

JULIANO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO HIPERALGÉSICO
INDUZIDO PELAS INJEÇÕES INTRATECAIS DE
GLUTAMATO E CININAS EM CAMUNDONGOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

**Florianópolis
2000**

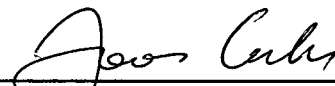
**“ CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO HIPERALGÉSICO
INDUZIDO PELAS INJEÇÕES INTRATECAIS DE
GLUTAMATO E CININAS EM CAMUNDONGOS”.**

POR

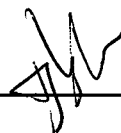
JULIANO FERREIRA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

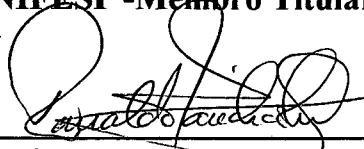
Banca Examinadora:



João Batista Calixto
(FMC/UFSC-Membro-Titular)



João Bosco Pesquero
(UNIFESP -Membro Titular)



Reinaldo Naoto Takahashi
(FMC/UFSC-Membro Titular)
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 13 de Março de 2000.

Ferreira, Juliano. *Caracterização do efeito hiperalgésico induzido pelas injeções intratecais de glutamato e cininas em camundongos*. Florianópolis, 2000, 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina).

Orientador: Professor Doutor João Batista Calixto.

Defesa: 13/03/2000.

O glutamato é um importante neurotransmissor na resposta nociceptiva. Uma parte deste trabalho teve como objetivo caracterizar a contribuição do NO em um modelo de hiperalgisia térmica induzida pelo glutamato. A administração de glutamato (10-100 nmol/sítio) por via intratecal (i.t.) em camundongos causou marcante e longa resposta hiperalgésica no teste da placa quente (5-60 minutos). A administração intratecal de inibidores da NO-sintase, de inibidores da guanilato ciclase solúvel e do inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 reverteram a resposta hiperalgésica induzida pelo glutamato. Além disso, o doador de NO, SNAP e o ativador da via GMP_C -PKG, 8-bromo- GMP_C potencializaram a resposta induzida pelo glutamato em dose sub-limiar (10 nmol/sítio, i.t.). Esses resultados demonstram que, pelo menos em parte, o NO tem uma importante contribuição na hiperalgisia térmica causada pelo glutamato. Assim como os receptores glutamatérgicos, os receptores B_1 e B_2 para as cininas são importantes para a transmissão da dor. Diante disto, outra parte do presente estudo visa caracterizar o efeito hiperalgésico induzido pelas cininas administradas intratecalmente. A bradicinina, a Tyr⁸-bradicinina (1-30 nmol/sítio), a des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina (3-50 nmol/sítio) causaram marcante hiperalgisia térmica quando analisados no teste da placa quente em camundongos, uma ação mediada pela ativação de receptores B_1 e B_2 . Além disso, a hiperalgisia induzida pela bradicinina foi parcial, mas significativamente revertida pela pré-administração intratecal dos antagonistas NMDA, NK_1 , do CGRP, dos inibidores da ciclooxigenase e da óxido nítrico sintase. Os resultados do presente estudo demonstram que as cininas que a hiperalgisia causada pela bradicinina, parece ser mediada por fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina, e pela liberação ou ação de glutamato, substância P, CGRP, prostaglandinas e óxido nítrico. Desta maneira, as cininas possuem importantes ações moduladoras da transmissão dolorosa espinhal. Assim, inibem as ações hiperalgésicas das cininas em nível espinhal, são potencialmente importantes para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Se a nossa existência não tem por fim imediato a dor, pode dizer-se que não tem razão alguma de ser no mundo. Porque é absurdo admitir que a dor sem fim, que nasce da miséria inerente à vida e enche o mundo, seja apenas um puro acidente, e não o próprio fim. Cada desgraça particular parece, é certo, uma exceção, mas a desgraça geral é a regra.

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Ao professor Calixto, por todo o apoio e orientação, e pelo exemplo de pesquisador que sempre foi.

Ao grande amigo Adair, por ter me iniciado na Farmacologia, por ser meu primeiro orientador, e por ser o companheiro de laboratório que me alegra com sua amizade caráter.

A Maria Martha Campos, pelo empenho e paciência na maneira de me auxiliar e mostrar os rumos.

A minha amada Fabiane por todo seu apoio e compreensão em todos os momentos da nossa vida.

Aos amigos de hoje e sempre, Eunice, Márcia, Fábio e Marco Antônio por compartilhar todos os bons e maus momentos da vida.

Aos meus irmãos, Danilo, Nádia e Carla, que de maneiras diferentes sempre estiveram ao meu lado me auxiliando.

Aos amigos dos dias e das noites Daniela, Alessandra e Martha, pelos ótimos momentos juntos.

Aos amigos do grupo do professor Calixto, Rafael, Rosana, Patricia, Michel, Lésiei, Gabriela, Priscilia, Beth, Rodrigo e Fernanda com compartilhamos juntos a caminhada pela Farmacologia.

Aos colegas da turma de mestrado, George, Janice, Cláudia, Rodrigo, Luciana e Sandra e todos os outros colegas da pós-graduação pelo companheirismo.

Ao pessoal do biotério, principalmente ao Pedro, por sempre ajudar a manter as melhores condições experimentais possíveis.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Animais.....	21
3.2. Administração das drogas por via intratecal.....	21
3.3. Hiperalgésia térmica induzida por diversos mediadores em camundongos.....	21
3.4. Análise dos receptores envolvidos na resposta hiperalgésica para as cininas.....	23
3.5. Análise das enzimas e dos mensageiros celulares envolvidos na resposta hiperalgésica das cininas e do glutamato.....	23
3.6. Análise da participação das fibras aferentes primárias na resposta das cininas.....	24
3.7. Drogas.....	24
3.8. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Hiperalgésia térmica induzida pelo glutamato.....	27
4.2 Hiperalgésia térmica induzida pelas cininas.....	31
4.3 Envolvimento dos receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgésia induzida pelas cininas.....	36
4.4 Envolvimento de outros receptores na hiperalgésia induzida pela bradicinina.....	39
4.5 Envolvimento da NO sintase e das ciclooxigenases na hiperalgésia induzida pela bradicinina.....	42
4.6 Envolvimento das fibras aferentes primária sensíveis á capsaicina na hiperalgésia induzida pela bradicinina.....	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
SUMMARY	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curvas tempo- e dose-resposta para o efeito causado pela injeção intratecal de glutamato em camundongos	27
Figura 2 -	Efeito da injeção intratecal do L-NOARG e do L- ou D-NAME na hiperalgisia causada pelo glutamato	28
Figura 3 -	Efeito da injeção intratecal do SNAP e do 8-Br-GMPc na hiperalgisia causada por uma dose sub-limiar de glutamato	29
Figura 4 -	Efeito da injeção intratecal do LY 83583 ou do ODQ na hiperalgisia causada pelo glutamato	30
Figura 5 -	Curvas tempo- e dose-resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de bradicinina em camundongos	32
Figura 6 -	Curvas tempo- e dose-resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de Tirosina ⁸ -bradicinina em camundongos	33
Figura 7 -	Curvas tempo- e dose-resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de des-Arg ⁹ -bradicinina em camundongos	34
Figura 8 -	Curvas tempo- e dose-resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de des-Arg ¹⁰ -calidina em camundongos	35
Figura 9 -	Efeito do pré-tratamento com HOE 140 e NPC 18884 na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	37
Figura 10 -	Efeito do pré-tratamento com des-Arg ⁹ -Leu ⁸ -bradicinina na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de des-Arg ⁹ -bradicinina ou bradicinina	38
Figura 11 -	Efeito do pré-tratamento com MK 801 na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	40
Figura 12 -	Efeito do pré-tratamento com FK 888, SR 48968 e SR 142801 na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	41
Figura 13 -	Efeito do pré-tratamento com CGRP ₈₋₃₇ na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	42
Figura 14 -	Efeito do pré-tratamento com L- ou D-NAME na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	43
Figura 15 -	Efeito do pré-tratamento com indometacina, DFU e piroxicam na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina	44
Figura 16 -	Efeito do tratamento neonatal com capsaicina na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina e glutamato, e na ação anti-hiperalgésica do HOE 140, MK 801, FK 888, L-NAME e da indometacina	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos valores das médias das DI_{50} dos inibidores da NO sintase e da guanilato ciclase, administrados por via intratecal, na hiperalgisia térmica causada pelo glutamato em camundongos	30
Tabela 2 - Valores médios das DE_{50} do glutamato e das cininas injetados intratecalmente na indução de hiperalgisia térmica analisada no modelo da placa quente	36
Tabela 3 - Comparação dos valores das médias das DI_{50} dos antagonistas do receptor B_2 na hiperalgisia térmica causada pela bradicinina em camundongos	39
Tabela 4 - Comparação dos valores das médias das inibições máximas dos antagonistas NMDA, NK1 e CGRP, dos inibidores da ciclooxigenase e da NO sintase, e da neurotoxina capsaicina na hiperalgisia térmica causada pela bradicinina em camundongos	47

RESUMO

O glutamato é um importante neurotransmissor na resposta nociceptiva. Age em receptores específicos mediando diversas respostas, incluindo a produção de óxido nítrico (NO) e a ativação da guanilato ciclase solúvel. Uma parte deste trabalho têm como objetivo caracterizar a contribuição do NO em um modelo de hiperalgisia térmica induzida pelo glutamato. Foram utilizados camundongos machos (25-35 g, n=6-12 por grupo). A administração de glutamato (10-100 nmol/sítio) por via intratecal (i.t.) causou marcante e longa resposta hiperalgésica no teste da placa quente (5-60 minutos). A administração intratecal dos inibidores da NO-sintase, L-NOARG ($DI_{50} = 166$ nmol/sítio) e L-NAME ($DI_{50} = 31$ nmol/sítio), e dos inibidores da guanilato ciclase solúvel, azul de metileno (1,25 μ mol/sítio), LY 83583 ($DI_{50} = 240$ nmol/sítio) e ODQ ($DI_{50} = 131$ nmol/sítio), reverteu a resposta hiperalgésica induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.). Além disso, o doador de NO, SNAP (0,22 μ mol/sítio, i.t.), e o ativador da via GMP_C -PKG, 8-bromo- GMP_C (22,5 nmol/sítio) potencializaram a resposta induzida pelo glutamato em dose sub-limiar (10 nmol/sítio, i.t.). O inibidor seletivo da ciclooxigenase-2, o DFU (9,1 nmol/sítio, i.t.), também inibiu a hiperalgisia induzida pelo glutamato. Esses resultados demonstram que, pelo menos em parte, o NO tem uma importante contribuição na hiperalgisia térmica causada pelo glutamato, demonstrada pelo aumento da resposta com a administração conjunta com doadores de NO e pelo ativador da via GMP_C -PKG, e pelo bloqueio causado pelos inibidores da NO sintase e da guanilato ciclase solúvel em nível espinhal. Além da via NO- GMP_C , outra via importante para a ação do glutamato em nível espinhal parece ser a estimulação da ciclooxigenase-2, pois o inibidor seletivo desta enzima, o DFU (0,9-9,1 nmol/sítio) bloqueou totalmente a hiperalgisia causada pela injeção intratecal de glutamato (100 nmol/sítio). A hiperalgisia causada pelo glutamato é relativamente dependente da ativação de fibras aferentes primárias, pois o tratamento neonatal dos animais com a

aferentes primárias induzida pelo tratamento neonatal dos camundongos com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) provocou diminuição marcante da hiperalgisia induzida pela bradicinina ($70\pm 8\%$). Além disso, este tratamento reverteu o efeito anti-hiperalgésico do MK-801, FK888, indometacina e L-NAME. Porém, o efeito anti-hiperalgésico do HOE140 (10 nmol/sítio) permaneceu inalterado (100%, $P < 0.05$).

Os resultados do presente estudo demonstram que as cininas, quando injetadas intratecalmente, causam importante hiperalgisia térmica, um evento mediado por receptores B_1 e B_2 . A hiperalgisia causada pela bradicinina, parece ser mediada por fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina, e pela liberação ou ação de glutamato, substância P, CGRP, prostaglandinas e óxido nítrico. Dessa maneira, as cininas possuem importantes ações moduladoras da transmissão dolorosa espinhal. Assim, inibem as ações hiperalgésicas das cininas em nível espinhal, são potencialmente importantes para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Uma parte destes resultados está publicada em:

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of nitric oxide in thermal hyperalgisia induced by intrathecal injection of glutamate in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 358 (supl. 1): R143, 1998.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgisia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, 38: 835-842, 1999.

Além deste trabalho, outros trabalhos que foram desenvolvidos durante o curso de Mestrado estão publicados, aceitos ou foram submetidos às seguintes revistas:

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal administration of amiloride in mice. **Life Sci.**, 65: 1059-1066, 1999.

DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.L.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 360: 278-286, 1999.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytother. Res.**, (no prelo).

CATAPAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA, A.M.; YUNES, R.A.; BRESCIANI, L.F.V.; SANTOS, A.R.S.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J.B.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological activity and chemical composition of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus*. **Pharmazie**, (submetido à publicação).

1. INTRODUÇÃO

A transmissão do estímulo doloroso envolve interações muito complexas de estruturas periféricas e cerebrais, desde o local do estímulo até o córtex cerebral (FÜRST, 1999). A dor pode ser definida, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.), como uma sensação e experiência desagradável associada com um dano tecidual atual ou potencial (MERSKEY e BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999). Existem diversos tipos de dor, denominadas “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, que estão associadas respectivamente, com uma estimulação excessiva dos nociceptores, com uma lesão ao tecido neuronal, com a disfunção de um nervo ou com fatores psicológicos (MILLAN, 1999). Além disso, algumas desordens ocorrem comumente em pacientes que experimentam a dor, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada à um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta à um estímulo normalmente não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal à um estímulo sensorial) (BESSON, 1999).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser transitório, agudo ou crônico. No tipo transitório, a ativação dos nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. No tipo agudo, ocorre uma lesão e ativação dos nociceptores no sítio lesionado. A dor crônica é causada geralmente por uma lesão ou doença, mas pode ser perpetuada por outros fatores que não os causadores da dor (LOESER e MELZACK, 1999). A dor aguda associada com uma lesão tecidual recente pode perdurar por menos do que um mês, mas às vezes, pode durar por até 6 meses. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a expressão neuronal de novos genes (a base para sensibilização e remodelamento neuronal) pode ocorrer dentro de 20 minutos após uma lesão. A dor crônica pode induzir mudanças comportamentais e histológicas de longa duração dentro de um dia. Alguns trabalhos clínicos recentes sugerem que a dor aguda pode tornar-se crônica rapidamente (CARR e GOUDAS, 1999).

O entendimento do processo doloroso tem progredido dramaticamente nos últimos anos, em grande parte devido a um aprimoramento na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia das fibras aferentes e no processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal (para revisão ver: BESSON e CHAOUCH, 1987; GRUBB, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Este progresso foi possível pelo uso de múltiplos protocolos experimentais, incluindo estudos comportamentais, eletrofisiologia *in vivo* e *in vitro*, além de estudos anatômicos e principalmente através da biologia molecular (para revisão ver: GRUBB, 1998; MILLAN, 1999). Apesar destes avanços, os mecanismos exatos da dor ainda não são totalmente conhecidos e analgésicos efetivos e potentes, especialmente para o tratamento da dor crônica, ainda são necessários. Um dos mais importantes analgésicos empregados na prática clínica hoje continua sendo o alcalóide morfina, apesar dos seus conhecidos efeitos adversos (para revisão ver: CALIXTO et al., 2000).

Os sinais nociceptivos são gerados em fibras aferentes finas do tipo C e A δ , que respondem a uma variedade de estímulos fisiológicos intensos tais como calor, frio, compressão e substâncias potencialmente nocivas. Todos os tecidos, com exceção do neurópilo do sistema nervoso central, são inervados por estas fibras aferentes. Apesar disto, as propriedades destas fibras diferem, dependendo se elas são aferentes somáticas (que inervam a pele, as articulações, os músculos), ou aferentes viscerais (que inervam os tecidos cardiovasculares e respiratórios, o trato gastrointestinal, ou os sistemas renal e reprodutivo). Os neurônios que respondem preferencialmente a estímulos nocivos são chamados de nociceptores. Estes nociceptores conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central, e seus corpos celulares encontram-se dentro dos gânglios das raízes dorsais, adjacentes à medula espinhal (DRAY e PERKINS, 1997; GRUBB, 1998; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999).

Os nociceptores primários fazem uma sinápsse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II de Rexed (substância gelatinosa)

da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender no trato espinotalâmico chegando até suas fibras terminais localizadas principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998). A via da dor descrita acima representa uma rota clássica, mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (ler: BESSON, 1999; JABBUR e SAADÉ, 1999). Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral, fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular gigantocelular (NRG). Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação descendente dos neurônios de segunda ordem (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição nociceptiva descendente (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (RUSSO e BROSE, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica à uma lesão tecidual. A nocicepção é a progenitora da dor, que por sua vez causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme, e a qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinadas por muitos fatores dentro da medula espinhal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BROSE, 1998).

A ação direta ou indireta de mediadores químicos, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotriênos), peptídeos (cininas, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP)), serotonina, dopamina, acetilcolina, noradrenalina, citocinas, fator de crescimento neural, glutamato, óxido nítrico, ATP, ADP, adenosina, prótons, e outros, que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina, capsaicina, ácido acético, alguns venenos, etc), são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (para revisão ver: DRAY, 1997; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000).

Existem várias fontes importantes onde mediadores químicos são gerados: tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células imunes, nervos simpáticos e sensoriais, entre outras. Além disso, existem mecanismos complexos pelos quais um transmissor pode agir, via múltiplos receptores que são amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais. Alguns neurotransmissores atuam através da interação com receptores acoplados às proteínas-G, associados com a formação de segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, proteínas quinase A, C e G, trifosfato de inositol (IP_3), diacilglicerol (DAG), e cálcio intracelular, etc. Outros neurotransmissores ativam diretamente canais iônicos, que por sua vez controlam a permeabilidade da membrana a íons (WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999, CALIXTO et al., 2000).

A inflamação é uma causa comum e complexa de dor clínica resultante de uma lesão ou degeneração tecidual. Quando um dano tecidual significativo ocorre, a dor é frequentemente mais persistente e está associada com inflamação e hiperalgesia na região lesionada. A ativação e sensibilização de nociceptores periféricos, por mediadores químicos, explica parcialmente este fenômeno. Além disso, existe uma importante contribuição de processos

centrais, levando a uma hipersensibilidade que permite que sinais oriundos de estímulos inócuos normais, como um leve toque (mediado por fibras aferentes A β de grande calibre), possam ser percebidos pelo SNC como dolorosos (WOOLF et al., 1992; WOOLF, 1994; DRAY e PERKINS, 1997). Os mediadores produzidos na inflamação são responsáveis pelos eventos que ocorrem durante este processo, incluindo a hiperalgesia, alterações no fenótipo celular, e expressão de novas moléculas (neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores) em todo sistema nervoso (LEVINE et al., 1993; DRAY et al., 1994; DRAY e PERKINS, 1997).

Entre os mediadores inflamatórios, a produção e ação das cininas é vista como crítica para a iniciação da dor, produção de alodinia e hiperalgesia (LEVINE et al., 1993; DRAY e PERKINS, 1997). As vias bioquímicas envolvidas na síntese e degradação das cininas compreendem mecanismos bem estabelecidos (REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992). As cininas são formadas em resposta a estímulos fisiológicos, ou durante o processo inflamatório, a partir de precursores chamados cininogênios, que podem ser α -globulinas de alto (120 KDa) ou de baixo peso molecular (66 KDa), através da ação de enzimas denominadas de cininogenases. O grupo mais importante de cininogenases é representado pelas calicreínas, um grupo de proteases que podem ser encontradas no sangue (calicreína plasmática), ou na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual) (BEAUBIEN et al., 1991; MURRAY et al., 1990). A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula na corrente sangüínea na forma inativa denominada de pré-calicreína (fator de Fletcher). A pré-calicreína é rapidamente convertida em calicreína, um processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sangüínea (Fator de Hagemann) (BATHON e PROUD 1991; BHOOLA et al., 1992). A ação da calicreína plasmática sobre o cininogênio de alto peso molecular, resulta na formação do nonapeptídeo bradicinina (BK). Por outro lado, a calicreína tecidual atuando sobre os cininogênios de baixo peso molecular, origina o decapeptídeo, calidina (lisil-BK). A calidina pode

ser convertida em BK através da clivagem da porção N-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973).

Logo depois de formadas, as cininas circulantes se difundem através da parede dos capilares ou vasos linfáticos dos tecidos, e são rapidamente inativadas por várias peptidases, dentre elas as do grupo da cininase I e da cininase II. O grupo das cininases I é representado pelas enzimas carboxipeptidase N-(plasma) e carboxipeptidase M (membrana) que removem o aminoácido arginina da porção C-terminal das moléculas da BK e da calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente (ERDÖS, 1990; MARCEAU, 1995). Por outro lado, as cininases II são representadas pela enzima conversora de angiotensina e pela endopeptidase neutra 24.11. A enzima conversora da angiotensina (ECA) é responsável por clivar o dipeptídeo da porção C-terminal da BK, transformando-a em um metabólito inativo (BHOOLA et al., 1992). Em alguns casos, a ECA é capaz de clivar o tripeptídeo da extremidade C-terminal da des-Arg⁹-BK, embora este fenômeno não ocorra com frequência devido à baixa afinidade que a ECA apresenta por metabólitos des-Arg⁹ (INOKUCHI e NAGAMATSU, 1981; OSHIMA et al., 1985). Finalmente, a endopeptidase neutra 24.11 ou encefalinase, é uma metalopeptidase, capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da molécula da BK, de maneira semelhante a ECA (GAFFORD et al., 1983).

Depois de formadas, as cininas, exercem uma série de efeitos biológicos que envolvem, principalmente, a regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, a regulação da pressão arterial, o transporte de glicose e de eletrólitos, além de estimularem a reabsorção óssea e a proliferação celular (BHOOLA et al., 1992). Além dessas ações, as cininas participam de vários eventos pró-inflamatórios que incluem dilatação venular, aumento da permeabilidade vascular, além da estimulação de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C (MARCEAU et al., 1983; SZOLCSANYI, 1987; HARGREAVES et al., 1988; PROUD e KAPLAN, 1988; DRAY e PERKINS, 1997). Estas ações indicam que as cininas podem participar de vários estados fisiopatológicos,

tais como reações alérgicas, rinite viral, asma, pancreatite, peritonite ou artrite reumatóide. Além disso, as cininas podem estar envolvidas na regulação da pressão arterial em certos tipos de hipertensão ou ainda durante o desenvolvimento do choque séptico (REGOLI e BARABÉ, 1980; GAVRAS et al., 1987; BATHON e PROUD, 1991; HALL, 1992).

