

Lenyta Oliveira Gomes

**COMPORTAMENTO DE COÇAR E NOCICEÇÃO
EVIDENCIADOS APÓS A APLICAÇÃO FACIAL DE
ENDOTELINA-1: UM NOVO TESTE, UMA NOVA
OPORTUNIDADE FARMACOLÓGICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Co-orientadora: Dr^a. Daniela Balz Hara

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

G633c Gomes, Lenyta Oliveira

Comportamento de coçar e nocicepção evidenciados após a aplicação facial de endotelina-1 [dissertação] : um novo teste, uma nova oportunidade farmacológica / Lenyta Oliveira Gomes ; orientador, Giles Alexander Rae, co-orientadora, Daniela Balz Hara. - Florianópolis, SC 2011.

83 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Endotelina-1. 3. Prurido. 4. Nocicepção. I. Rae, Giles Alexander. II. Hara, Daniela Balz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

CDU 615

Dedico esta dissertação aos meus pais, Eudes e Luiz Carlos.
A minha avó Aurora e minha tia Dirce.
Ao meu pai de coração, Geraldo.
As minhas amigas irmãs, Flaviane e Nathália.

AGRADECIMENTOS

✓ A Deus, pela via, por tudo que pude realizar. Por ter guiado os meus passos até a profissão farmacêutica, e assim, eu conheci a farmacologia, a qual deu ainda mais sentido a minha escolha;

“Muito embora cada um de nós seja movido pelo próprio existir, dependemos também da construção de relações com pessoas que ao longo de nossas vidas tornam-se co-autores dos nossos feitos.”

✓ Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, meu orientador, de maneira muito especial, agradeço, principalmente, a oportunidade a mim concedida, quando o mesmo aceitou me orientar. Sou grata pelos dois anos de orientação aos meus trabalhos, exercida de maneira extremamente presente, atenciosa e respeitosa, que contribuiu para meu crescimento intelectual, profissional e pessoal. Além disso, sou grata pelo mesmo ter me presenteado com a brilhante idéia deste trabalho, a qual me possibilitou realizar algo novo e promissor;

✓ À Dra. Daniela Balz Hara, minha co-orientadora, pela forma extremamente presente, dedicada que a mesma me co-orientou. Agradeço a “Dani”, principalmente por ter me ensinado tudo, de uma maneira que poucos têm a oportunidade de aprender, com paciência e com amor. Sou grata a ela por ter abraçado este desafiante trabalho comigo, por ter me dado força, incentivo e ainda me presenteado com sua sincera amizade.

✓ À minha mãe Eudes, pelo amor incondicional, por sua incansável dedicação para com o trabalho, a fim de que pudesse realizar todas as minhas aspirações. Por sua força em agüentar sabiamente toda a saudade causada pela ausência da minha presença e, desta forma, ter me permitido voar. Ainda, principalmente, por acreditar em mim, pois isso fez com que eu também acreditasse;

✓ Ao Orlando, companheiro de minha mãe, pela amizade e incentivo;

- ✓ Ao meu pai Luiz Carlos e sua esposa Neuraci, pelo amor e incentivo;
- ✓ À minha avó Aurora (Mama) e minha tia Dirce, pelo amor, carinho, cuidado, proteção, orações e preocupações;
- ✓ Ao Geraldo, meu pai de coração, por ter me dado maravilhosa oportunidade de ter seu afeto, e admiração. Por todo o incentivo;
- ✓ Às minhas grandes amigas Flaviane e Nathália, pelos longos anos de amizade incondicional, sincera, leal. Por participarem intensamente da minha vida, por torcerem com o coração para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos. Por estarem sempre ao meu lado;
- ✓ À Prof. Dra. Mônica C. Toffoli Kadri, minha professora de farmacologia na graduação (UFMS), por ter me ensinado a farmacologia com amor e paixão, pois isso fez com que eu também me apaixonasse. Por ter me inspirado e me incentivado a adentrar na pós-graduação. Pelo apoio e direcionamento durante o período que antecedeu minha entrada no mestrado. Por todo carinho.
- ✓ À Camila minha amiga e companheira de apartamento, pela amizade, companheirismo e compreensão. Por tornar meus dias, mais fáceis e muito mais felizes;
- ✓ Aos meus grandes amigos, Wesley, Laís, Lívia e Cibelle, pelo imenso carinho, amizade, companheirismo e por me lembrarem sempre de minha real capacidade.
- ✓ Às minhas doces e queridas amigas do departamento, Juliana, Lara e Karla, por compartilharem comigo não só dia a dia na farmacologia, mas fazerem com que cada dia fosse ainda mais alegre. Por todo apoio e incentivo nos momentos de cansaço;
- ✓ Às minhas colegas de laboratório, Giselle, Ana Paula, Alessandra e Samilla, por terem sido receptivas em minha entrada no laboratório. Por toda ajuda, ensinamentos, favores e

principalmente, pela paciência. Pela boa convivência e bons momentos de confraternizações ao longo destes dois anos. Por todo incentivo.

- ✓ À aluna de iniciação científica, Laurien, pela ajuda com os cuidados dos meus camundongos CD1 durante os últimos meses que antecederam minha defesa. Pelo incentivo e carinho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi e seus orientados, Eduardo, Taciane, Vanessa, Carol e Lucas, pelo carinho, receptividade e por me concederem a alegria de confraternizarmos bons momentos. Por serem tão solícitos e me concederem um espaço em seu laboratório, onde realizei alguns de meus experimentos;
- ✓ Ao Prof. Dr. Jamil Assrey e a todos os seus vários orientandos, por serem sempre tão amáveis e me convidarem para dividir alegres momentos de confraternizações.
- ✓ À Profa. Dr. Aurea Elizabeth Linder, por ter gentilmente aceitado me orientar na disciplina de estágio em docência, e desta forma, eu tive a oportunidade de vivenciar por algum tempo, um pouco da rotina trabalhosa, porém extremamente gratificante de ser professor.
- ✓ Ao Prof. Dr. Rui Prediger e a Profa. Dra. Thereza Monteiro de Lima, pela solicitude em me concederem um espaço em seu laboratório, onde realizei alguns de meus experimentos;
- ✓ À Dra. Adriana Abalen Martins dias, pesquisadora da Fundação Antônio Prudente/Hospital C. Camargo (centro de pesquisa), por ter cedido as matrizes dos camundongos CD1;
- ✓ Ao Prof Dr. Michel Otuki, por ter cedido o TMA;
- ✓ Ao Pedro, bioterista, por sua solicitude;
- ✓ À Eliziane, aluna de iniciação científica/Lab Calixto, pela ajuda com as configurações das imagens de histologia para mastócitos;

- ✓ À Kathryn, aluna de doutorado/Lab Calixto, pelos ensinamentos com relação a técnica histológica;
- ✓ Ao Ihor, por toda ajuda com a configuração do esquema 2, que resume as conclusões apontadas neste trabalho.
- ✓ Aos demais professores e funcionário do Departamento de Farmacologia;
- ✓ À CAPES pelo apoio financeiro.

Onde você quer chegar?
Ir alto? Sonhe alto.
Queira o melhor do melhor.
Se pensarmos pequeno,
coisas pequenas teremos.
Mas se desejarmos o melhor
e principalmente lutarmos pelo melhor,
o melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo e
e não do tamanho da minha altura.

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O presente trabalho reproduziu o modelo experimental descrito por Shimada e Lamotte, (2008), e o utilizou para diferenciar e quantificar as respostas de coceira ou nocicepção à ET-1 na face de camundongos. A histamina causou acessos de coceira com efeito máximo em 50 µg, sem causar movimentos de limpeza. A capsaicina causou nocicepção (movimentos de limpeza facial) na dose máxima de 40 µg, porém, não promoveu acessos de coceira. A co-injeção i.d. de histamina (50 µg) juntamente com capsaicina (10 µg) resultou em diminuição ambas as repostas. A injeção i.d. de ET-1 (3 - 60 pmol) induziu tanto coceira, quanto nocicepção, proporcionais à dose administrada. A coceira induzida pela ET-1 (30 pmol) foi inibida pelo antagonista de receptores ET_A BQ-123 (10 nmol, i.d., 5 min antes) e aumentada pelo antagonista de receptores ET_B BQ-788 (10 nmol, i.d., 5 min antes). A injeção de BQ-123 não inibiu a nocicepção, porém, a co-injeção de ambos os antagonistas reduziu a hipernocicepção à ET-1 causada por BQ-788. A co-injeção com naltrexona (5 µg, i.d.) não alterou a coceira, mas aumentou a nocicepção. Porém os antagonistas seletivos µ (CTOP, 20 nmol) e κ (Nor-BNI, 68 nmol) opióides aumentaram os acessos de coceira sem alterarem a nocicepção. Enquanto a coceira causada pela ET-1 foi inibida pelo agonista seletivo µ opióide (DAMGO, 100 nmol), mas não pelo agonista seletivo κ opióide (U50488-H, 100 nmol) a nocicepção foi reduzida por ambas as dorgas. A loratadina (10 mg/Kg, i.p., 60 min antes), antagonista dos receptores H1 para histamina reduziu ambas as respostas à ET-1. A análise histológica revelou aumento no número de mastócitos intactos e degranulados na derme, 15 e 30 min após injeção de ET-1. Assim, ambas as respostas à ET-1, neste modelo, são mediadas por receptores ET_A e por mastócitos, sendo dependentes de histamina. Este efeito parece ser limitado pela ativação de receptores ET_B acoplados a liberação local de opióides.

Palavras Chave: Endotelina-1, prurido, nocicepção e opióides.

ABSTRACT

This study aimed to replicate the experimental model described by Shimada and Lamotte (2008) and use it to differentiate and quantify the itch and nociception responses promoted by ET-1 in the cheek of mice. Histamine elicited scratching bouts, with maximal effect at 50 μg , but did not induce wiping bouts. Capsaicin evoked wiping responses in the maximum dose of (40 μg), but did not cause scratching. Responses induced by i.d. co-injection of histamine (50 μg) with capsaicin (10 μg) were reduced in comparison to those promoted by each drug alone. The i.d. injection of ET-1 (3 - 60 pmol) induced both scratching and wiping response, with maximum response at a dose of 60 pmol. Scratching induced by ET-1 (30 pmol) was inhibited by ET_A receptor antagonist, BQ-123 (10 nmol, i.d, 5 min before) and increased by ET_B receptor antagonist, BQ-788 (10 nmol, i.d, 5 min before). The BQ-123 treatment did not inhibit the wiping, but the co-injection of both antagonists reduced hypernociception to ET-1 induced by BQ 788. Co-injected with ET-1, naltrexone (5 μg , i.d.), did not alter the scratching bouts, but increased wiping. However, the selective antagonist μ opioids (CTOP, 20 nmol) and κ opioid receptor (Nor-BNI, 68 nmol) augmented the scratching bouts without affecting wiping. While the scratching bouts were inhibited only by the selective μ opioid agonist (DAMGO, 100 nmol) but not κ selective agonist (U50488-H, 100 nmol) the wiping was reduced by both opioid agonists. The treatment with loratadine (10 mg/kg, i.p., 60 min before) reduced both ET-1 induced responses. Cheek skin sections obtained 15 and 30 min after ET-1 i.d. injection showed an increased number of intact and degranulated mast cells. Thus, both responses to ET-1 in this model are mediated by ET_A receptors, being mediated by mast cells and histamine-dependent. This effect can be limited by activation of anti-pruritic ET_B receptors coupled to local opioid release.

Keywords: Endothelin-1, pruritus, nociception and opioids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Detalhamento de aspectos importantes do modelo de coceira e nociceção descrito por Shimada e LaMotte (2008) nas condições experimentais do presente estudo_____	13
Figura 2	Efeitos comportamentais da injeção intradérmica de histamina e capsaicina na bochecha de camundongos_	20
Figura 3	Comparação dos efeitos da administração intradérmica isolada ou combinada de histamina e/ou capsaicina na bochecha, sobre o comportamento de coçar e limpar de camundongos_____	21
Figura 4	A injeção intradérmica de ET-1 induz acessos de coceira e movimentos de limpeza em camundongo___	23
Figura 5	Influência do tratamento com antagonistas de receptores ET _A e/ou ET _B sobre os acessos de coceira e movimentos de limpeza induzidos pela ET-1_____	24
Figura 6	Influência do antagonista não seletivo de receptores opióides naltrexona sobre o comportamento de coçar e de limpeza induzidos por ET-1_____	26
Figura 7	Influência dos antagonistas seletivos de receptores opióides μ (CTOP), κ (Nor-BNI) e δ (Naltrindole) sobre os efeitos pruritoceptivo e nociceptivo da ET-1_	27
Figura 8	Influência dos agonistas seletivos para receptores opióides μ (DAMGO) e κ (U50488-H) sobre os efeitos pruritoceptivo e nociceptivo da ET-1_____	29
Figura 9	Influência da loratadina sobre o comportamento de coçar e movimentos de limpeza induzidos pela administração i.d. de ET-1 na bochecha de camundongos_____	30
Figura 10	Efeitos da injeção intradérmica de ET-1 no número de mastócito_____	31
Figura 11	Modificações histológicas após exposições repetidas ao TMA_____	32
Figura 12	Influência do tratamento com antagonistas de receptores ET _A sobre os acessos de coceira e movimentos de limpeza induzidos por TMA_____	33
Figura 13	Influência do tratamento com antagonistas de receptores ET _A sobre os acessos de coceira e movimentos de limpeza induzidos por TMA_____	34

Esquema 1	Protocolo para estudo da participação do sistema endotelinérgico na dermatite por TMA_____	17
Esquema 2	Representação esquemática do possível mecanismo de indução da resposta pruriginosa pela endotelina-1, quando injetada por via intradérmica na bochecha de camundongos_____	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
C 48/80	Composto 48/80
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ECEs	Enzima conversora de endotelinas
ET-1	Endotelina-1
E.P.M.	Erro padrão da média
GRPR	Receptores acoplados a proteína G
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
5-HT	5 – hidroxitriptamina
i.d.	Intradérmico
i.p.	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
IASP	The International Association for Study of Pain
IFSI	International Forum of the Study of Itch
IB ₄	Isolectina B ₄
IgE	Imunoglobulina E
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
NGF	Fator de Crescimento do nervo
NK ₁	Receptor de neurocininas do tipo 1
Nmol	Nanomol
PBS	Solução Salina Tamponada
PFA	Paraformaldeído
PGS	Prostaglandinas
PLA2	Fosfolipase A2
PAR	Receptores ativados por proteinases
Pmol	Picomol
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SP	Substância P
TrKA	Receptores tirosina quinase A
TNF α	Fator de necrose tumoral – alfa

TRPV1
UFSC

Receptor vanilóide de potencial transitório 1
Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	Materiais e Métodos	11
3.1	Animais	11
3.2	Reprodução do modelo desenvolvido por Shimada e LaMotte	11
3.3	Estudo da co – administração de histamina e capsaicina no comportamento de coçar e nocicepção	13
3.4	Verificação da resposta de coçar e limpeza facial induzida por ET-1	13
3.5	Avaliação da participação dos receptores endotelinérgicos ET _A e ET _B na resposta induzida por ET-1	13
3.6	Avaliação da participação dos efeitos comportamentais da ET-1 pelo sistema opióide	14
3.7	Participação da histamina na resposta sensorial	15
3.8	Influência da administração de ET-1 sobre a migração de mastócitos na pele	15
3.9	Indução de dermatite por TMA	16
3.10	Drogas	17
3.11	Análise estatística	18
4	Resultados	19
5	Discussão	35
7	Conclusões	46
7	Referências	57
8	Prêmios	55

1. INTRODUÇÃO

“As modalidades sensoriais operam de forma interconectada, o que garante que as interações do indivíduo com o ambiente sejam geralmente multisensoriais” (Calvert et al., 2004).

A pele, o maior órgão do corpo humano, é responsável por dar início às diferentes sensações, como toque, tato, calor, frio, dor e coceira. Diferentemente do toque ou tato, que geralmente são prazerosos, e do calor ou frio que em intensidade moderada são inócuos, a dor e a coceira são consideradas sensações desagradáveis. O prurido, ou coceira, foi definido há mais de trezentos e sessenta anos pelo médico alemão Samuel Hafenreffer como uma “sensação desagradável que evoca imediatamente o desejo ou reflexo de coçar” (Hanfenreffer, 1660; Pereira e Misery, 2006). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (Julius e Basbaum, 2001).

