B₁ são ativados preferencialmente pelos fragmentos ativos des-Arg⁹-BK e Lys-des-Arg⁹-BK, enquanto que os receptores B₂ apresentam grande afinidade pela BK e pela Lys-BK (calidina). Diversas evidências demonstram que os receptores B₂ apresentam um caráter constitutivo, sendo expressos em diversos tecidos (Dendorfer *et al.*, 1999). Já o receptor B₁ para cininas raramente está expresso em condições normais, sendo induzido após dano tecidual ou depois de uma longa exposição a citocinas pró-inflamatórias ou produtos bacterianos (Calixto *et al.*, 2001, 2004; Seergers *et al.*, 2004). As cininas estão associadas com a produção secundária de outros mediadores inflamatórios e nociceptivos,

incluindo prostanóides, taquicininas, citocinas, produtos derivados de mastócitos e óxido nítrico (Calixto *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2005). Devido a estas ações, as cininas e seus receptores têm sido implicados em alterações inflamatórias e nociceptivas, incluindo a asma, a artrite reumatóide, o choque endotóxico e os quadros de dor neuropática (Calixto *et al.*, 2001; Couture *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005; Pesquero e Bader, 2006). Muitos estudos sugerem ainda que os receptores B₂ estão relacionados com a fase inicial da resposta nociceptiva e inflamatória, enquanto os receptores B₁ seriam expressos para perpetuar estes eventos.

Levando em consideração o envolvimento dos receptores para cininas na gênese e perpetuação da dor e da inflamação, os resultados do presente estudo demonstram claramente que o edema de pata induzido pela tripsina parece ser mediado em grande parte pelo receptor B₂, já que o tratamento dos animais com o antagonista seletivo deste receptor causou redução significativa do edema em todos os pontos observados. O bloqueio dos receptores B₁ para cininas foi capaz de inibir o edema apenas 2 h após a injeção de tripsina, confirmando a hipótese de que os receptores B₁ são expressos ao longo do tempo, após a exposição a estímulos nocivos (Campos e Calixto, 1994; Seegers *et al.*, 2004). Da mesma maneira, o bloqueio dos receptores B₂, mas não do receptor B₁, diminuiu consideravelmente a nocicepção espontânea induzida pela tripsina. Estes resultados sugerem que tanto o edema de pata quanto a nocicepção espontânea induzida pela tripsina são mediadas em grande parte pelo receptor B₂, mas com pouca participação do receptor B₁.

Dentre as muitas células envolvidas no processo inflamatório, os mastócitos possuem grande importância em diversas doenças, devido à

liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, a partir de seus grânulos intracelulares. Os mastócitos originam-se de precursores hematopoiéticos pluripotentes da medula óssea (Metcalf *et al.*, 1997) e depois de circularem pela corrente sanguínea são recrutados para diferentes tecidos do organismo onde atingem a maturação, através da ação de diversos fatores de crescimento. Até poucos anos atrás se acreditava que estas células estavam envolvidas apenas com respostas de hipersensibilidade imediata (Metcalf *et al.*, 1997; Galli *et al.*, 2005), como condições alérgicas. Atualmente, os mastócitos têm sido relacionados a um grande número de doenças, como artrite reumatóide e esclerose múltipla. A degranulação dos mastócitos ocorre predominantemente durante o processo inflamatório, liberando inúmeros mediadores inflamatórios, como histamina, citocinas, serotonina e proteases, além de induzir a geração de mediadores derivados do ácido araquidônico (Galli *et al.*, 2005).

Os resultados, aqui apresentados, demonstram que a degranulação e a estabilização dos mastócitos reduziram, apenas parcialmente, o edema de pata induzido pela tripsina. De maneira semelhante, o mesmo tratamento foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção espontânea à tripsina. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Kawabata *et al.* (2002) que demonstraram que o tratamento crônico dos camundongos com o degranulador de mastócitos foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção espontânea induzida pelo agonista peptídico do receptor PAR-2. Por outro lado, Vergnolle e colaboradores (1999a) demonstraram que a resposta edematogênica induzida pelo agonista peptídico do PAR-2 em ratos ocorre de maneira independente da

degranulação de mastócitos, sugerindo que o PAR-2 presente em outros tipos celulares estaria envolvido na formação do edema.

Como observado no presente estudo, o tratamento sistêmico com o antagonista seletivo para o receptor H₁ de histamina causou redução significativa do edema de pata, mas não da nocicepção espontânea induzida pela tripsina. A histamina é uma amina básica encontrada na maioria dos tecidos do corpo, presente em altas concentrações no pulmão e na pele, sendo identificada em grandes quantidades em mastócitos e em basófilos. Os resultados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que a histamina está envolvida na resposta edematogênica, mas não na nocicepção espontânea induzida pela tripsina. Porém, estas respostas parecem envolver a ativação de mastócitos, uma vez que a estabilização ou a degranulação dos mastócitos reduziu pelo menos em parte, a nocicepção e o edema à tripsina. Desta forma, é possível sugerir que outros mediadores, oriundos da degranulação de mastócitos, além da histamina, poderiam estar envolvidos nas respostas nociceptivas causadas pela tripsina. Dentre as proteases liberadas pelos mastócitos a triptase é a mais abundante (Caughey, 1995). Esta é uma serino-protease como a tripsina, e é considerada uma ativadora endógena do receptor PAR-2 (Corvera *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2001). De acordo com estudos prévios, quando o receptor PAR-2 é ativado pela triptase ocorre a hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana seguido de aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺ (Molino *et al.*, 1997), o que poderia resultar em respostas nociceptivas. Estudos recentes demonstram que a injeção i.pl. de triptase em ratos produz hiperalgesia térmica duradoura, semelhante àquela produzida pela tripsina (Vergnolle *et al.*, 2001). Neste contexto, pode-se sugerir que a

triptase liberada no sítio inflamatório pela degranulação dos mastócitos teria papel relevante nas respostas nociceptivas, inclusive na nocicepção espontânea induzida pela tripsina, já que esta protease é capaz de clivar e ativar o receptor PAR-2. Contudo, experimentos futuros ainda são necessários para elucidar o papel da triptase na nocicepção espontânea e no edema induzidos pela tripsina.

Dados subseqüentes do presente estudo indicam o envolvimento das enzimas COX-1 e COX-2 no edema de pata, mas não na nocicepção espontânea induzida pela tripsina. Muitos estudos têm demonstrado que a ativação dos receptores PARs nos tecidos periféricos causa liberação de mediadores intracelulares associados à ativação das enzimas COXs (Macfarlane *et al.*, 2001; Svensson e Yarsh, 2002; Koetzer *et al.*, 2004), as quais por sua vez induzem a produção de prostanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (Neufeld e Majerus, 1983). As prostaglandinas são consideradas importantes mediadores inflamatórios e nociceptivos, sintetizados por uma variedade de células em resposta a estímulos inflamatórios (Bos *et al.*, 2004; Hata e Breyer, 2004). Atuam como hormônios locais em um grande número de processos fisiológicos e patológicos, incluindo dor, edema, febre e vários aspectos da inflamação (Ito *et al.*, 2001). Enquanto muitos mediadores químicos e neurotransmissores são estocados em vesículas, o ácido araquidônico, precursor das PGs, está localizado na membrana celular. Frente a um estímulo inflamatório, o ácido araquidônico é clivado pela fosfolipase A₂ (PLA₂) e, uma vez liberado, pode sofrer a ação de duas isoformas da enzima ciclooxigenase, chamadas COX-1 e COX-2 (Ito *et al.*, 2001). A COX-1 está geralmente presente constitutivamente na maioria dos tecidos do organismo,

incluindo estômago, rins e plaquetas, sendo considerada a enzima responsável por produzir os prostanóides necessários para a manutenção da homeostase do organismo (O'Neill e Ford-Hutchinson, 1993). Já a COX-2 é induzida em uma grande variedade de células, principalmente por mediadores inflamatórios, como citocinas, PGs, hormônios, entre outros (O'Neill e Ford-Hutchinson, 1993; Dubois *et al.*, 1998). A grande produção de PGs em tecidos inflamados é acompanhada pelo aumento da expressão do gene da COX-2, o que prolonga e induz a produção de mais PGs (Fermor *et al.*, 2002). Em estudo recente, Koetzer e colaboradores (2004) demonstraram que a injeção intratecal de agonistas dos receptores PAR-1 e PAR-2 causa liberação de PGE₂ na medula espinhal de ratos, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica. Ao contrário, os resultados do presente estudo demonstram que a nocicepção espontânea induzida pela tripsina não parece depender da ativação da enzima COX, pois o tratamento com a indometacina não foi capaz de alterar a resposta nociceptiva. Por outro lado, o tratamento com a indometacina reduziu de maneira significativa a resposta edematogênica induzida pela tripsina. Esta última resposta parece estar relacionada à ativação da enzima COX-2, pois uma redução similar àquela causada pela indometacina foi observada após a administração do inibidor seletivo da COX-2, o celecoxib. De fato, foi demonstrado recentemente que a trombina e a tripsina induzem a expressão da enzima COX-2 e de seu RNAm em células endoteliais e pulmonares humanas, sem no entanto interferir com a expressão da COX-1 (Chambers *et al.*, 2003; Syeda *et al.*, 2006), sendo esta resposta bloqueada pelo tratamento com a indometacina ou com o inibidor seletivo da COX-2 (Syeda *et al.*, 2006).