A maioria das ações biológicas das cininas é mediada pela interação com receptores de membrana. A existência de dois subtipos de receptores para cininas, denominados B₁ e B₂, foi proposta inicialmente por Regoli e Barabé (1980) com base na determinação da ordem de potência dos agonistas em diversos tecidos isolados. Posteriormente, esta classificação foi confirmada através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos, obtidos por modificações ou substituições dos amino ácidos que compõem a estrutura das moléculas da BK e da des-Arg⁹-BK (VAVREK e STEWART., 1985; REGOLI et al., 1990; REGOLI et al., 1994; ler para revisão: HALL e MORTON, 1997). Recentemente, a existência dos receptores B₁ e B₂ também foi confirmada através da clonagem e expressão desses receptores, bem como pelo emprego de estudos de *binding* (MCEACHERN et al., 1991; EGGERIKX et al., 1992; HESS et al., 1992; 1994; MENKE et al., 1994; PESQUERO et al., 1996). Estes estudos têm demonstrado também que existem variações entre espécies, em relação a afinidade de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores (HALL e MORTON, 1997).

O gene que codifica os receptores B₁ foi clonado em humanos (MENKE et al., 1994), coelhos (MACNEIL et al., 1995), camundongos (PESQUERO et al., 1996) e ratos (NI et al., 1998). O receptor B₁ humano possui uma seqüência de 353 aminoácidos e apresenta apenas 36% de homologia com o receptor do tipo B₂, o que sugere que ambos os receptores podem ser componentes de sistemas regulatórios diferentes (MENKE et al., 1994). Os genes que codificam os receptores B₂ foram inicialmente clonados a partir de tecidos e células de ratos (MCEACHERN et al., 1991) e posteriormente de humanos (HESS et al., 1992), camundongos (MA et al., 1994a), coelhos (BACHVAROV et al., 1995) e cobaias (FARMER et al., 1998). O gene

do receptor B₂ humano foi mapeado no cromossomo 14q32 (POWELL et al., 1993; MA et al., 1994b; KAMMERER et al., 1995), sendo que foram identificados alguns polimorfismos para o mesmo (BRAUN et al., 1995).

Os estudos de biologia molecular mostraram ainda que os receptores B₁ e B₂ para as cininas são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G que apresentam 7 domínios transmembranais. As ações mediadas por estes receptores podem envolver múltiplas vias de transdução de sinal, através de segundos mensageiros. Os receptores B₁ e B₂ para as cininas são preferencialmente acoplados a uma proteína do tipo Gq (GUTOWSKI et al., 1991) e na maioria das vezes suas ativações estão relacionadas com estimulação da fosfolipase C, e conseqüente formação de IP₃ e DAG. O aumento dos níveis de IP₃ resulta em aumento dos níveis de cálcio intracelular (LEE et al., 1993), enquanto que a formação de DAG promove ativação de isoformas específicas de proteína quinase C (TIPPMER et al., 1994). Os eventos celulares estimulados pelos receptores de cininas podem ainda envolver a mobilização de cálcio, ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio, transporte de íons cloreto, a ativação de adenilato ciclase, formação de óxido nítrico (NO), ou aumento expressivo dos níveis de prostanoídes em resposta a ativação da fosfolipase A₂ (BURCH e AXELROD, 1987; BHOOLA et al., 1992; HALL et al., 1992). Em alguns tecidos, os receptores B₂ podem ainda estar acoplados à uma proteína G_i (LIEBMANN et al., 1990; MIYAMOTO et al., 1997).

Os receptores do tipo B₁ são ativados pelos fragmentos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina, produzidos a partir da BK e da calidina por ação das carboxipeptidases N e M, enquanto que os receptores B₂ são praticamente insensíveis aos metabólitos que não possuem o resíduo arginina na porção C-terminal (REGOLI e BARABÉ, 1980). Os estudos dos receptores B₁ têm sido de grande interesse, uma vez que estes receptores apresentam a particularidade de serem induzidos em certas ocasiões, como por exemplo após um trauma tecidual ou durante processos inflamatórios crônicos (para revisão ver: MARCEAU, 1995; 1997). A indução dos

receptores B₁ pode ser facilmente observada em várias preparações *in vitro* obtidas de coelhos, ratos, suínos (MARCEAU, 1995), e também em tiras de cólon humano (COUTURE et al., 1981).

A importância fisiopatológica do fenômeno de indução dos receptores B₁ tem sido estudada em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. No modelo de edema de pata em ratos, o receptor B₁ pode ser induzido pela dessensibilização completa ao edema causado por injeções repetidas de bradicinina (CAMPOS e CALIXTO, 1995), pelo tratamento com lipopolissacarídeo de *E. coli* (CAMPOS et al., 1996), pelo tratamento crônico com BCG (CAMPOS et al., 1997), ou pela injeção intradérmica de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β ou fator de necrose tumoral- α) (CAMPOS et al., 1998). A indução do receptor B₁ causada pela interleucina-1 β ou fator de necrose tumoral- α envolve a ativação das vias da proteína quinase C, tirosina quinase, MAP-quinase e a ativação do fator de transcrição nuclear κ -B (CAMPOS et al., 1999). Evidências a respeito da indução dos receptores B₁ *in vivo* também têm sido demonstradas em modelos de hiperalgesia inflamatória em ratos, após a irradiação com raios ultravioleta, depois da injeção intra-articular de adjuvante de Freund ou após a injeção intra-articular de algumas citocinas, incluindo IL-1, IL-2 e IL-8 (PERKINS et al., 1993; PERKINS e KELLY, 1993; DAVIS et al., 1994; KHASAR et al., 1995; PERKINS et al., 1995).

Embora a maioria das respostas mediadas pelos receptores B₁ pareçam envolver a ativação de receptores induzidos, existem várias evidências acerca da ocorrência de receptores B₁ constitutivos. Dados da literatura mostram que a des-Arg⁹-BK é capaz de produzir alterações cardiovasculares em gatos e cães em condições normais (LORTIE et al., 1982; DEWITT et al., 1994; NAKHOSTINE et al., 1993) ou produzir aumento da permeabilidade vascular e influxo celular após injeção intratorácica em camundongos (VIANNA e CALIXTO, 1998). Outros exemplos de preparações obtidas de ratos, que apresentam receptores B₁ constitutivos são o fundo do estômago e a veia porta isolados de rato (CABRINI et al., 1996; CAMPOS e CALIXTO, 1994). Desta forma, em algumas espécies como suínos e coelhos, a população basal de

receptores B_1 é normalmente é nula, sendo que o aparecimento dos receptores B_1 está relacionado a estados patológicos. Por outro lado, em alguns casos, como é observado em cães, gatos, ratos e camundongos, os receptores do tipo B_1 parecem co-existir com os receptores B_2 , de forma constitutiva em condições fisiológicas (ver para revisão: MARCEAU, 1997).

Ao contrário dos receptores do tipo B_1 , os receptores B_2 parecem mediar a maior parte das ações fisiológicas das cininas, tendo sido identificados nos tratos gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (para revisão ler: HALL e MORTON, 1997). As respostas inflamatórias e nociceptivas induzidas pela BK são mediadas por receptores B_2 presentes em neurônios, células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e possivelmente em macrófagos e neutrófilos. As propriedades vasoativas da BK são mediadas por receptores B_2 localizados nas células endoteliais, devido à liberação de substâncias vasodilatadoras, tais como óxido nítrico e prostaglandinas (HESS, 1997). Além disso, através do uso de antagonistas seletivos, tem sido demonstrado que a ativação dos receptores B_2 pode estar envolvida em várias respostas, incluindo a broncoconstrição, hipotensão, processos inflamatórios agudos, dor e hiperalgesia (STERANKA e BURCH, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; HALL e MORTON, 1997).

Na periferia, uma importante ação da bradicinina é estimular os terminais nervosos nociceptivos e causar dor. Além da ativação direta de fibras sensoriais (na pele, articulação, músculo), a bradicinina sensibiliza estas fibras para outras respostas, incluindo estímulos mecânicos (RANG et al., 1991, 1994). Existe um forte sinergismo entre as ações da bradicinina e os efeitos de outras substâncias algogênicas, como as prostaglandinas e a serotonina. A bradicinina também induz um grande número de eventos indiretos, incluindo a liberação de prostaglandinas, a degranulação de mastócitos e conseqüente liberação de histamina e outros agentes inflamatórios, ativação de células imunes e excitação de fibras sensoriais e simpáticas

pós-ganglionares (TAIWO e LEVINE, 1988; WALKER et al., 1995). A estimulação de fibras sensoriais e simpáticas pela bradicinina leva à liberação de neuropeptídeos, prostanóides, além de transmissores simpáticos que sensibilizam nociceptores e influenciam a nocicepção de várias maneiras (WALKER et al., 1995). A liberação de taquicininas e CGRP das terminações periféricas de neurônios aferentes primários causa uma série de efeitos pró-inflamatórios, denominados coletivamente de inflamação-neurogênica (HALL e GEPPETTI, 1995).

A ativação direta dos nociceptores pela bradicinina é mediada pelo receptor B₂, que ativa a fosfolipase C e estimula a proteína quinase C a aumentar a condutância da membrana aos íons sódio, despolarizando as fibras sensoriais (BURGESS et al., 1989a; DRAY et al., 1992). Além disso, a inibição AMPc-dependente dos mecanismos de condutância ao potássio facilita a excitabilidade da membrana (WEINREICH e WONDERLIN, 1987). A despolarização dos neurônios sensoriais induz influxo de cálcio e uma conseqüente liberação de neurotransmissores, incluindo neuropeptídeos que podem então ativar um grande número de reflexos locais (WALKER et al., 1995). O influxo de cálcio também estimula a geração de GMPc através da produção de NO (BURGESS et al., 1989b; MCGEHEE et al., 1992; BRADLEY e BURGESS, 1993). Finalmente, a bradicinina também ativa a fosfolipase A₂ que gera ácido araquidônico (RANG et al., 1991). A partir deste, vários eicosanóides podem ser formados pela atividade da ciclooxigenase e da lipooxigenase (WALKER et al., 1995).

Os receptores B₁ são importantes na hiperalgisia principalmente durante a inflamação, mas, diferentemente da bradicinina, alguns estudos demonstram que a des-Arg⁹-bradicinina não ativa neurônios sensoriais diretamente (DRAY et al, 1992; NAGY et al., 1993). O processo hiperalgésico mediado pelo receptor B₁ é inibido pela indometacina, indicando ser mediado indiretamente por prostaglandinas (DAVIS e PERKINS, 1994). A hiperalgisia causada pela ativação do receptor B₁ pode ser mediada também pelo fator de necrose tumoral- α ou interleucina-1 β liberados de leucócitos, como os macrófagos (TIFFANY e BURCH, 1989).

De fato, os receptores das cininas parecem ser importantes na nocicepção. Por uma abordagem farmacológica, os antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ são antinociceptivos em diversos modelos experimentais de nocicepção (STERANKA et al., 1987; CORRÊA e CALIXTO, 1993; CORRÊA et al., 1996; DE CAMPOS et al., 1996, 1999; SUFKA e ROACH, 1996). Além disso, estudos de biologia molecular permitiram a criação de animais nocaute para os receptores das cininas. A deleção do gene do receptor B₂ em camundongos elimina as ações da bradicinina em tecido muscular liso e neuronal (BORKOWSKI et al., 1995), além de tornar este animal hipoalgésico quando avaliado no modelo de hiperalgisia inflamatória induzida pela carragenina (BOYCE et al., 1996). Recentemente, foi descrito um camundongo nocaute para o receptor B₁ (PESQUERO et al., 1997). Este animal apresentou alterações nas respostas inflamatórias e nociceptivas (PESQUERO et al., resultados não publicados). A deleção do gene do receptor B₁ causou hipoalgisia nos animais, quando analisados em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulos térmicos e químicos. Apesar da ausência de estudos em modelos de dor crônica, a deleção gênica dos receptores das cininas abre perspectivas de estudos que poderão elucidar a participação dos receptores B₁ e B₂ no processo nociceptivo de uma maneira mais clara.

Além das ações periféricas, o sistema nervoso central contém todos os componentes do sistema das cininas, onde estas substâncias estão envolvidas com diversos efeitos fisiopatológicos (RAIDOO e BHOOLA, 1997, 1998; WALKER et al., 1995). A presença da calicreína tecidual tem sido demonstrada no cérebro por diversas técnicas (POWERS e NASJLETTI, 1983; SCICLI et al., 1984; CHAO et al., 1987) ocorrendo em várias regiões, sendo encontrada em altas concentrações no hipotálamo e glândulas pituitária e pineal (KITAGAWA et al., 1991; SCICLI et al., 1984).

As cininas foram encontradas no líquido de humanos na concentração de 53 pg/ml (SCICLI et al., 1984) e a bradicinina foi encontrada em valores de 600 pg/g em tecido cerebral

total de ratos (PERRY e SNYDER, 1984). Uma ampla imunoreatividade à bradicinina foi identificada em várias regiões do SNC, incluindo hipotálamo, medula oblonga, cerebelo, corpo estriado, córtex e medula espinhal de diversas espécies de animais (CORREA et al., 1979; PERRY e SNYDER, 1984; KARIYA et al., 1985).

Uma variedade de cininases foram identificadas no tecido cerebral, incluindo a aminopeptidase (CAMARGO et al., 1972), a encefalinase (CAMARGO et al., 1972; SCHWARTZ et al., 1981) e as cininases I e II (CAMARGO et al., 1973). A bradicinina e seus metabólitos podem ser degradados em membranas sinápticas cerebrais, sugerindo uma localização específica para as cininases (ORAWSKI e SIMMONS, 1989).

Os receptores para a bradicinina foram identificados em culturas de tecido cerebral de ratos e camundongos (SNIDER e RICHELSON, 1984; LEWIS et al., 1985), e em várias regiões do cérebro e da medula espinhal de mamíferos (FUJIWARA et al., 1989; MURONE et al., 1996, 1997; SHARIF e WHITING, 1991; STERANKA et al., 1988). Uma alta densidade de sítios de ligação específicos para bradicinina foi encontrada na ponte, medula oblonga e medula espinhal. Uma densidade moderada foi encontrada no córtex cerebral e no hipocampo, com uma baixa densidade em outras várias regiões cerebrais (FUJIWARA et al., 1989). Os receptores B₂ foram localizados em vasos sanguíneos cerebrais, mas na medula espinhal estes receptores foram identificados nas lâminas superficiais (inclusive substância gelatinosa) do corno dorsal, especialmente nos terminais das fibras aferentes primárias (FUJIWARA et al., 1988; 1989; STERANKA et al., 1988; PRIVITERA et al., 1992). Além disso, através de anticorpos policlonais, os receptores B₁ foram identificados no tálamo, hipotálamo e substância gelatinosa da medula espinhal de humanos (BHOOLA, 1996; RAIDOO e BHOOLA, 1997, 1998). O RNAm do receptor B₁ foi encontrado em culturas de neurônios da raiz do gânglio dorsal e do gânglio cervical superior de camundongos, mas os agonistas do receptor B₁ promoveram despolarização neuronal somente após a exposição das células à IL-1 β e captopril, um fenômeno inibido pela

indometacina (SEABROOK et al., 1997). Ao contrário destes resultados, não foi observada a presença de receptores B₁ em cultura de neurônios da raiz do gânglio dorsal ou resposta à agonistas B₁ em neurônios sensoriais de ratos (DAVIS et al., 1996).

Além das células neuronais, outros tipos celulares podem participar dos processos fisiopatológicos do SNC. As células imunes são recrutadas e ativadas e as células da glia (principalmente a micróglia) parecem ter um importante papel imuno-efetor no SNC, inclusive nas reações inflamatórias e nociceptivas (MELLER et al., 1994a; PERRY et al., 1993; WALKER et al., 1995; WATKINS et al., 1997). Os receptores B₂ são encontrados na micróglia do SNC (HOSLI et al., 1992; HOSLI e HOSLI, 1993a,b; STEPHENS et al., 1993; CHOLEWINSKI et al., 1991). Os astrócitos e os oligo-

dendrócitos são ativados pela bradicinina, que induz a produção de fosfoinosítídeos que, por sua vez, aumentam a concentração de cálcio intracelular (RITCHIE et al., 1987; STEPHENS et al., 1993; GIMPL et al., 1992; HOSLI et al., 1992; LIN e CHUANG, 1992) e estimula a liberação de ácido araquidônico e glutamato (BURCH e KNISS, 1988; BURCH e TIFFANY, 1989; PARPURA et al., 1994). A bradicinina também é capaz de induzir a liberação de amino ácidos excitatórios de maneira cálcio-dependente em células de Schwann obtidas da raiz do corno dorsal (PARPURA et al., 1995). A des-Arg⁹-bradicinina também é capaz de induzir correntes iônicas e aumentar o cálcio intracelular em astrócitos (GIMPL et al., 1992).

Vários efeitos comportamentais são observados após a injeção intracerebral de bradicinina, tais como excitação e vocalização seguida de depressão, sedação e catatonia (GRAEFF et al., 1969; CLARK, 1979; WALKER et al., 1995). Além disso, as cininas e seus receptores estão envolvidas na regulação da secreção de hormônios da pituitária, no controle central da pressão arterial e frequência cardíaca, na febre e na enxaqueca (MADEDDU et al., 1990; PRIVITERA, 1992; WALKER et al., 1995, COELHO et al., 1997; MACFARLANE et al., 1991; FRANCELE, 1992). A administração intratecal de agonistas de receptores B₂ causa

aumento do extravasamento plasmático cutâneo e aumento da pressão arterial (JACQUES e COUTURE, 1990; LOPES e COUTURE, 1992).

Existem evidências que demonstram a participação das cininas nos mecanismos centrais de nocicepção. As cininas podem causar efeito antinociceptivo, principalmente quando injetadas no *locus coeruleus* (COUTO et al., 1998; PELÁ et al., 1996), ou causar efeito hiperalgésico, quando injetadas na região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (BURDIN et al., 1992). Estes efeitos das cininas parecem ser mediados principalmente por receptores B₂ (PELÁ et al., 1996).

Além disso, estudos eletrofisiológicos demonstraram o envolvimento dos receptores B₂ na resposta dos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal causada por estimulação nociceptiva periférica, pois a injeção intratecal do antagonista do receptor B₂ reduz a resposta da segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (CHAPMAN e DICKENSON, 1992). Sítios de ligação para a bradicinina foram localizados especificamente no gânglio da raiz dorsal e núcleo trigeminal, e nos terminais dos neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro na substância gelatinosa da medula espinhal (FUJIWARA et al., 1989; STERANKA et al. 1988). O transporte axonal direcionado centralmente pode ser responsável pelos receptores para bradicinina visualizados na medula espinhal (STERANKA et al., 1988).

A ativação dos terminais centrais das fibras aferentes primárias pela bradicinina é mediada por receptores B₂ (DUNN e RANG, 1990). A bradicinina em altas concentrações provoca pequeno aumento na liberação basal de CGRP de terminais sensoriais da medula espinhal, um efeito que é potencializado pelo ácido láctico (WANG e FISCUS, 1997). Em concentrações menores, a bradicinina potencializa a liberação de CGRP causada pela estimulação nociceptiva de fibras aferentes primárias, um efeito revertido pelo antagonismo do

receptor B₂ ou pela indometacina, indicando um envolvimento secundário de prostaglandinas nestas ações (ANDREEVA e RANG, 1993).

Concordando com estas observações, a injeção intratecal em nível torácico de bradicinina e calidina produziu resposta nociceptiva transitória, seguida por uma aparente ação antinociceptiva causada por uma interação pré-sináptica em terminais de fibras noradrenérgicas bulboespinhais (LANEUVILLE et al., 1987; 1989). Presumivelmente, a última ação é resultado de uma inativação neuronal causada pela intensa despolarização inicial dos terminais aferentes primários induzida pela bradicinina (WALKER et al., 1995).

A ação das cininas no controle do processo nociceptivo espinhal é de extremo interesse, pois a medula espinhal é um dos principais sítios de ação de drogas analgésicas, principalmente as utilizadas em dores crônicas, tais como a morfina, a gabapentina e o ziconotide (YAKSH et al., 1999). Sendo assim, fica claro que o processamento espinhal de informações nociceptivas é importante em estados dolorosos e a compreensão deste processamento pode levar à descoberta de novas drogas úteis na clínica. Sendo assim, o estudo dos efeitos farmacológicos de drogas em nível espinhal, definida em modelos animais, podem ser extraordinariamente preditivos da atividade analgésica em estados de dor em humanos (YAKSH et AL., 1999).

Da perspectiva da medula espinhal, a lesão tecidual periférica é refletida como um aumento da estimulação aferente oriunda de nociceptores sensibilizados ou anteriormente inativos, estes últimos também chamados de nociceptores silenciosos. Em alguns estados de dor crônica, tipicamente aquelas associadas a lesões nervosas, o circuito do corno dorsal da medula pode ser remodelado, o que contribui para os estados de alodinia que caracterizam a maioria das neuropatias (WOOLF, 1994; URBAN e GEBHART, 1999). Por consequência da estimulação aferente aumentada, neurotransmissores peptídicos (substância P e CGRP) e aminoácidos excitatórios (principalmente glutamato) são liberados em grande quantidade e por períodos mais longos do que aqueles associados com um evento nociceptivo agudo na periferia.

A substância P e o glutamato têm sido estudados mais extensivamente, mas outras substâncias neuroativas (tais como, galanina, somatostatina, fator de crescimento neural) também são implicadas no processamento espinhal alterado. Algumas ações destas substâncias reforçam sua importância em processos dolorosos (URBAN e GEBHART, 1999). Por exemplo, a administração intratecal de agonistas glutamatérgicos e taquicinérgicos produzem comportamentos relacionados à dor e hiperalgesia em animais (AANONSEN e WILCOX, 1987; MELLER e GEBHART, 1994; MOOCHHALA e SAWYNOK, 1984; PIERCEY et al., 1981; URBAN e GEBHART, 1999; URCA e RAIGORODSKY, 1988). Além disso, antagonistas dos receptores destas substâncias bloqueiam estes efeitos e aqueles causados por lesão de tecido periférico (URBAN e GEBHART, 1999). A substância P e o glutamato são sintetizados pelos mesmos corpos celulares de nociceptores e presumivelmente são liberados simultaneamente na medula espinhal quando o nociceptor é despolarizado (URBAN e GEBHART, 1999).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Seus neurônios e sinapses são distribuídos amplamente pelo sistema nervoso central, concentrados principalmente no hipocampo, no córtex cerebral e na substância gelatinosa da medula espinhal. Nessas estruturas, o glutamato está envolvido em processos fisiológicos, como a memória e o aprendizado, e em processos patológicos, como a excitotoxicidade neuronal. O glutamato, sintetizado pela deaminação da glutamina ou pelo ciclo de Krebs, é liberado de maneira cálcio dependente na fenda sináptica em resposta à despolarização do terminal nervoso pré-sináptico. As ações sinápticas do glutamato são podem ser determinadas por um sistema de recaptção de alta afinidade, encontrado em células neuronais e não-neuronais (HUDSPITH, 1997; THOMAS, 1995).

Uma vez liberado, o glutamato pode ativar seus receptores de membranas, que são de dois tipos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes de ligante que alteram a permeabilidade da membrana a íons sódio e cálcio dentro

de poucos milissegundos após a ligação do agonista. Estes receptores podem ser classificados farmacologicamente, de acordo com a interação de ligantes específicos, em três subtipos: receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato), cainato e NMDA (N-metil-D-aspartato). Os receptores metabotrópicos formam uma família de pelo menos 8 receptores acoplados à proteína G, que modulam segundos mensageiros intracelulares, como os fosfoinosítídeos e os nucleotídeos cíclicos. Diferente das respostas rápidas mediadas pelos receptores ionotrópicos, os receptores metabotrópicos produzem mudanças na excitabilidade neuronal em escala de tempo de centenas de milissegundos a segundos (HUDSPITH, 1997). Os receptores glutamatérgicos não são encontrados somente no sistema nervoso central, mas também no sistema nervoso periférico (CARLTON et al., 1995).