Apesar de serem sensações distintas, a dor e o prurido podem ser interpretadas como parte de um mecanismo de defesa do organismo contra estímulos nocivos. A dor pode ser classificada com transitória, aguda ou crônica, e está associada a inúmeras patologias (Loeser e Maelzack, 1999). O prurido, dentro do mesmo contexto, é classificado como agudo ou crônico, sendo que o prurido crônico, segundo o *International Forum for the Study of Itch* (IFSI), é aquele que persiste por mais de seis semanas (Ständer et al., 2007). Além disso, o prurido crônico é um sintoma comum em pacientes que apresentam doença renal crônica, colestase e linfoma, perfazendo também a sintomatologia de doenças inflamatórias de pele, como dermatite atópica, psoríase, urticária, entre outras (para revisão ver: Ikoma et al., 2006; Steinhof et al., 2006; Wang e Yosipovich, 2009). Ademais, ambas as sensações, de acordo com sua etiologia podem ser classificadas ainda como pruritoceptivas ou nociceptivas, neuropáticas, neurogênicas ou psicogênicas (Metz e Ständer, 2010).

Dor ou prurido?

Dor e prurido não compartilham somente o mesmo adjetivo “desagradável” no que diz respeito à qualidade dessas sensações. Além deste aspecto em comum, as mesmas têm a pele como o tecido que recebe tanto a maior parte dos estímulos nociceptivos quanto

pruritoceptivas e ainda fornece estas informações ao sistema nervoso central (Miller et al., 2002; Pereira e Misery, 2006). De fato, tanto o prurido como a dor são considerados resultantes da ativação de terminações nervosas livres, presentes na junção entre a derme e a epiderme, ou seja, estas sensações também dividem uma mesma rede de fibras sensoriais para sua transmissão (Stante et al., 2005). Tal fato torna importante questionar os caminhos, que permeiam a transmissão de ambas as sensações sejam eles comuns ou não.

A transmissão da sensação nociceptiva possui bases muito bem fundamentadas e cientificamente aprofundadas. De forma resumida, ela tem início com a ativação de neurônios sensoriais primários, denominados nociceptores, que conduzem informações nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. As fibras aferentes responsáveis pela nocicepção são do tipo A δ e C. As fibras A δ possuem diâmetros médio entre (2 a 6 μ m), fina bainha de mielina, e são caracterizadas por condução semi-rápida (aproximadamente 12-30 m/s). As fibras C são mais delgadas (0,5 a 2 μ m) e com velocidade de condução baixa (0,5-2 m/s). A estimulação de fibras A δ promove resposta sensorial rápida que resulta em dor aguda, ou dor de primeira fase, que frequentemente desencadeia o reflexo de retirada, enquanto que a ativação de fibras C leva a uma resposta duradoura responsável por dor difusa geralmente secundária à dor aguda (Julius e Basbaum, 2001; Almeida, 2004).

As fibras A δ são classificadas em dois grupos, as do tipo I, que estão presentes na pele glabra sendo altamente responsivas a estímulos mecânicos contudo, possuem limiar alto para estímulos químicos e térmicos (> 53°C), sendo os últimos mediados pela ativação de canais TRPV₂. Já as fibras do tipo II, são observadas principalmente na pele pilosa de primatas, estas possuem receptores mecânicos e térmicos (TRPV₁) para altas temperaturas (45-53°C) e para frio intenso abaixo de (15°C) (Wall and Melzack's, 2006). A maioria das fibras C, respondem a todos os tipos de estímulo nocivo, ou seja, estímulos de natureza mecânica, térmica, ou química, e por esta razão são chamadas de fibras polimodais.

Estas fibras do tipo C possuem receptores termossensíveis ativados por estímulos quentes ou frios, mecanoreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algogênicas, tais como prostaglandinas (PGs), bradicinina (BK), serotonina (5-hidroxi-triptamina; 5-HT), proteases e histamina (embora sejam, pouco responsivas à histamina) (Julius e Basbaum 2001, 2009; Almeida,

2004). Essas fibras são agrupadas em duas populações. Um grupo produz substância P (SP) e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores tirosina quinase A (TrKA), que apresentam alta afinidade pelo fator de crescimento do nervo (NGF). Tais fibras são conhecidas como fibras C peptidérgicas. A outra população expressa receptores purinérgicos P2X3 (para ATP), além de sítio de ligação para isolectina B₄ (IB₄) e são descritas como não-peptidérgicas. Ambas as populações de fibras C respondem a estímulos nocivos semelhantes e expressam o receptor vanilóide de potencial transitório 1 (TRPV1), sensível à ativação por capsaicina, prótons (H⁺) e calor entre outros estímulos (Wall and Melzack's, 2006).

Os estudos acerca das bases neurofisiológicas do prurido tiveram início no começo do século XX. Foi neste período que surgiram às primeiras indagações sobre como um estímulo é capaz de sensibilizar receptores sensoriais periféricos, gerando nelas informação a ser transmitida por fibras aferentes, á medula espinhal, que é repassada ao cérebro onde é, percebida como uma sensação distinta da dor.

A primeira hipótese adotada para explicar o prurido, chamada de teoria da intensidade, foi formulada acreditando-se que o prurido era uma sub-modalidade de dor, e que a transição de prurido para dor dependia da frequência de descargas elétricas dos nociceptores, de modo que, a baixa frequência de ativação dessas fibras induziria prurido e a alta frequência geraria dor. Segundo esta hipótese, o prurido, seria uma sub-modalidade menos intensa de dor (Schmelz, 2010). No entanto, posteriormente, alguns estudos mostraram que a aplicação de baixas concentrações de substâncias algogênicas causava apenas dor menos intensa e não prurido. Além disso, estudos com microestimulação elétrica intraneural de fibras aferentes humanas, revelam que estes estímulos induziam dor, e menos comumente, prurido. Assim, um sistema específico para codificação do prurido passou a ser sugerido.

Em 1995, Schimidt e colaboradores demonstraram a existência de um novo subtipo de neurônios irresponsivos à estimulação mecânica. Estudos subsequentes descreveram melhor estas fibras, as quais correspondem a 20% das fibras C aferentes, sendo caracterizadas por baixa velocidade de condução (0,5 m/s), grandes territórios de inervação, alto limiar elétrico cutâneo, ausência de atividade espontânea, sendo que 20% deste sub tipo, possui resposta sustentada à aplicação de histamina e capacidade de gerar eritema reflexo quando ativadas. Este sub tipo de fibras corresponde a 5 % de todas as fibras C (Schmelz et al., 1997). Essas fibras foram chamadas de fibras C insensíveis a

estímulos mecânicos (também denominadas fibras silenciosas). Posteriormente, foi demonstrado que a aplicação de histamina, por iontoforese, na pele de voluntários sadios é capaz de ativar, seletivamente e de modo dependente da dose uma população de fibras não-mielinizadas, insensíveis a estímulos mecânicos, cuja ativação está associada paralelamente com o desencadeamento da sensação de coceira (Schmelz et al., 2001).

Contribuindo com estes achados, Craig e Andrew (2001) demonstraram a existência de neurônios do trato espino-talâmico que respondem à aplicação por iontoforese de histamina na pele, com um perfil temporal de resposta similar àquele obtido por Schmelz e colaboradores, (1997). Este estudo demonstrou, ainda que os neurônios se projetavam da camada superficial do corno dorsal da medula espinal (lâmina I) para o tálamo, e apresentavam características similares aos pruritoceptores descritos anteriormente, ou seja, eram irresponsivos a estímulos mecânicos, tinham baixa velocidade de condução e alto limiar elétrico, mas não apresentavam atividade espontânea. Contudo, Schmelz e colaboradores, (2003) também demonstraram a presença de atividade espontânea em algumas fibras aferentes primárias, com características similares às de fibras C silenciosas, sugerindo que a coceira, em indivíduos com prurido crônico, pode ser causada pela ativação de uma sub-população distinta de fibras C.

Curiosamente, Ikoma e colaboradores, (2005) mostraram que, por vezes o prurido pode ser gerado sem a formação de eritema reflexo, que é uma característica intrínseca das fibras C silenciosas, sugerindo que estas fibras pertencem a uma outra classe de fibras aferentes. Nesse mesmo contexto, Davidson e colaboradores, (2007) identificaram, no trato espinotalâmico, populações exclusivas de neurônios que respondem a histamina ou ao prurido não-histaminérgico provocado por *cowhage* (espículas obtidas da planta tropical *Mucuna pruriens*, e que contém mucunaína). Posteriormente, Namer e colaboradores, (2008) mostraram, através de microneurografia, que a histamina e o *cowhage* ativam tipos diferentes de fibras C em humanos, e que por ativar os receptores ativados por proteases do tipo 2 (PAR₂), o último é capaz de sensibilizar fibras nociceptivas irresponsivas à histamina. Estes achados sugerem a existência de vias centrais e periféricas distintas, histaminérgicas e não-histaminérgicas, para transmissão da sensação de coceira, e podem explicar porque o tratamento com anti-histamínicos muitas vezes se mostra ineficaz na clínica.

Com os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nas vias neurais da coceira, outros mediadores e receptores passaram a ser investigados. Dentre eles está o peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor (GRPR). Sun e Chen (2007), mostraram que o GRP é expresso em terminações de fibras aferentes no corno dorsal da medula espinhal e medeia o comportamento pruriginoso. Ademais, neurônios que expressam GRPR são necessários para mediar o comportamento pruriginoso observado em resposta à aplicação intradérmica (i.d.) de diferentes mediadores, como histamina, 5-HT, endotelina-1 (ET-1) e um agonista PAR₂ (SLIGRL-NH₂) (Sun et al., 2009).

É experiência comum que o prurido possa ser reduzido por estímulos dolorosos causado pelo próprio ato de coçar. Contudo, a inibição da sensação pruriginosa por estímulos dolorosos foi experimentalmente demonstrada, pela primeira vez, por Ward et al., (1996), utilizando estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Um aspecto curioso em relação à modulação central do prurido é que o ato de coçar produz uma sensação prazerosa, a qual pode ser prejudicial, principalmente no caso de pacientes com prurido crônico, pois conduz a um ciclo vicioso de “sensação de coceira – ato de coçar”. Estudos indicam que a ativação do córtex pré-frontal e orbital-frontal podem contribuir para esta sensação, indicando que aspectos motivacionais, como a ativação do sistema de recompensa estão diretamente relacionados com o componente compulsivo do ciclo. Esta sensação prazerosa pode ocorrer devido à liberação de opióides endógenos (Ikoma et al., 2006).

Células epidérmicas e suas relações com o prurido

Dentre as diferentes células presentes na pele e que desempenham funções relevantes, os queratinócitos são os mais numerosos e importantes. Estas células expressam receptores para NGF, neurotrofina-4, e canabinóides, bem como receptores do tipo PAR₂, TRPV1, receptores para histamina H₁ e H₂ e receptores para ET-1. Além disso, elas podem estimular ou até mesmo inibir a dor e ou prurido (para revisão ver: Steinhoff et al., 2006).

Ambos os receptores H₁ e H₂ para histamina são expressos em queratinócitos onde podem estar envolvidos em disfunção da barreira epidérmica, como na dermatite atópica (Ashida et al., 2001). Ademais, tanto receptores de canabinóides do tipo 2 (CB₂), quanto de ET-1 (ET_B), estimulam a liberação de beta endorfina dos queratinócitos, produzindo efeito antinociceptivo sobre neurônios sensoriais (Khadorova et al.,

2003; Ibrahim et al., 2005). Interessantemente, a liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄), de queratinócitos, parece estar envolvida no prurido induzido por SP, bem como pela ativação de receptores PAR₂ (Andoh et al., 2001; Zhu et al., 2009). Em algumas doenças de pele, como a dermatite atópica, não só os queratinócitos, mas também as células de Langerhans, as principais células dendríticas da pele, são capazes de secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que também podem induzir prurido (Dubrac et al., 2010).

Os mastócitos também exercem papel fundamental na manutenção da fisiologia da pele, embora sejam bem conhecidos por estarem associados com condições fisiopatológicas, como alergia e anafilaxia (NcNeil et al., 2007). Com relação ao prurido, essas células parecem não só promovê-lo através da liberação de histamina, LTB₄ e PGD₂, mas também contribuem para amenizar este sintoma por liberarem vários tipos de proteases (triptases, quimases, carboxipeptidase A e catepsina G), algumas das quais são capazes de degradar ou limitar a ação de peptídeos pruritogênicos como SP, CGRP e ET-1 (Maurer et al., 2004).

O papel dos principais mediadores e receptores farmacológicos no prurido

A histamina é o mais conhecido mediador de prurido e de doenças inflamatórias alérgicas. Ela é estocada em mastócitos e basófilos e é liberada quando estas células são ativadas por contato com antígenos ou mediadores endógenos (Clough, et al., 2001). O seu efeito pruritogênico é mediado pelos receptores H₁ associadas á via fosfolipase C β , expressos em fibras C (Han et al., 2006). Sabe-se também que esta ação da histamina é dependente da estimulação do receptor TRPV1, via ativação das enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂) e 12-lipoxigenase (Shim et al., 2007). Todavia, Yamamura e colaboradores (2009) demonstraram que os receptores H₄ também estão envolvidos na resposta pruritogênica produzida por histamina e SP. Em camundongos, a SP foi capaz de induzir um comportamento associado ao prurido (Kuraishi et al., 1995; Andoh et al., 1998) e esta resposta foi suprimida pelo pré-tratamento com composto 48/80 (Andoh et al., 1998), indicando que possivelmente a resposta pruritogênica associada a este peptídeo se deve a liberação de histamina por mastócitos. Por outro lado, a participação da SP no prurido se processa também de forma independente da liberação de histamina de mastócitos, que por sua vez, não necessita da ativação de receptores para neurocininas do tipo 1 (NK₁). Alguns estudos sugerem

que esta resposta pruriceptiva, está associada com a liberação de leucotrieno B₄ (Andoh et al., 2001).

Os receptores ativados por proteinases (PARs) são importantes alvos farmacológicos no estudo do prurido (Steinhof, 2003). A resposta pruritogênica induzida por algumas dessas proteinases, como tripsina e quimases, ocorre através da liberação de histamina de mastócitos, enquanto que o prurido induzido por outras proteases, como as calicreínas, não ocorre através da liberação de histamina. Neste sentido, Tisujii e colaboradores, (2008) mostraram que o prurido causado pela ativação dos receptores PAR₁ e PAR₄ para proteases, diferentemente dos receptores PAR₂, é mediado pela liberação de histamina de mastócitos.

Os canais da família TRPV, sensíveis ao calor e ao frio, amplamente expressos em fibras aferentes, estão envolvidos tanto na dor quanto no prurido. Além de serem amplamente expressos em fibras C, estes receptores também são encontrados em células não neuronais como queratinócitos, células dendríticas e mastócitos. O membro mais explorado desta família é o canal TRPV1 (Caterina, et al., 1997; 2001), o qual é diretamente ativado por capsaicina, calor e prótons, e indiretamente ativados por mediadores como bradicinina, produtos da ação das lipooxigenases, histamina, prostaglandinas, ATP, citocinas pró-inflamatórias, agonistas de PAR₂, neurotrofinas e TNF- α . Alguns destes mediadores, além de possuírem características algogênicas, também são pruritogênicos e podem ativar os canais TRPV1 por mecanismos de sinalização intracelular que envolvem ativação de proteínas G. (Shim et al., 2007; Costa et al., 2008). Recentemente, outros membros da família TRPV, que são ativados por calor (TRPV2, TRPV3 e TRPV4) ou frio (TRPM8 e TRPA1), passaram a ser considerados como alvos farmacológicos relevantes ao tratamento do prurido (Bíró et al., 2007).

O sistema calicreína-cininas está implicado em várias condições patológicas inflamatórias. Embora a bradicinina seja conhecida por ser um importante mediador de dor, alguns estudos já mostraram sua participação na fisiopatologia do prurido. Recentemente, foi demonstrado que o sistema de cininas, por ação preferencial em receptores B₂ para cininas, modulam a sinalização da resposta pruriceptiva e que a deleção de ambos os receptores é capaz de prevenir a resposta pruritogênica desencadeada por diferentes estímulos. Surpreendentemente o antagonismo dos mesmos receptores é capaz de inibir o prurido desencadeado por agonistas PAR₂ (Costa et al., 2010).