As evidências sobre o envolvimento das PGs no edema de pata induzido pela tripsina, obtidas pelo pré-tratamento com antiinflamatórios não estereoidais (AINES), foram confirmadas pelos resultados obtidos com o glicocorticóide dexametasona, um antiinflamatório estereoidal. O tratamento com a dexametasona foi capaz de inibir significativamente o edema de pata, mas não a nocicepção espontânea induzida pela tripsina. A dexametasona tem os principais efeitos associados com a capacidade de influenciar a expressão gênica em todos os níveis de regulação conhecidos. Devido ao caráter lipofílico, os glicocorticóides se difundem através da membrana plasmática e se ligam a receptores celulares específicos (GR) localizados no plasma. Quando os receptores se ligam aos agonistas, sofrem alterações conformacionais que resultam na exposição do sinal de localização nuclear do receptor. Após a ativação, o GR é translocado para o núcleo, onde ocorrem interações proteína-proteína ou a interação direta com seqüências específicas do DNA, chamadas de elementos responsivos a glicocorticóides. Estes processos podem resultar tanto na estimulação, quanto na inibição da transcrição de uma série de genes, particularmente daqueles envolvidos no processo inflamatório (Witchel e DeFranco, 2006; Schacke *et al.*, 2006). Desta forma, o efeito da dexametasona no edema de pata, induzido pela tripsina, pode estar relacionado com a redução da síntese da enzima COX-2 ou de outros mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias. Pode-se sugerir ainda, que a ausência do efeito da dexametasona no modelo de nocicepção espontânea ocorreu devido à curta duração desta resposta, pois em um prazo de 10 min não haveria tempo para a síntese de novos receptores ou mediadores.

A identificação de PARs funcionais, em neurônios aferentes sensoriais, sugere fortemente que a ativação dos receptores PAR-1 e PAR-2 nestes neurônios pode contribuir para a transmissão nociceptiva central. A participação do receptor PAR-2 na transmissão de sinais nociceptivos e na indução da hiperalgesia foi estudada recentemente (Vergnolle, 2000; Coelho *et al.*, 2002; Vergnolle, 2005). Outras evidências experimentais indicaram que a injeção intraplantar de doses sub-inflamatórias dos agonistas do receptor PAR-2 em ratos e camundongos resultou em uma hiperalgesia térmica e mecânica de longa duração (Vergnolle, 2000, 2005). A ativação das vias nociceptivas pelos agonistas do receptor PAR-2 foi confirmada através do aumento da expressão da proteína c-fos, um marcador da atividade neuronal, nas lâminas superficiais da medula espinhal (Hunt *et al.*, 1987; Vergnolle *et al.*, 1999a). No entanto, ainda não se sabe ao certo quais seriam os mecanismos de ativação destas vias pelo receptor PAR-2. Estudos sugerem que este receptor estaria expresso nos neurônios aferentes primários e, que sua ativação induziria um potencial de ação, com conseqüente liberação de neurotransmissores dentro da medula espinhal. Além disso, os agonistas do receptor PAR-2 poderiam atuar sobre outras células, além dos neurônios, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios (como PGs, cininas, serotonina, dentre outros), levando à ativação e sensibilização dos nociceptores.

A ativação das fibras sensoriais do tipo C induz a liberação de neurocininas nos tecidos periféricos e na medula espinhal (Holzer, 1998; de Garavilla *et al.*, 2001; Obreja *et al.*, 2006). O efeito das neurocininas resulta de ações diretas e indiretas através da produção de mediadores inflamatórios, como a histamina, óxido nítrico e cininas (Hughes *et al.*, 1990; Hall e Morton,

1997; Holzer, 1998), que ao atuarem sobre diferentes células na periferia, como mastócitos, células imunes e endoteliais vasculares, produzem os sinais clássicos da inflamação, um processo conhecido como “inflamação neurogênica” (Holzer, 1998; de Garavilla *et al.*, 2001; Obreja *et al.*, 2006). Na inflamação neurogênica, as neurocininas exercem seus efeitos juntamente com outros mediadores inflamatórios como o CGRP e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Lembeck e Holzer, 1979; Brain *et al.*, 1985; Maggi, 1997; Holzer, 1998). Steinhoff *et al.* (2000) demonstraram que o receptor PAR-2 está presente em mais de 60 % dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, sendo localizado em neurônios aferentes primários juntamente com a SP e CGRP. Desta forma, a tripsina, a triptase e agonistas seletivos do receptor PAR-2 poderiam atuar diretamente sobre estes neurônios estimulando a liberação de CGRP e SP das fibras C e da medula espinhal (Steinhoff *et al.*, 2000; Obreja *et al.*, 2006; Patwardhan *et al.*, 2006). Foi demonstrado ainda que a tripsina e a triptase causam aumento significativo dos níveis de cálcio intracelular em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Este aumento nos níveis de cálcio é dependente da atividade proteolítica da tripsina, pois quando a cultura foi pré-incubada com um inibidor desta protease, o SBTI, não houve alteração dos níveis de cálcio em resposta à administração dos agonistas do receptor PAR-2 (Steinhoff *et al.*, 2000). Os mesmos autores demonstraram, ainda, que a pré-incubação de neurônios com agonistas seletivos do receptor PAR-2 aboliu as respostas subseqüentes à tripsina, à triptase ou ao agonista peptídico do PAR-2. Estes dados sugerem que essas proteases provavelmente ativam os neurônios por clivarem o receptor PAR-2, ao invés de se ligarem a outros receptores.

Os resultados do presente estudo sugerem também que a tripsina produz respostas inflamatórias e nociceptivas através de mecanismos neurogênicos. Estes efeitos da tripsina parecem ser mediados, pelo menos em parte, pela liberação de neurocininas (SP, neurocinina A e neurocinina B) e do CGRP a partir dos terminais periféricos dos neurônios sensoriais. Estas conclusões são baseadas nos resultados que mostram que tanto o edema de pata quanto a nocicepção espontânea causados pela tripsina foram inibidos pelos antagonistas seletivos dos receptores das neurocininas (SP, neurocinina A e neurocinina B) e do CGRP. Tais resultados estão de acordo com os dados obtidos por Steinhoff *et al.* (2000), os quais demonstram que as respostas edematogênicas induzidas pelos agonistas do receptor PAR-2 são bloqueadas pelo pré-tratamento com antagonistas dos receptores para CGRP, SP e pela deleção das fibras sensoriais do tipo C. Muitos agentes inflamatórios estimulam os terminais dos neurônios aferentes primários causando a liberação de CGRP e SP (Brain e Williams, 1988; Newbold e Brain, 1993; Holzer, 1998). Assim, o CGRP e a SP atuam sinergisticamente para induzir o edema e a nocicepção (Brain e Williams, 1988; Newbold e Brain, 1993; Holzer, 1998). O CGRP se liga ao receptor CGRP_1 e causa vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo para o sítio inflamado, com conseqüente formação de edema (Brain *et al.*, 1985; Hugles e Brain, 1991). Este neuropeptídeo também potencializa a liberação de SP dos neurônios aferentes primários (Oku *et al.*, 1987) e inibe a degradação da SP por endopeptidases neurais (Le Greves *et al.*, 1985), aumentando ainda mais os seus efeitos biológicos (Biella *et al.*, 1991). Já a substância P induz extravasamento plasmático, além de estimular a adesão e infiltração de

leucócitos, provavelmente através de ligação ao receptor NK₁ nas células endoteliais (Baluk *et al.*, 1995).