Todos os receptores glutamatérgicos parecem estar envolvidos na transmissão da nocicepção, tanto central como periféricamente (BOXALL et al., 1998; LUTFY et al., 1997; ZAHN et al., 1998; ZHOU et al., 1996; PROCTER et al., 1998). Uma lesão tecidual periférica produz impulsos contínuos na medula espinhal, via ativação de fibras A δ e C, que resulta em aumento progressivo da resposta de neurônios espinhais a estímulos subsequentes. Esta plasticidade neuronal está envolvida com fenômenos de hipersensibilidade sensorial e síndromes de dor crônica, e é chamada sensibilização central. Após a estimulação nociceptiva periférica, o glutamato é liberado de terminações de fibras aferentes primárias, principalmente nas lâminas superficiais da do corno dorsal da medula espinhal. O glutamato ativa inicialmente receptores do tipo AMPA e cainato, causando influxo neuronal principalmente de sódio. Se o estímulo for de amplitude e duração suficiente para remover o íon magnésio que bloqueia o receptor NMDA, ocorre a ativação deste, o que causa um influxo de cálcio e conseqüente estimulação de vários sítios intracelulares, incluindo fosfolipases que produzem DAG, IP₃ e eicosanóides, ativação de proteínas quinase e de isoformas constitutivas da NO sintase. A ativação dos receptores NMDA

e metabotrópicos está envolvida no fenômeno de sensibilização central e conseqüente produção de hiperalgesia (HUDSPITH, 1997; LUTFY et al., 1997; MELLER e GEBHART, 1994).

Apesar do grande número de trabalhos desenvolvidos, principalmente no campo dos amino ácidos excitatórios, e da importância do controle da nocicepção em nível espinhal, a participação das cininas neste processo ainda é objeto de investigação. Apesar de alguns estudos terem sido feitos na área, diversos aspectos importantes ainda devem ser investigados, incluindo em última instância, a análise da viabilidade do uso, em episódios de dor em humanos, de drogas que modulam as ações das cininas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Verificar o efeito causado pela injeção intratecal de glutamato e das cininas em camundongos sobre a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico produzido pela placa quente;
- 2) Investigar, através de técnicas farmacológicas usando drogas seletivas, os mecanismos que podem estar relacionados com um possível efeito do glutamato e das cininas sobre o estímulo térmico em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos (25-35 g) criados pelo Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro / escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 horas, e os animais submetidos a um protocolo experimental não foram reutilizados em outro protocolo. Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

3.2. Administração das drogas por via intratecal

A administração das drogas pela via intratecal (i.t.) foi realizada como descrito anteriormente (HYLDEN e WILCOX, 1980). Os camundongos foram anestesiados levemente com éter etílico e um volume de 5 µl de salina tamponada com fosfato (PBS), ou com as drogas foi injetado no espaço subaracnóide da medula espinhal (entre as vértebras L5 e L6), com o auxílio de uma microsseringa conectada a um tubo de polietileno. Quando a agulha atinge o espaço subaracnóide da medula espinhal dos animais, estes respondem com uma retirada da cauda que confirma o sucesso da administração intratecal.

3.3. Hiperalgisia térmica induzida por diversos mediadores em camundongos

Um aparelho de placa quente foi usado para medir a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico, de acordo com método descrito anteriormente (AANONSEN e WILCOX,

1987; BEIRITH et al., 1998). Nesse experimento a placa quente (Ugo Basile, modelo DS 37) foi mantida a 50 ± 1 °C. Os animais foram colocados sobre a placa aquecida, circundada por um cilindro de acrílico de 24 cm de diâmetro, e o tempo dispendido entre a exposição à placa e a reação de lambar ou agitar as patas dianteiras ou traseiras, ou saltar foi registrado como latência ao estímulo térmico. Um tempo máximo de exposição de 30 segundos foi utilizado para evitar qualquer dano tecidual ao animal. Cada camundongo foi testado antes da administração das drogas para a determinação da latência basal de resposta.

A hiperalgesia térmica foi induzida pela injeção intratecal de glutamato (10-100 nmol/sítio), bradicinina (1-30 nmol/sítio), Tyr⁸-bradicinina (1-30 nmol/sítio), des-Arg⁹-bradicinina (3-50 nmol/sítio) ou des-Arg¹⁰-calidina (3-50 nmol/sítio). Após a administração das substâncias hiperalgésicas, a latência na placa quente foi medida em intervalos de tempo convenientes, até que a resposta hiperalgésica não fosse mais observada. Para evitar a degradação da bradicinina, o inibidor da cininase II, o captopril (5 mg/kg, s.c.), foi administrado 1 hora antes da administração deste peptídeo (CORREA e CALIXTO, 1993).

O efeito hiperalgésico máximo possível, em porcentagem, (%EMP) induzido pelos mediadores foi estimado para cada animal, usando no mínimo 6 camundongos por dose, e foi calculada pela seguinte equação:

$$\%EMP = \frac{(\text{pós-droga} - \text{pré-droga})}{(30 - \text{pré-droga})} \times 100$$

Onde:

pós-droga = é a latência de reação dos animais após a administração das drogas

pré-droga = é a latência basal de reação dos animais (antes da administração)

30 = é o tempo máximo de exposição dos animais ao estímulo térmico, correspondente à 100% de analgesia, e inversamente proporcional à hiperalgesia.

3.4. Análise dos receptores envolvidos na resposta hiperalgésica para as cininas

Para avaliar se o possível efeito hiperalgésico das cininas foi estritamente relacionado com a ativação dos seus receptores, foram utilizados antagonistas seletivos para o receptor B₂ (HOE 140, 1-10 pmol/sítio, i.t. e 1-10 nmol/kg, s.c.; NPC 18884, 1-30 nmol/sítio, i.t.) e para o receptor B₁ (des-Arg⁹-Leu⁸-bradicinina, 25 nmol/sítio, i.t.). Além disso, foram utilizados antagonistas de outros receptores que poderiam estar envolvidos na resposta às cininas. Foi verificada a participação dos sistemas glutamatérgico (MK-801, antagonista do receptor NMDA, 1-10 nmol/sítio, i.t.), taquicinérgico (FK 888, 3-30 pmol/sítio, i.t.; SR 48968, 10 pmol/sítio, i.t.; SR 142801, 10 pmol/sítio, i.t.; antagonistas dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP₈₋₃₇, 0,32-3,2 nmol/sítio, antagonista do receptor para CGRP). Todos os antagonistas foram administrados por via intratecal 10 minutos antes da injeção das cininas, exceto o HOE 140, que em um grupo de animais foi administrado 1 hora antes por via subcutânea (s.c.).

3.5. Análise das enzimas e dos mensageiros celulares envolvidos na resposta hiperalgésica das cininas e do glutamato

Para avaliar a possível participação do sistema nitrérgico no efeito hiperalgésico induzido pela bradicinina e pelo glutamato em camundongos, foram utilizados os inibidores da NO sintase, L-NAME (11-111 nmol/sítio, i.t.) e L-NOARG (45,6-456 nmol/sítio, i.t.), e os inibidores da guanilato ciclase solúvel, ODQ (30-300 pmol/sítio, i.t.) e LY 83583 (100-1000 pmol/sítio, i.t.). Além disso, o doador de óxido nítrico (SNAP, 0, 22 µmol/sítio, i.t.) e o análogo estável do GMPc (8-Br-GMPc, 22,5 nmol/sítio, i.t.) foram associados com doses sub-limíares de glutamato (10 nmol/sítio, i.t.) para verificar o possível efeito sinérgico destas substâncias.

Para analisar o envolvimento dos metabólitos das ciclooxigenases no efeito hiperalgésico causado pelas cininas e glutamato, foi utilizado um inibidor não seletivo das

ciclooxigenases, (indometacina, 3-30 nmol/sítio, i.t.) bem como inibidores seletivos da ciclooxigenase-1 (piroxicam, 9-50 nmol/sítio), ou da ciclooxigenase-2 (DFU, 0,9-9,1 nmol/sítio, i.t.).

Todos os antagonistas foram administrados por via intratecal 10 minutos antes da injeção das cininas, ou foram co-administrados por via intratecal com o glutamato.

3.6. Análise da participação das fibras aferentes primárias na resposta das cininas

Para verificar a participação das fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina no efeito hiperalgésico causado pelas cininas ou pelo glutamato, camundongos foram anestesiados com éter etílico e tratados com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou com o veículo (PBS com 10% de etanol e 10% de Tween 80) no segundo dia de vida, como descrito anteriormente (GAMSE, 1982). Os efeitos deste tratamento foram analisados 6 a 7 semanas após o tratamento com capsaicina ou veículo (utilizados como controle). Para verificar a eficácia do tratamento neonatal com capsaicina, um grupo de animais foi submetido ao teste da nocicepção causada pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata), conforme método descrito anteriormente (CORRÊA et al., 1996).

3.7. Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: BK, des-Arg⁹-BK, Tyr⁸-BK, des-Arg⁹-Leu⁸-BK, azul de metileno, captopril, capsaicina, CGRP₈₋₃₇, glutamato, indometacina, L-NOARG (N^G-nitro-L-arginina), L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil éster), D-NAME (N^G-nitro-D-arginina metil éster), piroxicam, SNAP, e pastilhas de salina com tampão fosfato-PBS (todas obtidas da Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). O LY 83583 (6-anilino-5,8-quinolinediona) e o 8-bromo-GMPc foram obtidos da RBI (Natick, EUA), e o ODQ (1H[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona) e o MK 801 (maleato de (5R,10S)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-

imina) foram obtidos da Tocris Cookson (Balwin, EUA). O HOE 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradicinina), o NPC 18884, o FK 888 (N²-[(4R)-4-hidroxi-1-(1-metil-1H-indol-3il)carbonil-L-prolil]-N-metil-N-fenilmetil-3-(2-naftil)-L-alaninamida), o DFU (5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metillsulfonil)fenil-2(5H)-furanona), os SR 48968 ((S)-N-metil-N [4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidino)-2-(3,4-diclorofenil) butil] benzamida) e SR 142801 (S)-(N)-(1-(3-(1-benzoil-3-(3,4-diclorofenil)piperidin-3-il)propil)-4-fenilpiperidina-4-yl)-N-metilacetamida) foram cedidos gentilmente pela Hoechst (Frankfurt, Alemanha), pela Scios/Nova Corporation (Baltimore, USA), pela Fujisawa Pharmaceutical (Osaka, Japão), pela Merck Froost (Quebec, Canadá) e pela Sanofi Recherché (Montpellier, França), respectivamente. As soluções estoque para todos os peptídeos foram preparadas em PBS (1-10 mM) em tubos siliconizados, mantidos à -18 °C e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos. As outra drogas foram diluídas em PBS e mantidas à 2 °C, com exceção do piroxicam, ODQ e LY 83583 (diluídos em 1% de DMSO), da capsaicina (diluída em 10% de etanol e 10% de Tween 80) e da indometacina (diluída em 5% de etanol absoluto). A concentração final de DMSO e etanol não excederam 0,5%, e não causaram nenhum efeito *per se* no limiar da dor.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média, exceto os valores individuais para as DE₅₀ e DI₅₀ (ou seja, doses das drogas que produziram 50% da resposta máxima, ou doses dos antagonistas que reduziram a hiperalgesia em 50% em relação aos controles, respectivamente). Esses valores foram expressos como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95% e calculados através de regressão linear através de experimentos individuais usando o programa "GraphPad Software". Os valores de DE₅₀ e DI₅₀ foram calculados nos picos de resposta hiperalgésia de cada substância, assim como os efeitos hiperalgésicos e as inibições máximas. Os efeitos e as inibições

máximas foram representados como a diferença entre o EMP dos grupos tratados e os EMP do grupo que recebeu apenas PBS (que representa a hiperalgesia causada pelo protocolo experimental). Desta maneira o efeito hiperalgésico máximo representa somente a hiperalgesia causada pelo agente nociceptivo, sem interferências experimentais. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Dunnett. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicat

4. RESULTADOS

4.1. Hiperalgisia térmica induzida pelo glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (HUDSPIT, 1997). Seus receptores são encontrados em terminações espinhais de fibras aferentes primárias, e agonistas exógenos dos diferentes receptores glutamatérgicos causam hiperalgisia quando injetados intratecalmente (HENLEY et al., 1993; MELLER e GEBHART, 1994). Com o objetivo de verificar se o ligante endógeno dos receptores glutamatérgicos, glutamato, produz efeito hiperalgésico espinhal, um grupo de animais recebeu uma injeção i.t. deste neurotransmissor. A injeção intratecal de glutamato (10-100 nmol/sítio) causou hiperalgisia dose-dependente quando avaliado no modelo de estimulação térmica, a placa quente, mantida à 50 °C (figura 1A e B). O efeito hiperalgésico do glutamato iniciou rapidamente, tendo o seu pico de efeito máximo aos 5 minutos, e foi mantido por até 60 minutos. A média dos valores da DE₅₀ (e seus limites de confiança de 95%) calculada foi de 34,9 (31,4 – 38,8) nmol/sítio, e a porcentagem máxima de hiperalgisia induzida pelo glutamato em relação ao controle PBS, para a maior dose utilizada (100 nmol/sítio) foi de 69 ± 7%.

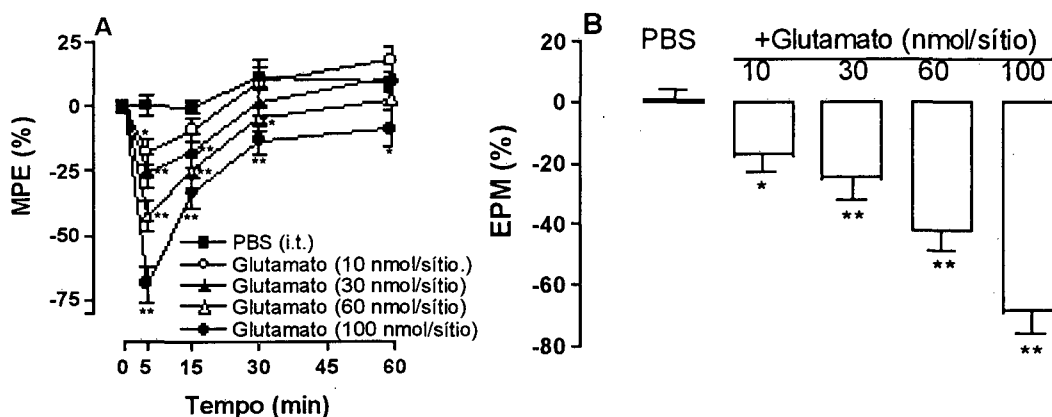


Figura 1 – Curvas tempo- (A) e dose- (B) resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de glutamato em camundongos. A relação dose-resposta para a ação hiperalgésica é melhor observada no pico do efeito (5 minutos) (B). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto da curva ou das colunas representa a média de 8-12 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

A administração intratecal dos inibidores da NO sintase, L-NOARG (45,6-456,0 nmol/sítio) e L-NAME (11,1-111,0 nmol/sítio), não induziu nenhum efeito *per se* nas latências basais dos animais, mas causou inibição dose-dependente da hiperalgesia induzida pelo glutamato (figura 2, A e B). A média dos valores da DI_{50} foram de 166,0 (129,5-212,9) e 31,3 (22,5-43,5) nmol/sítio para a L-NOARG e L-NAME, respectivamente. A inibição máxima da hiperalgesia causada por ambos os inibidores, foi de 100% (Tabela 1). O isômero inativo do inibidor L-NAME, o D-NAME (111,0 nmol/sítio), administrado pela via intratecal, não interferiu com o efeito hiperalgésico do glutamato (figura 2B).

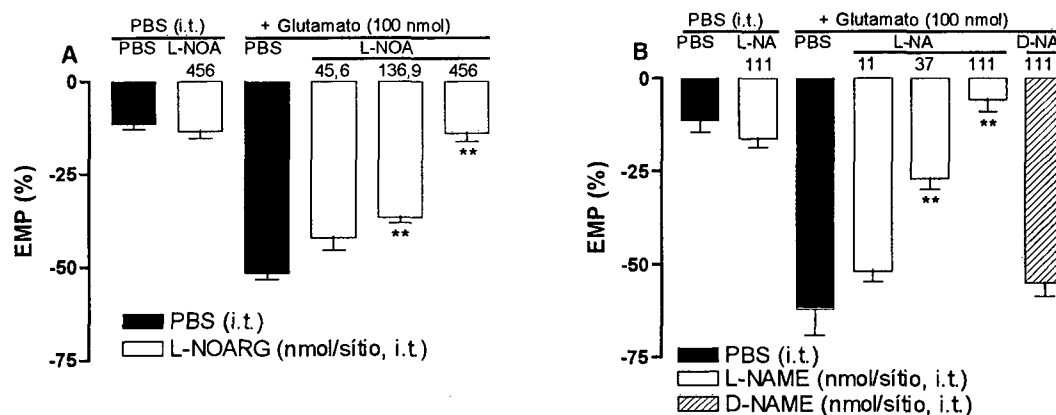


Figura 2 – Efeito da injeção intratecal do L-NOARG (L-NOA, A) e do L- ou D-NAME (L-NA, B) na hiperalgesia causada pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) no tempo de 5 minutos. Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (glutamato) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), ** $P < 0,01$.

Os resultados apresentados na figura 3 demonstram que o doador de óxido nítrico, SNAP (0,22 μ mol/sítio, i.t., A) ou do análogo estável do GMPc, 8-bromo-GMPc (22,5 nmol/sítio, i.t., B) co-administrados com uma dose sub-limiar de glutamato (10 nmol/sítio, i.t.), potencializaram significativamente o efeito hiperalgésico do glutamato. A administração intratecal de SNAP ou 8-Br-GMPc *per se* não causou alteração na latência basal de resposta ao estímulo térmico dos animais nas doses utilizadas (resultados não apresentados).

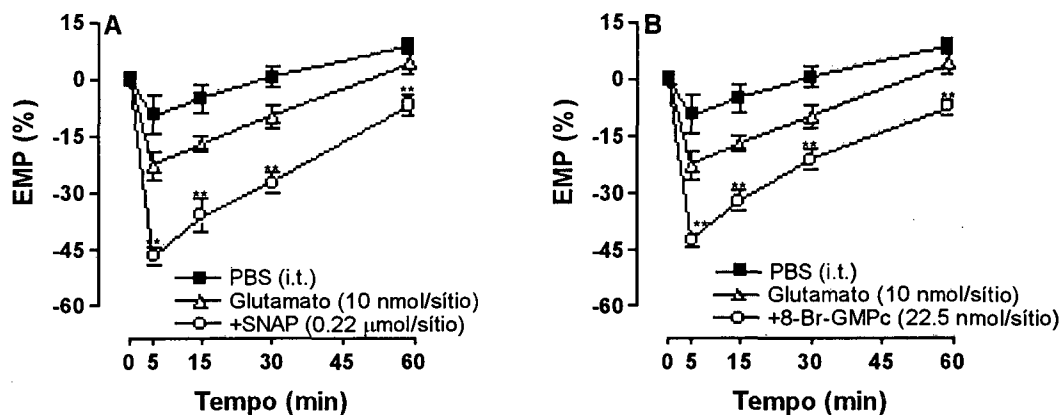


Figura 3 – Efeito da injeção intratecal do SNAP (A) e do 8-bromo-GMPc (B) na hiperalgesia causada por dose sub-limiar de glutamato (10 nmol/sítio, i.t.). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (glutamato) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), ** $P < 0,01$. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

Da mesma forma, a injeção intratecal de inibidores da guanilato ciclase solúvel LY 83583 (100-1000 pmol/sítio) ou do ODQ (30 - 300 pmol/sítio) não causou nenhum efeito *per se*, mas, quando administrados em conjunto com glutamato (100 nmol/sítio, i.t.), inibiram totalmente e de maneira dose-dependente a hiperalgesia térmica causada pelo glutamato (figura 4A e B). A média dos valores da DI_{50} foram de 240 (160-360) e 131 (99-174) nmol/sítio para o LY 83583 e ODQ, respectivamente (Tabela 1). O inibidor não seletivo da guanilato ciclase solúvel, azul de metileno (1,25 μmol/sítio, i.t.) também inibiu totalmente a hiperalgesia induzida pelo glutamato (resultados não apresentados).

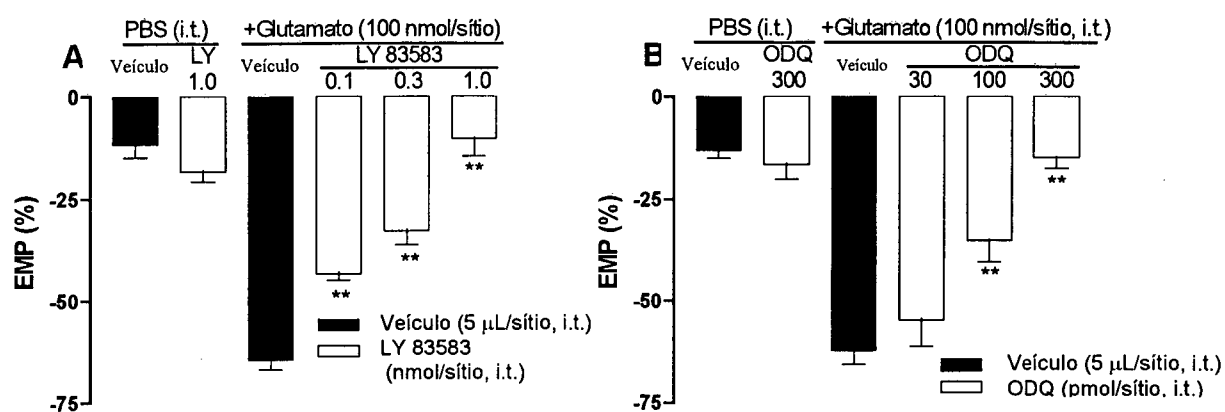


Figura 4 – Efeito da injeção intratecal do LY 83583 (A) ou do ODQ (B) na hiperalgesia causada pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) no tempo de 5 minutos. Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (glutamato) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), **P<0,01.

Tabela 1 - Comparação dos valores das médias das DI_{50} dos inibidores da NO sintase e da guanilato ciclase solúvel, administrados por via intratecal, na hiperalgesia térmica causada pelo glutamato em camundongos.

Drogas	DI_{50}^a	Inibição máxima
L-NOARG	166,0 (129,5-212,9) nmol/sítio	100%
L-NAME	31,3 (22,5-43,5) nmol/sítio	100%
LY83583	240 (160-360) nmol/sítio	100%
ODQ	131 (99-174) nmol/sítio	100%

Observação: Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais. ^a DI_{50} s com os seus respectivos limites de confiança (95%).