Outros importantes alvos de estudo na gênese e modulação do prurido são os receptores opióides. Particularmente, os agonistas μ

opióides, parecem desempenhar um importante papel na indução do prurido, pois, sabe-se que os antagonistas μ opióides, (naloxona e naltrexona), conseguem atenuar o prurido em pacientes com colestase renal, falência renal e dermatite atópica (Togashi et al., 2002; Umeuchi et al., 2003; Wakasa et al., 2004;). Ao contrário do que havia sido descrito acerca dos μ opióides, os receptores κ -opióides parecem estar associado à atenuação do prurido (Nagase et al., 1998).

O sistema endotelinérgico na nocicepção e no prurido

Há mais de vinte anos, Ferreira et al., (1989), relataram que a injeção i.d. de ET-1 no antebraço de voluntários causava sensação de coceira e queimação. Não obstante, Trentin e colaboradores (2006), demonstraram pela primeira vez que a ET-1, conhecido mediador peptídico exercia importante papel no prurido.

As endotelinas (ET-1, ET-2 e ET-3) são sintetizadas e liberadas por cardiomiócitos, mastócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e neurônios. Suas ações são primariamente locais, agindo de forma parácrina ou autócrina. As atividades imediatas são normalmente breves, uma vez que todas as endotelinas são degradadas por proteases extracelulares como enzima conversora de endotelinas (ECEs), porém seu efeito pode durar horas (Davenport e Maguire, 2006; Khorodova et al., 2009).

As ações das endotelinas nos mamíferos ocorrem por ativação de dois subtipos de receptores ambos pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCR), chamados de ET_A e ET_B. Os mesmos são codificados por genes distintos e estão distribuídos em vários tecidos e células, porém com diferentes níveis de expressão (Masaki et al., 1993; Masaki 2004; Davenport e Maguire, 2006; Khorodova et al., 2009). Dados da literatura ainda indicam que estes receptores estão acoplados às proteínas G α_i e G $\alpha_q/11$, sendo que o ET_A parece ter afinidade preferencialmente por G α_i , enquanto o ET_B parece ter afinidade tanto por G α_i quanto por G $\alpha_q/11$. Funcionalmente ambos os receptores ativam a fosfolipase C, que conduz à hidrólise de trifosfato de inositol, levando a um aumento do cálcio intracelular. (Davenport e Maguire, 2006; Khorodova et al., 2009).

A participação da ET-1 e de seus receptores na nocicepção independente de seu efeito vasoconstritor tem sido amplamente caracterizada (Rae e Henriques, 1998; Chichorro et al., 2009; para revisão ver Khodorova et al., 2009). Os receptores ET_A são encontrados em larga proporção em corpos celulares de neurônios sensoriais de

pequeno e médio diâmetro em gânglios da raiz dorsal (DRG), os quais estão associados a fibras C e A δ , responsáveis por conduzir os impulsos dolorosos. Já os receptores ET_B parecem ser mais expressos em células satélites e células de Schwann no DRG nas quais induzem a liberação de prostaglandina E (PGE) (Pomonis, 2001). Tanto os receptores ET_A, quanto os ET_B, podem induzir hipernocicepção e hiperalgesia em animais e em humanos (para revisão ver: Khodorova, 2009). De modo interessante, os receptores ET_B também parecem estar envolvidos em processos antinociceptivos, através da liberação de beta-endorfina de queratinócitos, promovendo assim um efeito analgésico local (Khodorova, et al., 2002; 2003). Complementarmente, quando liberada a ET-1, pode promover a degranulação de mastócitos, com consequente liberação de mediadores (histamina, serotonina e LTB₄) (Stassen et al., 2002), os quais, como descrito anteriormente, estão particularmente associados à indução de prurido.

A resposta comportamental observada em camundongos refere qual sensação?

A maioria dos trabalhos em que se avalia a sensação de prurido, faz se uso de um modelo experimental, no qual a aplicação da substância de interesse é realizada na região do dorso de camundongos, com posterior avaliação do comportamento de coçar com as patas traseiras. Recentemente, Shimada e LaMotte (2008), observaram que, após a administração i.d. de histamina na região da face (bochecha), os camundongos coçavam, a região onde a substância havia sido administrada, com as patas traseiras. No entanto, em resposta à capsaicina, os camundongos exibiam o comportamento de limpeza facial com movimentos das a pata dianteira. Logo, o estudo concluiu que é possível diferenciar repostas comportamentais frente à aplicação de estímulos dolorosos ou pruriginosos. Ao mesmo tempo em que os mecanismos farmacológicos que envolvem o prurido ainda carecem de investigação e os tratamentos para doenças de pele como as dermatites mostram-se pouco satisfatórios, percebemos que o modelo proposto por Shimada e LaMotte (2008), pode servir como uma importante ferramenta funcional farmacológica para o entendimento da real participação do sistema de endotelinas no prurido, na dor ou até mesmo na dermatite atópica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar, através de técnicas farmacológicas e da análise comportamental o papel da endotelina-1 (ET-1) em um modelo que diferencia a coceira da nocicepção em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Confirmar se o modelo experimental descrito por Shimada e LaMotte (2008), distingue prurido de nocicepção;
- Diferenciar e quantificar a resposta comportamental induzida por ET-1;
- Caracterizar a participação dos receptores endotelinérgicos implicados nas diferentes respostas comportamentais (pruriginosa) e (nociceptiva) com a utilização de antagonistas específicos para os receptores ET_A e ET_B;
- Investigar a participação do sistema opióide na modulação das diferentes respostas comportamentais induzidas por ET-1;
- Avaliar a influência da ET-1 sobre a população de mastócitos na pele;
- Estudar o papel funcional do sistema endotelinérgico na dermatite atópica induzida por anidrido trimelítico (TMA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos m da linhagem CD1 (descendentes de matrizes do Laboratório Charles River - EUA), com pesos entre 20 e 30 g e com idade de dois meses. Os animais foram mantidos em gaiolas do tipo microisoladores, com temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas. Os animais tiveram livre acesso a água filtrada e ração especial para roedores esterilizada. Para a realização dos experimentos foi necessária a consolidação de uma colônia de animais CD1 no biotério setorial do Laboratório de Peptídeos do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo seguiram as recomendações do guia Animais de Laboratório Cuidados na Iniciação Experimental (Mezadri et al., 2004) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número de protocolo (23080.008788/2009-00).

Quarenta e oito horas antes do início dos experimentos, os animais tiveram os pêlos da região facial (bochechas) removidos com o auxílio de um depilador elétrico (Britânia[®]) para facilitar a aplicação intradérmica (i.d.) das drogas (Figura 1A). A fim de tornar mais fácil o procedimento de remoção dos pelos, os animais foram anestesiados com Isoflurano (2% em 100% O₂). Os testes comportamentais foram realizados no período entre 8 e 16 horas. Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados com CO₂ em câmara apropriada.

3.2. Reprodução do modelo desenvolvido por Shimada e LaMotte

Com o objetivo de adaptar o modelo descrito por Shimada e LaMotte, (2008) às nossas condições experimentais, os animais foram ambientados por uma hora, em pequenas caixas de acrílico medindo 9x9x13 cm, contendo em seu interior dois espelhos angulados ao fundo e dois espelhos retos nas laterais, o que possibilitou a ampla visualização das respostas comportamentais (Figura 1B). Ainda, para evitar a interferência de barulhos externos, utilizou-se como ruído branco de fundo o som de um rádio sintonizado entre duas estações. Para uma análise mais precisa dos resultados, todos os experimentos realizados neste trabalho foram filmados, sendo que cada dupla de animais foi

filmada por 40 minutos após a administração das diferentes drogas. Para as filmagens, utilizou-se uma microcâmara (Intelbras[®], 200 VM) e as imagens captadas pela câmara foram transferidas para um microcomputador (Positivo[®], Mobile V56) com o auxílio de uma placa de captura externa de vídeo (KTC[®], Security).

O comportamento de coçar (*scratching*) é considerado, neste modelo, como a manifestação de movimentos repetidos executado com o membro posterior ipsilateral em direção à região facial na qual a droga foi administrada (bochecha esquerda), ou próxima a esta (Figura 1C). Já o comportamento nociceptivo (*wipes*) é considerado como manifestação de movimentos de limpeza executados com os membros anteriores, na proximidade da região onde a droga foi administrada. Esses movimentos são tipicamente iniciados atrás da bochecha e seguem em direção à porções mais anteriores da face (Figura 1D). A intensidade desses comportamentos foi quantificada como o número de acessos de coceira (independente de quantos movimentos ocorriam por processo) ou e movimentos de limpeza facial (cada movimento foi considerado um evento) em 40 min. Somente foram registrados movimentos de limpeza unilaterais com o membro dianteiro, que não fazem parte do movimento típico de limpeza facial simultâneos (*grooming*) (Figura 1E), o qual se caracteriza por movimentos de limpeza facial com ambos os membros dianteiros, que se iniciam atrás das orelhas e seguem em direção às bochechas. Em todos os experimentos realizados, quanto da administração de drogas à região facial dos camundongos, as mesmas foram injetadas na bochecha esquerda; sendo que o volume máximo administrado foi de 20 µl por bochecha.

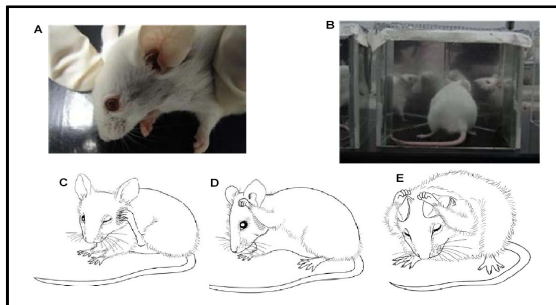


Figura 1: Detalhamento de aspectos importantes do modelo de coceira e nociceção descrito por Shimada e LaMotte (2008) nas condições experimentais do presente estudo. (A) Depilação da bochecha dos animais, lado esquerdo. (B) Caixa de acrílico espelhada para a observação comportamental. (C) Comportamento de coçar a bochecha injetada, com a pata posterior, indicativo de coceira (scratching). (D) Comportamento de movimentos de limpeza facial com a pata dianteira, indicativo de nociceção (wipes). (E) Comportamento de limpeza da face com as duas patas posteriores (grooming).

Como o intuito de se buscar reproduzir adequadamente o modelo experimental originalmente descrito por Shimada e Lamotte (2008), em nossas condições experimentais, foram realizados dois dos protocolos relatados naquele estudo. No primeiro, avaliou-se as respostas comportamentais induzidas pela administração i.d. de histamina. Para isto, administrou-se histamina, previamente dissolvida em salina (0,9% NaCl) nas doses de 5, 10, 20 e 50 μg ou o veículo correspondente em diferentes grupos de animais. No segundo protocolo, foi administrada capsaicina por via i.d. nas doses de 1, 10 e 40 μg ou o veículo correspondente (7% de Tween 80 em PBS) e a incidência de respostas pruritoceptivas e nociceptivas foi observada por 40 min.

Uma vez que ambos os protocolos sido reproduziram os perfis de respostas comportamentais de resposta relatados por Shimada e LaMotte (2008), todos os subseqüentes, seguiram o molde avaliativo do referido modelo experimental.

3.3. Estudo da co-administração de histamina e capsaicina no comportamento de coçar e na nociceção

Para avaliar a possível interferência cruzada entre respostas pruriginosas e nociceptivas, histamina (50 μg) e capsaicina (10 μg) foram co-injetadas na região da bochecha por via i.d., em volume total de 20 μl . As respostas comportamentais de coceira ou de limpeza facial

foram comparadas aquelas promovidas pela isolada de histamina ou capsaicina, ou dos respectivos veículos.

3.4. Verificação da resposta de coçar e de limpeza facial induzida por ET-1

Para a verificação da ação da ET-1 neste modelo, os animais receberam injeção i.d. de ET-1 (3, 10, 30 pmol) ou veículo (PBS) em um volume de 20 μ l. Imediatamente após administração os animais foram colocados individualmente nas caixas experimentais e observados por até 40 min. O número de acessos de coceira (*scratching*) e de movimentos de limpeza facial (*wipes*) foram filmados e posteriormente quantificados. Com o intuito de se verificar o decurso temporal de ambas as respostas promovidas por ET-1, os acessos de coceira e movimentos de limpeza foram avaliados nos intervalos de tempo de 5, 10, 20, 30 e 40 min, após o tratamento.

3.5. Avaliação da participação dos receptores endotelinérgicos ET_A e ET_B na resposta induzida por ET-1

O estudo da participação dos receptores de ET-1 foi realizado utilizando-se antagonistas peptídicos seletivos dos receptores ET_A, (BQ-123, 10 nmol) ou ET_B (BQ-788, 10 nmol). Em diferentes grupos experimentais, os antagonistas foram administrados, isoladamente ou conjuntamente, na bochecha esquerda em volume de 10 μ l. Logo após a aplicação, foi feita uma pequena marcação em azul indicando o local exato da administração. Decorridos 5 minutos, os mesmos animais receberam ET-1 (30 pmol) por via i.d. no mesmo local em volume idêntico. O volume total administrado em cada bochecha foi de 20 μ l, incluindo o grupo controle que recebeu veículo correspondente (PBS). Os registros das respostas comportamentais foram realizados como descrito anteriormente.

3.6. Avaliação da modulação dos efeitos comportamentais da ET-1 pelo sistema opióide

Foram realizados três protocolos experimentais diferentes para identificar, funcionalmente, a possível participação de mecanismos sinalizados por receptores opióides, na modulação das respostas induzidas pela ET-1. No primeiro protocolo, os animais receberam naltrexona (antagonista não - seletivo de receptores opióides; 5 μ g) e ET-1 (30 pmol), co-administradas por via i.d. em um volume final de 20 μ l (Trentin, 2006). No segundo protocolo, diferentes grupos de animais

foram tratados i.d. com CTOP (antagonista seletivo de receptores μ -opióide; 20 nmol), Nor-BNI (antagonista seletivo de receptores κ -opióides; 68 nmol) ou naltrindole (antagonista seletivo de receptores δ -opióide; 80 nmol), co-administrados com ET-1 (30 pmol) (Khodorova et al., 2003). No terceiro protocolo, foram testados os efeitos da co-injeção de DAMGO (agonista seletivo de receptores μ opióide; 100 nmol) ou U-50488H (agonista seletivo de receptores κ -opióide; 100 nmol) juntamente com ET-1 (30 pmol) (Yamamoto e Sugimoto, 2010). Em cada série de experimentos o grupo controle positivo foi tratado apenas com ET-1 (30 pmol, 20 μ l) e o grupo controle negativo apenas com (PBS; 20 μ l).

Como existem dados na literatura, indicando que o Nor-BNI e o DAMGO causam efeito pruritogênico “*per se*” quando administrado por via i.d. (Kamei e Nagase, 2001; Yamamoto e Sugimoto, 2010), foi avaliado se a administração i.d. de Nor-BNI (68 nmol) ou DAMGO (100 nmol) induziriam efeito pruritoceptivo neste modelo experimental.

3.7. Participação da histamina na ação sensorial da ET-1

Para avaliar a possível participação da histamina nos efeitos comportamentais da ET-1, os animais foram tratados com loratadina, um anti-histamínico, antagonista de receptores H_1 , frequentemente utilizado na clínica para tratar dermatite de contato (Seik et al., 2005). Neste protocolo, os animais foram tratados com loratadina (10 mg/kg), por via i.p. uma hora antes da administração i.d. de ET-1 (30 pmol; 20 μ l) na bochecha esquerda. Os animais controle receberam PBS (veículo correspondente a ET-1 e loratadina) por via i.p. e ou i.d. Os acessos de coceira e movimentos de limpeza facial (nocicepção) foram contados conforme descrito anteriormente.

3.8. Influência da administração de ET-1 sobre a migração de mastócitos na pele

Mastócitos desempenham um papel central na indução da coceira (Ständer et al., 2011; Kalesnikoff e Galli, 2008; Ikoma et al., 2006). Desse modo, foi investigado se a resposta pruritogênica induzida pela administração de ET-1 seria acompanhada de alterações na população local dessas células e seu grau de degranulação. Com esse objetivo, os animais foram tratados com ET-1 (30 pmol) ou veículo (PBS), por via i.d., na região da bochecha esquerda. Grupos distintos foram sacrificados em intervalos de tempo de 10, 15 e 30 minutos após a

injeção e, suas bochechas retiradas e processadas para avaliação histológica por microscopia óptica.