Além da SP e do CGRP, que causam inflamação neurogênica por atuarem sobre células endoteliais, mastócitos e células imunes (Maggi, 1995), outras situações como a exposição à capsaicina, prótons, temperaturas elevadas, bradicinina, triptase, dentre outras, podem ativar os neurônios sensoriais e desencadear ações inflamatórias e nociceptivas (Richardson e Vasko, 2002). Um importante modulador envolvido nas respostas inflamatórias e nociceptivas é o receptor de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1) (Caterina *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2005). O TRPV1 é um canal catiônico não-seletivo expresso predominantemente em fibras sensoriais do tipo C e A δ (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998; Prescott e Julius, 2003). Este receptor é ativado pela capsaicina, temperaturas elevadas (> 43 °C), pH ácido (< 6,5), pela anandamida e por alguns mediadores lipídicos (Bevan e Geppetti, 1994; Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002), além de ser susceptível à sensibilização por outros mediadores pró-inflamatórios, incluindo PGs, bradicinina, ATP, neurotrofinas e outros agentes (Ferreira *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004). O mecanismo de sensibilização do TRPV1 por diferentes mediadores envolve a ativação da PKC e PKA, as quais, ao fosforilar o receptor, modificam a abertura do canal (Lopshire e Nicol, 1998; Premkumar e Ahern, 2000; Bhave *et al.*, 2002; Mohapatra e Nau, 2003).

A ativação do TRPV1 induz a liberação dos neuropeptídeos SP e CGRP dos neurônios sensoriais em inúmeros tecidos periféricos e na medula espinhal, contribuindo para a instalação da inflamação neurogênica e

surgimento da hiperalgesia (Kessler *et al.*, 1999), sendo estas ações dependentes da entrada de cálcio na célula. Como o receptor PAR-2 é um receptor acoplado à proteína G, sua ativação não é capaz de induzir o aumento de cálcio intracelular de forma suficientemente rápida para gerar potenciais de ação nos neurônios aferentes (Seeliger *et al.*, 2003). Devido a isto, tem sido sugerido que o receptor PAR-2 pode interagir com outras moléculas, tais como canais iônicos, para produzir a despolarização dos neurônios e transmitir o potencial de ação. Estudos recentes demonstraram que o TRPV1 e o receptor PAR-2 estão co-localizados em neurônios sensoriais primários e, que os agonistas do receptor PAR-2 ativam estes neurônios por uma via dependente de PLC e PKC. Sabe-se que a PKC pode fosforilar os canais TRP, tais como o TRPV1 (Cesare *et al.*, 1999; Amadesi *et al.*, 2004), sensibilizando-os e diminuindo seu limiar de ativação. Desta forma, a ativação da PKC pelo receptor PAR-2 resulta na sensibilização do TRPV1 com conseqüente desenvolvimento de hiperalgesia térmica ou mecânica persistentes (Amadesi *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Amadesi *et al.*, 2006; Patwardhan *et al.*, 2006). Estas respostas podem ser bloqueadas por antagonistas seletivos do receptor TRPV1, pela deleção gênica deste receptor ou pela inibição da ativação da PKC (Amadesi *et al.*, 2004). Sabe-se ainda, que o receptor PAR-2 pode-se acoplar à proteína G_q, resultando na ativação da PLC β e formação de IP₃ e DAG (Ossovskaya e Bunnett, 2004), os quais aumentam os níveis intracelulares de cálcio e, conseqüentemente, ativam a PKC. Outros estudos demonstram que o receptor PAR-2 aumenta os níveis intracelulares de AMP cíclico, sugerindo a ativação da cascata da PKA (Scott *et al.*, 2003). Da mesma maneira, Amadesi *et al.* (2006) demonstraram que a

ativação do receptor PAR-2, pela tripsina ou por seu agonista sintético, causa sensibilização do TRPV1 por um mecanismo dependente de PKC e PKA. Os resultados do presente trabalho sugerem que o receptor TRPV1 está amplamente envolvido nas respostas edematogênica e nociceptiva induzidas pela tripsina, uma vez que o tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor TRPV1, SB363791, foi capaz de inibir de forma expressiva o edema e a nocicepção espontânea induzidas pela tripsina na pata de camundongos. Neste caso em particular, a tripsina poderia estar ativando diretamente (via receptor PAR-2) ou indiretamente as fibras nociceptivas sensoriais, devido a liberação de outros mediadores inflamatórios, como cininas, PGs, entre outros ou, ainda, sensibilizando o TRPV1 pela ativação da via da PKC e PKA. A ativação do receptor TRPV1 pode ocorrer também pela acidez do sítio inflamatório devido a liberação de prótons, por meio da BK, ou até mesmo por outras substâncias presentes no local da lesão, como exemplo a anandamida.

Uma das moléculas produzidas em grandes quantidades em sítios inflamatórios, juntamente com outros mediadores, é o óxido nítrico (NO). O NO é uma importante molécula sinalizadora inter- e intracelular, envolvida na regulação de várias funções celulares em situações fisiológicas e patológicas. Nos tecidos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS). Existem três isoformas distintas de NOS: as isoformas constitutivas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e a NOS induzida (iNOS) (Nathan e Xie, 1994; Alderton *et al.*, 2001). As isoformas constitutivas da NOS são responsáveis pela produção de pequenas quantidades de NO, relacionadas aos eventos fisiológicos como

neurotransmissão, regulação do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária e da adesão celular, além do efeito antioxidante (Guzik *et al.*, 2003). Por outro lado, a iNOS tem a expressão modulada por mediadores inflamatórios e citocinas produzidas por estímulos inflamatórios. Uma vez expressa, a iNOS libera NO de maneira contínua e em grandes quantidades (Guzik *et al.*, 2003; Gow *et al.*, 2004).

Kawabata e colaboradores (2002) demonstraram que a nocicepção espontânea induzida pelo agonista sintético do receptor PAR-2 em camundongos não está relacionada com a produção de NO. Da mesma maneira, Vergnolle *et al.* (1999a) demonstraram que o tratamento dos animais com o inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) não foi capaz de diminuir o edema de pata induzido pelo agonista peptídico do receptor PAR-2. Confirmando os dados da literatura, os resultados do presente estudo indicam que o pré-tratamento dos animais com o inibidor não-seletivo da NOS, L-NOARG, não foi capaz de interferir nas respostas nociceptivas ou inflamatórias induzidas pela tripsina. Estendendo estes resultados, a resposta edematogênica induzida pela tripsina não foi modificada em animais com deleção gênica para a iNOS. A partir destes dados, é possível sugerir que o NO não parece estar envolvido nas respostas induzidas pela tripsina ou pela ativação do receptor PAR-2.

O recrutamento de leucócitos do sangue para o compartimento extravascular é uma característica central do processo inflamatório. A migração de leucócitos a partir da circulação sanguínea é um processo composto por uma série de etapas, orquestradas pela ativação seqüencial de moléculas de adesão e seus ligantes nos leucócitos e células endoteliais (Tonnesen, 1989;

Lawrence e Springer, 1991). O rolamento e a adesão dos leucócitos ocorrem em resposta à ação de diferentes mediadores (histamina, leucotrieno C₄, PAF, citocinas, quimiocinas) liberados por diferentes células, tais como mastócitos e células endoteliais (Kubes *et al.*, 1991; Zimmerman *et al.*, 1992; Kubes e Kanwar, 1994). Os neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas da circulação para o tecido inflamado, com o papel de eliminar partículas estranhas, tais como bactérias (Delves e Roitt, 2000). Howells e colaboradores (1997) demonstraram que o receptor PAR-2 está expresso no endotélio vascular e na membrana de leucócitos, especialmente em neutrófilos. Logo, isto permite sugerir que as respostas inflamatórias induzidas pela ativação do receptor PAR-2 ocorrem principalmente em decorrência das alterações vasculares e da infiltração de granulócitos (Vergnolle *et al.*, 2001). Da mesma forma, recentemente Lim *et al.* (2006) demonstraram que a tripsina pode aumentar a adesão de linfócitos na superfície luminal da aorta de camundongos, quando aplicada exogenamente ou administrada por via endovenosa, 24 h antes. O fato de estes efeitos estarem ausentes em animais com deleção gênica para o PAR-2, sugere que a ativação deste receptor possui ações pró-inflamatórias relacionadas ao recrutamento de leucócitos. Estes dados foram confirmados por estudos *in vivo* indicando que a ativação do receptor PAR-2 induz um aumento significativo do rolamento, da adesão e do extravasamento de leucócitos em ratos (Vergnolle, 1999; Tae *et al.*, 2003), sendo a ativação do PAR-2 crucial para o recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório.