4.2. Hiperalgisia térmica induzida pelas cininas

Assim como o glutamato, a bradicinina e os receptores para cininas são encontrados em terminações espinhais de neurônios aferentes primários (BHOOLA, 1996; PERRY e SNYDER, 1984; STERANKA et al., 1988). Sendo assim, as cininas também poderiam causar hiperalgisia quando aplicadas por via intratecal em camundongos. A administração intratecal da bradicinina (1-30 nmol/sítio) causou hiperalgisia térmica dose-dependente quando avaliada no modelo da placa quente (figura 5A e B). Este efeito hiperalgésico teve um pico máximo aos 10 minutos, e durou cerca de 60 minutos após a injeção do peptídeo. A média dos valores da DE_{50} (e seus limites de confiança de 95%) calculada foi de 3,8 (3,1–4,7) nmol/sítio, e a porcentagem máxima de hiperalgisia induzida pela bradicinina em relação ao controle PBS, para a maior dose utilizada (30 nmol/sítio) foi de $67 \pm 10\%$ (Tabela 2). Além do efeito hiperalgésico, poucos segundos após a administração da bradicinina (1-30 nmol/sítio, i.t.), os animais apresentaram comportamento anormal caracterizado por hiperatividade, que durou até 1 minuto após a injeção intratecal.

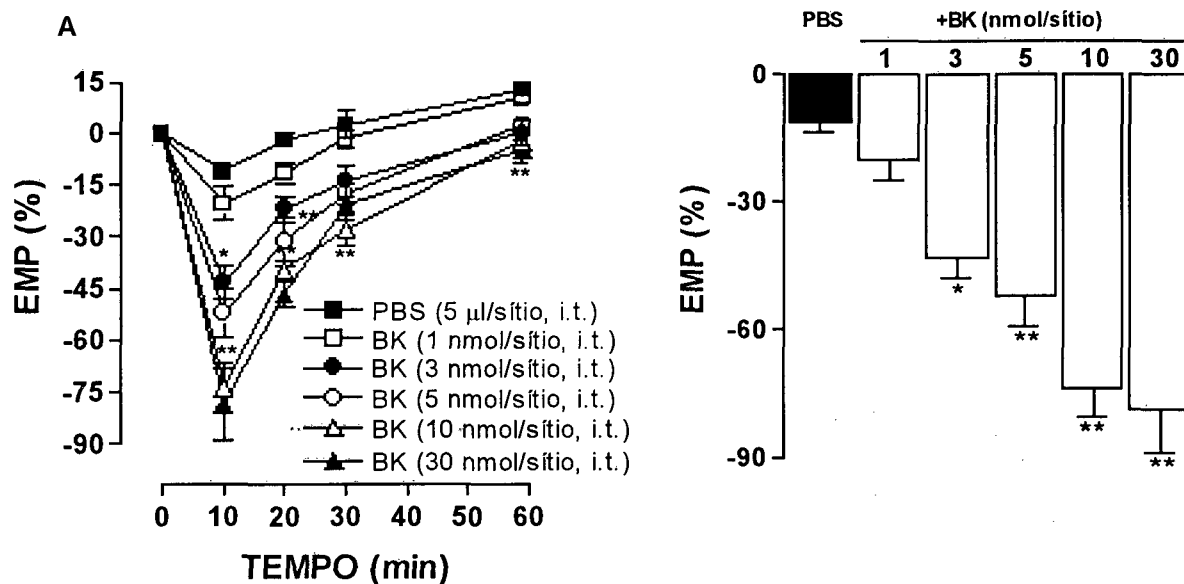


Figura 5. Curvas tempo- (A) e dose- (B) resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de bradicinina (BK) em camundongos. A relação dose-resposta para a ação hiperalgésica é melhor observada no pico do efeito (10 minutos) (B). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto da grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

Do mesmo modo que a bradicinina, o agonista seletivo do receptor B_2 , a tirosina⁸-bradicinina (Tyr⁸-BK, 1-30 nmol/sítio, i.t.), causou hiperalgesia duradoura (até 60 minutos) de maneira dose-dependente (figura 6A e B). A média dos valores da DE_{50} (e seus limites de confiança de 95%) calculado foi de 6,5 (5,4-7,8) nmol/sítio, e a porcentagem de hiperalgesia induzida pela Tyr⁸-bradicinina em relação ao controle PBS, para a maior dose utilizada (30 nmol/sítio) foi de $42 \pm 3\%$ (Tabela 2). A Tyr⁸-bradicinina também causou um estado de hiperatividade transitória nos animais.

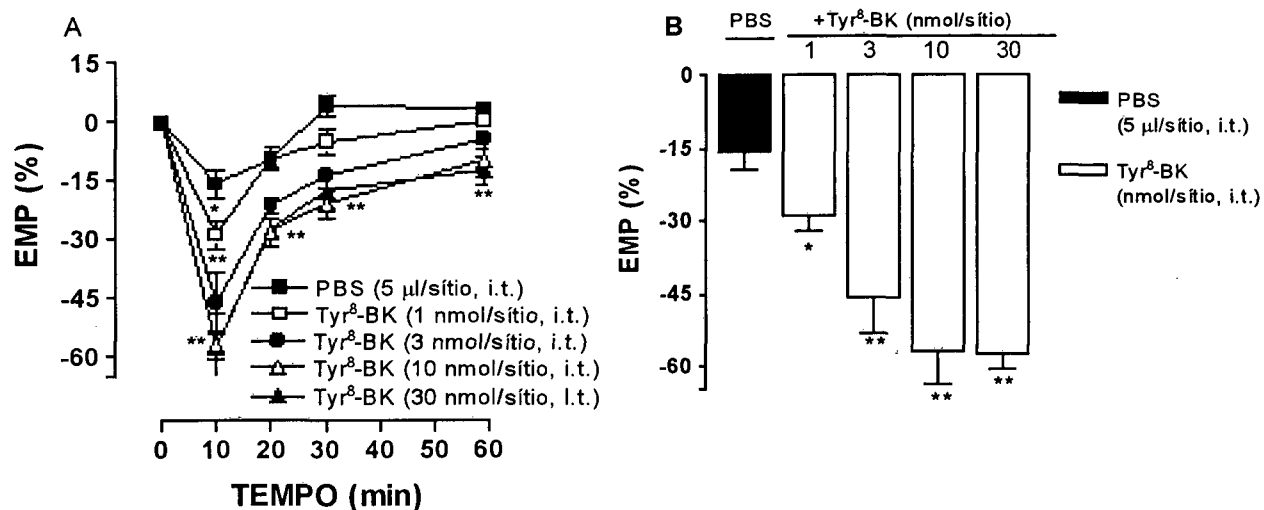


Figura 6. Curvas tempo- (A) e dose- (B) resposta para o efeito hiperalгésico causado pela injeção intratecal de tirosina⁸-bradicinina (Tyr⁸-BK) em camundongos. A relação dose-resposta para a ação hiperalгésica é melhor observada no pico do efeito (10 minutos) (B). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto representa a média de 6-8 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), *P<0,05 e **P<0,01. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

O agonista seletivo para o receptores B₁, a des-Arg⁹-bradicinina (DABK, 3-50 nmol/site, i.t.), também causou hiperalgesia térmica em camundongos (figura 7A e B). Mas diferente da bradicinina, a DABK produziu uma hiperalgesia significativa somente a partir de 20 minutos após a injeção intratecal, um efeito que permaneceu por cerca de 90 minutos. A média dos valores da DE₅₀ (e seus limites de confiança de 95%) calculada foi de 21,3 (14,8–30,7) nmol/site, e a porcentagem máxima de hiperalgesia induzida pela DABK em relação ao controle PBS, foi de 32 ± 4%, no tempo de 60 minutos (Tabela 2). Além disto, a DABK não causou nenhum efeito de hiperatividade nos animais.

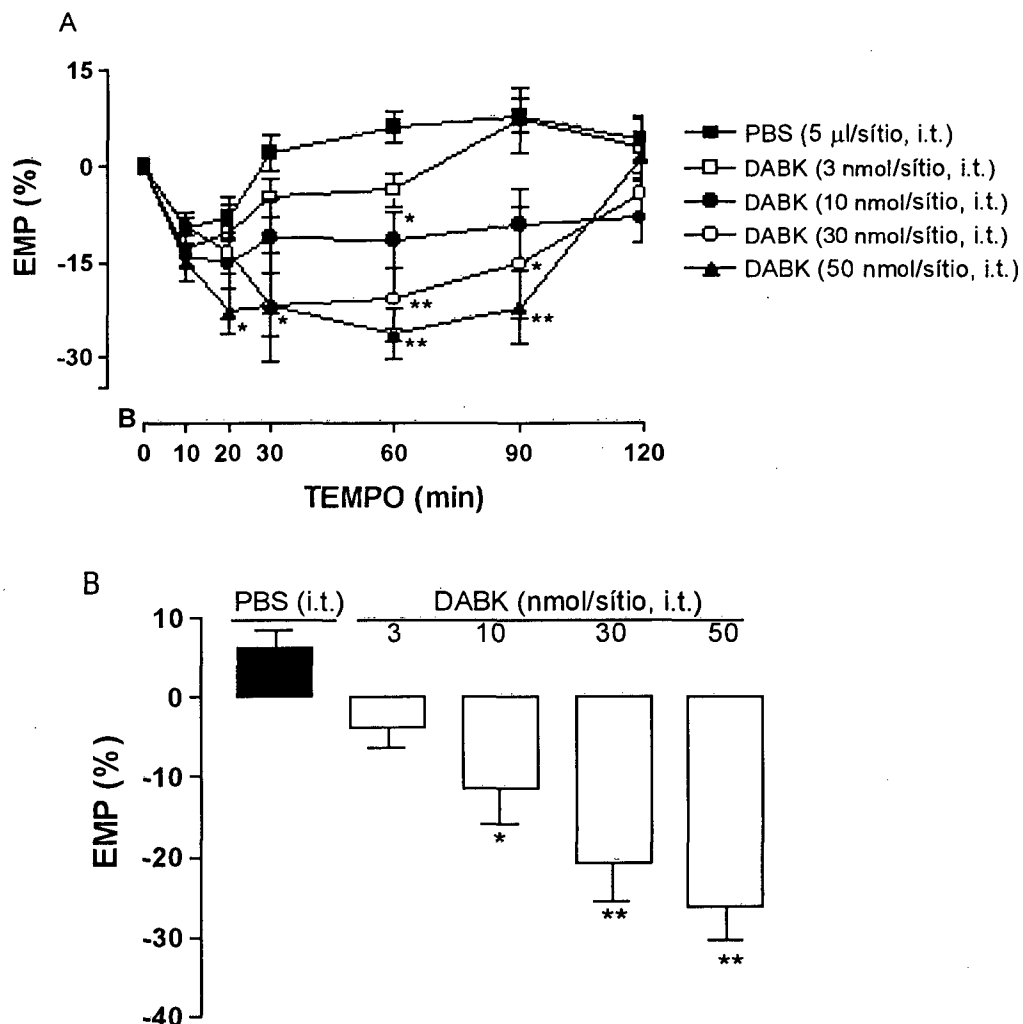


Figura 7. Curvas tempo- (A) e dose- (B) resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal da des-Arg⁹-bradicinina (DABK) em camundongos. A relação dose-resposta para a ação hiperalgésica é melhor observada no pico do efeito (60 minutos) (B). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), *P<0,05 e **P<0,01. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

Do mesmo modo que a des-Arg⁹-bradicinina, outro agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg¹⁰-calidina (DAKD, 1-50 nmol/sítio, i.t.), também causou hiperalgésia duradoura (até 90

minutos) de maneira dose-dependente em camundongos (figura 8A e B). A média dos valores da DE_{50} (e seus limites de confiança de 95%) calculado foi de 22,7 (17,0–30,4) nmol/sítio, e a porcentagem de hiperalgésia induzida pela DAKD em relação ao controle PBS foi de $36,4 \pm 4,7\%$ (Tabela 1).

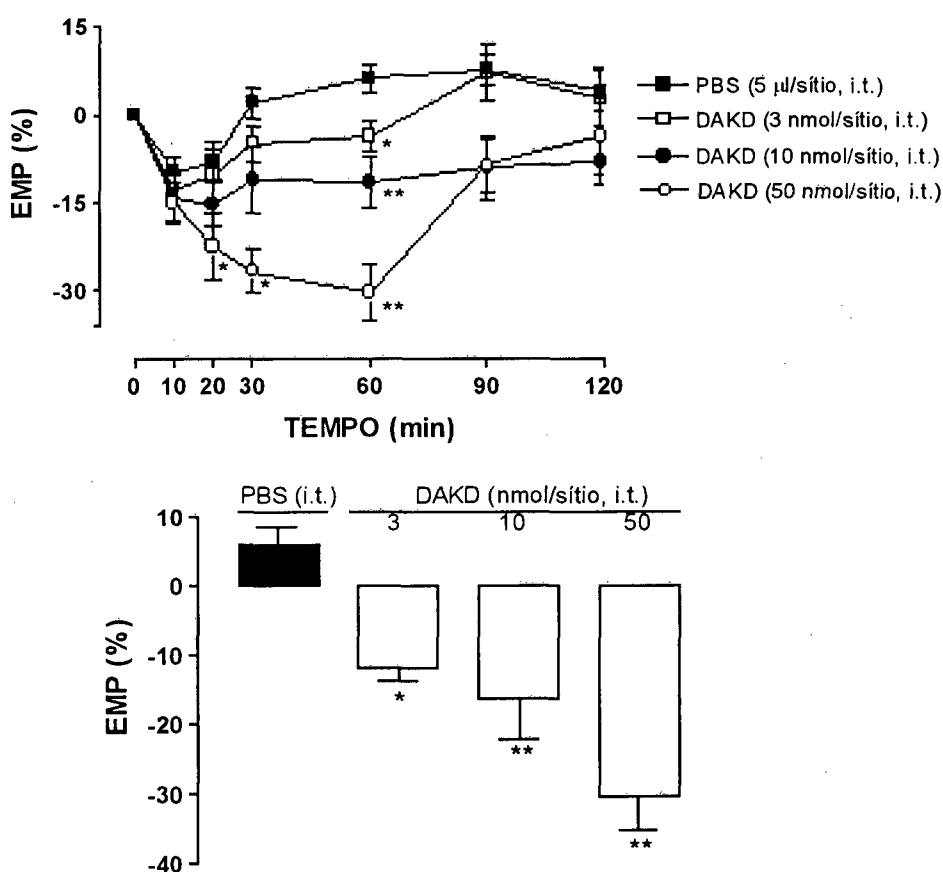


Figura 8. Curvas tempo- (A) e dose- (B) resposta para o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal da des-Arg¹⁰-calidina (DAKD) em camundongos. A relação dose-resposta para a ação hiperalgésica é melhor observada no pico do efeito (60 minutos) (B). Os efeitos das drogas são expressos em EMP (%). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

Tabela 2 - Valores médios das DE₅₀ do glutamato e das cininas injetados intratecalmente na indução de hiperalgésia térmica analisada no modelo da placa quente em camundongos.

Substância	DE ₅₀ ^a	Efeito hiperalgésico máximo
Glutamato	34,9 (31,4-38,8) nmol/sítio	69 ± 7%
Bradicinina	3,8 (3,1-4,7) nmol/sítio	67 ± 10%
Tirosina ⁸ -bradicinina	6,5 (5,4-7,8) nmol/sítio	42 ± 3%
des-Arg ⁹ -bradicinina	21,3 (14,8 – 30,7) nmol/sítio	32 ± 4%
des-Arg ¹⁰ -calidina	22,7 (17,0 – 30,4) nmol/sítio	36,7 ± 4,7%

Observação: Cada valor representa a média de 6 a 12 animais. ^a DE₅₀s com os seus respectivos limites de confiança (95%).

4.3. Envolvimento dos receptores B₁ e B₂ na hiperalgésia induzida pelas cininas

Para caracterizar os receptores envolvidos na resposta hiperalgésica causada pelas cininas, foram utilizados antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂. Os antagonistas do receptor B₂ HOE 140 (1-10 pmol/sítio, i.t., A, ou 1-10 nmol/kg, s.c., B) ou NPC 18884 (1-30 pmol/sítio, i.t., C), reverteram totalmente o efeito hiperalgésico induzido pela bradicinina (5 nmol/sítio, i.t.) (figura 9). A média dos valores da DI₅₀ (e seus limites de confiança de 95%) calculados foram de 4,8 (4,1 – 5,6) pmol/sítio, 1,5 (0,9-2,4) nmol/kg, e 6,4 (4,1 – 9,8) pmol/sítio, para o HOE 140 (i.t. e s.c.) e NPC 18884 (i.t.), respectivamente. A inibição máxima em todas as vias foi de 100% para o HOE 140 e o NPC 18884 (Tabela 3).

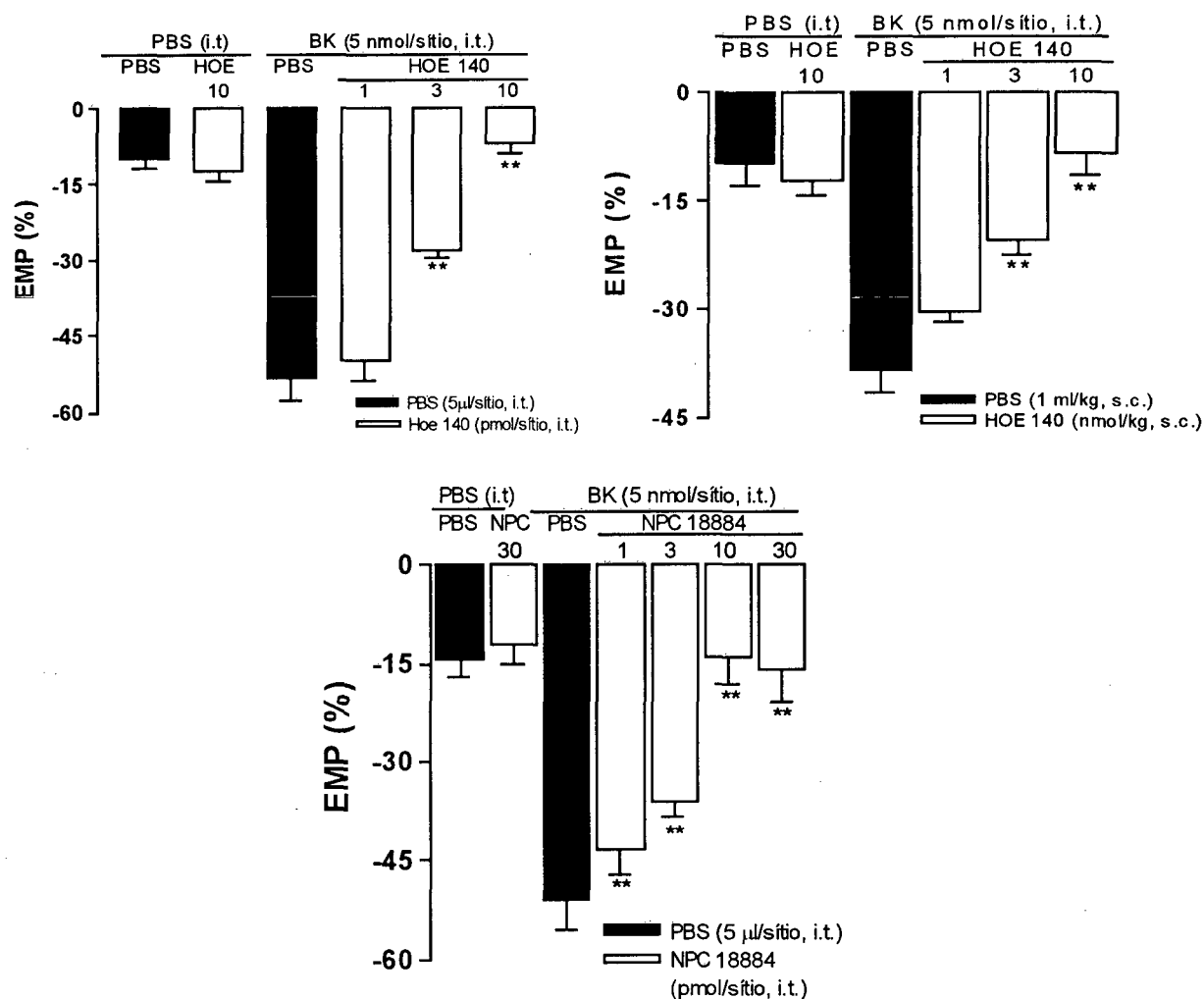


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com HOE 140 (1-10 pmol/sítio, i.t., A, ou 1-10 nmol/kg, s.c., B) ou NPC 18884 (1-30 pmol/sítio, i.t., C), na ação hiperalérgica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK) no seu pico de efeito (10 minutos) em camundongos. O efeito das drogas é expresso em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (bradicinina) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett). *P<0,05, **P<0,01.

O antagonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-bradicinina (DALBK, 25 nmol/sítio, i.t.) reverteu totalmente o efeito hiperalérgico causado pela DABK (inibição máxima de 100%)

(figura 10 A). Além disto a DALBK (10 nmol/sítio, i.t.) inibiu parcialmente, mas de maneira significativa, a hiperalgésia induzida pela bradicinina aos 30 e 60 minutos (figura 10 B).

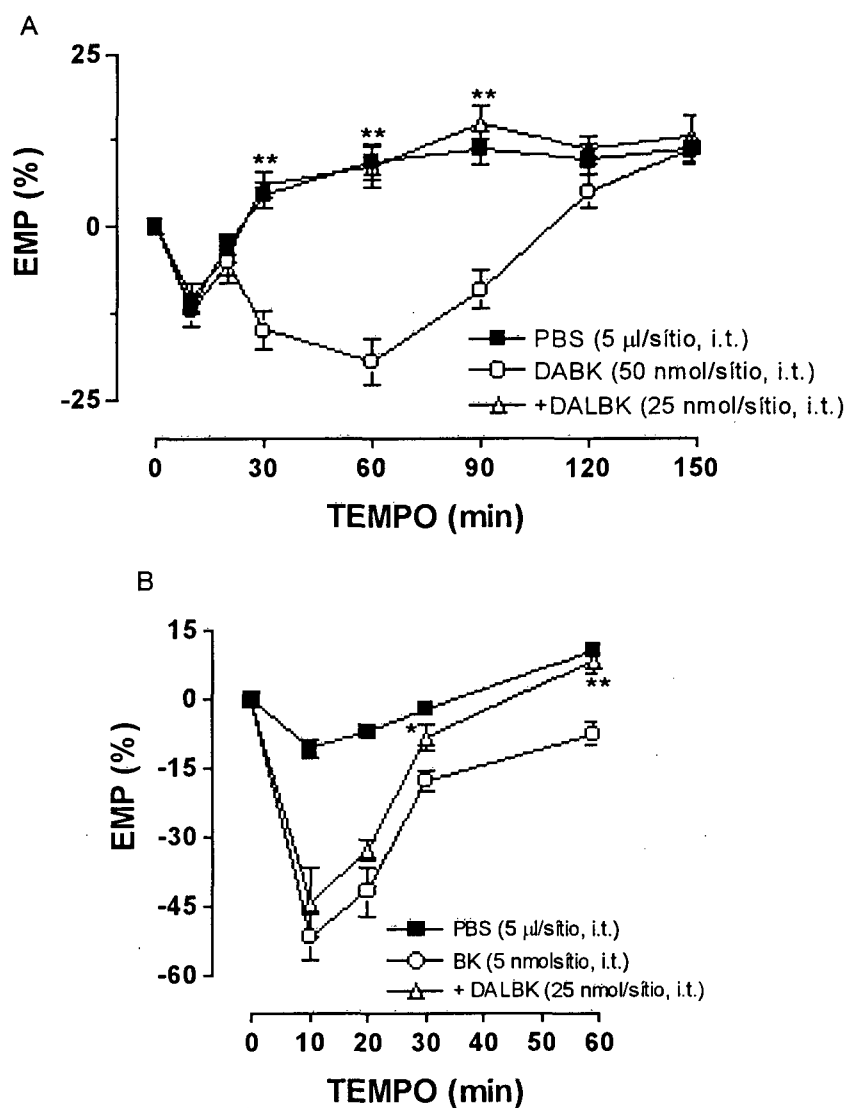


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com des-Arg⁹-Leu⁸-bradicinina (DALBK, 10 nmol/sítio, i.t.) na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de des-Arg⁹-bradicinina (DABK, A) ou bradicinina (BK, B) em camundongos. As respostas são expressos em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (DABK, A ou BK, B) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), *P<0,05, **P<0,01. Em alguns casos as linhas do E.P.M. estão inseridas dentro dos símbolos.