Para o preparo dos cortes histológicos, as bochechas coletadas foram mantidas em paraformaldeído (PFA) 4 %, por 48 horas e em etanol 70 % por outras 24 horas. As amostras foram então desidratadas por passagens consecutivas em etanol, 70%, 80%, 90% e, finalmente em etanol absoluto. Posteriormente, foram submetidas a dois banhos de xilol (xileno), de 30 minutos para clareamento e diafanização. Sendo então colocados na parafina por um período de 3 horas para inclusão. Cortes teciduais de 6 μm de espessura foram obtidos através da utilização de um micrótomo (Leica Co.) e posicionados sobre lâminas, que foram mantidas em estufa a uma temperatura de 60-70 °C até a completa fusão da parafina. Posteriormente, os tecidos foram desparafinados em xilol e submetidos a passagens sucessivas em etanol absoluto.

Após o processo de desparafinização com xilol e sucessivas passagens em etanol, as lâminas foram então lavadas com água destilada e embebidas em Azul de Toluidina (0,05 %) por 30 minutos. Este corante básico, metacromático possui afinidade por aminas sulfatadas, ligando-se aos grânulos de heparina no citoplasma de mastócitos, conferindo a estas células a coloração violeta, que caracteriza a metacromasia (Yong et al., 1997). Os cortes foram novamente lavados com água destilada, até a retirada completa do excesso de corante e submetidos novamente a três passagens sucessivas de xilol e etanol respectivamente.

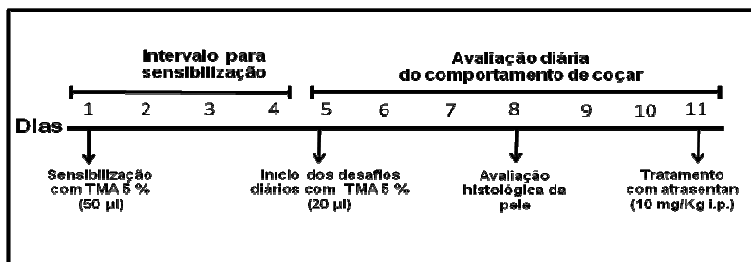
Os cortes foram avaliados histologicamente em do microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, USA), em aumento de 400x. O número de células degranuladas e/ou intactas foram contadas ao longo do corte histológico e o resultado dividido pela área total do corte, sendo expresso em número de células/ mm^2 (Yamashita et al., 2005). As imagens foram obtidas através da câmera digital (DS-5M-L1) acoplada ao microscópio.

3.9. Indução de dermatite atópica por TMA

Uma série final de experimentos procurou investigar a possível participação das endotelinas nas alterações sensoriais associadas a um modelo experimental de dermatite atópica, originalmente descrito por Schneider et al, (2008). Os animais foram depilados na região da bochecha esquerda e sensibilizados com 50 μl de anidrido trimelítico (TMA, 5%), em acetona e miristato de isopropila (4:1). A partir do

quinto dia após a sensibilização, os animais foram desafiados diariamente com TMA (5%; 20 μ l) por até 7 dias consecutivos (i.e. até o dia 11 depois da sensibilização – ver esquema 1). Animais do grupo controle foram tratados de maneira idêntica apenas com o veículo. Decorridas vinte e quatro horas após o terceiro desafio com TMA (i.e. no dia 8), parte dos animais foram sacrificados e as bochechas coletadas para identificação histológica de alterações nas camadas da pele, através da coloração com hematoxilina – eosina. Esta técnica de coloração utiliza os mesmos procedimentos iniciais da técnica de coloração por Azul de Toluidina, porém após a primeira lavagem com água destilada as lâminas são coradas em banho de hematoxilina por dois minutos, sendo posteriormente, lavadas em água destilada e embebidas em solução de eosina por três minutos. E por fim, submetidas a sucessivos banhos de etanol e xilol.

No décimo primeiro dia após a sensibilização, os animais que estavam sendo desafiados diariamente com TMA (5%, 20 μ l), foram separados em dois grupos. Um grupo recebeu por via i.p. o antagonista não - peptídico seletivo de receptores ET_A, atrasentan (10 mg/Kg) e o outro recebeu o veículo (PBS). Uma hora após o tratamento, todos os animais foram desafiados com TMA (5%, 20 μ l) na região da bochecha, e o número de acessos de coceira ou movimentos de limpeza facial foi medido como descrito no item (3.3).



Esquema 1: Protocolo para estudo da participação do sistema endotelínérgico na dermatite por TMA: No décimo primeiro dia os animais foram tratados com atrasentan (10 mg/Kg) ou com seu veículo (PBS), desafiados com TMA para posterior avaliação do comportamento de coçar e nocicepção.

3.10. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: endotelina-1 (ET-1), BQ-123 (ciclo[DTrp-DAsp-Pro-Dal-Leu]) BQ-788 (*N-cis*-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- γ -metileucil-D-1-metoxycarbonil-D-norleucina), provenientes da American Peptide Co., Sunnyvale, U.S.A. O atrasentan foi gentilmente fornecido pelo laboratório Abbott (Abbott Park, IL, USA). O dicloridrato de histamina, capsaicina, naltrexona, CTOP, dicloridrato de *nor*-binaltorfimina (Nor-BNI), DAMGO [D-Ala²,N-Met-Phe⁴,Gly⁵-d] sal de acetato de encefalina, U-50488H (*trans*-(\pm)-2-(3,4-diclorofenil)-*N*-metil-*N*-[21pirrolidil] ciclohexil)), anidrido trimelítico (TMA) e loratadina foram todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, U.S.A). O atrasentan foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 3% de etanol e 100 μ L de NaOH 0,1 N. Para a preparação da solução estoque de capsaicina foi utilizado 7% de Tween 80, diluído com 930 μ l de PBS. As soluções estoque de ET-1, BQ-123, BQ-788, CTOP, Nor-BNI, DAMGO e U-588H foram preparadas em PBS e mantidas a uma temperatura de -18 °C, sendo diluídas momentos antes dos experimentos com o mesmo veículo. O dicloridrato de histamina foi diluído em solução de NaCl 0,9 %.

3.11. Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6-8 animais, por grupo experimental. Para análise estatística dos resultados, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls, quando pertinente. Em todas as análises estatísticas utilizadas, as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

A injeção i.d. de histamina (5, 10, 20 e 50 μg) na bochecha esquerda de camundongos induziu acessos de coceira, caracterizados por movimentos repetidos das patas traseiras dirigidos à bochecha tratada, cuja quantidade foi proporcional à dose administrada (Figura 2A). A resposta máxima à histamina ocorreu com a dose de 50 μg (40 acessos em média). Camundongos tratados da mesma forma com capsaicina (1, 10 e 40 μg) apresentaram comportamento de limpeza facial, com movimentos dos membros anteriores dirigidos às bochechas em quantidade proporcional à dose (Figura 2D). A maior dose testada de capsaicina (40 μg) causou 49 movimentos de limpeza em média. Por outro lado, a administração de histamina nas mesmas doses não foi efetiva em induzir movimentos de limpeza facial (Figura 2C). Da maneira análoga, porém inversa, a capsaicina não promoveu acessos de coceira de forma significativa (Figura 2D).

A co-administração i.d. de histamina (50 μg) juntamente com capsaicina (10 μg) promoveu um número menor de acessos de coceira do que o observado em resposta à administração isolada de histamina (Figura 3A). Na presença de capsaicina, os acessos de coceira foram inibidos em 59 %. De maneira semelhante, a co-administração i.d. de capsaicina (10 μg) juntamente com histamina (50 μg) induziu um número menor de movimentos de limpeza promoveu um número menor que a capsaicina sozinha (inibição de 45%; Figura 3B). Estes resultados demonstram que, ao serem co-injetadas, tanto a capsaicina é capaz de interferir na resposta pruritoceptiva, quanto a histamina na resposta nociceptiva.

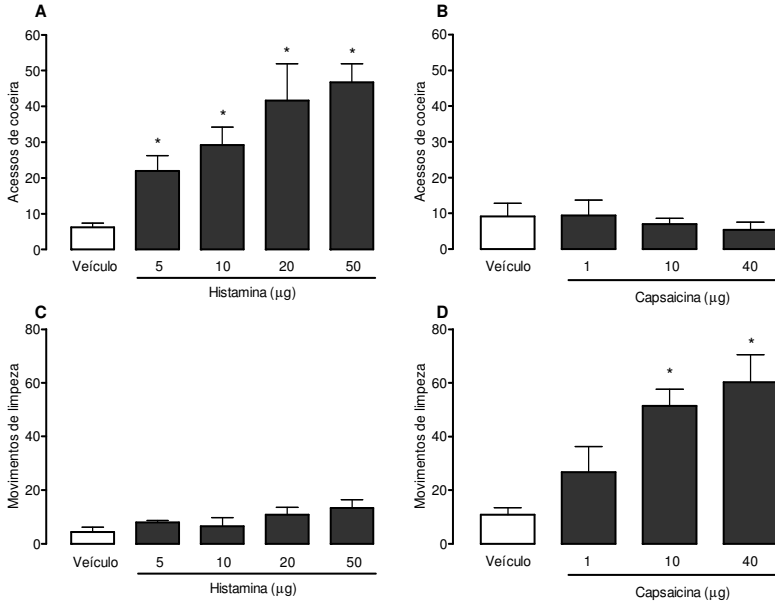


Figura 2: Efeitos comportamentais da injeção intradérmica de histamina e capsaicina na bochecha de camundongos. Os painéis A e B mostram curvas dose-resposta para a promoção de acessos de coceira e os painéis C e D mostram curvas análogas para o número movimentos de limpeza causados por histamina e capsaicina, respectivamente. Os tratamentos foram feitos por injeção i.d. na bochecha esquerda de animais. Os controles foram tratados com salina (veículo histamina) ou 7% Tween 80 em PBS (capsaicina). O volume das injeções foi de 20 µL. Os valores representam a média ± erro padrão da média ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

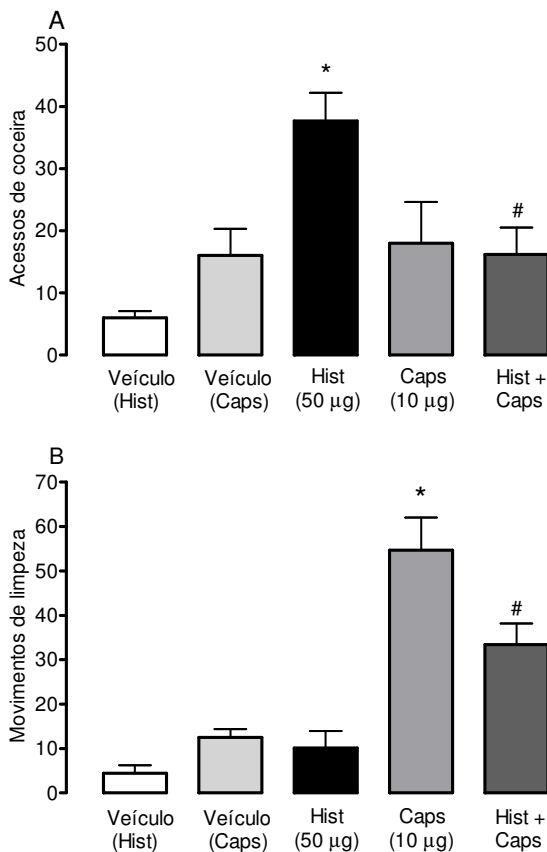


Figura 3: Comparação dos efeitos da administração intradérmica isolada ou combinada de histamina e/ou capsaicina na bochecha, sobre o comportamento de coçar e limpar de camundongos. Os painéis A e B mostram o número de acessos de cocceira e de movimentos de limpeza causados pela administração isolada ou combinada de histamina (Hist, 50 µg) e/ou capsaicina (Caps, 10 µg), respectivamente. Os tratamentos foram feitos por administração intradérmica na bochecha esquerda dos animais. Os controles foram tratados com salina (veículo histamina) ou para capsaicina (7% Tween 80 em PBS), sendo o volume total da solução injetada de 20 µL. Os valores representam a média ± erro padrão da média do número de acessos de cocceira e de limpeza ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com o veículo correspondente. Cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com histamina (A) ou capsaicina (B) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

A injeção i.d. de ET-1 (3, 10, 30, 60 pmol) na bochecha induziu tanto acessos de coceira, quanto movimentos de limpeza facial, sendo que ambas as respostas se mostraram dependentes da dose administrada (Figura 4A e 4B). Na maior dose testada, a ET-1 induziu em média, 60 acessos de coceira e 27 movimentos de limpeza. Ambas as respostas comportamentais promovidas pela ET-1, coceira e limpeza, manifestaram-se principalmente nos primeiros 20 minutos após a injeção, ainda que fossem ainda observados, em menor frequência, no transcorrer do restante do período de observação de 40 minutos (Figura 4C e 4D).

Com o propósito de caracterizar os possíveis receptores responsáveis tanto pelo efeito pruriginoso quanto nociceptivo da ET-1, no modelo experimental adotado neste estudo, testou-se, em outra série de experimentos, a influência de antagonistas seletivos dos receptores ET_A e ET_B. Observou-se que a administração i.d. do antagonista peptídico seletivo para receptor ET_A BQ-123 (10 nmol), 5 minutos antes da injeção de ET-1 (30 pmol), reduziu marcadamente a incidência de acessos de coceira (89% de inibição; Figura 5A). Contudo, o tratamento local prévio com BQ-123 não modificou o número de movimentos de limpeza facial induzido pela ET-1 (Figura 5B). Por outro lado, a injeção local de BQ-788 (10 nmol), um antagonista peptídico seletivo para receptores ET_B, aumentou em 72% o efeito pruritogênico da ET-1 (Figura 5A), e também foi capaz de potencializar a resposta nociceptiva ao peptídeo, aumentando em 108% o número de movimentos de limpeza (Figura 5B). A co-injeção de BQ-123 mais BQ-788 (ambos a 10 nmol, 5 minutos), foi efetiva em reduzir os acessos de coceira e os movimentos de limpeza induzidos por ET-1, para valores semelhantes aos observados nos animais tratados previamente com BQ-123, de modo que ambos os comportamentos apresentaram-se inibidos em 90 e 70%, quando comparados aos valores observados no grupo tratado com BQ-788 antes de ET-1, respectivamente.