No presente estudo foi observado que o tratamento local com tripsina produziu migração marcante e tempo-dependente de neutrófilos para a pata de

camundongos, como verificado pelo ensaio da MPO. A enzima MPO, presente principalmente no interior dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, catalisa a reação entre peróxido de hidrogênio e cloreto, formando ácido hipocloroso, um importante componente da resposta de defesa contra infecções bacterianas. Desta forma, o aumento da atividade da enzima é um indicativo indireto da migração de neutrófilos para o local da inflamação (Bradley *et al.*, 1982; Winterbourn *et al.*, 2000; Faurschou e Borregaard, 2003). O influxo de neutrófilos, observado no presente estudo após a administração da tripsina, alcançou nível máximo em 3 h, mantendo-se significativo até 6 h e diminuindo após este período. Estes resultados sugerem que a tripsina, assim como demonstrado para os agonistas sintéticos do receptor PAR-2, é capaz de induzir a migração de neutrófilos quando injetada na pata de camundongos. Além disso, o recrutamento de neutrófilos foi completamente inibido em animais com deleção gênica para o PAR-2, indicando que a ativação do PAR-2 seria responsável pelo efeito da tripsina sobre a migração de neutrófilos.

Como já descrito, um dano tecidual leva ao desenvolvimento de respostas inflamatórias devido à produção de inúmeros mediadores inflamatórios e nociceptivos, tais como a BK, SP, PGs e citocinas (Calixto *et al.*, 2000; Safieh-Garabedian *et al.*, 2002). As citocinas são pequenas proteínas reguladoras, produzidas por uma variedade de células, incluindo as do sistema nervoso, em resposta a uma série de estímulos, constituindo um elo entre o dano celular e o desenvolvimento dos sinais sistêmicos ou locais da inflamação (Blackwell e Christman, 1996; Dinarello, 2000; Hopkins, 2003; Cunha e Ferreira, 2003; Conti *et al.*, 2004). A ativação das citocinas ou a produção exagerada está relacionada com uma variedade de patologias, tais como sepse, artrite

reumatóide, doença de Crohn, esclerose múltipla, além de estar envolvida com o aparecimento da dor e hiperalgesia (Sommer e Kress, 2004, Cunha *et al.*, 2005). Dentre as citocinas, o TNF α possui papel fundamental no processo inflamatório e nociceptivo, pois é capaz de estimular a sua própria produção e a liberação de inúmeras outras citocinas tais como IL-6, IL-8 e IL-1 β (Cunha *et al.*, 1992; Watkins *et al.*, 1995; Junger e Sorkin, 2000). A citocina pró-inflamatória IL-1 β é produzida e secretada sob condições patológicas por múltiplos tipos celulares, tais como fibroblastos, linfócitos e células endoteliais (Poole *et al.*, 1999). Suas ações pró-nociceptivas são mediadas pela produção de uma cascata de sinalização, envolvendo a produção de NO, BK e PGs (Poole *et al.*, 1999).

Muitos estudos demonstram uma relação entre os receptores PAR-2 e as citocinas pró-inflamatórias. A ativação do receptor PAR-2 por seus agonistas causa a liberação de prostanóides e citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α (Lourbakos *et al.*, 2001; Cenac *et al.*, 2002; Uehara *et al.*, 2003), as quais por sua vez são capazes de aumentar a expressão do receptor PAR-2 (Nystedt *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 2006). Os dados do presente estudo confirmam e estendem estas evidências, demonstrando que a injeção local de tripsina foi capaz de aumentar significativamente os níveis de TNF α e IL-1 β , na pata de camundongos. Curiosamente, a produção de TNF α foi máxima 6 h após a injeção de tripsina, enquanto os resultados do presente trabalho demonstram que o edema de pata e a nocicepção espontânea causados pela tripsina foram significativamente reduzidos em animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . Pode-se sugerir que o TNF α é liberado inicialmente pela degranulação dos mastócitos ou a partir de outras células, onde o encontra-se

pré-estocado, e ao decorrer do processo inflamatório é produzido por outros tipos celulares, por isso seus níveis mantêm-se elevados até 6 h após a injeção de tripsina. Por outro lado, os níveis máximos de IL-1 β foram verificados 3 h após a injeção de tripsina. Este dado coincide com o pico de migração de neutrófilos na pata dos camundongos, o que pode sugerir que a produção de IL-1 β estaria diretamente relacionada à migração de neutrófilos.

Os PARs foram primeiramente relacionados aos mecanismos de ativação da cascata da coagulação e das plaquetas, com importantes funções no reparo de lesões. No entanto, recentemente, um grande interesse tem sido dado a este novo grupo de receptores no desenvolvimento e manutenção dos processos inflamatórios e nociceptivos (Dery *et al.*, 1998; Vergnolle *et al.*, 2001; Coughlin *et al.*, 2003). O papel do receptor PAR-2 nas respostas nociceptivas e inflamatórias tem chamado maior atenção após a descoberta de sua expressão em células inflamatórias e em neurônios sensoriais (Steinhoff *et al.*, 2000). Além do mais, o envolvimento do receptor PAR-2 em diferentes patologias, como artrite reumatóide, doença de Crohn, pancreatite, dentre outras, sugere que este receptor pode ser um importante mediador inflamatório e nociceptivo e com isso um possível alvo para a intervenção terapêutica. O presente trabalho procurou avaliar a seqüência de eventos que originam as respostas inflamatórias e nociceptivas induzidas pela injeção intraplantar de tripsina em camundongos. Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que as respostas edematogênica e nociceptiva induzidas pela tripsina na pata de camundongos parecem constituir eventos multimediados, envolvendo a ativação de diferentes receptores e de distintas vias de sinalização intracelular. Desta forma, é possível sugerir que diferentes mediadores agem em conjunto

para gerar as respostas induzidas pela tripsina. Embora os mecanismos exatos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina ainda não sejam totalmente compreendidos, é possível inferir que antagonistas seletivos para o receptor PAR-2 poderiam representar uma opção terapêutica para o tratamento de diversas alterações inflamatórias e nociceptivas. Levando em consideração que o receptor PAR-2 está envolvido tanto em processos patológicos quanto fisiológicos, dependendo do tipo celular em que está expresso, há a necessidade de elucidar os mecanismos envolvidos nestas ações para que os antagonistas do receptor PAR-2 causem o mínimo possível de efeitos colaterais e possam ser utilizados para o tratamento de diferentes patologias que envolvam algum componente inflamatório.

6. Mecanismo proposto para o edema de pata (a) e nocicepção espontânea (b) induzidos pela tripsina na pata de camundongos