Tabela 3 - Comparação dos valores das médias das DI_{50} dos antagonistas do receptor B_2 na hiperalgesia térmica causada pela bradicinina em camundongos.

Drogas	DI_{50}^a	Inibição máxima
HOE 140	4,8 (4,1-5,6) pmol/sítio, i.t.	100%
HOE 140	1,5 (0,9-2,4) nmol/kg, s.c.	100%
NPC 18884	6,4 (4,1-9,8) pmol/sítio	100%

Observação: Cada valor representa a média de 6 a 10 animais. ^a DI_{50} s com os seus respectivos limites de confiança (95%).

4.4. Envolvimento de outros receptores na hiperalgesia induzida pela bradicinina

Como a resposta hiperalgéica da bradicinina foi a mais pronunciada entre as cininas, o restante dos experimentos procuraram avaliar a participação de receptores de outros neurotransmissores envolvidos no controle da nocicepção em nível espinhal na ação causada pela bradicinina. A administração do antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, MK 801 (1-10 nmol/sítio, i.t.) não causou nenhum efeito *per se*, mais inibiu parcialmente a hiperalgesia induzida pela bradicinina (figura 11). A inibição máxima calculada foi de $65,7 \pm 2,6\%$, no pico do efeito hiperalgéico máximo da bradicinina (Tabela 4). Apesar disto, o HOE 140 (10 pmol/sítio, i.t.), na mesma dose que inibiu a hiperalgesia da bradicinina, não foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) (resultados não mostrados).

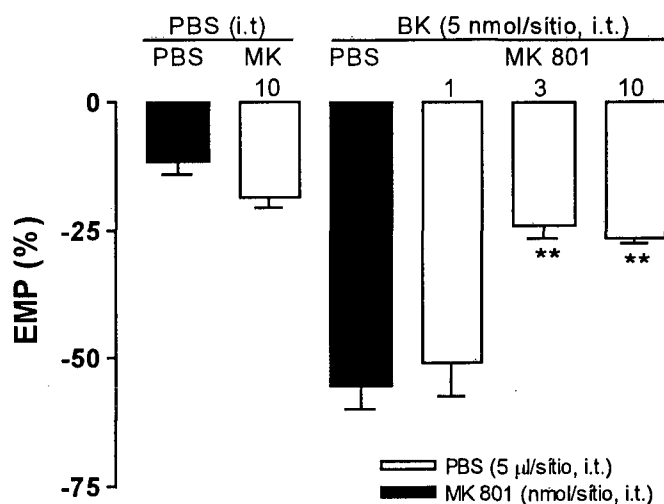


Figura 11. Efeito do pré-tratamento com MK801 (1-10 nmol/sítio, i.t.) na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK) no seu pico de efeito (10 minutos) em camundongos. O efeito das drogas é expresso em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (bradicinina) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), **P<0,01.

Da mesma forma, a injeção intratecal do antagonista do receptor taucinérgico NK₁, o FK 888 (3-30 pmol/sítio) inibiu parcialmente, mas de maneira significativa, a hiperalgesia induzida pela bradicinina (figura 12A), com inibição máxima calculada foi de $54,3 \pm 6,4\%$ (Tabela 4). Diferente do antagonista do receptor NK₁, os antagonistas seletivos dos receptores NK₂ e NK₃ (figura 12B), SR 48968 (10 pmol/sítio, i.t.) e SR 142801 (10 pmol/sítio, i.t.), respectivamente, não foram capazes de inibir a hiperalgesia induzida pela bradicinina.

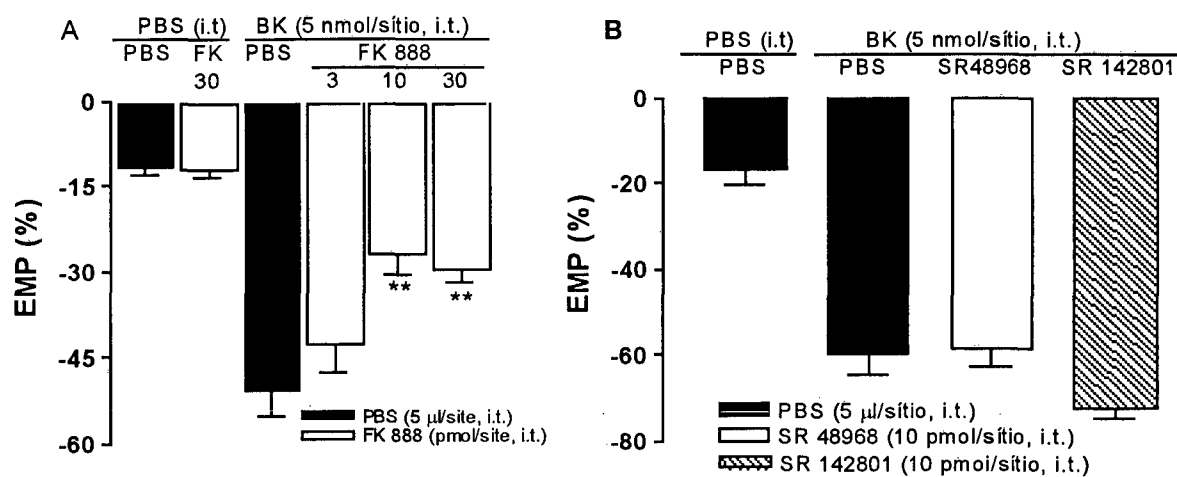


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com FK888 (A), SR 48968, e SR 142801 (B) na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK) em camundongos. As respostas são expressas em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (bradicinina) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Finalmente, para avaliar a participação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na resposta da bradicinina, foi utilizado um antagonista do receptor de CGRP. O CGRP₈₋₃₇ (0,32-3,2 nmol/sítio, i.t.) inibiu parcialmente, porém significativamente, a hiperalgesia induzida pela bradicinina, com inibição máxima calculada de $52 \pm 13\%$ (figura 13).

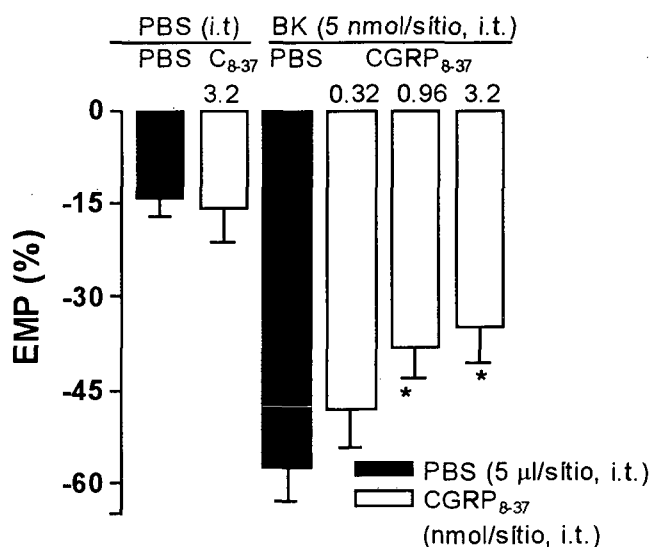


Figura 13. Efeito do pré-tratamento com CGRP₈₋₃₇ (C₈₋₃₇, 0,32–3,2 nmol/sítio, i.t.) na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradycinin (BK) em camundongos. As respostas são expressas em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (bradycinin) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), *P<0,05.

4.5. Envolvimento na NO sintase e das ciclooxygenases na hiperalgésia induzida pela bradycinin

Como a via do óxido nítrico foi importante para o efeito hiperalgésico do glutamato, e pelo fato da bradycinin poder induzir a formação de óxido nítrico em neurônios (BAUER et al., 1993), o efeito deste mediador foi estudado. Para verificar o envolvimento do óxido nítrico na resposta à bradycinin, foi utilizado um inibidor da enzima NO sintase, o L-NAME (3 – 30 nmol/sítio, i.t.). O L-NAME, em doses que capazes de bloquear a hiperalgésia do glutamato, causou inibição parcial, mas significativa, da hiperalgésia induzida pela bradycinin, com inibição máxima de $62,6 \pm 2,5\%$

(figura 14 e tabela 4). O isômero inativo do L-NAME, D-NAME (30 nmol/sítio) não causou nenhum efeito sobre a resposta da bradicinina, demonstrando a especificidade do efeito anti-hiperalgésico.

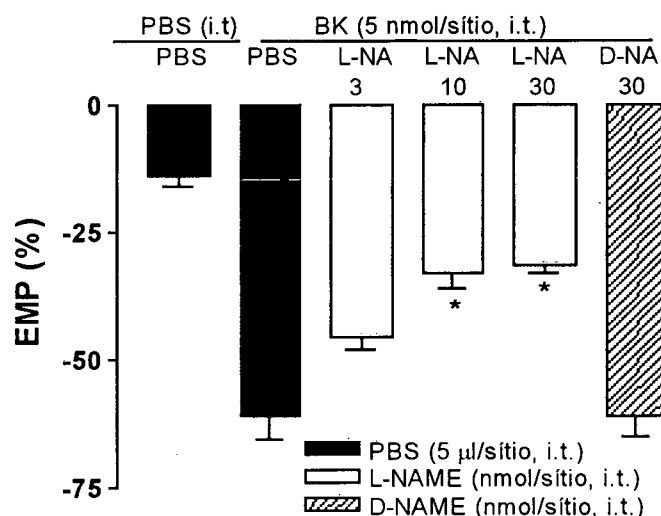


Figura 14. Efeito do pré-tratamento com L- e D-NAME (L- e D-NA, 3-30 nmol/sítio, i.t.) na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK) em camundongos. As respostas são expressas em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle-bradicinina (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

A ativação das ciclooxigenases tem sido implicada na mediação espinal do processo nociceptivo. Do mesmo modo, tem sido demonstrado que prostaglandinas administradas por via intratecal causam hiperalgesia (UDA et al., 1990). Para verificar a participação da via das ciclooxigenases na hiperalgesia causada pela bradicinina, foi utilizado o inibidor não-seletivo indometacina, e os inibidores seletivos de ciclooxigenase-1 e -2, piroxicam e DFU, respectivamente. A indometacina (3-30 nmol/sítio, i.t.), mas não o piroxicam (9-50 nmol/sítio, i.t.), foi capaz de reduzir, de maneira significativa, a hiperalgesia causada pela bradicinina ($63,3 \pm 7,3\%$) (figura 15A e C). Além disto, o DFU (0,9-9,1 nmol/sítio, i.t.) também inibiu a hiperalgesia

causada pela bradicinina, com inibição máxima de 100% (figura 15B e tabela 4) e com $DI_{50} = 2,1$ (0,8-5,3) nmol/sítio. O DFU (9,1 nmol/sítio, i.t.) também foi capaz de bloquear a hiperalgesia induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) (resultados não demonstrados).

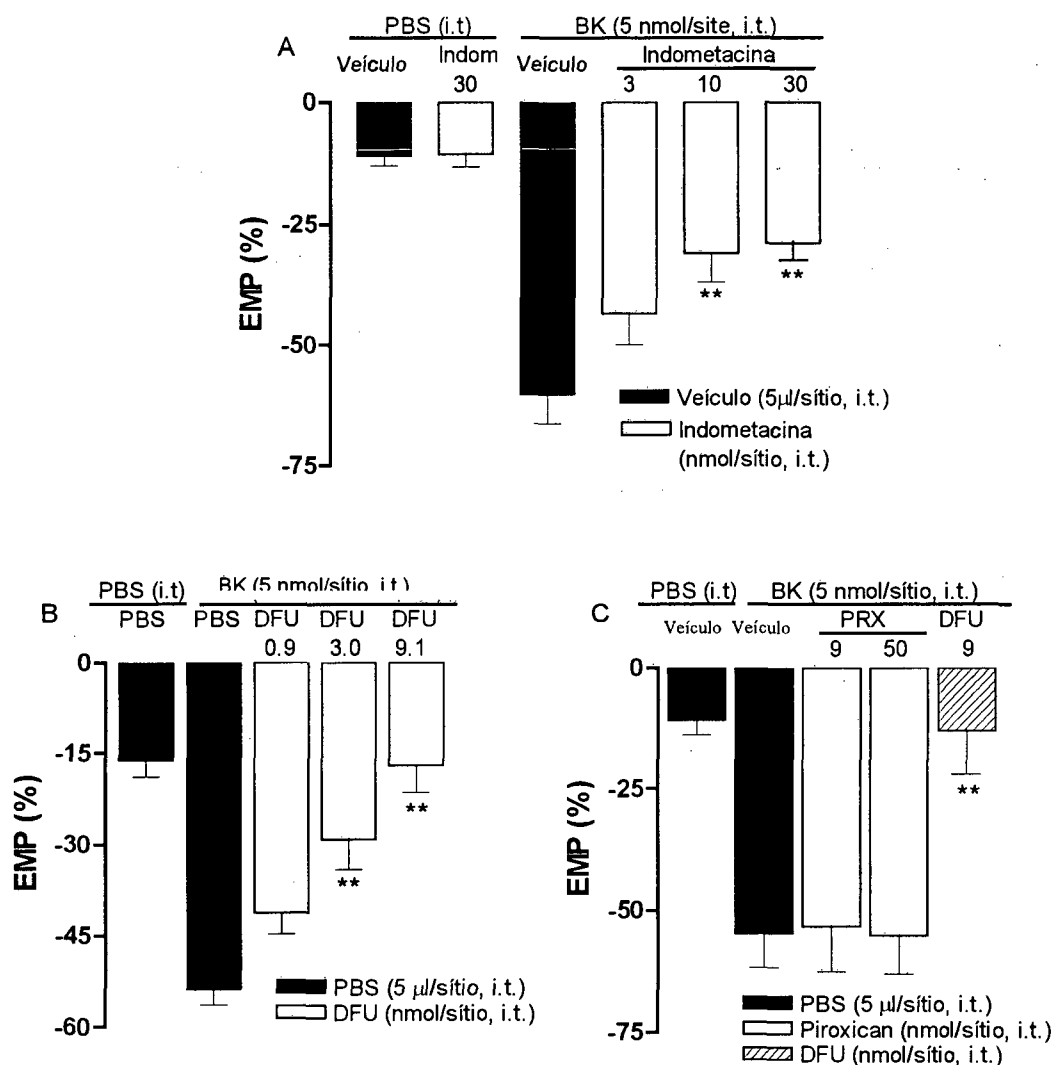


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com indometacina (Indom., A), DFU (B) e piroxicam (PRX, C) na ação hiperalérgica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK) em camundongos. As respostas são expressas em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (bradicinina) (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett), ** $P < 0,01$.

4.6. Envolvimento das fibra aferentes primárias sensíveis à capsaicina na hiperalgesia induzida pela bradicinina

As fibras aferentes primárias são as principais estruturas neuronais onde se encontram os receptores da bradicinina nas suas terminações espinhais. Além disto, estas fibras parecem ser importantes na nocicepção espinhal induzida pelo agonista glutamatérgico, NMDA (LIU et al, 1997). O tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) foi utilizado para destruir grande parte destas fibras aferentes. Em animais tratados no segundo dia de vida com capsaicina, a hiperalgesia induzida pela bradicinina foi reduzida em $70,5 \pm 8,3\%$, quando comparada aos animais que receberam veiculo no período neonatal (figura 16A e tabela 4). Este mesmo tratamento reduziu de maneira significativa a hiperalgesia induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.) em $38,4 \pm 5,2 \%$ (figura 16B). A resposta à capsaicina nos animais tratados no período neonatal com esta substância foi verificada na nocicepção causada pela injeção intraplantar capsaicina. Neste animais ocorreu uma significativa inibição de $82 \pm 4 \%$ no tempo de reação dos animais ao estímulo, quando comparado com os animais que receberam veiculo no período neonatal (resultados não demonstrados).

Além disso, a destruição de fibras aferentes pela capsaicina retira a capacidade do MK-801, FK 888, L-NOARG e indometacina, mas não do HOE 140, de inibir a hiperalgesia induzida pela bradicinina (figura 16A).

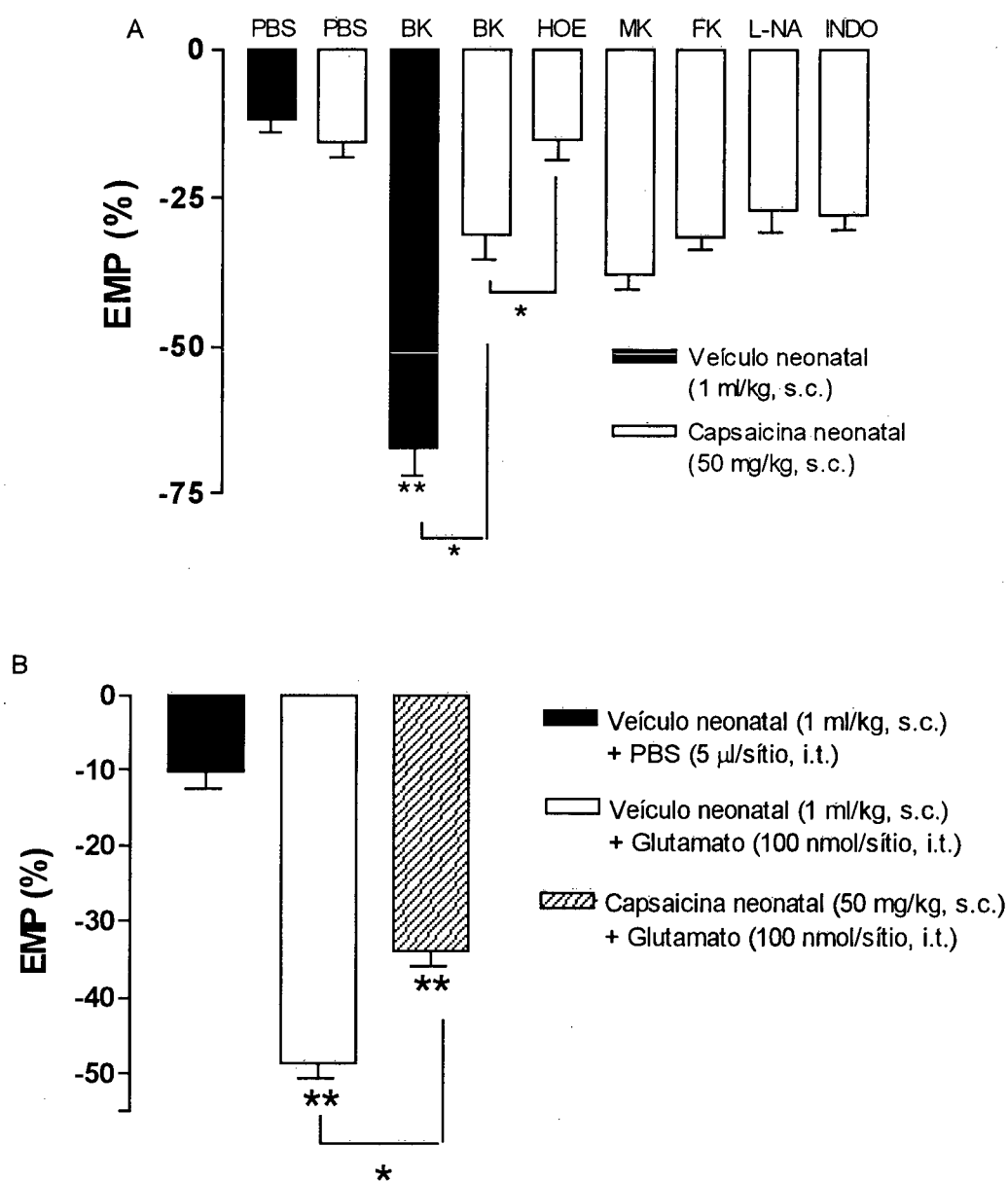


Figura 16. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina na ação hiperalgésica induzida pela injeção intratecal de bradicinina (BK, A) ou glutamato (B), e da ação anti-hiperalgésica do HOE 140 (HOE10 pmol/sítio), do MK 801 (MK, 10 nmol/sítio), do FK 888 (FK, 30 nmol/sítio), da L-NAME (L-NA, 30 nmol/sítio) e da indometacina (indo, 30 nmol/sítio) em camundongos. As respostas são expressas em EMP (%). Cada ponto na curva representa a média de 6 a 10 animais e as barras verticais representam os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Tabela 4 - Comparação dos valores das médias das inibições máximas dos antagonistas NMDA, NK₁ e CGRP, dos inibidores da ciclooxigenase e da NO sintase, e da neurotoxina capsaicina na hiperalgesia térmica causada pela bradicinina em camundongos.

Drogas	Inibição máxima
MK 801	65,7 ± 2,6%
FK 888	54,3 ± 6,4%
CGRP ₈₋₃₇	52 ± 13%
L-NAME	62,6 ± 2,5%
Indometacina	63,3 ± 7,3%
DFU	100%
Capsaicina neonatal	70,5 ± 8,3%

Observação: Cada valor representa a média de 6 a 10 animais.

5. DISCUSSÃO

A ativação de fibras aferentes primárias produz a liberação de neurotransmissores nas sinapses primárias do corno dorsal da medula espinhal (DICKENSON et al., 1997). Uma grande proporção destas fibras contém peptídeos, como a substância P e o CGRP, que coexistem com aminoácidos excitatórios como o glutamato (DE BIASI e RUSTIONI, 1988; JURÁNEK e LEMBERCK, 1997). Assim, a estimulação de fibras A δ and C aferentes envolve receptores para neuropeptídeos, assim como receptores para aminoácidos excitatórios, na medula espinhal. De fato, diversos agonistas glutamatérgicos e taquicinérgicos causam hiperalgesia e/ou comportamento nociceptivo quando injetados intratecalmente em animais (AANONSEN e WILCOX, 1987; FERREIRA e LORENZETTI, 1994; MAO et al., 1992; MELLER et al., 1992a, b; MELLER e GEBHART, 1994; MOOCHHALA e SAWYNOK, 1984; PIERCEY et al., 1981; URCA e RAIGORODSKY, 1988). Do mesmo modo, os antagonistas dos receptores para estas substâncias conseguem inibir a transmissão da dor de diversas origens quando administrados por via i.t. em animais (CAMPBELL et al., 1998; CHAPLAN et al., 1997; COUDORÉ-CIVIALE et al., 1998; REN et al., 1992; WATKINS et al., 1994; ZAHN et al., 1998; ZHUO, 1998; para revisão ler THOMAS, 1995; HUDSPITH, 1997).