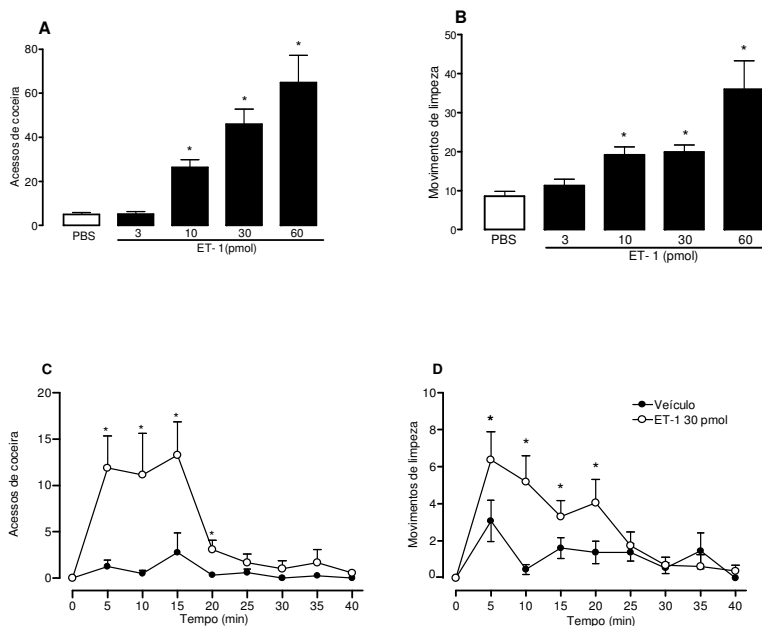


Figura 4: A injeção intradérmica de ET-1 induz acessos de coceira e movimentos de limpeza em camundongos. Os painéis A e B mostram curvas dose-resposta para a promoção de acessos de coceira e movimentos de limpeza promovidos pela aplicação i.d. de ET-1 (3 a 60 pmol) na bochecha esquerda de camundongos, respectivamente. Os Painéis C e D mostram o decurso temporal da manifestação dos acessos de coceira e movimentos de limpeza induzidos nos primeiros 40 minutos após a administração de ET-1 (30 pmol). Os controles foram tratados com PBS (20 μ L). Os valores representam a média \pm erro padrão da média ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao valor correspondente do grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

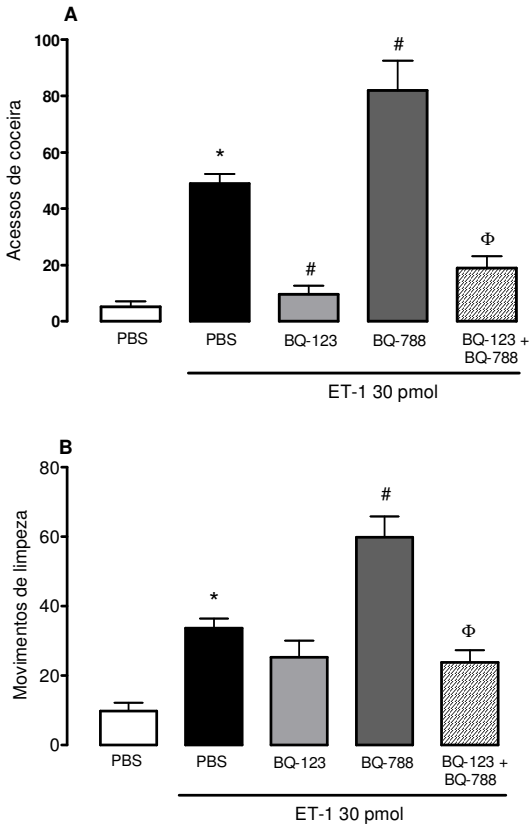


Figura 5: Influência do tratamento com antagonistas de receptores ET_A e/ou ET_B sobre os acessos de coceira (painel A) e movimentos de limpeza (painel B) induzidos pela ET-1. Os animais receberam, na bochecha esquerda, injeção i.d. de ET-1 (30 pmol), 5 min após a administração i.d. de veículo (PBS), BQ-123 (antagonista de receptores ET_A, 10 nmol), BQ-788 (antagonista de receptores ET_B, 10 nmol) ou ambos os antagonistas (BQ-123 + BQ-788). Os controles foram tratados com PBS. O volume total injetado foi de 20 µL. Os valores representam a média ± erro padrão da média do número de acessos de coceira ou movimentos de limpeza observados nos primeiros 40 minutos após a injeção de ET-1 ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos, cerquilhas e ϕ indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com PBS, ao grupo tratado com ET-1 + PBS ou ao grupo tratado com ET-1 + BQ-788, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls).

Em outra série de experimentos, avaliou-se a influência da co-administração i.d. de diferentes antagonistas de receptores opióides sobre os efeitos pruritoceptivos e nociceptivos da ET-1. Neste sentido, foi observado que a co-injeção de ET-1 mais naltrexona (5 µg), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, não promoveu mudanças significativas do efeito pruritogênico da ET-1 (30 pmol; Figura 6A), mas potencializou em 94 % o efeito nociceptivo causado pelo peptídeo (Figura 6B). Por outro lado, a co-injeção local do antagonista seletivo para os receptores µ opióides, CTOP (20 nmol), juntamente com ET-1 (30 pmol), foi capaz de aumentar os acessos de coceira (54 % de aumento; Figura 7A), sem contudo modificar o número de movimentos de limpeza (Figura 7B). Da mesma forma, o tratamento análogo com Nor-BNI (68 nmol), um antagonista seletivo para receptores κ opióides, potencializou em 24% os acessos de coceira induzidos por ET-1, sem alterar o número de movimentos de limpeza (Figura 7C e 7D respectivamente). A administração intradérmica de Nor-BNI causou acessos de coceira *per se* (27 acessos em média), porém, não foi capaz de induzir movimentos de limpeza por ET-1 (Figura 7C). Em contraste com os efeitos causados pelos antagonistas seletivos µ e κ, o antagonista seletivo δ opióide naltrindole (80 nmol) não alterou o número de acessos de coceira induzidos por ET-1, porém reduziu o número de movimentos de limpeza em 26% (Figura 7E e 7F, respectivamente).

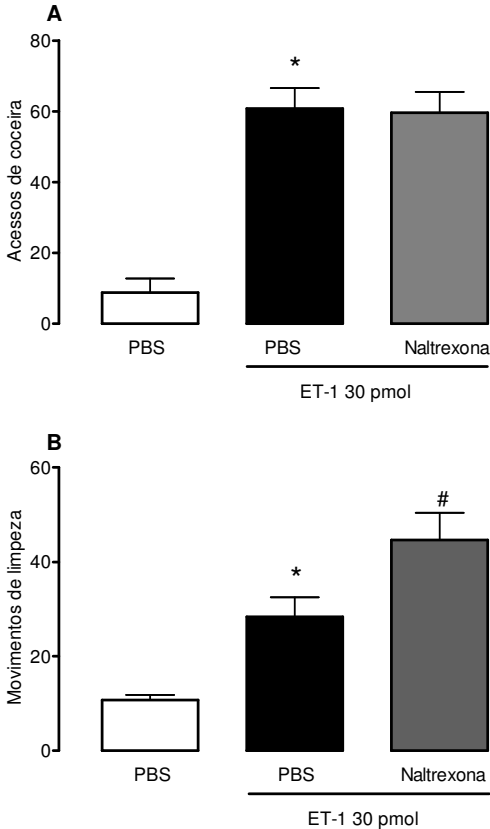


Figura 6: Influência do antagonista não seletivo de receptores opióides naltrexona sobre o comportamento de coçar (painel A) e de limpeza (painel B) induzidos por ET-1. Naltrexona (5 µg) ou PBS foi co-injetada com ET-1 (30 pmol) por via i.d. na bochecha esquerda de cada animal. O volume total das injeções foi de 20 µL. Os valores representam a média ± erro padrão da média do número de acessos de cocceira (A) ou de movimentos de limpeza (B) ($n = 6$ a 8 animais). Os asteriscos e a cerquilha denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle ou tratados com ET-1 + PBS, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

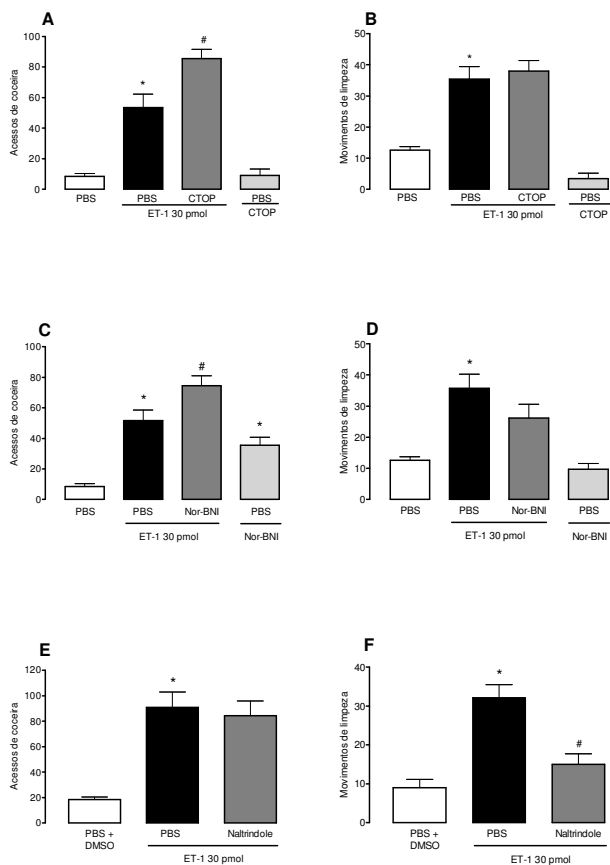


Figura 7: Influência dos antagonistas seletivos de receptores opióides μ (CTOP), κ (Nor-BNI) e δ (Naltrindole) sobre os efeitos pruritoceptivo e nociceptivo da ET-1. A figura ilustra o comportamento de coçar e movimentos de limpeza em resposta à injeção i.d. de ET-1 (PBS ou PBS + DMSO, para Naltrindole) co-administrado com CTOP (20 nmol; painéis A e B, respectivamente), Nor-BNI (68 nmol; painéis C e D, respectivamente) Naltrindole (80 nmol; painéis E e F, respectivamente). As injeções foram aplicadas na bochecha esquerda de camundongos em um volume total de 20 μ L. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira e de movimentos de limpeza nos 40 min que seguiram a injeção ($n = 6 - 8$ animais). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS ou PBS + DMSO, para Naltrindole) ou ET-1 + PBS, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Complementando esta série de experimentos, foi testado ainda o efeito da co-injeção i.d. de ET-1 juntamente com um agonista seletivo dos receptores opióides μ ou κ , DAMGO e UH-50488H, respectivamente. O DAMGO (100 nmol) reduziu os acessos de coceira em 50% (Figura 8A), bem como o número de movimentos de limpeza em 87% (Figura 8B). Já o UH-50488H (100 nmol) afetou de forma significativa somente o número de movimentos de limpeza, que foi reduzido em 36% (Figura 8A e 8B). A administração intradérmica de DAMGO (100 nmol) não promoveu alterações em nenhuma das respostas comportamentais *per se*.

Como a histamina é o mediador implicado no prurido mais estudado, verificou-se o possível envolvimento dos receptores H_1 para histamina nas respostas pruritogênicas e nociceptivas promovidas pela ET-1. O tratamento prévio sistêmico com loratadina (10 mg/kg, i.p., 1 hora antes), um antagonista de receptores H_1 , promoveu redução discreta do efeito pruritoceptivo da ET-1 (22% de inibição Figura 9A). Por outro lado, o mesmo tratamento foi capaz de reduzir mais efetivamente os movimentos de limpeza facial induzidos pela ET-1 (61% de inibição, Figura 9B).

Os mastócitos são células que têm sido implicadas na patofisiologia do prurido, uma vez que seus grânulos são ricos em histamina, serotonina e outras substâncias envolvidas em processos pruriginosos. Desta forma, foi verificada se a resposta pruritoceptiva à administração de ET-1 (30 pmol) seria acompanhada de alteração nas características da população local de mastócitos. Conforme mostram as imagens típicas de micrografias de secções da pele da bochecha de camundongos após a injeção i.d. de PBS ou de ET-1 (Figura 10 A-D) e os resultados médios dispostos na Figura 10E, a ET-1 causou aumentos significativos no número de mastócitos degranulados, de mastócitos intactos, bem como no número total destas células.

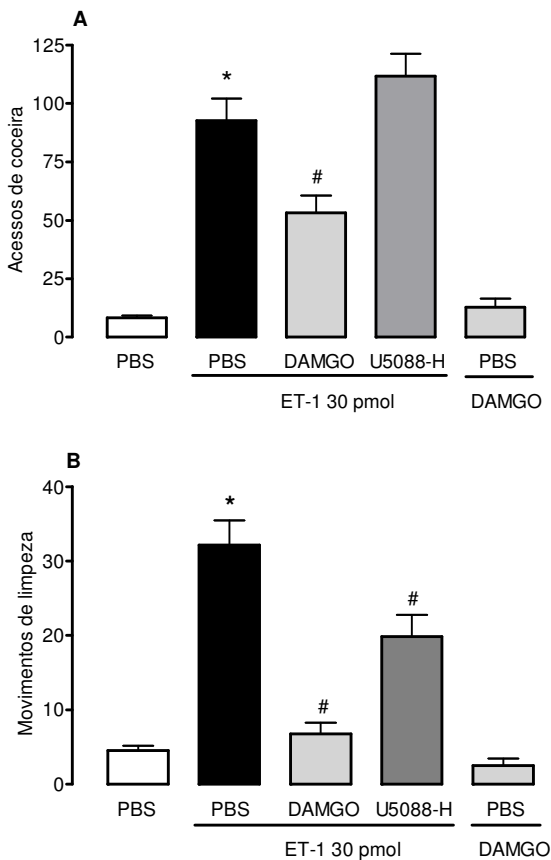


Figura 8: Influência dos agonistas seletivos para receptores opióides μ (DAMGO) e κ (U-50488H) sobre os efeitos pruritoceptivo e nociceptivo da ET-1. A figura ilustra o comportamento de coçar (painel A) e movimentos de limpeza (painel B) em resposta à injeção i.d. de ET-1 (ou PBS) co-administrado juntamente com DAMGO ou U-50488H (100 nmol em ambos os casos). Outro grupo experimental recebeu apenas DAMGO (100 nmol) co-injetado i.p. com PBS. As injeções foram aplicadas na bochecha esquerda de camundongos em um volume total de 20 μ L. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira e de movimentos de limpeza nos 40 min que seguiram a injeção ($n = 6 - 8$ animais). Asteriscos e cerquilhas indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS controle ou ET-1 + PBS, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls)

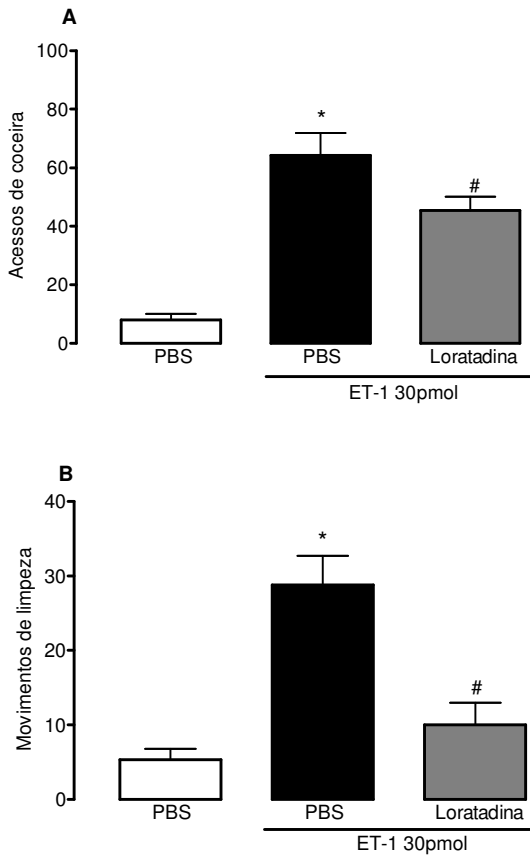


Figura 9: Influência da loratadina sobre o comportamento de coçar e movimentos de limpeza induzidos pela administração i.d. de ET-1 na bochecha de camundongos. Os Painéis A e B mostram o número de acessos de coceira e movimentos de limpeza, promovidos por ET-1 na bochecha esquerda, respectivamente. Os animais foram tratados, por via i.p. e uma hora antes da ET-1, com loratadina (10 mg/kg) ou (PBS. + Twen 7 %). Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira e de movimentos de limpeza ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Os asteriscos e a cerquilha indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com PBS ou com ET-1 + PBS, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

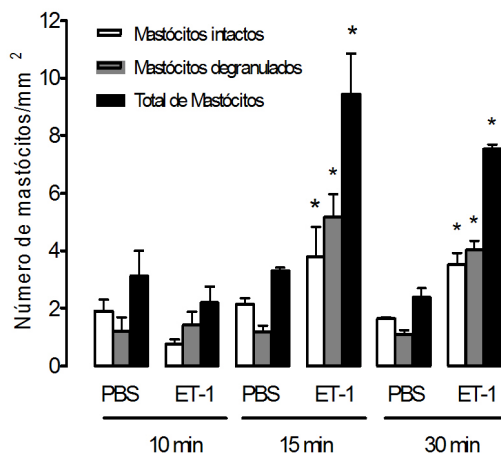
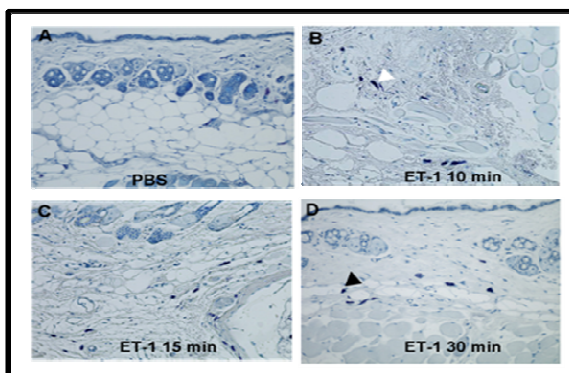


Figura 10: Efeitos da injeção intradérmica de ET-1 no número de mastócitos. Os painéis de A até D mostram o perfil histológico de micrografias ópticas de cortes da pele da bochecha de camundongos após injeção i.d. de PBS, ou 10, 15 e 30 minutos após administração similar de ET-1 (30 pmol), respectivamente. A cabeça de seta branca no painel B identifica um mastócito degranulado. A cabeça de seta preta no painel D identifica um mastócito intacto. O painel E mostra os números médios de mastócitos intactos ou degranulados, bem como o total de mastócitos aos 10, 15 ou 30 min da injeção. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de células encontradas ($n = 6$ a 8 animais). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS correspondente (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls).