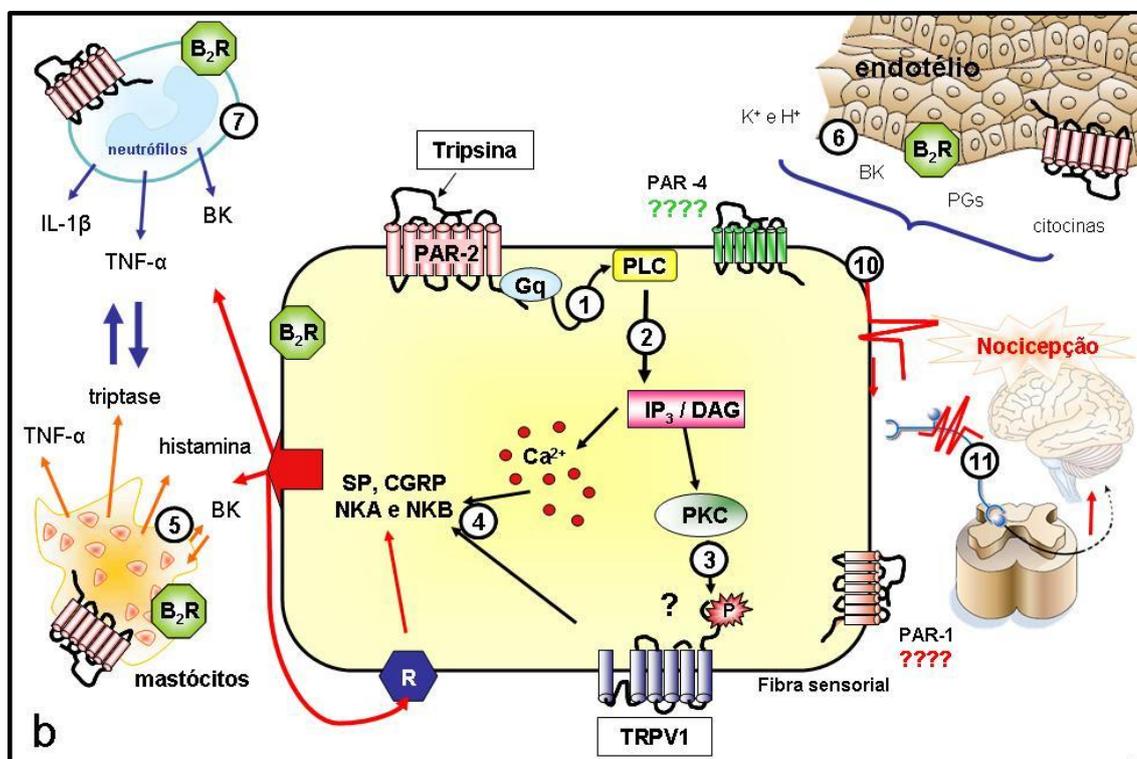
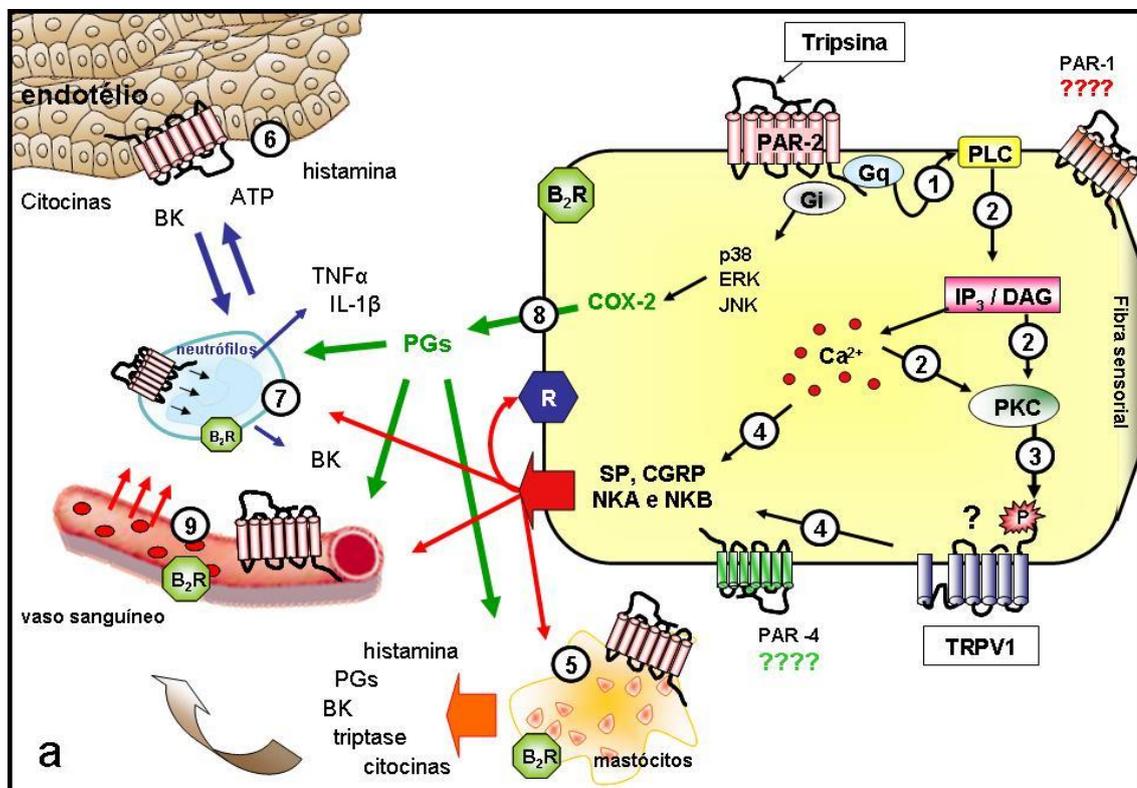


Figura 28. Mecanismos envolvidos no edema de pata (a) e nociceção espontânea (b) induzidos pela tripsina em camundongos. Como discutido, os resultados do presente estudo fornecem evidências *in vivo* indicando que o edema de pata e a nociceção espontânea induzidos pela tripsina são processos multimediados e, ao menos em parte, dependentes da ativação do receptor PAR-2. (1) A tripsina ao ativar o receptor PAR-2 poderia estimular a enzima PLC. (2) A formação de DAG e o aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} induzido pelo IP_3 são capazes de ativar a PKC. (3) A PKC ativada pode induzir a fosforilação de alvos chaves, entre eles o TRPV1. (4) O TRPV1 e o aumento nos níveis de Ca^{2+} são importantes moduladores da liberação de neuropeptídeos dos terminais sensoriais. (5) Os neuropeptídeos, ao se ligarem aos seus receptores (NK_1 , NK_2 , NK_3 e $CGRP_R$) e, a tripsina, ao clivar o receptor PAR-2 sobre a superfície de mastócitos promovem a degranulação destas células, com liberação de inúmeros mediadores, dentre eles a bradicinina (BK) e citocinas ($TNF\alpha$ e $IL-\beta$). (6) Os neuropeptídeos, a tripsina e a BK atuando sobre o endotélio adjacente induzem a liberação de outros mediadores inflamatórios. (7) Estes contribuem para o recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão, com subsequente liberação de mais mediadores. (8) Ao atuar sobre outros tipos celulares, estes mediadores podem induzir a expressão de proteínas e receptores envolvidos na inflamação, como a enzima COX-2 que irá produzir as prostaglandinas (PGs). (9) Em conjunto, esta gama de mediadores liberados agindo sobre seus respectivos receptores expressos na superfície dos vasos sanguíneos promove vasodilatação e extravasamento vascular, com conseqüente formação do edema. (10) Da mesma forma, estes mediadores ativam seus respectivos receptores presentes na superfície das fibras aferentes sensoriais promovendo a sensibilização do neurônio, com conseqüente geração de um impulso nervoso. (11) Este impulso nervoso será transmitido pelas fibras periféricas até a medula espinhal onde será levado até o sistema nervoso central para ser codificado como um estímulo nociceptivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Detection of functional receptors for the proteinase-activated receptor-2-activating polypeptides, SLIGRL-NH₂ in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*, 73: 1203-1207, 1995.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615, 2001.
- Alm AK, Gagnemo-Persson R, Sorsa T, Sundelin J. Extraprostatic trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 77-83, 2000.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*, 1000: 40-56, 2004.
- Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci*, 24: 4300-4312, 2004.
- Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Baragas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol*, 575: 555-571, 2006.
- Andersen P H, Bucher A P, Saeed I, Lee P C, Davis J A, Maibach H I. Faecal enzymes: in vivo human skin irritation. *Contact Dermatitis*, 30: 152-158, 1994.
- Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E₂ release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol*, 168: 3577-3585, 2002.
- Babiarz-Magee L, Chen N, Seiberg M, Lin CB. The expression and activation of protease-activated receptor-2 correlate with skin color. *Pigment Cell Res*, 17: 241-251, 2004.

- Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald DM, Nadel JA. NK₁ receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am J Physiol*, 12: L263-L269, 1995.
- Barrett AJ, Rawlings ND. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem*, 382: 727-733, 2001.
- Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JWD, Wilner GD. Receptor-mediated chemotactic response of a macrophage cell line (J774) to thrombin. *Lab Invest*, 49: 702-707, 1983.
- Bascands JL, Schanstra JP, Couture R, Girolami JP. Bradikinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med. Sci. (Paris)*, 19: 1093-1100, 2003.
- Berger P, Tunon-de-Lara JM, Savineau JP, Marthan R. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2 mediated Ca²⁺ signalling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, 91: 995-1003, 2001.
- Bevan S, Geppetti P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci*, 17: 509-512. 1994.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW4th. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35: 721-73, 2002.
- Bhoola K, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, Dlamini Z, Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem*, 382: 77-89, 2001.
- Biella G, Panara C, Pecile A, Sotgiu ML. Facilitatory role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on excitation induced by substance P (SP) and noxious stimuli in rat spinal dorsal horn neurons. An iontophoretic study in vivo. *Brain Res*, 559: 352-356, 1991.
- Bizios R, Lai L, Fenton JWD, Malik AB. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol*, 128: 485-490, 1986.
- Bjelland S, Hjelmeland K, Volden G. Degradation of human epidermal keratin by cod trypsin and extracts of fish intestines. *Arch Dermatol Res*, 280: 469-473, 1989.

- Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*, 77: 110-117, 1996.
- Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J*, 15: 1009-1016, 1996.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1187-1205, 2004.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78: 206-209, 1982.
- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*, 86: 855-860, 1985.
- Brain SD, Williams TJ. Neuropharmacology of peptides in skin. *Semin Dermatol*, 7: 278-283, 1988.
- Buckingham KW, Berg RW. Etiologic factors in diaper dermatitis: the role of feces. *Pediatr Dermatol*, 3: 107-112, 1986.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87:1-5, 2000.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol*, 14: 519-526, 2001.
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol*, 143: 803-818, 2004.
- Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther*, 106: 179-208, 2005.

- Campos MM, de Souza, GE, Calixto JB. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br J Pharmacol*, 117: 793-798, 1996.
- Campos MM, de Souza GE, Calixto JB. Modulation of kinin B₁ but not B₂ receptors-mediated rat paw edema by IL-1 β and TNF- α . *Peptides*, 19: 1269-1276, 1998.
- Campos MM, de Souza GE, Ricci ND, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B₁ receptors in rats. *Br J Pharmacol*, 135: 1107-1114, 2002.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, LeVide JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824, 1997.
- Caughey GM. Mast cell chymases and tryptases: phylogeny, family and relations, and biogenesis. In: Mast Cell Proteases in Immunology and Biology, edited by Caughey GH. *New York: Dekker*, pp. 305-329, 1995.
- Caviedes BE, Herranz JL. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. *Rev Neurol*, 35: 1037-1048, 2002.
- Cenac N, Coelho A, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, Macnanghton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, Vergnolle N. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol*, 161: 1903-1915, 2002.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*, 23: 617-624, 1999.
- Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, Thompson J, Johnson PR, Burgess JK. PAR-2 activation, PGE₂, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285: L619-L627, 2003.
- Cirino G, Vergnolle N. Proteinase-activated receptors (PARs): crossroads between innate immunity and coagulation. *Curr Opin Pharmacol*, 6: 1-7, 2006.

- Cocks TM, Fong B, Chow JM, Anderson GP, Frauman AG, Goldie RG, Henry PJ, Carr MJ, Hamilton JR, Moffatt JD. A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature*, 398: 156-160, 1999.
- Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 103-108, 2000.
- Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulm Pharmacol Ther*, 14: 183-191, 2001.
- Coelho AM, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J, Bueno L. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*, 122: 1035-1047, 2002.
- Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. Cytokines and fever. *Front Biosci*, 9: 1433-1449, 2004.
- Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Bohm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor-2. *J Clin Invest*, 100: 1383-1393, 1997.
- Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, Bunnett N. Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochem Soc Trans*, 31: 1191-1197, 2003.
- Cottrell G S, Amadesi S, Grady E F, Bunnett N W. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*, 279: 13532-13539, 2004.
- Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 11023-11027, 1999.
- Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*, 407: 258-264, 2000.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 161-176, 2001.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72: 359-371, 2005.

- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor in the development of inflammatory hyperalgesia, *Br J Pharmacol*, 107: 660-664, 1992.
- Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol*, 521: 22-39, 2003.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:1755-1760, 2005.
- Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. Proteinase-activated receptor-2 mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci*, 24: 4293-4299, 2004.
- da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res*, 38: 1241-1453, 2004.
- Damiano BP, D'andrea MR, De Garavilla L, Cheung WM, Andrade-Gordon P. Increase expression of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) in balloon-injured rat carotid artery. *Thromb Haemostasis*, 81: 808-814, 1999a.
- Damiano BP, Cheung MW, Santulli RJ, Fung-Leung WP, Ngo K, Ye RD, Darrow AL, Derian CK, de Garavilla L, Andrade-Gordon P. Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (PAR-2) and thrombin receptor (PAR-1) are distinguished in mice deficient in PAR-2 or PAR-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 288: 671-678, 1999b.
- Daniel TO, Gibbs VC, Milfay DF, Garovoy MR, Williams LT. Thrombin stimulates C-sis gene-expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 261: 9579-9582, 1986.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Atkinson K, Hughe SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1

- is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405: 183-187, 2000.
- de Garavilla L, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, Steinhoff M, Ossovskaya VS, D'Andrea MR, Mayer EA, Wallace JL, Hollenberg MD, Andrade-Gordon P, Bunnett NW. Agonists of protease-activated receptor-1 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol*, 133: 975-987, 2001.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343: 37-49, 2000.
- Dendorfer A, Wolfrum S, Dominiak P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallicrein system. *Jpn J Pharmacol*, 79: 403-426, 1999.
- Dery O, Corvera C, Steinhoff M, Bunnett N. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*, 274: C1429-C1452, 1998.
- Dery O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, Bunnett NW. Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and β -arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. B-arrestin-dependent endocytosis of proteinase receptor. *J Biol Biochem*, 274: 18524-18535, 1999.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118: 503-508, 2000.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*, 5: 125-131, 1995.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 12: 1063-1073, 1998.
- Dunn, BM . Determination of protease mechanism. *Proteolytic Enzymes*. Ed. Oxford: UK. pp 57-81, 1989.
- Ebeling C Forsythe P, Ng J, Gordon JR, Hollenberg M, Vliagoftis H. Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 623-630, 2005.

- Fang M, Kovács KJ, Fisher LL, Larson AA. Thrombin inhibits NMDA-mediated nociceptive activity in the mouse: possible mediation by endothelin. *J Physiol*, 549: 903-917, 2003.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, 5: 1317-1327. 2003
- Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Fink C, Guilak F. Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 792-798, 2002.
- Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, de Souza GE, Fittipaldi JF, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B₁ receptor expression. *Br J Pharmacol*, 146: 209-216, 2005.
- Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B₂ kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol*, 141: 787-794, 2004.
- Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B₁ receptor knock-out mice. *J Neurosci*, 25: 2405-2412, 2005.
- Fiorucci S, Mencarelli A, Plazzatti B, Distratti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, Cirino G. Proteinase-activated receptor-2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13936-13941, 2001.
- Fox MT, Harriott P, Walker B, Stone SR. Identification of potential activators of proteinase-activated receptor-2. *FEBS Lett*, 17: 417:267-269, 1997.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 6: 135-142, 2005.
- Girard P, Pansart Y, Coppe MC, Verniers D, Gillardin JM. Role of the histamine system in nefopam-induced antinociception in mice. *Eur J Pharmacol*, 503: 63-69, 2004.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie

- P, Finance O, Le Fur G. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 309: 661-669, 2004.
- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Physiol*, 287: L262-L268, 2004.
- Gu Q, Lee LY. Hypersensitivity of pulmonary chemosensitive neurons induced by activation of protease-activated receptor-2 in rats. *J Physiol*, 574: 867-876, 2006.
- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54: 469-487, 2003.
- Hall JM, Morton IKM. The Pharmacology and Immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG (eds) *The kinin system*. New York: Academic Press. pp 9-43, 1997.
- Handy RL, Moore PK. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology*, 37: 37-43, 1998.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*, 103: 147-166, 2004.
- Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 1380-1385, 2005.
- Hollenberg MD. Protease-mediated signalling: new paradigms for cell regulation and drug development. *Trends Pharmacol Sci*, 17: 3-6, 1996.
- Hollenberg MD, Saifeddine M, al-Ani B, Kawabata A. Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and

- receptor selectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol*, 75: 832-841, 1997.
- Hollenberg MD, Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 54: 203-217, 2002.
- Hollenberg MD. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): proteinases as hormone-like signal messengers: PARs and more. *J Pharmacol Sci*, 97: 8-13, 2005.
- Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24: 739-768, 1988.
- Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*, 30: 5-11, 1998.
- Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, Sun D, Micci MA, Lee-Hellmich H, Xiao SY, Winston JH, Pasricha PJ. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci*, 21: 9036-9042, 2001.
- Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)*, 5: S45-57, 2003.
- Howells GL, Macey MG, Chinni C, Hou L, Foox MT, Harriot P et al. Proteinase-activated receptor-2: Expression by human neutrophils. *J Cell Sci*, 110: 881-887, 1997.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8400-8405, 2002.
- Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol*, 191: 481-484, 1990.
- Hughes SR, Brain SD. A calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist (CGRP8-37) inhibits microvascular responses induced by CGRP and capsaicin in skin. *Br J Pharmacol*, 104: 738-742, 1991.

- Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328: 632-634, 1987.
- Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chintala M, Zhang R, Chatterjee M, Sybertz E. Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 78: 581-588, 1996.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6155-6160, 2000.
- Inoue H, Nagata N, Koshihara Y. Effect of the tachykinin receptor antagonists, SR140333, FK888, and SR142801, on capsaicin-induced mouse ear oedema. *Inflamm Res*, 45: 303-307, 1996.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 3: 502-506, 1997.
- Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res*, 41: 299-332, 2001.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.
- Junger H, Sorkin LS. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF alpha. *Pain*, 85: 145-151, 2000.
- Kanke T, Macfarlane S, Seatter M, Plevin R. Regulation of c-Jun-N-terminal kinase and p38 MAP kinase by proteinase activated receptor-2 in human skin epithelial cell line NCT2544. *Br J Pharmacol*, 129: 23P, 2000.
- Kawabata A, Kuroda R, Minami T, Kataoka K, Taneda M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br J Pharmacol*, 125: 419-422, 1998.

- Kawabata A, Kuroda R. Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jpn J Pharmacol*, 82: 171-174, 2000.
- Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, Arizono N, Oda Y, Kakehi K. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest*, 107: 1443-1450, 2001.
- Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Shimada C. The PAR-1 activating peptide attenuates carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Peptides*, 23: 1181-1183, 2002.
- Kawabata A, Kawao N. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. *J Pharmacol Sci*, 97: 20-24, 2005.
- Kessler F, Habelt C, Averbeck B, Reeh PW, Kress M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain*, 83: 289-295, 1999.
- Koetzner L, Gregory JA, Yaksh TL. Intrathecal protease-activated receptor stimulation produces thermal hyperalgesia through spinal cyclooxygenase activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 311: 356-363, 2004.
- Kong W, Mcconalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK, Bunnett NW. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8884-8889, 1997.
- Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 52: 5046-5053, 1992.
- Koshikawa N, Nagashima Y, Miyagi Y, Mizushima H, Yanoma S, Yasumitsu H, Miyazaki K. Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett*. 409: 442-448, 1997.
- Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsuhashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyagi Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Expression of trypsin by epithelial cells

- of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol*, 153: 937-944, 1998.
- Krem MM, Rose T, Di Cera E. Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. *Trends Cardiovasc Méd*, 10:171-176, 2000.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 4651-4655, 1991.
- Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol*, 152: 3570-3577, 1994.
- Lawrence MB, Springer TA. Leukocyte roll on a selectin at physiological flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859, 1991.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53: 597-652, 2001.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57: 27-77, 2005.
- Le Greves P, Nyberg F, Terenius L, Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur J Pharmacol*, 115: 309-311, 1985.
- Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *N-S Arch Pharmacol*, 310: 175-183, 1979.
- Lembeck F, Donnerer J, Tsuchiya M, Nagahisa A. The non-peptide tachykinin antagonist CP-96,345 is a potent inhibitor of neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol*, 105: 527-530, 1992.
- Levy JH. The human inflammatory response. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27: S31-37, 1996.

- Lim SY, Tennant GM, Kennedy S, Wainwright CL, Kane KA. Activation of mouse protease-activated receptor-2 induces lymphocyte adhesion and generation of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*, 149: 591-599, 2006.
- Lindner JR, Kahn MI, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, Foy D, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol*, 165: 6504-6510, 2000.
- Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci*, 18: 6081-6092, 1998.
- Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. Arginine-specific proteinase from *Porphyromonas gingivalis* activates proteinase-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*, 69: 5121- 5130, 2001.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53: 245-282, 2001.
- Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as cotransmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol*, 45: 1-98, 1995.
- Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pep*, 70: 75-90, 1997.
- Matěj R, Mandáková P, Netíková I, Poučková P, Olejár T. Proteinase-activated receptor-2 expression in breast cancer and the role of trypsin on growth and metabolism of breast cancer cell line MDA MB-231. *Physiol Res*, Epub ahead of print, 2006.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*, 77, 1033-1079, 1997.
- Meyer-Hoffert U, Rogalski C, Seifert S, Schmeling G, Wingertzahn J, Proksch E, Wiedow O. Trypsin induces epidermal proliferation and inflammation in murine skin. *Exp Dermatol*, 13: 234-241, 2004.

- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57: 1-164, 1999.
- Minn A, Schubert M, Neiss WF, Muller-Hill B. Enhanced GFAP expression in astrocytes of transgenic mice expressing the human brain-specific trypsinogen IV. *Glia*, 22: 338-347, 1998.
- Moffatt JD, Lever R, Page CP. Effects of inhaled thrombin receptor agonists in mice. *Br J Pharmacol*, 143: 269-275, 2004.
- Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 278: 50080-50090, 2003.
- Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem*, 272: 4043-4049, 1997.
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*, 99: 6-38, 2005.
- Nagase H. Matrix metalloproteinases. A mini-review. *Contrib Nephrol*, 107: 85-93, 1994.
- Nakanishi-Matsui M, Zheig YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR-3 is a cofactor for PAR-4 activation by thrombin. *Nature*, 404: 609-613, 2000.
- Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls. *Cell*, 78: 915-918, 1994.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*, 420: 846-852, 2002.
- Neufeld EJ, Majerus PW. Arachidonate release and phosphatidic acid turnover in stimulated human platelets. *J Biol Chem*, 258: 2461-2467, 1983.
- Newbold P, Brain SD. The modulation of inflammatory oedema by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol*, 108: 705-710, 1993.

- Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo C, Koh DS, Bunnett NW. Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase-activated receptor-2. *J Clin Invest*, 103: 261-269, 1999.
- Nystedt S, Ramakrishnan V, Sundelin J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem*, 271: 14910-14915, 1996.
- Obreja O, Rukwied R, Steinhoff M, Schmelz M. Neurogenic components of trypsin and thrombin-induced inflammation in rat skin, *in vivo*. *Exp Dermatol*, 15: 58-65, 2006.
- Oh SB, Tran PB, Gillard SE, Hurley RW, Hammond DL, Miller RJ. Chemokines and glycoprotein 120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci*, 21: 5027-5035, 2001.
- Okada F. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Rep*, 7: 357-368, 2002.
- Oku R, Satoh M, Fujii N, Otaka A, Yajima H, Takagi H. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res*, 403: 350-354, 1987.
- Okva K, Lang A, Pokk A, Valid M, Nevalainen T. Litter has an effect on the behavioural changes caused by the administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine and ethanol in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28: 1171-1179, 2004.
- O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, 330: 156-160, 1993.
- Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Ver*, 84: 579-621, 2004.
- Parikh SA, Cho SH, Oh CK. Preformed enzymes in mast cell granules and their potential role in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3: 266-272, 2003.
- Patwardhan AM, Diogenes A, Berg KA, Fehrenbacher JC, Clarke WP, Akopian AN, Hargreaves KM. PAR-2 agonists activate trigeminal nociceptors and

- induce functional competence in the delta opioid receptor. *Pain*, 125: 114-124, 2006.
- Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade-Gordon P, Frank RD, Mackman N. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*, 103: 1342-1347, 2003.
- Perkins M, Dray A. Novel pharmacological strategies for analgesia. *Ann Rheum Dis*, 55: 715-722, 1996.
- Pesquero JB, Bader M. Genetically altered animal models in the kallikrein-kinin system. *Biol Chem*, 387: 119-126, 2006.
- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*, 14: 433-439, 1994.
- Pintér E, Thán M, Chu DQ, Fogg C, Brain SD. Interaction between interleukin 1b and endogenous neurokinin 1 receptor agonists in mediating plasma extravasation and neutrophils accumulation in the cutaneous microvasculature of the rat. *Neurosci Lett*, 318: 13-16, 2002.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Frighetto M, Souza GE, Henriques MG, Rae GA. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. *Br J Pharmacol*, 141: 755-763, 2004.
- Poole S, Cunha FC, Ferreira SH. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. In: Watkins LR, Maier SF (eds.). *Cytokines and Pain*. *Birkhäuser: Basel*. pp 59-87, 1999.
- Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408: 985-990, 2000.
- Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300: 1284-1288, 2003.
- Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis*, 186: S152-S156, 2002.
- Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*, 290: 205-218, 1993.

- Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 997-1008, 2004.
- Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, 32: 1-46, 1980.
- Ricciardolo FL, Steinhoff M, Amadesi S, Guerrini R, Tognetto M, Trevisani M, Creminon C, Bertrand C, Bunnett NW, Fabbri LM, Salvadori S, Geppetti P. Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 161: 1672-1680, 2000.
- Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 302: 839-845, 2002.
- Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chemistry*, 280: 19808-19814, 2005.
- Sabri A, Muske G, Zhangué HL, Pak E, Darrow A, Andrade-Gordon P, Steinberg SF. Signalling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res*, 86: 1054-1061, 2000.
- Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacol*, 42: 864-872, 2002.
- Samoszuk M, Corwin MA. Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int J Cancer*, 107: 159-163, 2003.
- Sawada K, Nishibori M, Nakaya N, Wang Z, Saeki K. Purification and characterization of a trypsin-like serine proteinase from rat brain slices that degrades laminin and type IV collagen and stimulates protease-activated receptor-2. *J Neurochem*, 74: 1731-1738, 2000.
- Scarisbrick IA, Towner MD, Isackson PJ. Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J Neurosci*, 17: 8156-8168, 1997.
- Schacke H, Rehwinkel H, Asadullah K, Cato AC. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of

- novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp Dermatol*, 15: 565-573, 2006.
- Scheele G, Bartelt D, Bieger W. Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology*, 80: 461-473, 1981.
- Schmidlin F, Bunnett NW. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharmacol*, 1: 575-582, 2001.
- Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, Gater PR, Geppetti P, Bertrand C, Stevens ME. Protease-activated receptor-2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol*, 169: 5315-5321, 2002.
- Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*, 8: 93-131, 2006.
- Scott G, Leopardi S, Parker L, Babiarz L, Seiberg M, Han R. The proteinase-activated receptor-2 mediates phagocytosis in a Rho-dependent manner in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 121: 529-541, 2003.
- Seegers HC, Avery PS, McWilliams DF, Haywood L, Walsh DA. Combined effect of bradykinin B₂ and neurokinin-1 receptor activation on endothelial cell proliferation in acute synovitis. *FASEB J*, 18: 762-764, 2004.
- Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, Bunnett NW, Nawroth R, Schmelz M, Von Der Weid PY, Buddenkotte J, Sunderkotter C, Metze D, Andrade-Gordon P, Harms E, Vestweber D, Luger TA, Steinhoff M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *FASEB J*, 17: 1871-1885, 2003.
- Sharma JN, Buchanan WW. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol*, 46: 421-433, 1994.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18: 385-405, 2004.
- Shpacovitch VM, Brzoska T, Buddenkotte J, Stroh C, Sommerhoff CP, Ansel C, Schulze-Osthoff K, Bunnett NW, Luger TA, Steinhoff M. Agonists of

- proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappa B in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 118: 380-385, 2002.
- Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Bruck W. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment in to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*, 110: 177-185, 2000.
- Siqueira-Junior JM, Peters RR, Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-Do-Valle RM. Effects of valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor, on models of acute inflammation in mice. *Pharmacol Res*, 48: 437-443, 2003.
- Sommer C. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 16: 623-628, 2004.
- Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia *Neurosc Lett*, 361: 184-187, 2004.
- Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tynnela J, Konttinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkila P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S, Stenman UH Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem*, 272: 21067-21074, 1997.
- Southan C. A genomic perspective on human proteases. *FEBS Lett*, 498: 214-218, 2001.
- Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol*, 8: 282-294, 1999.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*, 6: 151-158, 2000.
- Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M. Proteinase activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci*, 23: 6176-6180, 2003.

- Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev*, 26: 1-43, 2005.
- Stubbs MT, Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res*, 69: 1-58, 1993.
- Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmback K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7597-7602, 1998.
- Svensson CI, Yaksh TL. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 553-583, 2002.
- Syeda F, Grosjean J, Houlston RA, Keogh RJ, Carter TD, Paleolog E, Wheeler-Jones CP. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem*, 281: 11792-11804, 2006.
- Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clin Chim Acta*, 330: 165-171, 2003.
- Takeeda M, Yamato M, Kato S, Takeuchi K. Cyclooxygenase isozymes involved in adaptive junctional responses in rat stomach after barrier disruption. *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 713-719, 2003.
- Tang HB, Inoue A, Oshita K, Nakata Y. Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *Eur J Pharmacol*, 498: 37-43, 2004.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21: 531-543, 1998.

- Tonnesen MG. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophils adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol*, 93: 53S-58S, 1989.
- Torebjork HE, Lundberg LE, LaMotte RH. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol*, 448: 765-780, 1992.
- Trejo J. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 437-442, 2003.
- Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through proteinase-activated receptor 2. *J Immunology*, 170: 5690-5696, 2003.
- Ueno A, Naraba H, Kojima F, Morita E, Oh-Ishi S. FR190997, a novel bradykinin B₂ agonist, expresses longer action than bradykinin in paw edema formation and hypotensive response. *Immunopharmacol*, 45: 89-93, 1999.
- Varga A, Nemeth J, Szabo A, Mcdougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci Lett*, 385: 137-142, 2005.
- Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induced leukocytes rolling, adhesion, and extravasation *in vivo*. *J Immunol*, 163: 5064-5069, 1999.
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol*, 127: 1083-1090, 1999a.
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *Br J Pharmacol*, 126: 1262-1268, 1999b.
- Vergnolle N. Proteinase-activated receptors: novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther*, 14: 257-266, 2000.

- Vergnolle N, Bunnett NW, Sharley KA, Brussee V, Compton S, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum A, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor 2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. *Nat Med*, 7: 821-826, 2001.
- Vergnolle N, Ferazzini M, D'Andrea M R, Buddenkotte J, Steinhoff M. Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci*, 26: 496-500, 2003.
- Vergnolle N, Cellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Bunnett NW, Hollenberg MD, Wallace JL, Cirino G, Fiorucci S. A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest*, 114: 1444-1456, 2004.
- Vergnolle N. Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 173-176, 2005.
- Veronesi B, Sailstad DM, Doerfler DL, Selgrade M. Neuropeptide modulation of chemical induced skin irritation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 135: 258-267, 1995.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 22: 1057-1068, 1991.
- Watkins LR, Goehler LE, Relton J, Brewer MT, Maier SF. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia, *Brain Res*, 692: 244-250, 1995.
- Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*, 82: 981-1011, 2002.
- Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood* Ver, 16; 87-96, 2002.
- Wiegand U, Corbach S, Minn A, Kang J, Muller-Hill B. Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene*, 136: 167-175, 1993.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, 7:53-58, 2000.

- Witchel SF, DeFranco DB. Mechanisms of disease: regulation of glucocorticoid and receptor levels-impact on the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2: 621-631, 2006.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80: 617-653, 2000.
- Woolf CJ. Generation of acute pain: central mechanisms. *Br Med Bull*, 47: 523-533, 1991.
- Xiang Y, Masuko-Hongo K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1b, TNF-a and TGF-b *OsteoArthritis and Cartilage*, 14: 1163-1173, 2006.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9: 6642-6666, 1998.
- Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F. Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. *Inter Immunopharmacol*, 3: 1883-1887, 2003.
- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today*, 13: 93-100, 1992.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animal. *Pain*, 16: 109 -111, 1983.

8. ANEXO

Parte dos resultados da presente dissertação está submetida à publicação em:

PASZCUK, A.F., QUINTÃO, N.L.M., FERNANDES, E.S., JULIANO, L., CHAPMAN, K., ANDRADE-GORDON, P., CAMPOS, M.M., VERGNOLLE, N., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. **Biochem. Pharmacol.**, 2007.