O NMDA produz hiperalgesia térmica quando administrado por via espinhal em camundongos e em ratos, uma ação mediada pela ativação da NO sintase (KITTO et al., 1992; MALMBERG e YAKSH, 1993; MELLER et al., 1994b, 1996). O presente estudo estende estas observações, demonstrando que a injeção intratecal de concentrações nanomolares do neurotransmissor excitatório endógeno, glutamato, produz hiperalgesia térmica dose-dependente e relativamente duradoura (até 60 minutos) quando analisada no teste da placa quente mantido à 50 °C. Esses resultados diferem, por diversos motivos, da breve hiperalgesia induzida por pequenas doses de NMDA que dura por volta de 3 a 5 minutos (AANONSEN e

WILCOX, 1987; KITTO et al., 1992; KOLHEKAR et al., 1993). Quando doses altas de AMPA ou NMDA (6,8 nmol e 1,1 nmol/sítio) foram administradas por via i.t. em ratos (MALMBERG e YAKSH, 1992), esses agonistas glutamatérgicos produziram hiperalgesia mais duradoura (até 45 minutos). A resposta ao glutamato é diferente possivelmente pela sua capacidade de ligar-se a todos os receptores glutamatérgicos. Outra diferença, em relação a potência hiperalgésica causada pela injeção de NMDA (faixa de pmol) comparado ao glutamato (faixa de nmol), pode ser atribuída ao fato de que, o glutamato é rapidamente recaptado por sistemas de alta afinidade neuronais e não-neuronais (URCA e RAIGOROSKY, 1988).

Os resultados do presente estudos demonstram pela primeira vez que a hiperalgesia induzida pelo glutamato é mediada pela via da L-arginina-NO-GMPc em nível espinhal. Estas observações derivam das seguintes evidências:

- 1) O tratamento por via intratecal com os inibidores da NO sintase, L-NAME (mas não D-NAME) e L-NOARG, antagonizou de maneira dose-dependente a hiperalgesia induzida pelo glutamato. O L-NAME teve um efeito anti-hiperalgésico mais potente do que a L-NOARG;
- 2) A hiperalgesia causada por doses baixas de glutamato foi potencializada pela co-administração do doador de NO, SNAP e pelo análogo estável do GMPc, o 8-Br-GMPc
- 3) Finalmente, dois inibidores não seletivos da guanilato ciclase solúvel, o LY 83583 e o azul de metileno (LUO et al., 1995; MELLER et al., 1996), e também o inibidor seletivo desta enzima, o ODQ (GARTHWAITE et al., 1995; CELLEK et al., 1996; SCHRAMMEL et al., 1996), administrados por via intratecal, bloquearam a hiperalgesia induzida pelo glutamato. É importante ressaltar que o ODQ foi aproximadamente 2 a 3 vezes mais potente do que o LY 83583 neste modelo.

O influxo de cálcio induzido pela ativação do receptor NMDA provoca, entre outras ações, a ativação da enzima NO sintase e conseqüente síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina em tecido neuronal (GARTHWAITE et al., 1988). As três formas de NO sintase, a

neuronal, a endotelial e a induzida, são encontradas no sistema nervoso central, onde participam de funções fisiológicas e patológicas (PAAKKARI e LINDSBERG, 1995). O glutamato e o NMDA perfundidos na medula espinhal de ratos são capazes de liberar localmente óxido nítrico (RIVOT et al., 1999). Este NO liberado pode agir intracelularmente interagindo com diversos alvos, ou então agir como mensageiro retrógrado, modulando a liberação de glutamato e neuropeptídeos das terminações de neurônios aferentes primários (AIMAR et al., 1998; MELLER e GRBHART, 1993). Como consequência, o óxido nítrico parece estar envolvido na modulação da nocicepção em nível espinhal. De fato, existem evidências demonstrando a liberação de NO e alteração na atividade e quantidade de NO sintase na medula espinhal após lesão periférica (CHOI et al., 1996; GORDH et al., 1998; RIVOT et al., 1997). Além disso, vários inibidores da NO sintase são capazes de inibir a nocicepção periférica, a hiperalgesia e alodinia, tanto de origem inflamatória como de origem neurogênica (CODERRE e YASHPAL, 1994; COUTINHO e GEBHART, 1999; HALEY et al., 1992; HANDY e MOORE, 1998; NIEDBALA et al., 1995; OSBORNE e CODERRE, 1999; MELLER et al., 1992a, b; 1994; YAMAMOTO et al., 1993).

Estes estudos esclarecem os resultados obtidos com os inibidores da NO sintase e o doador de óxido nítrico obtidos no presente trabalho. A produção de óxido nítrico parece ser extremamente importante para a indução da hiperalgesia pelo ligante endógeno dos receptores glutamatérgicos. Como anteriormente relatado, o óxido nítrico pode causar diversos efeitos biológicos agindo em sítios distintos. Um dos efeitos descritos para o NO em neurônios é a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e consequente formação do GMPc a partir do GTP (SOUTHAM e GARTHWAITE, 1993). De fato, a ativação da via óxido nítrico-GMPc- proteína quinase G tem sido implicada na indução da sensibilização de longa duração causada por estimulação elétrica em nociceptores do molusco *Aplysia* (LEWIN e WALTERS, 1999). Os resultados do presente estudo demonstraram que o inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ODQ administrado por via intratecal, bloqueou a hiperalgesia térmica induzida pelo glutamato

em camundongos. Este resultado é de grande relevância, pois os inibidores LY 83583 e azul de metileno, que foram utilizados em outros estudos para demonstrar a participação do GMPc na hiperalgesia induzida pelo NMDA, apresentam alguns efeitos inespecíficos, como inibição da liberação do NO e/ou inibição direta da NO sintase (MULSCH et al., 1988; MAYER et al., 1993; LUO et al., 1995). Alguns estudos demonstraram que o ODQ, é capaz de inibir amplamente o aumento do GMPc dependente de NO, induzido pelo glutamato *in vitro*, bem como aquele causado pelo NMDA e AMPA em cerebelo *in vivo* (FEDELE et al., 1996; GARTHWAITE et al., 1995). Além disso, o ODQ administrado por via intratecal e intracerebroventricular em ratos diminui a hiperalgesia térmica causada por neuropatia periférica (SALTER et al., 1996).

O presente trabalho também demonstra que os inibidores da NO sintase e da guanilato ciclase solúvel, em doses que bloquearam a hiperalgesia induzida pelo glutamato, não apresentaram efeito *per se* sobre as latências basais dos animais. Desta maneira, parece que a geração basal de NO e formação de GMPc não induz hiperalgesia térmica. Contudo, doses altas de doadores de NO e GMPc causaram efeito hiperalgésico (GARRY et al., 1994; INOUE et al., 1997). É conhecido que o óxido nítrico provoca outras ações além daquelas mediadas pela ativação da guanilato ciclase solúvel e aumento de GMPc (BOLOTINA et al., 1994; BRUNE et al., 1994; BRUNE e LAPETINA, 1989; BRUNNER et al., 1995; CLANCY et al., 1994; GARTHWAITE e BOULTON, 1995; STAMLER et al., 1992). Assim como a inibição da NO sintase, a inibição da poli(ADP-ribose) sintase ativada pelo óxido nítrico em nível espinhal também pode atenuar a hiperalgesia e a alodinia causadas pela neuropatia periférica (MAO et al., 1997). A inibição periférica da NO sintase, mas não da guanilato ciclase solúvel, bloqueia a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar prostaglandina E₂ (ALEY et al., 1998). Diferente desta resposta periférica, a hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato aparentemente é mediada, na sua totalidade, pela liberação de óxido nítrico e ativação da guanilato ciclase solúvel. Estes resultados sugerem que o óxido nítrico ativa vias distintas em

nível espinhal e periférico. Analisados em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação da via óxido nítrico-GMPc em nível espinhal, pelo menos a aquela causada pela injeção intratecal de glutamato ou por estímulos nociceptivos, parece constituir um passo importante para a transmissão da informação dolorosa, na medula espinhal.

Assim como os receptores glutamatérgicos, os receptores das cininas são encontrados na substância gelatinosa da medula espinhal (STERANKA et al., 1988; BHOOLA, 1996). Visando verificar se as cininas, de maneira similar ao glutamato, causam hiperalgesia em nível espinhal, agonistas dos receptores B₁ e B₂ foram administrados intratecalmente em camundongos. De fato, assim como o glutamato, a bradicinina, a Tyr⁸-bradicinina, a des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina causaram hiperalgesia térmica quando analisada no teste da placa quente. As respostas hiperalgésicas das cininas parecem ser predominantemente mediadas pela ativação do receptor B₂, apesar do receptor B₁ também ter causado hiperalgesia, embora em menor intensidade. As respostas hiperalgésicas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ parecem ser distintas. A bradicinina possui uma ação rápida (pico em 10 minutos) e duradoura (até 60 minutos) após sua aplicação intratecal. Ao contrário, o início da resposta à des-Arg⁹-bradicinina foi mais lento (significativo apenas aos 20 minutos após a administração), com efeito hiperalgésico máximo obtido aos 60 minutos após a administração do peptídeo, e com duração de 90 minutos. Estes resultados estão de acordo com os estudos de biologia molecular que demonstram que o receptor B₁ humano possui uma sequência de 353 aminoácidos, apresentando apenas 36% de homologia com o receptor B₂, o que sugere que eles façam parte de sistemas regulatórios distintos (HESS et al., 1992; MA et al., 1994a; MENKE et al., 1994; PESQUERO, 1996).

Os resultados do presente estudo, demonstram pela primeira vez que a des-Arg⁹-bradicinina e da des-Arg¹⁰-calidina podem induzir hiperalgesia em nível espinhal. Os agonistas dos receptores B₁ causaram seus efeitos imediatamente após a suas administrações em

camundongos, sugerindo que eles estão constitutivamente presentes nesta espécie. Confirmando os resultados apresentados, diversos dados da literatura demonstram a presença de receptores B₁ constitutivos em camundongos. Estudos de biologia molecular demonstraram no camundongo a presença de RNAm para receptores B₁ no coração, pulmão, rim, fígado e neurônios do gânglio da raiz dorsal e do gânglio simpático (PESQUERO et al., 1996; SEABROOK et al., 1997). Estudos *in vitro* demonstram que a des-Arg⁹-bradicinina causa contração de estômago isolado (ALLOGHO et al., 1998) e estimulação da liberação de cálcio e formação de prostaglandina E₂ em tecido ósseo (LJUNGGREN e LERNER, 1990) sob condições basais. Estudos *in vivo* demonstraram que a des-Arg⁹-bradicinina produz aumento da permeabilidade vascular e influxo de células após administração intratorácica (VIANNA e CALIXTO, 1998). Além disso, os agonistas B₁ causam hiperalgesia quando co-administrados com a formalina na pata de camundongos (DE CAMPOS et al., 1998).

Ao contrário do receptor B₁, evidências sobre a participação da bradicinina e do receptor B₂ no controle da transmissão espinhal foram anteriormente descritas. Foi demonstrado que o antagonista do receptor B₂, HOE 140, aplicado intratecalmente é capaz de inibir a segunda fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em ratos (CHAPMAN e DICKENSON., 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993). A administração intratecal da bradicinina em ratos causou comportamento nociceptivo transitório, seguido de uma inibição do reflexo nociceptivo, quando analisada no teste da placa quente (LANEUVILLE e COUTURE, 1987). Este efeito antinociceptivo, é mediado por uma ação pré-sináptica da bradicinina em terminais noradrenérgicos bulboespinhais (LANEUVILLE et al., 1989).

Desta maneira, a bradicinina parece ser um modulador no processo de transmissão nociceptiva espinhal, podendo causar efeito antinociceptivo ou hiperalgésico. Existem diversos motivos que explicam os resultados, aparentemente opostos, obtidos com a bradicinina quando aplicada por via intratecal em ratos (LANEUVILLE e COUTURE, 1987; LANEUVILLE et al., 1989)

e camundongos (presente trabalho). No trabalho desenvolvido por Couture e colaboradores (LANEUVILLE e COUTURE, 1987; LANEUVILLE et al., 1989) e no presente estudo foram utilizados animais diferentes (ratos *versus* camundongos), com técnicas de administração intratecal diferentes (canulação crônica *versus* aplicação aguda) e em níveis medulares diferentes (nível torácico *versus* nível lombar). Uma outra diferença nesses estudos é o tipo de teste utilizado para verificar os efeitos das cininas (retirada de cauda vs. placa quente). Os testes da retirada de cauda e da placa quente utilizam a mesma modalidade de estímulo (térmico), mas as respostas dos animais à estes estímulos são diferentes. A resposta da retirada de cauda é puramente reflexa, diferente da resposta à placa quente que além do componente reflexo (retirada da pata), possui um componente organizado (o ato de lambar a pata ou saltar) (MOGIL et al., 1999).

De qualquer maneira, o controle nociceptivo espinhal é complexo, existindo diversos mecanismos regulatórios para o controle das ações de um transmissor. O próprio NMDA pode ativar sistemas espinhais nociceptivos ou antinociceptivos (inibitórios) dependendo da dose e do protocolo experimental utilizado (RAIGORODSKY e URCA, 1987; ROMITA e HENRY, 1996).

Os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ não causaram nenhum efeito *per se* na latência dos animais ao estímulo térmico quando analisados no modelo da placa quente, demonstrando que estes receptores não parecem estar envolvidos com a modulação de estímulos nociceptivos transitórios, na ausência do peptídeo. No entanto, a administração intratecal do HOE 140, inibiu a fase inflamatória da nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina (CHAPMAN e DICKENSON, 1992) e as cininas produziram hiperalgesia duradoura quando administradas por via intratecal (presente estudo). Os resultados obtidos por Chapman e Dickenson (1992) juntamente com os resultados do presente estudo, sugerem que em nível espinhal, as cininas e seus receptores parecem estar envolvidos com a estimulação nociceptiva duradoura, podendo assim participar de processos patológicos. De fato, estudos *ex vivo* demonstram que após a

indução de neuropatia em ratos, existe aumento na imunoreatividade à bradicinina e diminuição da densidade de receptores B₂ na medula espinhal (LOPES et al., 1995; LOPES e COUTURE, 1997), e indução de receptores B₁, além de aumento do número de receptores B₂ no gânglio da raiz dorsal (ECKERT et al., 1999).

A produção endógena de bradicinina pode ativar os receptores B₂ localizados em terminais espinhais de nociceptores, facilitando a liberação de vários mediadores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva (LOPES et al., 1995). Esta hipótese é baseada nos resultados que demonstram o envolvimento das cininas e seus receptores no processo nociceptivo espinhal, juntamente com a capacidade da bradicinina de induzir liberação, principalmente via síntese de prostanóides, de CGRP na medula espinhal (ANDREEVA e RANG, 1993; WANG e FUSCUS, 1997). Com o objetivo de analisar a participação das fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina, que são a principal fonte de liberação de neuropeptídeos e glutamato na sinapse primária da medula espinhal, foi realizado o tratamento neonatal dos animais com a neurotoxina capsaicina. A capsaicina, um ingrediente pungente isolado de diversas plantas do gênero *Capsicum*, liga-se com um receptor ionotrópico específico, o receptor vanilóide (VR1), e excita fibras aferentes primárias, causando a liberação de neuropeptídeos e aminoácidos excitatórios, e conseqüentemente induzindo nocicepção (CATERINA et al., 1997; HOLZER, 1991; SZALLASI e BLUMBERG, 1999). O tratamento neonatal dos animais com capsaicina provoca neurotoxicidade devido a uma estimulação prolongada do receptor VR1, induzindo influxo excessivo de íons cálcio e sódio nas fibras sensíveis à capsaicina. Este influxo exacerbado causa destruição de cerca de 75% de fibras C e 12% de fibras A aferentes (HOLZER, 1991, 1998).

De fato, os antagonistas dos receptores NMDA, NK₁ e para CGRP, e o tratamento neonatal dos animais com capsaicina, foram capazes de inibir, embora parcialmente, a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intratecal de bradicinina. Estes resultados sugerem a

participação do glutamato, substância P e CGRP liberados de fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina no desenvolvimento da resposta hiperalgésica à bradicinina.

O tratamento com capsaicina também causou uma diminuição do efeito hiperalgésico causado pelo glutamato. Liu e colaboradores (1997) demonstraram resultados semelhantes com a nocicepção induzida pela administração intratecal de NMDA. Neste trabalho, os autores demonstraram que o tratamento neonatal com capsaicina ou com um antagonista do receptor NK_1 causou inibição parcial, enquanto que o antagonista do receptor NMDA bloqueou completamente os efeitos nociceptivos do NMDA. Estes resultados sugerem portanto, que o NMDA ativa receptores pré-sinápticos (na fibra aferente primária) causando a liberação de glutamato e substância P, que podem facilitar e prolongar a transmissão nociceptiva (LIU et al., 1997).

Uma análise semelhante pode ser feita com os resultados obtidos no presente estudo. A bradicinina pode, pelo menos em parte, ativar receptores B_2 nas terminações espinhais de fibras aferentes primárias, causando liberação de glutamato, substância P e CGRP. Esta hipótese deriva da análise dos seguintes resultados:

- 1) Os antagonistas dos receptores B_2 bloquearam totalmente a ação hiperalgésica da bradicinina;
- 2) Os antagonistas dos receptores NMDA, NK_1 e do CGRP inibiram parcialmente (com valores de inibição máxima muito próximos) a hiperalgesia induzida pela bradicinina;
- 3) O tratamento neonatal com capsaicina inibe a hiperalgesia causada pela bradicinina, com inibição máxima muito próxima a dos antagonistas dos receptores NMDA, NK_1 e do CGRP;
- 4) Nos animais tratados com capsaicina, a bradicinina causa uma pequena hiperalgesia, que foi somente bloqueada com o HOE 140, mas não os antagonistas dos receptores NMDA e NK_1 . Apesar da importante dependência das fibras aferentes primárias, outros sítios podem estar envolvidos na ação hiperalgésica da bradicinina, incluindo outras células neuronais e células

não-neuronais, como as células da glia.

A bradicinina provoca a ativação de diversas vias intracelulares em neurônios, incluindo a estimulação da fosfolipase C e ativação de isoformas específicas de proteínas quinases C que aumentam a condutância aos ions sódio causando despolarização neuronal (BURGUESS et al., 1989a; CESARE et al., 1999; DRAY et al., 1992). A despolarização neuronal induz o influxo de cálcio que estimula a óxido nítrico sintase a produzir óxido nítrico e GMPc (BURGESS et al., 1989b; MCGEHEE et al., 1992). A produção endógena de óxido nítrico e GMPc parece estar envolvida na hiperalgesia mecânica causada pela injeção intraplantar de bradicinina em ratos (NAKAMURA et al., 1996). O óxido nítrico liberado pode também modular a atividade do receptor B_2 *in vitro*, inibindo as proteínas G_i e G_q acopladas a este receptor (MIYAMOTO et al., 1997).

No presente estudo, o inibidor da NO sintase, L-NAME inibiu parcialmente a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intratecal de bradicinina. Este efeito do L-NAME pode ser resultante de uma ação direta sobre a ativação da NO sintase em resposta a ativação do receptor B_2 , já que a ativação deste receptor em células neuronais ativa a NO sintase e induz a liberação de óxido nítrico (BAUER et al., 1993). Como parte da ação da bradicinina é causada pela liberação de glutamato e substância P, e como a hiperalgesia induzida pela injeção i.t. de glutamato (presente estudo), e substância P (RADHAKRISHNAN et al., 1995) é mediada pela via do NO-GMPc, o efeito do L-NAME pode ser indireta sobre as ações destes neurotransmissores. O efeito anti-hiperalgésico do L-NAME foi revertido pelo tratamento neonatal dos camundongos com capsaicina, demonstrando que a produção de NO é mediada por fibras aferentes primárias. De acordo com os dados apresentados no presente estudo, a ativação da NO sintase e a produção de óxido nítrico parecem ser importantes, mas não imprescindíveis, para a ação hiperalgésica causada pela injeção intratecal de bradicinina.

Outra importante via envolvida pela ativação do receptor B_2 , é a da estimulação da fosfolipase A_2 e conseqüente produção de prostaglandinas e leucotrienos através da ativação da

ciclooxigenase e da lipooxigenase, respectivamente. No sistema nervoso central e periférico as prostaglandinas parecem exercer um papel importante na mediação do efeito final da bradicinina (HALL e GEPETTI, 1995). A hiperalgisia térmica causada pela injeção de bradicinina na pata de ratos foi inibida pela administração sistêmica de indometacina e pelo tratamento neonatal dos animais com capsaicina (SCHULIGOI et al., 1994). Da mesma maneira que na periferia, o inibidor não seletivo (indometacina), e o inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (DFU), mas não da ciclooxigenase-1 (indometacina) inibiram a hiperalgisia induzida pela injeção intratecal de bradicinina. Além disso, o tratamento neonatal dos animais com capsaicina inibiu o efeito anti-hiperalgésico da indometacina. Da mesma maneira, a hiperalgisia térmica causada pela administração intratecal de glutamato também foi bloqueada pelo DFU. Esses resultados em conjunto, demonstram que, pelo menos parte, as respostas hiperalgésicas causadas pela injeção intratecal de bradicinina e glutamato, são mediadas pela estimulação da ciclooxigenase-2 e produção de prostaglandinas.

As ciclooxigenases e seus produtos parecem estar envolvidos na regulação da nocicepção em nível espinhal. Tem sido demonstrado que inibidores das ciclooxigenases administrados por via i.t. inibem a nocicepção induzida por lesão tecidual periférica (LASHBROOK et al., 1999; MALMBERG e YAKSH, 1995). Por outro lado, a injeção intratecal de prostaglandinas causa hiperalgisia térmica e alodínia mecânica em animais (MINAMI et al., 1994; UDA et al., 1990). Inibidores inespecíficos das ciclooxigenases inibem a hiperalgisia causada pelo NMDA, substância P e doadores de NO injetados intratecalmente (MALMBERG e YAKSH, 1992; MASUE et al., 1999). Trabalhos recentes têm demonstrado que a ciclooxigenase-2 é a principal isoforma de ciclooxigenase expressa constitutivamente no sistema nervoso central de animais experimentais e humanos (BEICHE et al., 1998; VANE et al., 1998), e que inibidores seletivos para esta enzima causam efeito antinociceptivo no teste da formalina e revertem a alodínia causada por NMDA, quando administrados por via intratecal (DOLAN e

NOLAN, 1999; YAMAMOTO e NOZAKI-TAGUCHI, 1996). Os resultados do presente estudo estendem os dados da literatura sobre a importância das ciclooxigenases, principalmente a do tipo 2, no processo de transmissão nociceptiva espinhal.

Como as cininas podem ser formadas em altas taxas e em quantidades potencialmente ilimitadas a partir de elementos sangüíneos, além de apresentarem grande potência biológica no tecido vascular, a pesquisa bioquímica e farmacológica das cininas foi, inicialmente direcionada para suas ações pró-inflamatórias e hipotensivas na periferia (HALL e GEPETTI, 1995). Outras possibilidades de efeitos mediados pelas cininas foram menos exploradas, inclusive uma possível ação no sistema nervoso central (HALL e GEPETTI, 1995).