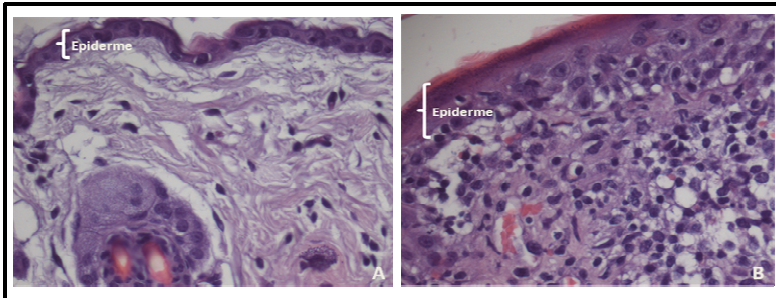


Figura 11: Modificações histológicas após exposições repetidas ao TMA. Os painéis de (A) e (B) mostram o perfil histológico de micrografias ópticas de cortes da pele da bochecha de camundongos, 24 horas após a 3^o re-exposição ao TMA 5% ou veículo do TMA (8^o dia do protocolo experimental), respectivamente. A chave branca nos painéis identifica a espessura da epiderme.

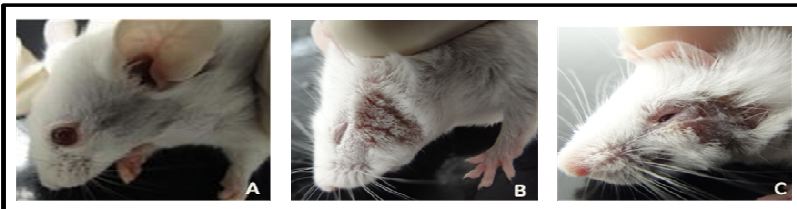


Figura 12: Alterações morfológicas externas após exposições repetidas ao TMA. O painel de (A) mostram o perfil morfológico da pele da bochecha de camundongos após tratamento tópico com o veículo do TMA (acetona e miristato de isopropila, 4:1). Os Painéis (B) e (C) mostram a morfologia da pele após a 3^a e a 7^a re-exposição ao TMA (8^o e 11^o dias do protocolo experimental).

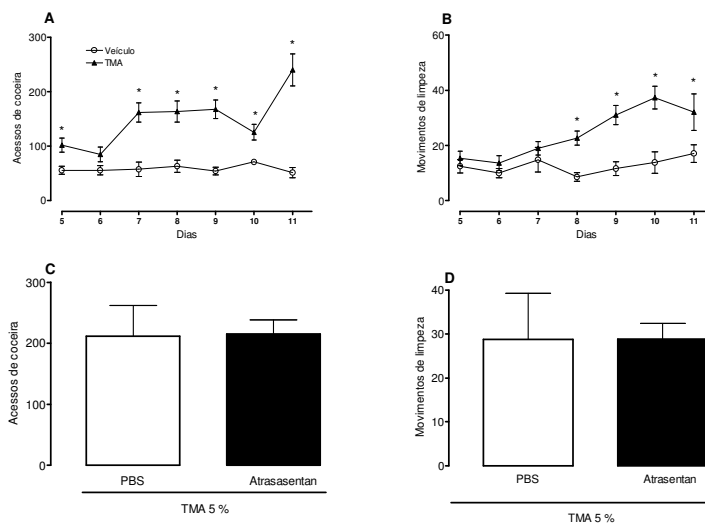


Figura 13: Influência do tratamento com antagonistas de receptores ET_A sobre os acessos de coceira e movimentos de limpeza induzidos por TMA. Os painéis (A) e (B) mostram o número de acessos de coceira ou movimentos de limpeza, após os desafios diários com TMA 5 %, respectivamente. Os painéis (C) e (D) mostram o número de acessos de coceira ou movimentos de limpeza após administração i.p. de atrasentan (10 mg/kg) ou PBS, uma hora antes do sétimo desafio (11° dia) com TMA 5 %. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de acessos de coceira ou movimentos de limpeza observados na primeira hora após a aplicação tópica de TMA 5 % ($n = 6 - 8$ animais por grupo). Asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com veículo (acetona e miristato de isopropila, 4:1) (ANOVA de uma via com medidas repetidas).

Em um grupo final de experimentos, investigou-se a possível participação do sistema das endotelinas na coceira e nocicepção associadas ao modelo de dermatite atópica causada por TMA. Neste modelo, a bochecha esquerda do animal é tratada topicamente com TMA 5%. A partir do quinto dia, a bochecha foi desafiada, diariamente, com a mesma dose do composto. Conforme ilustra a Figura 11, a exposição repetida ao TMA por 3 dias induziu a modificações histológicas em cortes da pele, características de um quadro de dermatite. A Figura 12 ilustra modificações na morfologia externa da pele, também características de um quadro de dermatite, dos animais expostos repetidamente ao TMA 24 horas após o 8° e 11° dias (Figura 12B e 12C, respectivamente). Observou-se que os números de acessos de coceira e de movimentos de limpeza facial aumentam proporcionalmente à quantidade de re-exposições ao TMA, sendo que o aumento da incidência do comportamento pruritoceptivo parece anteceder o do comportamento nociceptivo (Figura 13A e 13B). A administração i.p. de um antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_A para endotelinas, o atrasentan (10 mg/kg), uma hora antes do sétimo desafio diário com TMA (11° dia do protocolo), não foi efetivo em reduzir quaisquer dos dois comportamentos avaliados durante primeira hora após o desafio (Figura 13C e 13D).

5. DISCUSSÃO

O primeiro objetivo do trabalho foi o de reproduzir o modelo descrito por Shimada e Lamotte (2008), o qual utiliza a bochecha de camundongos como sítio de administração de substâncias pruritogênicas ou algogênicas a fim de diferenciar respostas comportamentais pruriginosas de nociceptivas. Os resultados que foram obtidos confirmaram que a injeção i.d. de histamina na bochecha foi capaz de induzir acessos de coceira com a pata traseira de maneira dose - dependente, em doses que não causaram movimentos de limpeza facial com a pata dianteira dirigidas ao mesmo local. Ao contrário, a capsaicina, quando injetada na bochecha mostrou ser capaz de causar movimentos de limpeza facial de maneira dependente da dose sem induzir acessos de coceira.

Além de Shimada e Lamotte (2008), recentemente Akiyama et al., (2010), utilizaram este mesmo modelo para avaliar as respostas comportamentais evocadas por diferentes substâncias pruritogênicas e algogênicas. Neste trabalho os autores, além de testarem histamina e capsaicina, observaram que mediadores pruritogênicos como serotonina, espículas de *Mucuna pruriens* (*cowhage*), e agonistas de receptores PAR₂ e PAR₄, causaram acessos de coceira de maneira dose-dependente e poucos movimentos de limpeza facial. Em contraste, mediadores algogênicos como a bradicinina, promoveram movimentos de limpeza facial de maneira dose dependente e poucos acessos de coceira. Surpreendentemente, a formalina reconhecida por evocar uma resposta comportamental sugestiva de nocicepção, quando administrada na pata de camundongos, neste modelo, causou mais acessos de coceira do que movimentos de limpeza facial. Desta forma, nossos resultados, associados aos dados da literatura, demonstram que, além de ser reprodutível o modelo experimental desenvolvido por Shimada e Lamotte (2008), é capaz de diferenciar de maneira clara e precisa respostas comportamentais distintas para as sensações de dor ou coceira.

Ward et al., (1996) observaram , em voluntários, que a nocicepção é capaz de interferir na percepção da sensação pruriginosa, reduzindo-a, mas a sensação pruriginosa não afetou a nocicepção. Nossos experimentos, utilizando o modelo de Shimada e Lamotte (2008), parecem comprovar que a sensação pruriginosa interfere na resposta pruritoceptiva dos comundongos pois, ao co-administrarmos histamina e capsaicina, observamos que a capsaicina foi capaz de reduzir a resposta pruritogênica. Contudo a histamina reduziu a resposta

nociceptiva a capsaicina, quando são comparadas as respostas produzidas pela combinação àquelas induzidas por estas drogas isoladamente.

De modo interessante, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a administração intradérmica de ET-1 no dorso de camundongos foi capaz de induzir acessos de coceira sugestivos de efeito pruriginoso (Trentin et al., 2006). No entanto, como a ET-1 é um mediador peptídico conhecido tanto por suas ações pruritogênicas quanto nociceptivas, nos sentimos instigados a estudar as ações da ET-1 neste novo modelo. Nossos resultados demonstram que a ET-1 foi capaz de induzir tanto acessos de coceira com a pata traseira quanto movimentos de limpeza facial com a pata dianteira, quando injetada por via intradérmica na bochecha esquerda de camundongos. Estes resultados somam-se aos dados da literatura que demonstraram que ET-1 é capaz de induzir acessos de coceira de maneira dose - dependente quando administrada por via i.d. no dorso de camundongos (McQueen et al., 2007; Liang et al., 2010).

Trabalhos realizados até o momento comprovam que a coceira causada por ET-1 é mediada por receptores ET_A , uma vez que o bloqueio desses receptores com antagonistas seletivos foi capaz de inibir os acessos de coceira. Diferentemente, o bloqueio dos receptores ET_B potencializou a resposta pruritogênica de ET-1, indicando um possível papel antipruriginoso desses receptores (Trentin et al., 2006; Liang et al., 2009). Ademais, também foi demonstrado que o prurido causado por ET-1 através da ativação de receptores ET_A requer a participação de PKC por via adenil ciclase e pode ser reduzido pela inibição de fosfolipase C. Contribuindo com esses estudos, Iamamachi et al., (2009) demonstraram que o prurido elicitado por ET-1 no dorso de camundongos não dependem da ativação de um tipo específico de fosfolipase C, a isoforma β_3 . Curiosamente, estes autores também observaram que canais TRPV1 embora presentes nas fibras sensoriais periféricas implicadas na ação pruriginosa de ET-1, não participam na mediação deste efeito.

Nossos resultados indicaram que os acessos de coceira induzidos foram prevenidos pelo tratamento local com BQ-123 (antagonista seletivo de receptores ET_A), indicando o importante papel dos receptores ET_A nesta resposta. Além disso, a administração local de BQ-788 (antagonista seletivo de receptores ET_B) aumentou pronunciadamente o número de acessos de coceira induzidos pela ET-1. Estes resultados reforçam a importância primordial dos

receptores ET_A na mediação da coceira e evidenciam o papel antipruriginoso dos receptores ET_B .

Dados da literatura demonstram que a estimulação dos receptores ET_A causa nociceção por via de sinalização celular que envolve a abertura de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (TTX) ativação de canais TRPV1 e por eventos intracelulares como a ativação de PKC (Plant et al., 2007; Motta et al., 2009). Além disso, é importante ressaltar, que esta ativação de canais TRPV1, via receptores ET_A , também pode ocorrer no sistema trigeminal, onde foi observada a co-localização dos canais TRPV1 em neurônios que expressam receptores endotelinérgicos ET_A ou ET_B (Chichorro et al., 2010).

Apesar dos receptores ET_A serem primordiais na nociceção induzida por ET-1, nossos resultados demonstraram que a administração local de BQ-123 não foi capaz de reduzir o número de movimentos de limpeza induzidos pelo peptídeo. Na sequência, ao estudarmos o antagonismo do receptor ET_B na nociceção, verificamos que a utilização do BQ-788 causou aumento na resposta nociceptiva à ET-1. Mediante esse resultado realizamos o experimento de co-administração de BQ-123 + BQ-788, o qual preveniu o aumento da nociceção induzida por BQ-788, demonstrando, desta forma, a importância dos receptores ET_A no processo nociceptivo. Dessa forma, acreditamos que, na região facial, o bloqueio dos receptores ET_B promove uma resposta hipernociceptiva à ET-1 possivelmente resultante da ativação dos receptores ET_A , possivelmente por supressão da analgesia periférica por ativação dos receptores ET_B (Khodorova et al., 2003; Verri et al., 2006).

O sistema opióide endógeno na pele inclui a expressão dos receptores opióides (μ , κ e δ) e de peptídeos opióides como encefalinas, endorfinas, dinorfinas e endomorfina, presentes em células epidérmicas como queratinócitos e fibras sensoriais periféricas (Kieffer BL e Gaveriaux-Ruff C, 2002). Alguns integrantes deste sistema parecem estar intimamente relacionado com o sistema de endotelinas pois, Khodorova et al., (2003) demonstraram a co-localização de receptores ET_B e β -endorfina em queratinócitos, adjacentes a terminações de fibras sensoriais nociceptivas na superfície plantar da pata de ratos. Ademais, o mesmo estudo mostrou que a ativação dos receptores ET_B desencadeia a liberação de β -endorfina de queratinócitos a qual interage com receptores opióides acoplados a canais de potássio sendo capazes de suprimir a nociceção causada por ET-1. Estes dados podem ser correlacionados com nossos resultados, que demonstram a potencialização do efeito nociceptivo da ET-1 pelo bloqueio seletivo de

receptores ET_B com BQ-788. Por outro lado, outros estudos demonstram que os receptores ET_B também podem desempenhar um papel pronociceptivo e hiperalgésico no sistema trigeminal de ratos (Motta et al., 2009; Chichorro et al., 2009).

Com o intuito de estudar o possível papel do sistema opióide na modulação das respostas comportamentais pruritoceptivas e nociceptivas promovidas por ET-1, no modelo experimental utilizado neste estudo, verificamos a ação de alguns antagonistas e agonistas opióides. Nossos resultados demonstraram que a co-injeção local i.d. de naltrexona (antagonista não - seletivo de receptores opióides) com ET-1, não foi capaz de alterar os acessos de coceira. Contudo, recentemente Akiyama et al., (2010) utilizando o mesmo modelo descrito por Shimada e Lamotte, (2008) evidenciaram que o mesmo antagonista administrado por via i.p. foi capaz de inibir os poucos acessos de coceira provocados por capsaicina e aqueles promovidos por histamina, agonista PAR_2 , agonista PAR_4 . Provavelmente, o fato da naltrexona não ter alterado os acessos de coceira promovidos por ET-1 em nosso estudo, pode estar relacionado com a via de administração utilizada.

A possível modulação dos receptores μ opióides no prurido induzido por ET-1 foi avaliada em dois grupos experimentais diferente; um tratado com antagonista seletivo e outro com agonista seletivo deste subtipo de receptor. Dessa maneira, a co-injeção local de ET-1 com o antagonista CTOP promoveu aumento no número de acessos de coceira; diferentemente do agonista seletivo μ DAMGO que foi capaz de reduzir o efeito pruritogênico da ET-1. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a administração i.d. de ET-1 disponibiliza este peptídeo junto às células epidérmicas e desta forma, ET-1 pode ativar receptores ET_B presentes em queratinócitos, promovendo a liberação de β -endorfina que por sua vez poderia estar limitando o efeito pruritogênico, da mesma forma pela qual limita a resposta nociceptiva já descrita por Khodorova e colaboradores, (2003). Embora, em um estudo recente Yamamoto e Sugimoto, (2010) tenham demonstrado que o agonista μ opióide, DAMGO (100 nmol), fosse capaz de causar comportamento de coçar quando administrado no dorso de camundongos, no modelo experimental utilizado em nosso estudo, este mesmo agonista, na mesma dose, não teve efeito pruritogênico.