Apesar do possível papel das cininas como neurotransmissores centrais (SNYDER, 1980), até o momento não existem evidências que dêem suporte a esta hipótese. Os fatos que evidenciam um papel de neurotransmissor para as cininas são reduzidos e de natureza especulativa (HALL e GEPETTI, 1995). Várias questões devem ser respondidas antes que tal hipótese possa ser confirmada, particularmente a demonstração da liberação de cininas de maneira cálcio-dependente de células neuronais específicas (HALL e GEPETTI, 1995).

Os resultados do presente estudo não permitem demonstrar um possível papel das cininas como neurotransmissores. Pela características de todos os estudos *in vivo* e *in vitro*, as cininas parecem exercer um papel de neuromoduladores, pelo menos em nível espinhal. Após estimulação periférica sustentada, neuropeptídeos como a substância P, são detectados extrasinápticamente em lâminas superficiais e em alguns casos também em lâminas profundas do corno dorsal da medula espinhal (DUGGAN e HENDRY, 1986; SANDKÜHLER, 1996). A difusão extrasináptica de sinalizadores químicos tem sido definida como neurotransmissão por volume. Esta forma de transmissão é diferente da neurotransmissão pontual, onde a ação do sinalizador químico fica restrita à fenda sináptica. A neurotransmissão pontual parece mediar a transmissão sináptica rápida e localizada que sinaliza os estímulos sensoriais breves e

ordenados (AGNATI et al., 1986; SANDKÜHLER, 1996). A substância P exógena aplicada na medula espinal lombar de ratos não somente despolariza e aumenta a excitabilidade de muitos neurônios espinhais *In vitro*, mas também aumenta significativamente a liberação de glutamato em fatias de medula espinal (KANGRGA e RANDIC, 1990). Desta maneira, a substância P extrasináptica pode agir como um neuromodulador que modifica os efeitos de neurotransmissores clássicos, a atividade sináptica e a conectividade funcional dentro da rede nociceptiva espinal. De fato, os efeitos espinhais da substância P são similares como nas modificações que acontecem durante inflamação periférica. Possivelmente outros peptídeos, como o CGRP e a bradicinina, também podem desempenhar papel semelhante (SANDKÜHLER, 1996).

A aplicação exógena de substâncias por superfusão espinal *in vivo* e *in vitro*, por microinjeções ou por aplicação iontoforética próximas ao sítio neuronal estudado são sempre extrasinápticas. Assim, o estudo dos efeitos sinápticos de uma substância não podem ser deduzidos. Apesar disso, a estimulação aferente duradoura e eficaz provoca mudanças de longa duração na nocicepção espinal, sugerindo que a difusão extrasináptica de peptídeos como as cininas pode estar envolvida em situações patofisiológicas (SANDKÜHLER, 1996).

Uma análise do conjunto dos estudos realizados na medula espinal, sugere que em certas condições a produção endógena de cininas ativa terminais espinhais de fibras aferentes primárias causando a liberação de neurotransmissores das mesmas (ANDREEVA e RANG, 1993; LOPES et al., 1995; WANG e FISCUS, 1997). Além disso, apesar de todos os componentes do sistema caliceína-cininas existirem na medula espinal, o sítio de produção das cininas ainda não foi identificado. Claramente, mais estudos são necessários para explicar a participação das cininas no sistema de nocicepção espinal.

A apreciação de possíveis ações das cininas no sistema nervoso, ao lado dos inibidores e antagonistas do sistema caliceína-cininas recentemente oferecidos, podem, de fato, estimular

e redirecionar a pesquisa a novas áreas onde o sistema das cininas possa ser manipulado com possibilidade de propostas terapêuticas reais.

Analisados em conjunto, os resultados do presente trabalho permitem concluir que a aplicação intratecal de glutamato causa hiperalgesia térmica, quando verificada no modelo da placa quente. A hiperalgesia causada pelo glutamato parece envolver a ativação da via óxido nítrico-GMPc, a estimulação da ciclooxigenase-2 e a ativação de fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina. Por outro lado, as cininas ativando tanto receptores B₂ como B₁, também causam hiperalgesia térmica em camundongos quando administradas por via intratecal. Quando comparada com a resposta dos agonistas do receptor B₂, os agonistas do receptor B₁ causam hiperalgesia de menor intensidade, mas de maior duração. Além disso, a resposta ao receptor B₁ parece envolver receptores constitutivos. A ação hiperalgésica da bradicinina parece envolver a ativação de receptores B₂, principalmente os encontrados em fibras aferentes sensíveis à capsaicina, levando a liberação de glutamato, substância P e CGRP. A bradicinina ainda pode ativar outros sítios para causar hiperalgesia. O estudo das ações das cininas em nível espinhal é promissor na perspectiva de se encontrar novas drogas úteis no tratamento da dor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 243: 9-19, 1987.
- AGNATI, L.F.; FUXE, K.; ZOLI, M.; OZINI, I.; TOFFANO, G.; FERRAGUTI, F. A correlation analysis of the regional distribution of centralenkephalins and β -endorphin immunoreactive terminals and opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. **Acta Physiol. Scand.**, 128: 201-207, 1986.
- AIMAR, P.; PASTI, L.; CARMIGNOTO, G.; MERIGHI, A. Nitric oxide-producing vesicle cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa. **J. Neurosci.**, 18: 10375-10388, 1998.
- ALEY, K.O.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **J. Neurosci.**, 18: 7008-7014, 1998.
- ALLOGHO, S.N.; GOBEIL'F.; PERRON, S.I.; HESS, J.F.; REGOLI, D. Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 357: 192-196, 1998.
- ANDREEVA, L.; RANG, H.P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 108: 185-190, 1993.
- BACHVAROV, D.R.; SAINT-JACQUES, E.; LARRIVÉE, J.F.; LEVESQUE, L.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 275: 1623-1630, 1995.
- BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Ann. Rev. Pharmacol.**, 31: 129-162, 1991.

- BAUER, M.B.; SIMMONS, M.L.; MURPHY,S.; GEBHART, G.F. Bradykinin and capsaicin stimulate cyclic GMP production in cultured rat dorsal root ganglion neurons via a nitrosyl intermediate. **J. Neurosci. Res.**, 36: 280-289, 1993.
- BEAUBIEN, G.; ROSINSKI-CHUPIN, I.; MATTEI, M.G.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M.; SAIDAH, N.G. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochemistry**, 30: 1628-1635, 1991.
- BÉICHE, F.; KLEIN,T.; NÜSING, R.; NEUHUBER, W; GOPPELT-STRUEBE, M. Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ receptor EP₃ in the rat lumbar spinal cord. **J. of Neuroimmunol.**, 89: 26-34, 1998.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, 67: 67-186, 1987.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA,T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptiveaction of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, 345: 233-245, 1998.
- BÉSSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.
- BHOOLA, K.D. Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation. **Immunopharmacology**, 33: 247-256, 1996.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-44, 1992.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-852, 1994.
- BORKOWSKI, J.A.; RANSOM, R.W.; SEABROOK, G.R.; TRUMBAUER, M.; CHEN, H.; HILL, R.G.;

- STRADER, C.D.; HESS, J.F. Targeted disruption of a B₂ bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **J. Biol. Chem.**, 270: 13706-13710, 1995.
- BOYCE, S.; RUPNIAK, N.M.J.; CARLSON, E.J.; WEBB, J.; BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F.; STRADER, C.D.; HILL, R.G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ bradykinin receptor knockout mice. **Immunopharmacology**, 33: 333-335, 1996.
- BOXALL, S.; BERTHELE, A.; THOMAS, R.; ZIGLGÄNSBERGER, T.W.; URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuro Report**, 9:1201-1203, 1998.
- BRADLEY, C.; BURGESS, G.M. A nitric oxide synthase inhibitor reduces desensitization of bradykinin -induced activation of phospholipase C in sensory neurones. **Trans. Biochem. Soc.**, 21: 4353, 1993.
- BRAUN, A.; KAMMERER, S.; BOHME, E.; MULLER, B.; ROSCHER, A.A. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B₂ receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 211: 234-240, 1995.
- BRUNE, B.; DIMMELER, S.; MOLINA Y VEDIA, L.; LAPETINA, E.G. Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. **Life Sci.**, 54: 61-70, 1994.
- BRUNE, B.; LAPETINA, E.G. Activation of cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. **J. Biol. Chem.**, 264: 8455-8458, 1989.
- BRUNNER, F.; STESSEL, H.; KUKOVETZ, W.R. Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. **FEBS Lett.**, 376: 262-266, 1995.
- BURCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-stimulated arachidonic acid and release of inositol phosphate in Swiss 3T3 fibroblasts. Evidence for G-protein coupled phospholipase A₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 6374-6378, 1987.

- BURCH, R.M.; KNISS DA. Modulation of receptor-mediated signal transduction by diacylglycerol mimetics in astrocytes. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 8: 251-257, 1988.
- BURCH, R.M.; TIFFANY, C.W. Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin, and other agonists. **J. Cell Physiol.**, 141:85-89, 1989.
- BURDIN, T.A.; GRAEFF, F.G.; PELA, I.R. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. **Physiol. Behav.**, 52: 405-410, 1992.
- BURGESS, G.M.; MULLANEY, J.; MCNEILL, M.; DUNN, P.; RANG, H.P. Second messengers involved in the action of bradykinin in cultured sensory neurones. **J. Neurosci.**, 9:3314-3325, 1989a.
- BURGESS, G.M.; MULLANEY, J.; MCNEILL, M.; COOTE, P.R.; MINHAS, A.; WOOD, J.N. 1989b. Activation of guanylate cyclase by bradykinin in rat sensory neurones is mediated by calcium influx: possible role of the increase in cyclic GMP. **J. Neurochem.**, 53: 1212-1218, 1989b.
- CABRINI, D.A.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. A pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277: 299-307, 1996.
- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytother. Res.**, (no prelo), 2000.
- CAMARGO, A.C.M.; RAMALHO-PINTO, F.J.; GREENE, L.J. Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. **J. Neurochem.**, 19: 37-49, 1972.

- CAMARGO, A.C.M.; SHAPANKA,R.; GREENE, L.J. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. **Biochemistry**, 12: 1838-1844, 1973.
- CAMPBELL, E.A.; GENTRY, C.T.; PATEL, S.; PANESAR, M.S.; WALPOLE, C.S.J.; URBAN, L. Selective neurokinin-1 receptor antagonists are anti-hyperalgesic in a model of neuropathic pain in the guinea -pig. **Neuroscience**, 87: 527-532, 1998.
- CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. The role of B₁ and B₂ receptors in oedema formation after long-term treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). **Br. J. Pharmacol.**, 120: 502-508, 1997.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Up-regulation of B₁ mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 117: 793-798, 1996.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Modulation of kinin B₁ receptor-mediated rat paw oedema by IL-1 β and TNF- α . **Peptides**, 19: 1269-1276, 1998.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. *In vivo* kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. **Br. J. Pharmacol.**, 127: 1851-1859, 1999.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, 353: 2051-2058, 1999.
- CARLTON, S.M.; HARGETT,G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci. Lett.**, 197:25-28, 1995.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824,

1997.

- CELLEK, S.; KASAKOV, L.; MONCADA, S. Inhibition of nitregeric relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. **Br. J. Pharmacol.**, 118:137-140, 1996.
- CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; MCNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC- ϵ in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, 23: 617-624, 1999.
- CHAO, J.; CHAO, L.; SWAIN, C.C.; TSAI, J.; MARGOLIUS, H.S. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. **Endocrinology**, 120: 475-482, 1987.
- CHAPLAN, S.R.; MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther** 280: 829-838, 1997.
- CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 219: 427-433, 1992.
- CHOI, Y.; RAJA, S.N.; MOORE, L.C.; TOBIN, J.R. Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. **J. Neurol. Sci.**, 138: 14-20, 1996.
- CHOLEWINSKI, A.J.; STEPHENS, G.J.; MCDERMOTT, A.M.; WILKIN, G.P. Identification of B₂ binding sites on cultures rat cortical astrocytes. **J. Neurochem.**, 57: 1456-1458, 1991.
- CLANCY, R.M.; LEVARTOVSKY, D.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; YEGUDIN, J.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 3680-3684, 1994.
- CLARK, W.G. Kinins and the peripheral and central nervous system. In: ERDOS, E.G. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. XXV (Suppl.). Springer Verlag: New York, pp. 312-356, 1979.

- CODERRE, T.J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Neurosci.**, 6: 1328-1334, 1994.
- COELHO, M.M.; OLIVEIRA, C.R.; PAJOLLA, G.P.; CALIXTO, J.B.; PELÁ, I.R. Central involvement of kinin B₁ and B₂ receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. **Br. J. Pharmacol.** 121: 296-302, 1997.
- CORREA, F.M.; INNIS, R.B.; UHL, G.H.; SNYDER, S.H. Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 76: 1489-1493, 1979.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 193-198, 1993.
- CORRÊA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B₂ bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 117: 552-558, 1996.
- COUDORÉ-CIVALE, M.A.; COURTEIX, C.; ESCHALIER, A.; FIALIP, J. Effect of tachykinin receptor antagonists in experimental neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 361: 175-184, 1998.
- COUTO, L.B.; CORRÊA, F.M.A.; PELÁ, I.R. Brain sites involved in the anticonceptive effect of bradykinin in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 125: 1578-1584, 1998.
- COUTINHO, S.V.; GEBHART, G.F. A role for spinal nitric oxide in mediating visceral hyperalgesia in the rat. **Gastroenterology**, 116: 1399-1408, 1999.
- COUTURE, R.; MIZRAHI, J.; REGOLI, D.; DEVROEDE, G. Peptides and human colon: an *in vitro* pharmacological study. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 59: 957-964, 1981.

- DAVIS, A.J.; KELLY, D.; PERKINS, M.N. The induction of der-Arg⁹-bradykinin-mediated hyperalgesia in the rat paw by inflammatory stimuli. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27: 1793-1802, 1994.
- DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 63-68, 1994.
- DAVIS, C.L.; NAEEM, S.; PHAGOO, S.B.; CAMPBELL, E.A.; URBAN, L.; BURGESS, G.M. B₁ bradykinin receptors and sensory neurones. **Br. J. Pharmacol.**, 118: 1469-1476, 1996.
- DE BIASI, S.; RUSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85: 7820-7824, 1988.
- DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 316: 277-286, 1996.
- DE CAMPOS, R.O.P.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. Systemic treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin (BCG) potentiates kinin B₁ receptor agonist-induced nociception and oedema formation in the formalin test in mice. **Neuropeptides**, 32: 393-403, 1998.
- DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.L.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 360: 278-286, 1999.
- DEWITT, D.J.; CHNEG, D.Y.; KADOWITZ, P.J. Des-Arg⁹-bradykinin produces tone-dependent B₁ receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. **Circ. Res.**, 75: 1064-1072, 1994.

- DICKENSON, A.H.; CHAMPMAN, P.; GREEN, G.M. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **Gen. Pharmacol.**, 28: 633-638, 1997.
- DOLAN, S.; NOLAN, A.M. N-methyl D-aspartate induced mechanical allodynia is blocked by nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors. **Neuroreport**, 10: 449-452, 1999.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 157-172, 1997.
- DRAY, A.; PATEL, I.; PERKINS, M.N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 1129-1134, 1992
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, 15: 190-197, 1994.
- DUGGAN, A.W.; HENDRY, I.A. Laminar localizations of the sites of release of immunoreactive substance P in the dorsal horn with antibody-coated microelectrodes. **Neurosci. Lett.**, 68: 134-140, 1986.
- DUNN, P.M.; RANG, H.P. Bradykinin-induced depolarization of primary afferent terminals in the neonatal rat spinal cord *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 100: 656-660, 1990.
- ECKERT, A.; BANCHET, G.S.; SOPPER, S.; PETERSEN, M. Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. **Pain**, 83: 487-497, 1999.
- EGGERIKX, D.; RASPE, E.; BERTRAND, D.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of human bradykinin B₂ receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 187: 1306-1313, 1992.
- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas of kinin metabolism. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S20-S24, 1990.

- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 32: 511-536, 1992.
- FARMER, S.G.; POWELL, S.J.; WILKINS, D.E.; GRAHAM, A. Cloning, sequencing and functional expression of a guinea pig lung bradykinin B₂ receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, 346: 291-298, 1998.
- FEDELE, E.; JIN, Y.; VARNIER, G.; RAITERI, M. *In vivo* microdialysis study of a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase on the glutamate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Br. J. Pharmacol.**, 119: 590-594, 1996.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurones associated with nociception. **Neuropharmacology**, 33: 1479-1485, 1994.
- FRANCEL, P.C. Bradykinin and neuronal injury. **J. Neurotrauma**, 9 (supl. 1): S27-S45, 1992.
- FUJIWARA, Y.; MANTIONE, C.R.; YAMAMURA, H.I. Identification of B₂ bradykinin binding sites in the guinea pig brain. **Eur. J. Pharmacol.**, 147: 487-488, 1988.
- FUJIWARA, Y.; MANTIONE, C.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; YAMAMURA, H.I. Characterization of (³H) bradykinin binding sites in guinea pig central nervous system: possible existence of B₂ subtypes. **Life Sci.**, 44: 1645-1653, 1989.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** 48: 129-141, 1999.
- GAFFORD, J.T.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G.; HERSH, L.B. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. **Biochemistry**, 22: 3265-3271, 1983.
- GAMSE, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 320: 205-216, 1982.
- GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.J. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.**, 57: 683-706, 1995.

- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. **Nature**, 336: 385-388, 1988.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48:184-188, 1995.
- GARRY, M.G.; ABRAHAM, E.; HARGREAVES, K.M.; AANONSEN, L.M. Intrathecal injection of cell - permeable analogs of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate produces hyperalgesia in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 260: 129-131, 1994.
- GAVRAS, H.; BENETOS, A.; GAVRAS, I. Contribution of bradykinin to maintenance of normal blood pressure. **Hypertension**, 9:147-149, 1987.
- GIMPL, G.; WALZ, W.; OHLEMEYER, C.; KETTENMANN, H. Bradykinin receptors in cultures astrocytes from neonatal brain are linked to physiological responses. **Neurosci. Lett.**, 144:139-142, 1992.
- GORDH, T.; SHARMA, H.S.; ALM, P.; WESTMAN, J. Spinal nerve lesion induces upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord. **Amino Acids**, 14: 105-112, 1998.
- GRAEFF, F.G. PELÁ, I.R.; ROCHA e SILVA, M. Behavioural and somatic effects of bradykinin injected into the cerebral ventricles of unanaesthetized rabbits. **Br. J. Pharmacol.**, 37: 723-732, 1969.
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** 81: 8-11, 1998.
- GUIMARÃES, J.A.; BORGES, B.R.; PRADO, E.S.; PRADO, J.L. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochem. Pharmacol.**, 22: 3157-3172, 1973.
- GUTOWSKI, S.; SMRCKA, A.; NOWAK, L.; WU, D.G.; SIMPM, M.; STERNWEISS, P.C. Antibodies to the α_q subfamily of guanine nucleotide binding regulatory proteins subunits

attenuate activation of phosphatidylinositol-4,5-biphosphato hydrolysis by hormones. **J. Biol. Chem.**, 266: 20519-20524, 1991.

HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, 31: 251-258, 1992.

HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, 56: 131-190, 1992.

HALL, J.M.; GEPPETTI, P. Kinins receptors in the nervous system. **Neurochem.**, 26: 17-25, 1995.

HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 9-43, 1997.

HANDY, R.L.C.; MOORE P.K. Effect of selective inhibitors of neuronal nitric oxide syntase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, 37: 37-43, 1998.

HARGREAVES, K.M.; TROULLOS, E.S.; DIONNE, R.A.; SCHMIDT, E.A.; SCHAFFER, S.C.; JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 44: 613-621, 1988.

HENLEY, J.M.; JENKINS, R.; HUNT, S.P. Localization of glutamate receptor binding sites and mRNAs to the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuropharmacology**, 32: 37-41, 1993.

HESS, J.F. Molecular pharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 45-55, 1997.

- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; YOUNG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 184: 260-268, 1992.
- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; MACNEIL, T.; STONESIFER, G.Y.; FRAHER, J.; STRADER, C.D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. **Mol. Pharmacol.**, 45: 1-8, 1994.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43: 143-201, 1991.
- HOLZER, P. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. **Am. J. Physiol.**, 275: G8-G13, 1998.
- HOSLI, E.; HOSLI, L. Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. **Neuroreport**, 4: 159-162, 1993a.
- HOSLI, E.; HOSLI, L. Receptor for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, 40: 477-506, 1993b.
- HOSLI, L.; HOSLI, E.; KAESER, H.; LEFKOVITS, M. Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. **Neurosci. Lett.**, 148:114-116, 1992.
- HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, 78: 731-747, 1997.
- HYLDEN, J.K.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, 67: 313-316, 1980.
- INOKUCHI, J.I.; NAGAMATSU, A. Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin converting enzyme). **Biochem. Biophys. Acta**, 662: 300-307, 1981.

- INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBUTA, S.; YOSHIYA, I. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. **J. Neurol. Sci.**, 153: 1-7, 1997.
- JABBUR, S.J.; SAADE, N.E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain, Supl. 6:** S87-S92, 1999.
- JACQUES, L.; COUTURE, R. Studies on the vascular permeability induced by intrathecal injection of substance P and bradykinin in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 184: 9-20, 1990.
- JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **J. Physiol. Pharmacol.**, 75: 661-664, 1997.
- KAMMERER, S.; BRAUN, A.; ARNOLD, N.; ROSCHER, A.A. The human bradykinin B₂ receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 211: 226-233, 1995.
- KANGRGA, I.; RANDIC, M. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal cord slice. **J. Neurosci.**, 10: 2026-2038, 1990.
- KARIYA, K.; YAMAUCHI, A.; SASAKI, T. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. **J. Neurochem.**, 44: 1892-1897, 1985.
- KHASAR, S.G.; MIAO, F.J.; LEVINE, J.D. Inflammation modulates the contribution of receptor subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. **Neuroscience**, 69: 685-690, 1995.
- KITAGAWA, A.; KIZUKI, K.; MORIYA, H.; KUDO, M.; NOGUCHI, T. Localization of kallikrein in rat pineal glands. **Endocrinology Jpn.**, 38: 109-112, 1991.
- KITTO, K.F.; HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.**, 148: 1-5, 1992.
- KOLHEKAR, R.; MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Characterization of the role of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in thermal nociception in the rat. **Neuroscience**, 57: 385-395, 1993.

- LANEUVILLE, O., COUTURE, R. Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of a nociceptive reflex in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 137: 281-285, 1987.
- LANEUVILLE, O.; RAEDER, T.A.; COUTURE, R. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 159: 273-283, 1989.
- LASHBROOK, J.M.; OSSIPOV, M.H.; HUNTER, J.C.; RAFFA, R.B.; PORRECA, F. Synergistic antiallodynic effects of spinal morphine with ketorolac and selective COX₁- and COX₂-inhibitors in nerve-injured rats. **Pain**, 82: 65-72, 1999.
- LEE, K.M.; TOSCAS, K.; VILLERREAL, M.L. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca²⁺ entry by tyrosine kinase inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 268: 9945-9948, 1993.
- LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, 13: 2273-2286, 1993.
- LEWIN, M.R.; WALTERS, E.T.; Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. **Nature Neurosc.**, 2:18-23, 1999.
- LEWIS, R.E.; CHILDERS, S.R.; PHILLIPS, M.I. (125I)Tyr-bradykinin binding in primary rat brain cultures. **Brain Res.**, 346: 263-272, 1985.
- LIEBMANN, C.; OFFERMANN, S.; SPICHER, K.; HINSCH, K.D.; SCHNITTLER, M.; MORGAT, J.L.; REISSMANN, S.; SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W. A high-affinity bradykinin receptor in membrane from rat myometrium is coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins of the G_i family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 167: 910-917, 1990.
- LIN, W.W.; CHUANG, D.M. Regulation of bradykinin-induced phosphoinositide turnover in cultured cerebellar astrocytes: possible role of protein kinase C. **Neurochem. Int.**, 21: 573-579, 1992.
- LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, 386: 721-724, 1997.