Alguns estudos tem apontado um efeito antipruritogênico dos receptores κ opióides. Um agonista seletivo dos receptores κ opióides, o nalfurafine (agonista seletivo κ) previne a coceira causada por 5'-guanidinonaltrindole um antagonista seletivo κ (Kamei e Nagase,

2001). Além disso, o U-50488H outro agonista seletivo κ também conseguiu reverter o prurido causado, por Nor-BNI outro antagonista seletivo κ e por DAMGO, um agonista seletivo de receptores μ opióide, (Yamamoto e Sugimoto, 2010; Inan et al., 2009). Entretanto, o papel dos receptores κ na coceira induzida por ET-1, foi paradoxal em nosso estudo quando comparado com os dados da literatura. Apesar do antagonista Nor-BNI ter aumentado o número de acessos de coceira promovidos pela co-injeção local com ET-1 (o que confirmou os dados da literatura), inesperadamente, o agonista seletivo U-50488H na respectiva dose utilizada, não alterou a resposta comportamental. A respeito dos receptores δ opióides, nossos resultados indicam que estes parecem não estar relacionados com o efeito pruritogênico da ET-1, visto que o antagonista seletivo para estes receptores o naltrindole, não alterou os acessos de coceira induzidos por ET-1.

Diferentemente da resposta observada para o prurido, a resposta nociceptiva à ET-1 foi potencializada pela co-injeção local de naltrexona juntamente com ET-1. Estes resultados podem sugerir que o bloqueio concomitante de ambos os receptores μ ou κ opióides pela naltrexona é capaz de prevenir a analgesia promovida pela ativação de receptores ET_B localizados em queratinócitos, como descrito por Khodorova et al., (2003). Porém, diferentemente do demonstrado pelo trabalho citado anteriormente, a co-injeção local dos antagonistas seletivos μ ou κ , na dose utilizada, não alterou a resposta nociceptiva induzida por ET-1. Contudo este resultado não exclui a participação de ambos os receptores opióides na nocicepção induzida por ET-1 neste modelo, pois a co-administração local do agonista seletivo μ (DAMGO) inibiu os movimentos de limpeza facial induzidos por ET-1 e também o agonista κ (U-50488H) foi capaz de reduzir parcialmente a resposta.

Inesperadamente, ao investigarmos neste modelo a via de sinalização δ opióide, observamos que a co-injeção local de naltrindole (antagonista seletivo δ opióide) com ET-1 reduziu a resposta nociceptiva. Pelo fato de não existirem dados na literatura indicando que a ativação destes receptores pode causar nocicepção, pode-se sugerir que, talvez, o efeito antinociceptivo observado em nossos resultados, com o bloqueio dos receptores δ , decorra da ativação de receptores opióides μ e κ por opióides endógenos (Machelska, 2007), liberados de queratinócitos, mediante a ação direta de ET-1 sobre receptores ET_B localizados nestas células. Esta especulação pode ser reforçada por nossos resultados, já comentados anteriormente, em que a co-administração i.d dos agonistas seletivos para os receptores μ e κ

opióides com ET-1, causou um efeito analgésico sobre a nocicepção induzida pelo peptídeo. Ademais, esses dados, podem ser correlacionados com os resultados obtidos por Akiyama e colaboradores, (2010), utilizando o mesmo modelo experimental adotado em nosso estudo, estes autores observaram que a administração sistêmica de morfina, foi capaz de inibir a resposta nociceptiva à capsaicina, que a exemplo da ET-1, induz nocicepção via ativação de receptores TRPV1 em fibras trigeminiais (Chichorro, et al., 2010).

Conforme descrito na introdução, dor e prurido são resultantes da ativação de terminações nervosas livres que podem ser ou não compartilhadas para a transmissão das respectivas sensações. Este aspecto depende essencialmente não só do tipo de mediador pruritogênico ou algogênico envolvido, mas também da localização e dos tipos de fibras sensoriais. Tem sido demonstrado, que em camundongos, neurônios da região superficial da medula espinhal respondem tanto à histamina, quando a agonistas PAR₂ e capsaicina (Akiyama et al., 2009). A presença de neurônios com este perfil sugere que capsaicina (mediador algogênico clássico) seja capaz de produzir não somente dor, mas comportamento de coceira. Desse modo, em experimentos futuros será de extrema importância determinar se existem populações separadas de neurônios no subnúcleo caudal trigeminal, que passam a responder seletivamente as substâncias pruritogênicas ou algogênicas injetadas na bochecha de camundongos.

Sabe-se que a histamina é um importante mediador do prurido e exerce suas ações principalmente através dos receptores H₁ presentes em subpopulações específicas de fibras C (Thurmond et al., 2008). O envolvimento da histamina no prurido é confirmado pela ação antipruriginosa de anti-histamínicos, H₁ clássicos, como a loratadina e a cetirizina os quais são a opção mais comum de tratamento, apesar de em alguns casos, como na urticária crônica, doses até quatro vezes maiores que a regular não serem efetivas (Zurbier et al., 2009; Metz et al., 2010). Observamos no presente estudo que o comportamento pruriginoso induzido pela ET-1 foi discretamente reduzido pelo pré-tratamento com a loratadina um potente antagonista de receptores H₁.

Dados da literatura descrevem que a ET-1 é capaz de degranular mastócitos provenientes da medula óssea, da pele fetal ou da cavidade peritoneal de camundongos, sendo que esta ação parece ser mediada pela ativação de receptores ET_A e ET_B presentes nestas células (Yamamura et al., 1995; Matsushima et al., 2004). Além disso, através de testes *in vitro*, em que mensurando a liberação de serotonina, Metz e

colaboradores, (2007), demonstraram que mastócitos provenientes da pele de camundongos sofrem degranulação quinze minutos após a estimulação com ET-1, e esta ação foi inibida de maneira dose-dependente pelos antagonistas peptídicos seletivos para receptores ET_A (BQ-123) e ET_B (BQ-788). Ainda, estes autores observaram intensa degranulação de mastócitos em cortes de pele de camundongo seis horas após a administração i.d. de ET-1. Estes dados podem ser correlacionados com nossos resultados, nos quais observamos um aumento temporal na degranulação destas células em 15 e 30 minutos após a injeção i.d de ET-1 na bochecha de camundongo.

Quando procuramos na literatura científica trabalhos associados a migração de mastócitos nos deparamos muitas vezes, com estudos relacionados à ativação e degranulação como o reportado anteriormente. Essa capacidade de recrutamento de mastócitos foi reportada recentemente por Nguyen e colaboradores (2011), neste trabalho foi demonstrado que o aumento de citocinas inflamatórias é responsável por induzir a migração de mastócitos após noventa minutos de exposição a luz UVB, na pele de pacientes com lupus eritematoso. Contudo a migração de mastócitos pode ocorrer de acordo com o agente inflamatório envolvido. Aung et al., (2010), demonstraram que a catestatina, um peptídeo neuroendócrino com ação antimicrobiana, encontrada principalmente em queratinócitos da pele humana, é capaz de induzir a migração e degranulação de mastócitos após noventa minutos de estimulação com este neuropeptídeo.

Frente à ação da ET-1, tem sido sugerido que parte dos seus efeitos pró-inflamatórios na pele estejam diretamente relacionados com a presença de mastócitos. Metz e colaboradores 2006, demonstraram que animais nocautes para mastócitos, apresentaram significativa redução do edema de orelha, uma hora depois da administração intradérmica de ET-1. Nossos resultados demonstraram que, há um aumento temporal na migração de mastócitos após 15 e 30 minutos da injeção i.d de ET-1 na bochecha de camundongo. O recrutamento destas células 15 minutos após a injeção i.d. de ET-1, parece ser muito mais rápido do que os tempos até então referidos após a exposição a outros mediadores inflamatórios. Este dado nos faz pensar na importância deste peptídeo e a sua extrema relação com a migração celular, principalmente, no recrutamento de mastócitos.

Dessa forma sugerimos que a resposta de acessos de coceira causada por ET-1 na bochecha de camundongos seja dependente de mastócitos e mediada, ao menos em parte, pela histamina, pois

conforme já comentado na introdução, os mastócitos também sintetizam e liberam outros mediadores como, serotonina e leucotrieno B₄, os quais estão associados á indução de prurido (Andoh et al., 2001).

O comportamento nociceptivo induzido por ET-1 na face foi significativamente reduzido pelo tratamento prévio com loratadina. Estes dados correlacionam-se com estudos anteriores realizados em nosso grupo, no qual Frighetto, (2004) demonstrou que o efeito nociceptivo hiperalgésico (à dor causada por capsaicina) e edematogênica da injeção de ET-1 na superfície plantar da pata de camundongos foram todas bloqueadas pela pirlamina (antagonista seletivo de receptores H₁), bem como após depleção da população local de mastócitos com injeções repetidas de composto 48/80. Além disso, a resposta nociceptiva induzida por injeção de ovalbumina na pata de camundongos sensibilizados ao antígeno demonstrou ser mediada em grande parte por endotelinas e também foi prevenida por injeções repetidas do composto 48/80 (Piovezan et al., 2004). Assim, quando relacionados com os dados da literatura descritos acima, nossos resultados sugerem que semelhante ao que ocorre com coceira, o comportamento nociceptivo induzido por injeções intradérmicas de ET-1 na bochecha de camundongos, pode ser dependente de mastócitos e mediado por histamina.

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória de pele comum e de grande interesse na dermatologia clínica, especialmente por ser prevalente em países industrializados e afeta principalmente crianças (20%). Sua sintomatologia é caracterizada por prurido intenso e inflamação crônica da pele, que pode ocorrer devido a fatores genéticos, hiper-reatividade cutânea a fatores ambientais ou alterações imunológicas (Homey et al., 2006). Pelo fato das terapias existentes ainda serem insatisfatórias, faz-se necessária a utilização de modelos animais que consigam reproduzir as características fisiopatológicas macroscópicas, microscópicas, a participação de diferentes células do sistema imune (linfócitos T, eosinófilos, mastócitos), a expressão de citocinas TH₂, o aumento nos níveis de IgE e a cronicidade (Homey et al., 2006).

O modelo que utiliza o TMA (anidrido trimelítico), um agente sensibilizador de vias aéreas, como indutor de dermatite atópica é capaz de desencadear reações cutâneas em camundongos associadas à infiltração de eosinófilos, produção de citocinas TH₂ e aumento nos níveis de imunoglobulina E (IgE), ou seja, consegue mimetizar as

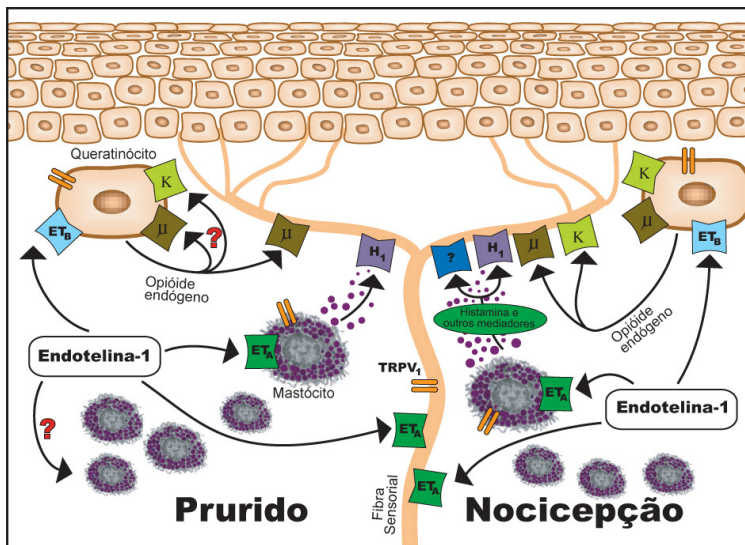
características fisiopatológicas mais importantes da DA (Dearmam et al., 2002).

Há algum tempo estudos vem caracterizando a participação da ET-1 em diferentes patologias que afetam a pele, demonstrando que o peptídeo pode contribuir para estimulação de melanócitos, induzindo uma resposta inflamatória na pele de camundongos após radiação por UV-B, que está associada ao aumento na expressão de ET-1 e seus receptores ET_A e ET_B (Imokawa et al., 1995; Ahn et al., 1998). Ademais, Metz et al., (2006), demonstraram que a resposta inflamatória de pele provocada por luz UV-B é parcialmente dependente de ET-1 e mastócitos. Mediante esses dados, em nosso estudo, nos preocupamos em avaliar se haveria alguma participação do sistema das endotelinas na coceira e na nocicepção associadas ao modelo de dermatite atópica causada por TMA.

Observamos que a re-exposição ao TMA por 3 dias induziu modificações histológicas em cortes da pele características de um quadro de dermatite, conforme descrito por Schneider et al., (2008). Além disso, os números de acessos de coceira e de movimentos de limpeza facial aumentaram proporcionalmente à quantidade de exposições ao TMA, sendo que o aumento da incidência do comportamento pruritoceptivo parece anteceder o do comportamento nociceptivo. Porém, a administração i.p. de atrasentan (antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_A para endotelinas), uma hora antes do sétimo desafio diário com TMA, não foi efetivo em reduzir quaisquer dos comportamentos avaliados durante a primeira hora.

Apesar de negativo, este resultado não descarta, a possível participação do sistema de endotelinas no modelo de dermatite atópica causada por TMA. A inefetividade do tratamento com atrasentan pode ter ocorrido pelo fato de que o protocolo experimental por nós adaptado, re-expôs os animais muitas vezes ao TMA (sete desafios diários), sem que houvesse diminuição na concentração utilizada. Desta forma, acreditamos que tenhamos induzido um processo inflamatório exacerbado, mais intenso do que o referido por Schneider et al., (2008), o qual provavelmente dificultou a demonstração de efeitos significativos do antagonista utilizado. Talvez nosso protocolo de tratamento com atrasentan escolhido pode ter sido inadequado. No entanto destacamos que até o momento, esta foi a primeira vez em que o comportamento de coceira e nocicepção foi investigado no modelo de DA por TMA.

Em conclusão, este estudo reproduziu e confirmou o modelo experimental descrito por Shimada e Lamotte, (2008) que distingue o comportamento sugestivo de prurido do de nocicepção. Através da padronização deste modelo foi possível a diferenciação e a quantificação das respostas pruritoceptivas e nociceptivas induzidas por ET-1. Ademais evidenciamos também que os comportamentos induzidos pela ET-1 na bochecha de camundongos são mediados principalmente pela ativação de receptores ET_A, provavelmente localizados em fibras sensoriais presentes na derme, e limitados por receptores ET_B, possivelmente presentes em queratinócitos. Esses achados provavelmente estão relacionados à liberação local de opióides endógenos os quais podem estar agindo preferencialmente em receptores μ e κ opióides. A injeção intradérmica de ET-1 na bochecha de camundongos mostrou ser capaz de induzir a degranulação e migração de mastócitos. Adicionalmente, as resposta pruritoceptiva e nociceptivas parecem ser e mediadas, pelo menos em parte, por histamina. Este trabalho tentou pela primeira vez avaliar a participação da endotelina em um modelo de DA, pois é conhecida na literatura a participação da ET-1 na inflamação de pele induzida por UV-B. Contudo, embora os resultados tenham sido negativos, a investigação da participação do sistema de endotelinas na DA induzida por TMA necessita de outros experimentos, que tenham em vista a identificar o momento mais apropriado para a avaliação das respostas comportamentais e uma possível intervenção terapêutica baseada no sistema endotelinérgico.



Esquema 2: Representação esquemática do possível mecanismo de indução das respostas pruritoceptivas e nociceptivas pela ET-1, quando administrada por via intradérmica na bochecha de camundongos. Os receptores ET_A localizados em fibras sensoriais são ativados por endotelina-1 promovendo prurido e nocicepção. Os receptores ET_B são ativados por endotelina-1 e induzem a liberação de opióides endógenos de queratinócitos. Os receptores μ - opióides, localizados em fibras sensoriais, causam um efeito antipruriginoso e antinociceptivo, quando ativado por opióides endógenos liberados de queratinócitos, via ativação de receptores ET_B por ET-1. O receptor κ - opióide, localizado na fibra sensorial, causa um efeito antinociceptivo quando ativado por opióides endógenos, liberados de queratinócitos. Os receptores μ e κ também são encontrados em queratinócitos. A Endotelina-1 parece estimular a migração de mastócitos. Além de induzir a degranulação destas células por ativar receptores ET_A. Além da histamina outros mediadores liberados de mastócitos, podem ativar receptores seus respectivos receptores localizados nas fibras sensoriais, contribuindo para o prurido e nocicepção causados por endotelina-1. Os canais TRPV₁, são encontrados em fibras sensoriais, podendo ser ativados por endotelina-1, via receptores ET_A. Estes canais também estão presentes em queratinócitos e mastócitos.

6. CONCLUSÕES

Com base neste trabalho foi possível concluir que:

- O modelo experimental descrito por Shimada e Lamotte (2008), distingue prurido de nocicepção.
- Através da utilização do modelo descrito por Shimada e Lamotte (2008) é possível distinguir as respostas comportamentais induzidas por ET-1, pruriginosas de nociceptivas, bem como quantificá-las.
- As respostas comportamentais pruritoceptivas ou nociceptivas induzidas por ET-1 na bochecha de camundongos são mediadas pela ativação de receptores ET_A, provavelmente localizados em fibras sensoriais presentes na derme.
- A ação da ET-1 sobre os receptores ET_B, possivelmente presentes em queratinócitos, promove um efeito antinociceptivo e antipruriginoso, provavelmente por induzir à liberação local de opióides endógenos, que podem estar agindo preferencialmente em receptores μ e κ opióide localizados em fibras sensoriais periféricas.
- A ET-1 parece ser capaz não só de promover a degranulação de mastócitos residentes na derme da pele da bochecha de camundongos, mas também de induzir a migração destas células para este local.
- O mecanismo envolvido na gênese das respostas comportamentais induzidas pela ET-1 na face de camundongos parecem ser, mediados por mastócitos e dependentes, ao menos em parte, da liberação de histamina.
- Outros experimentos ainda são necessários para caracterizar o papel funcional do sistema endotelinérgico, na dermatite atópica induzida por TMA.

7. REFERÊNCIAS

Ahn GY, Butt KI, Jindo T, Yaguch H, Tsuboi R, Ogawa H. The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increase after ultraviolet - B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alfa. **J. Dermatol.**, 25: 78-84, 1998.

Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Excitation of mouse superficial dorsal horn neurons by histamine and/or PAR₂ agonist: Potential role in itch: **J. Neurophysiol.**, 102: 2176-2183, 2009.

Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Differential itch – and – pain – related behavioral responses and μ -opioid modulation in mice. **Acta. Derm. Venereol.**, 90: 575-581, 2010.

Akihiko I, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, and Schmelz M. The neurobiology of itch. **Nat. Neurosci. Rev.**, 7: 535-546, 2006.

Almeida TF, Roizenblatt S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.

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

Andoh T, Katsube N, Maruyama M, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ in substance P - induced itch - associated response in mice. **J. Invest. Dermatol.**, 117: 1621-1626, 2001.

Ashida Y, Denda M, Hirao T. Histamine, H1 and H2 receptor antagonist accelerate skin barrier repair and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption in dry environment. **J. Invest. Dermatol.**, 116: 261-265, 2001.

Aung G, Niyonsaba HU, Kajiwarra HS, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. **Immunology**, doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03395.x, 2010.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, and Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 139: 267-284, 2009.

Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobroi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. **Biochim. Biophys. Acta**, 8: 1004-1021, 2007.

Calvert G, Spense C, Stein BE. **The Handbook of Multisensory Processing. Mit Press, Cambridge, MA, 2004.**

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-24, 1997.

Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu. Rev. Neurosci.**, 24: 487- 517, 2001.

Chichorro J, Zampronio AR, Cabrini DA, Franco CR, Rae GA. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contributed to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides.**, 43: 133-142, 2009.

Chichorro JG, Fiuza CR, Claudino RF, Leite DF, Rae GA. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: Role ETA and ETB receptors. **Brain Res.**, 1345: 73-83, 2010.

Clough GF, Boutsouk P, Church MK. Comparison of effects of lecoceterizine and loratadine on histamine-induced wheal, flare and itch in humans skin. **Allergy**, 56: 985-988, 2001.

Costa R, Marotta DM, Manjavachi MN, Fernandes ES, Lima – Garcia JF, Paszcku AG, Quintão NL, Juliano L, Brain SD, Calixto JB. Evidence for the role neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behavior in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 154: 1094-1013, 2008.

Costa R, Manjavachi MN, Motta EM, Juliano L, Torres HA, Perqueiro JB, Calixto JB. The Role of kinin B1 and B2 receptors in scratching behavior induced by proteases activated receptor-2 agonist in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 159: 888-897, 2010.

Craig AD, Andrew D. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. **Nat. Neurosci.**, 4: 74-77, 2001.

Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simon DA, Gieller GJ Jr. The itch producing agents histamine and cowhage activate population of primate spinothalamic tract neuron. **J. Neurosci.**, 27: 1007-1014, 2007.

Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. **Handb. Exp. Pharmacol.**, 176: 295-329, 2006.

Dearman RJ, Warbrick EV, Skinner R, Kimber I. Classification of chemical allergens according to cytokine secretion profiles of murine lymphonod cells. **J. Appl. Toxicol.**, 17: 53-62, 2002.

Dubrac S, Schmith M, Ebner S. Atopic dermatitis: The role of langerhans cells in disease pathogenesis. **Immunol. Cell. biol.**, 4: 400-409, 2010.

Ferreira SH, Romitelli M, De Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 5: 220-222, 1989.

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

Hafenreffer S. In: Nosodochium, in quo cutis, eique adaerentium partium, affectus omnes, singulari methodo, et cognoscendi e curandi fidelissime traduntur. **Kuhnen.**, 98–102, 1660.

Han SK, Mancino V, Simom MI. Phosoholipase C β_3 mediates scratching response activated by the histamine H₁ receptor on C-fiber nociceptive neurons. **Neuron.**, 52: 691-703, 2006.

Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leund D. Citokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 118: 178-189, 2006.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102: 3093-3098, 2005.

Ikoma A, Handwerker H, Mijach e Schemelz M. Electrically evoked itch in humana. **Pain**, 113: 148-154, 2005.

Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. **Nat. Rev.**, 7: 535-547, 2006.

Imamachi N, Goon Hp, Hyosang L, Anderson JD, Simon MI, Basbaum AI, Han SK. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. **PNAS.**, 106: 11330-11335, 2009.

Imokawa G, Myagshi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. **J. Dermatol.**, 105: 32-37, 1995.

Inan S, Dun NJ, Cowan A. Nalfurafine prevents 5'-guanidinonaltrindole and compound 48/80-induced spinal c-fos expression and attenuates 5'-guanidinonaltrindole-elicited scratching behavior in mice. **Neurosci.**, 163: 23-33, 2009.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413: 203-210, 2001.

Kalesnikoff J, Galli J. New developments in mast cells biology. **Nat. Immunol.**, 9: 1215-1223, 2008.

Kamei J e Nagase H. Norbinaltorphimine, a selective κ -opioid receptor antagonist, induces an itch-associate response in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 418: 141-145, 2001.

Khodorova A, Fareed MU, Gokin A, Strichartz GR, Davar G. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1 induced pain like behavioral and excitation of nociceptors in naloxone-sensitive manner. **J. Neurosci.**, 22: 7788-7796, 2002.

Khodorova A, Navarro B, Jouvalle SL, Murphy JE, Rice F, Mazurkiewicz JE, Woodward DL, Stoffel M, Strichartz GR, Yukananov R, Davar G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat. Med.**, 9: 1055-1061, 2003.

Khodorova A, Montmayeur JP, Strichartz G. Endothelin receptors and pain. **J. Pain**, 10: 4-28, 2009.

Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. **Prog. Neurobiol.**, 66: 285-306, 2002.

Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 75: 229-233, 1995.

Liang T, Kawmata T, Ji W. Molecular signaling of pruritus induced by endothelin-1 mice. **Exp. Biol. Med.**, 235: 1300-1305, 2010.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. **The Lancet.**, 353: 1607-1609, 1999.

Machlowska H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. **Neuropeptides.**, 41: 355-363, 2007.

Masaki T. Endothelins: Homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. **Endocr. Rev.**, 14: 256-268, 1993.

Masaki T. Historical review: Endothelins. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 25: 219-224, 2004.

Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S. The effects of endothelin-1 on degranulation, cytokine, and growth factor production by skin-derived mast cells. **Eur. J. Immunol.**, 34: 1910-1909, 2004.

Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast

cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. **Nature.**, 25: 512-516, 2004.

McQueen DS, Noble MAH, Bond SM. Endothelin-1 activates ET-A receptors to causes reflex scratching in BALB/c mice. **Br. J. Pharmacol.**, 151: 278-284, 2007.

Metz, Lammel V, Gibbs BF, Maurer M. Inflammatory murine skin response to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. **Am. J. Pathol.**, 169: 815-821, 2006.

Metz M, Ständer S. Chronic pruritus – pathogenesis, clinical aspects and treatment. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.**, 24: 1249-1260, 2010.

Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VA. Animais de Laboratório: Cuidados na iniciação experimental. **Editora UFSC**. Florianópolis, 2004.

Motta E, Chichorro JG, D'Orléans-Juste P, Rae GA. Roles of endothelin ETA and ETB receptors in nociception and chemical, thermal and mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in the rat hindpaw. **Peptides**, 30: 918-925, 2009.

Namer B, Carr R, Johaneck LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M. Separate peripheral pathways for pruritus in man. **Amerc. Physiol.**, 100: 2062-2069, 2008.

Nagase H, Haykawa J, Kawamura K, Kawai K, Takezawa Y, Matsuura H, Tajima C, Endo T. Discovery of a structurally novel opioid Kappa – agonist derived from 4,5-epoximorphinam. **Chem. Pharm. Bull.**, 46: 366-369, 1998.

NcNeil HP, Adach R, Stevens RL. Mast Cell-restricted tripitases: structure and function in inflammation and pathogen defense. **J. Biol. Chem.**, 29: 85-89, 2007.

Nguyen HV, Girolano ND, Jackson N, Hampartzoumian T, Bullpitt P, Tedla N, Wakefield O. Ultraviolet radiation-induced cytokines promote mast cell accumulation and matrix metalloproteinases production: potential role in cutaneous lupus erythematosus. **Scand. J. Rheumatol.**, 1: 1-8, 2011.

Pereira U, Misery L. Understanding pruritus. **Keratin**, 11: 12-18, 2006.

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: 755-63, 2004.

Plant TD, Zölher C, Moura SA, OKsche A. Endothelin-1 potentiates capsaicin-induced TRPV1 currents via the endothelin - A receptor. **Exp. Biol. Med.**, 231: 1161-1164, 2006.

Pomonis JD, Rogers SD, Petters CM, Gihiliard JR, Manthy PW. Expression and localization of endothelin receptors: Implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J. Neurosci.**, 21: 999-1006, 2001.

Rae GA e Henriques MG. Endothelins in inflammation, in Saids (ed): Pro-inflammatory and anti-inflammatory peptides. New York, **Marcel Dekker**. 163-202, 1998.

Schemelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, and Torebjörk HE. Specific C - receptors for itch in human skin. **J. Neurosci.**, 20: 8003-8008, 1997.

Schemelz M. A neural pathway for itch. **Nat. Neurosci.**, 4: 9-10, 2001.

Schemelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of nociceptors to pruritogens and algogens. **J. Neurophysiol.**, 89: 2441-2449, 2003.

Schemelz M. Itch and Pain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 34: 171-176, 2010.

Schmidt R, Schemelz M, Foster C, Ringkamp M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Novel classes of responsive and unresponsive C-nociceptor units in human skin. **J. Neurosci.**, 15: 333-341, 1995.

Schmidt R, Schemelz M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Innervation territories of mechano-responsive C-nociceptor units in human skin. **J. Neurophysiol.**, 78: 2641-2648, 1997.

Schneider C, Döck WDF, Zollner T, Röse L. Chronic mouse model of TMA – induced contact hypersensitivity. **J. Invest. Dermatol.**, 129: 899-907, 2008.

Seike M, Takata T, Ikeda M, Kodama H, Terui T, Ohtsu H. Histamine helps development of eczematous lesions in experimental contact dermatitis in mice. **Arch. Dermatol. Res.**, 297:68-74, 2005.

Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Kim M, Koo JY, Lee CH, Kim M, Oh U. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. **J. Neurosci.**, 27: 2331-2337, 2007.

Shimada SG, LaMotte RH. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. **Pain**, 139: 681-687, 2008.

Ständer S, Weisshaar E, Mettang T et al. Clinical classification of itch a position paper of International Forum for Study of itch. **Acta. Derm. Venereol.**, 87: 291-294, 2007.

Ständer S, Raap U, Weisshaar E, Schmelz M, Mettang T, Handwerker, Luger TA. Pathogenesis of Pruritus. **J. Dtsh. Dermatol. Ges.**, Doi:10.1111/j. 1610-0387.2011.17585.x., 2011.

Stante M, Hanna D, Lotti T. Itch, pain and metasthetic sensation. **Dermatol. Ther.**, 18: 308-313, 2005.

Stassen M, Hültner L, Schimitt E. Classical and alternative pathways of mast cells activation. **Crit. Rev. Immunol.**, 18: 308-313, 2002.

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, Bienenstock J, Schemelz M, Maurer M, Wei Ed and Tamás Bíró. Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. **J. Invest. Derm.**, 126: 1705-1718, 2006.

Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, 9: 1003-1008, 2003.

Sun YG, Chen ZH. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. **Nature**, 448: 700-7003, 2007.

Sun YG, Zhao QG, Meng XL, Yin J, Liu XL, Chen ZF. Cellular basis of itch sensation. **Science**, 325: 1531-1534, 2009.

Togashi Y, Umeuchi H, Okano K, Ando N, Yoshizawa Y, Honda T et al. Antipruritic activity of the kappa-opioid receptor agonist. TRK-820. **Eur. J. Pharmacol.**, 435: 259-264, 2002.

Tsuji K, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and - independent pathways in mice. **J. Pharmacol. Sci.**, 108: 385-388, 2008.

Trentin P, Fernandes MB, D' Orléans JP, Rae GA. Endothelin-1 causes pruritus in mice. **Exp. Biol. Med.**, 231: 1146-1151, 2006.

Thurmond R, Gelfand E, Dunford P. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 7: 41-53, 2008.

Umeuchi.H, Togashi Y, Honda T, Nakao K, Okano K, Tanaka T, Nagase H Involvement of central μ -opioid system in the scratching

behavior in mice, and the suppression of it by the activation of kappa - opioid system. **Eur. J. Pharmacol.**, 5: 29-35, 2003.

Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines targets for analgesia drug development? **Pharmacol. Ther.**, 112: 116-136, 2006.

Ward L, Wright E, McMahon SB. A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain. **Pain**, 64: 129-138, 1996.

Wakasa Y, Fujiwara A, Umeuchi H, Endoh T, Okano K, Tanaka T, Nagase H. Inhibitory effects of TRK-820 on systemic skin scratching induced by morphine in rhesus monkey. **Life Sci.**, 24: 2947-2957, 2004.

Wall P and Melzack's R. Textbook of pain. **Elsevier**. 5th edition, 2006.

Wang H, Yosipovitch G. New insights into the pathophysiology and treatment of chronic itch in patients with end-stage renal disease, chronic liver disease, and lymphoma. **Int. Soc. Dermatol.** doi:10.1111/j.1365-2664.2009.04249.x., 2009.

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K. Mechanism of histamine release by endothelin-1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow-derived mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 15: 288: 269-275, 1995.

Yamamura K, Oda M, Suwa E et al. Expression of histamine H₄ receptors in human epidermal tissues and attenuation of experimental pruritus using H₄ receptor antagonist. **J. Toxicol. Sci.**, 34: 427-431, 2009.

Yamamoto A and Sugimoto Y. Involvement of peripheral mu opioid receptors in scratching behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 649: 336-341, 2010.

Yamashita H, Michihata Y, Mizukami H, Ogihara Y, Morita A, Nose M. Dermal mast cells play a central role in the incidence of scratching behavior in mice induced by multiple application of the hapten, 2,4,6 - trinitrochlorobenzene. **Exp. Dermatol.**, 14: 438-444, 2005.

Zuberbier T, Asero R, Bindsley-jensen C et al. EAAC-I/GA (2) LEN/EDF/WAO guideline: management of urticaria. **Allergy**, 64: 1427-1443, 2009.

Zhu Y, Wang XR, Peng C et al. Induction of leukotriene B₄ and prostaglandin E(2) release from keratinocytes by proteases-activated

receptor-2-activating peptide in ICR mice. **Int. Immunopharmacol.**, 9: 1332-1336, 2009.

8. Prêmios

Parte dos resultados deste estudo foram apresentados como trabalho na forma de pôster, o qual recebeu menção honrosa de melhor poster: Oliveira L, Hara DB, Rae GA. ***Endothelin-1 induces both itch and pain in the mouse cheek.*** 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado em 18 a 21 de outubro de 2010, em Ribeirão Preto, SP