- LJUNGGREN, O.; LERNER, U.H. Evidence for BK₁ bradykinin-receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption. **Br. J. Pharmacol.**, 101: 382-386, 1990.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353: 1607-1609, 1999.
- LOPES, P.; COUTURE, R. Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 210: 137-147, 1992.
- LOPES, P.; COUTURE, R. Localization of bradykinin-like immunoreactivity in the rat spinal cord: effects of capsaicin, melittin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. **Neuroscience**, 78: 481-497, 1997.
- LOPES, P.; KAR, S.; CHRÉTIEN, L.; REGOLI, D.; QUIRION, R.; COUTURE, R. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸] bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. **Neuroscience**, 68: 867-881, 1995.
- LORTIE, M.; REGOLI, D.; RHALEB, N.E.; PLANTE, G.E. The role of B₁ and B₂ kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. **Am. J. Physiol.**, 262: R72-R76, 1982.
- LUO, D.; DAS, S.; VICENT, S.R. Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase. **Eur. J. Pharmacol.**, 290: 247-251, 1995.
- LUTFY, K.; CAI, S.X.; WOODWARD, R.M.; WEBER, E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, 70: 31-40, 1997.
- MA, J.; WANG, D.Z.; CHAO, L.; CHAO, J. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B₂ receptor gene. **Gene**, 149: 283-288, 1994a.
- MA, J.; WANG, D.Z.; WARD, D.C.; CHEN, L.; DESSAI, T.; CHAO, J.; CHAO, L. Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B₂ receptor. **Genomics**, 23: 362-369, 1994b.

- MACFARLANE, R.; MOSKOWITZ, M.A.; SAKAS, D.E.; TASDEMİROGLU, E.; WEI, E.P.; KONTOS, H.A. The role of neuroeffector mechanisms in cerebral hyperfusion syndromes. **J. Neurosurg.**, 75: 845-855, 1991.
- MACNEIL, T.; BIERILLO, K.K.; MENKE, J.G.; HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. **Biochem. Biophys. Acta Gene Struct. Expres.**, 1264: 223-228, 1995.
- MADEDDU, P.; GLORIOSO, N.; SORO, A.; TONOLO, G.; MANUNTA, P.; TROFFA, C.; DEMONTIS, M.P.; VARONI, M.V.; ANANIA, V. Brain kinins are responsible for the pressor effect of intracerebroventricular captopril in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 15: 407-412, 1990.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, 257: 1276-1279, 1992.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, 54: 291-300, 1993.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J. of Neurosci.**, 15: 2768-2776, 1995.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, 257: 1276-1279, 1992.
- MANNING, D.C.; RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 50: 721-729, 1991.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Res.**, 598: 271-278, 1992.

- MAO, J.; PRICED.D.; ZHU, J.; LU, J.; MAYER, D.J. The inhibition of nitric oxide-activated poly (ADP-ribose) synthetase attenuates transsynaptic alteration of spinal cord dorsal horn neurons and neuropathic pain in the rat. *Pain*, 72: 355-366, 1997.
- MARCEAU, F.; Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30: 1-26, 1995.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptor induction and inflammation. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 143-156, 1997.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J.P. Pharmacology of kinins; their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.*, 14: 209-229, 1983.
- MASUE, t.; DOHI, S.; ASANO, T.; SHIMONAKA, H. Spinal antinociceptive effect of epidural nonsteroidal antiinflammatory drugs on nitric oxide-induced hyperalgesia in rats. *Anesthesiology*, 91: 198-206, 1999.
- MAYER, B.; BRUNNER, F.; SCHMIDT, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 367-374, 1993.
- MCEACHERN, A.E.; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKI, J.; ALDRISH, R.W.; JARNAGIN, K. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 7724-7728, 1991.
- MCGEHEE, D.S.; GOY, M.F.; OXFORD, G.S. Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the desensitization of bradykinin responses of cultured rat sensory neurones. *Neuron*, 9: 315-324, 1992.
- MELLER, S.T.; CUMMINGS, C.P.; TRAUB, R.J.; GEBHART, G.F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience*, 60: 367-374, 1994b.

- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. **Eur. J. Pharmacol.**, 214: 93-96, 1992b.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, 71: 327-335, 1996.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F. Acute mechanical hyperalgesia is produced by coactivation of AMPA and metabotropic glutamate receptors. **NeuroReport**, 4: 879-882, 1993.
- MELLER, S.T.; DYKSTRA, D.; GRZYBYCKI, D.; MURPHY, S.; GEBHART, G.F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology**, 33: 1471-1478, 1994a.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Spinal mediators of hyperalgesia. **Drugs**, 47 (supl. 5): 10-20, 1994.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, 52: 127-136, 1993.
- MELLER, S.T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neuroscience**, 50: 7-10, 1992a.
- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269: 21583-21586, 1994.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. IASP Press: Seattle, 1994.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, 57: 1-164, 1999.

- MINAMI, T.; UDA, R.; HORIGUCHI, S.; ITO, S.; HYODO, M.; HAYAISHI, O. Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E₂ to conscious mice. **Pain**, 57: 217-223, 1994.
- MIYAMOTO, A.; LAUFS, U.; PARDO, C.; LIAO, J.K. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 272: 19601-19608, 1997.
- MOGIL, J.S.; WILSON, S.G.; BON, K.; LEE, S.E.; CHUNG, K.; RABER, P.; PIEPER, J.O.; HAIN, H.S.; BELKNAP, J.K.; HUBERT, L.; ELMER, G.I.; CHUNG, J.M.; DEVOR, M. Heritability of nociception II. types of nociception revealed by genetic correlation analysis. **Pain**, 80: 83-93, 1999.
- MOOCHHALA, S.M.; SAWYNOK, J. Hyperalgesia produced by intrathecal substance P and related peptides: desensitization and cross desensitization. **Br. J. Pharmacol.**, 82: 381-388, 1984.
- MOSKOWITZ, M.A.; BRODY, M.; LIU-CHEN, LY. *In vitro* release of immunoreactive substance P from putative afferent nerve endings in bovine pia arachnoid. **Neuroscience**, 9: 809-814, 1983.
- MULSCH, A.R.; BUSSE, S.; LIEBAU, S.; FÖRSTERMANN, U. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247: 283-288, 1988.
- MURONE, C.; PERICH, R.B.; SCHLAWA, I.; CHAI, S.Y.; CASLEY, D.; MACGREGOR, D.P.; MÜLLER-ESTERL, W.; MENDENSOHN, F.A.O. Characterization and localization of bradykinin B₂ receptors in the guinea-pig using a radioiodinated HOE140 analogue. **Eur. J. Pharmacol.**, 306: 237-247, 1996.
- MURONE, C.; PAXINOS, G.; MCKINLEY, M.J.; OLDFIELD, B.J.; MÜLLER-ESTERL, W.; MENDENSOHN, F.A.O.; CHAI, S.Y. Distribution of bradykinin B₂ receptors in sheep brain

and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. **J. Comp. Neurol.**, 381: 203-218, 1997.

MURRAY, S.R.; CHAO, J.; LIN, F.; CHAO, L. Kallikrein multigenes families and the regulation of their expression. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S7-S15, 1990.

NAGY, I.; PABLA, R.; MATESZ, K.; WOOF, C.J.; URBAN, L. Cobalt uptake enables identification of capsaicin and bradykinin sensitive sub-populations of rat dorsal root ganglion cells *in vitro*. **Neuroscience**, 56: 167-172, 1993.

NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 117: 407-412, 1996.

NAKHOSTINE, N.; RIBOUT, C.; LAMONTAGNE, D.; NADEAU, R.; COUTURE, R. Mediation by B₁ and B₂ receptors of vasopressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 71-76, 1993.

NI, A.; CHAI, K.X.; CHAO, L.; CHAO, J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. **Biochem. Biophys. Acta**, 1442: 177-185, 1998.

NIEDBALA, B.; SÁNCHEZ, A.; FERIA, M. Nitric oxide mediates neuropathic pain behavior in peripherally denervated rats. **Neurosci. Lett.**, 188: 57-60, 1995.

ORAWSKI, A.T.; SIMMONS, W.H. Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. **Peptides**, 10: 1063-1073, 1989.

OSBORNE, M.G.; CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 1840-1846, 1999.

OSHIMA, G.; HIRAGA, Y.; SHIRONO, K.; OH-ISHI, S.; SAKAKIBARA, S.; KINOSHITA, T. Cleavage of des-Arg⁹-bradykinin by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex. **Experientia**, 41: 325-328, 1985.

- PARPURA, V.; BASARSKY, T.A.; LIU, F.; JEFTNIJA, K.; JEFTNIJA, S.; HAYDON, P.G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, 369: 744-747, 1994.
- PARPURA, V.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.V.; HAYDON, P.G.; JEFTINIJA, S.D. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. **J. Neurosci.**, 15: 5831-5839, 1995.
- PAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. **Ann. Med.**, 27: 369-377, 1995.
- PELÁ, I.R.; ROSA, A.L.; SILVA, C.A.A.; HUIDOBRO-TORO, J.P. Central B₂ receptor involvement in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 118: 1488-1492, 1996.
- PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E.; DRAY, A. Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, 53: 191-197, 1993.
- PERKINS, M.N.; KELLY, D. Induction of bradykinin-B₁ receptors "in vivo" in a rat model of ultraviolet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1441-1444, 1993.
- PERKINS, M.N.; KELLY, D.; DAVIS, A.J. Bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73: 832-836, 1995.
- PERRY, D.C.; SNIDER, S.H. Identification of bradykinin in mammalian brain. **J. Neurochem.**, 43: 1072-1080, 1984.
- PERRY, V.H.; ANDERSSON, P.B.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends Pharmacol. Sci.**, 16: 268-273, 1993.
- PESQUERO, J.B.; OLIVEIRA, S.M.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L.; KETTRITZ, R.; PAIVA, A.C.M.; GANTEN, D.; BADER, M. Generation and study of mice lacking the kinin B₁ receptor gene. **Livro de resumos da XII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Caxambu-MG, 27-30 de agosto, p. 45, 1997.

- PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; OLIVEIRA, S.M.; ROSCHER, A.A.; METZGER, R.; GANTEN, D.; BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. **Biochem. Biophys. Acta**, 220: 219-225, 1996.
- PIERCEY, M.F.; SCHROEDER, L.A.; FOLKERS, K.; XU, J.C.; HORIG, J. Sensory and motor functions of spinal cord substance P. **Science**, 214: 1361-1362, 1981.
- POWELL, S.J.; SLYINN, G.; THOMAS, C.; HOPKINS, B.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. **Genomics**, 15: 435-438, 1993.
- POWERS, C.A.; NASJLETTI, A. A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. **Endocrinology**, 112: 1194-1200, 1983.
- PRIVITERA, P.J. Brain kallikrein-kinin system in arterial pressure regulation. **Agents Actions**, (Suppl.) 38 (III): 39-46, 1992.
- PRIVITERA, P.J.; DAUM, P.R.; HILL, D.R.; HILEY, C.R. Autoradiographic visualization and characteristics of (125I) bradykinin binding sites in guinea pig brain. **Brain Res.**, 577: 7-79, 1992.
- PROCTER, M.J.; HOUGHTON, A.K.; FABER, E.S.L.; CHIZH, B.A.; ORNSTEIN, P.L.; LODGE, D.; HEADLEY, P.M. Actions of kainate and AMPA selective glutamate receptor ligands on nociceptive processing in the spinal cord. **Neuro Pharmacol.**, 37:1287-1297, 1998.
- PROUD, D.; KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Ann. Rev. Immunol.**, 6: 49-83, 1988.
- RADHAKRISHNAN, V.; YASPAL, K.; HUI-CHAN, C.W.Y.; HENRY, J.L. Implication of a nitric oxide synthase mechanisms in the action of substance P: L-NAME blocks thermal hyperalgesia induced by endogenous and exogenous substance P in the rat. **Eur.J. Neurosci.**, 7: 1920-1925, 1995.

- RAIDOO, D.M.; BHOOLA, K.D. Kinin receptors on human neurones. **J. Neuroimmunol.**, 77: 39-44, 1997.
- RAIDOO, D.M.; BHOOLA, K.D. Pathophysiological of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissues. **Pharmacol. Ther.**, 79: 105-127, 1998.
- RAIGORODSKY, G.; URCA, G. Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. **Brain Res.**, 422: 158-162, 1987.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **Br. Med. Bull.**, 47: 534-548, 1991.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. *Textbook of pain*. Churchill Livingstone: Edinburgh, pp. 57-78, 1994.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32: 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; RHALEB, N-E.; DRAPEAU, G.; DION, S. Kinin receptors subtypes. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S30-S38, 1990.
- REGOLI, D.; GOBIEL, F.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D.; SEONE, P.R.; SALVINO, J.M.; SAWUTZ, D.G. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. **Life Sci.**, 55: 735-749, 1994.
- REN, K.; WILLIAMS, G.M.; HYLLEN, J.L.K.; RUDE, M.A.; DUBNER, R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptors antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 219: 235-243, 1992.
- RITCHIE, T.; COLE, R.; KIM, H.S.; DE VELLIS, J.; NOBLE, E.P. Inositol phospholipid hydrolysis in cultures astrocytes and oligodendrocytes. **Life Sci.**, 41: 31-39, 1987.

- RIVOT, J.P.; BARRAUD, J.; MONTÉCOT, C.; JOST, B.; BESSON, J.M. Nitric oxide (NO): in vivo electrochemical monitoring in the dorsal horn of the spinal cord of the rat. **Brain. Res.**, 773: 66-75, 1997.
- RIVOT, J.P.; SOUZA, A.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.M. Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: an in vivo electrochemical approach in the rat. **Brain. Res.**, 821: 101-110, 1999.
- ROMITA, V.V.; HENRY, J.L. NMDA receptor involvement in espinal inhibitory controls of nociception in the rat. **Neuro Report.**, 7: 1705-1708, 1996.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** 49:123-133, 1998.
- SALTER, M.; STRIJBOS, P.L.; NEALE, S.; DUFFY, C.; FOLLENFANT, R.L.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. **Neuroscience**, 73: 649-655, 1996.
- SANDKÜHLER, J. Neurobiology of spinal nociception: new concepts. In: CARLI, G.; ZIMMERMANN, M. **Progress in Brain Research**. Vol. 110, Londres: Elsevier, pp. 207-224, 1996.
- SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 50:1-5, 1996.
- SCHULIGOI, R.; DONNERER, J.; AMANN, R. Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. **Neuroscience**, 59:211-215, 1994.
- SCHWARTZ, J.C.; MALFROY, B.; LA BAUME, S.D. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxipeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. **Life Scin.**, 29: 1715-1740, 1981.
- SCICLI, A.G.; FORBES, G.; NOLLY, H.; DUJOUNY, M.; CARRETERO, O.A. Kallikrein-kinins in the central nervous system. **Clin. Exp. Hypertens.**, A6: 1731-1738, 1984.

- SEABROOK, G.R.; BOWERY, B.J.; HEAVENS, R.; BROWN, N.; FORD, H.; SIRINATHSINGHI, D.J.S.; BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F.; STRADER, C.D.; HILL, R.G. Expression of B₁ and B₂ bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurones from wild-type and B₂ receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, 36: 1009-1017, 1997.
- SHARIF, N.A.; WHITING, R.L. Identification of B₂-bradykinin receptors in the guinea pig brain regions, spinal cord and peripheral tissues. **Neurochem. Int.**, 18: 89-96, 1991.
- SNIDER, R.M.; RICHELSON, E. Bradykinin receptor mediated cyclic GMP formation in a nerve cell population (murine neuroblastoma, clone NIE-115). **J. Neurochem.**, 43: 1749-1754, 1984.
- SNYDER, S.H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science**, 209: 976-983, 1980.
- SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide -cyclic GMP signalling pathway in rat brain. **Neuropharmacology**, 32: 1267-1277, 1993.
- STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; OSBORNE, J.A.; MULLINS, M.E.; JARAKI, O.; MICHEL, T.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 444-448, 1992.
- STEPHENS, G.J.; MARRIOT, D.R.; DJAMGOZ, M.B.A.; WILKIN, G.P. Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultures rat cortical oligodendrocytes. **Neurosci. Lett.**, 153: 223-226, 1993.
- STERANKA, L.R.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pain and inflammation. In: BURCH, R.M. **Bradykinin antagonists. Basic and clinical research**. New York: Marcell Dekker, pp. 191-211, 1991.
- STERANKA, L.R.; DEHASS, C.J.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; ENNA, S.J.; SNYDER, S.H. Antinociceptive effects of bradykinin antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, 136: 261-262, 1987.

- STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; SNIDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 3245-3249, 1988.
- SUFKA, K.J.; ROACH, J.T. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists. **Pain**, 1996.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, 51:159-211, 1999.
- SZOLCSANYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors on the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. **J. Physiol.**, 388: 9-23, 1987.
- TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain. Res.**, 458:402-406, 1988.
- THOMAS, R.J. Excitatory amino acids in health and disease. **J. Am. Geriatric Soc.**, 43: 1279-1289, 1995.
- TIFFANY, C.W.; BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. **FEBS Lett.**, 247: 189-192, 1989.
- TIPPMER, S.; QUITTERER, U.; KOLM, V.; FAUSSENER, A.; ROSCHER, A.A.; MOSTHAF, L.; MÜLLER-ESTERL, W.; HÄRING, H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α , ϵ , and ζ . **Eur. J. Biochem.**, 225: 297-304, 1994.
- UDA, R.; HORIGUCHI, S.; ITO, S.; HYODO, M.; HAYAISHI, O. Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D₂, E₂, or F_{2 α} to conscious mice. **Brain Research**, 510:26-32, 1990.
- URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Central mechanisms in pain. **Med. Clin. North Am.** 83: 585-596, 1999.

- URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, 153: 211-220, 1988.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 38: 97-120, 1998.
- VAVREK, R.; STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides**, 6: 161-164, 1985.
- VIANNA, R.M.J.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, 123: 281-291, 1998.
- WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinin and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem. Int.**, 26: 1-16, 1995.
- WANG, X.; FISCUS, R.R. Lactic acid potentiates bradykinin- and low-pH-induced release of CGRP from rat spinal cord slices. **Am. J. Physiol.**, 273: E92-E98, 1997.
- WATKINS, L.R.; MARTIN, D.; ULRICH, P.; TRACEY, K.J.; MAIER, S.F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, 71: 225-235, 1997.
- WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E.P.; FURNESS, L.E.; MAIER, S.F. Illness-induced hyperalgesia is mediated by spinal neuropeptides and excitatory amino acids. **Brain. Res.**, 664: 17-24, 1994.
- WEINREICH, D.; WONDERLIN, W.F. Inhibition of calcium-dependent spike after-hyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurones. **J. Physiol.**, 394: 415-427, 1987.
- WOOD, J.N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, 59: 457-482, 1997.

- WOOLF, C.J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing and the generation of pain.
In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain.**, 2 ed. Churchill Livingstone: Edinburgh,
pp. 101-112, 1994.
- WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R.E. Peripheral nerve injury triggers central
sprouting of myelinated afferents. **Nature**, 355: 75-78, 1992.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal
sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Analg.**, 77: 886-890,
1993.
- YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in
spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and
NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Res.**, 739: 104-110, 1996.
- YAKSH, T.L.; HUA, X.Y.; KALCHEVA, I.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; MARSALA, M. The spinal
biology of humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 7680-7686, 1999.
- ZAHN, P.K.; UMALI, E.; BRENNAN, T.J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor
antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. **Pain**, 74: 213-223,
1998.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.
Pain, 16: 109-110, 1983.
- ZHUO, M. NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice. **Eur. J.
Pharmacol.**, 349: 211-220, 1998.
- ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results
in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, 7: 895-900, 1996.

SUMMARY

Glutamate is the major amino acid neurotransmitter in the central nervous system. The intrathecal administration of glutamate (10 to 100 nmol) caused dose-related hyperalgesia (mean ED₅₀ of 35 nmol) when assessed in the thermal behaviour model of nociception, the hot-plate test maintained at 50 °C. The i.t. injection of both nitric oxide synthase inhibitors, L-NOARG and L-NAME, did not induce any detectable effect *per se*, but instead produced dose-related inhibition of glutamate-induced hyperalgesia. D-NAME, the inactive enantiomer of L-NAME, had no effect. The co-injection of SNAP (0.22 µmol) or 8-bromo-cGMP (22.5 nmol) with glutamate (10 nmol), through i.t. route, significantly enhanced glutamate-induced hyperalgesia. The guanylate cyclase inhibitors LY 83583 (0.1-1.0 nmol) or ODQ (30 - 300 pmol), co-administered with glutamate, dose-dependently antagonised the glutamate-induced hyperalgesia. Collectively, these results demonstrate that the i.t. injection of glutamate into the spinal cord of mice produces dose-related hyperalgesia, an effect that is largely mediated by L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway from spinal sites.

Like glutamate receptors, kinin B₁ and B₂ receptors are observed in the substantia gelatinosa of the spinal cord dorsal horn. In the periphery, kinins activate Aδ and C fibres in sensory nerves, producing pain and hyperalgesia, and may, in addition, release pro-inflammatory and hyperalgesic mediators which also largely accounting for their pro-inflammatory and nociceptive properties. This study also investigates some of the mechanisms by which kinins injected spinally, produce thermal hyperalgesia in mice. The intrathecal administration of bradykinin, Tyr⁸-bradykinin, des-Arg⁹-bradykinin or des-Arg¹⁰-kallidin (1-50 nmol/site) caused a significant hyperalgesia when assessed in the thermal model of nociception, the hot plate test. The agonists for the kinin receptors B₁ and B₂ have shown some differences in their responses. The peak of the hyperalgesia was 10 minutes for the B₂ agonists and 60 minutes for the B₁

agonists. However, the hyperalgesic action caused by the B₂ agonists was more efficacious than that caused by the B₁ agonists. The pre-treatment of animals by i.t. route with the B₂ receptor antagonists HOE 140 or NPC 18884, or with the COX-2 inhibitor DFU, completely abolished the BK-induced hyperalgesia. The same pre-treatment with FK888, MK 801, CGRP₈₋₃₇, L-NAME or indometacin, or the neonatal pre-treatment with capsaicin, attenuated the BK hyperalgesic action. However, the i.t. pre-treatment of animals with SR48968, SR142801 or piroxicam failed to interfere with the BK effect. Collectively, these results demonstrate that the i.t. injection of kinins into the spinal cord of mice produces a significant hyperalgesia. These effects seem to be related with constitutive receptors present in the mice. However, the BK response seems to be related, at least in part, with the glutamate, substance P and CGRP release by capsaicin-sensitive afferent fibres, besides prostaglandins and NO production.