

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DAS ENDOTELINAS
SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA DO CAMUNDONGO
À FORMALINA E À CAPSAICINA**

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. Giles Alexander Rae

ANNA PAULA PIOVEZAN
Florianópolis
1997

Piovezan, Anna Paula. *Influência das endotelinas sobre a resposta nociceptiva do camundongo à formalina e à capsaicina*. Florianópolis, 1997, 83f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Professor Doutor Giles Alexander Rae.

Defesa: 22/08/1997.

A capacidade das [endotelinas] causarem [hiperalgesia] foi testada em dois modelos de [nocicepção] induzida pelos agentes químicos: [formalina] e [capsaicina]. No modelo da formalina a endotelina(ET)-1 e a ET-3 potencializaram a primeira fase de nocicepção, enquanto a segunda fase foi potencializada por ET-1, ET-3 e [sarafotoxina S6c] (SRTX-c). A ET-1 também potencializou o edema de pata causado por formalina. O antagonista não-seletivo de receptores ET_A/ET_B [bosentan] reduziu todos os efeitos causados pela ET-1, mas não pela [histamina]. No modelo da capsaicina, a ET-1 (mas não SRTX-c ou IRL 1620), potencializou a resposta nociceptiva causada por este agente. Este efeito hiperalgésico parece ser mediado por receptores ET_A , uma vez que o mesmo foi inibido por [BQ-123] ou [BMS 182874], ambos antagonistas seletivos de receptores ET_A , ou ainda por bosentan, mas não por [BQ-788], um antagonista seletivo de receptores ET_B . Finalmente, também foi evidenciado que a ET-1 e o IRL 1620, em dose elevada, impediram o desenvolvimento de hiperalgesia à [serotonina] no modelo da capsaicina, sugerindo que em determinadas condições a ativação de receptores ET_B deflagre um mecanismo anti-hiperalgésico. Conclui-se que as endotelinas, dependendo da dose e da seletividade de ação do agonista, podem afetar a resposta nociceptiva de camundongos a estímulos algícos químicos de modos distintos.

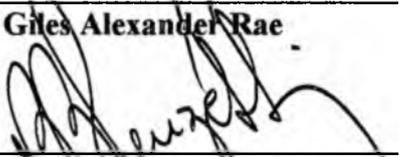
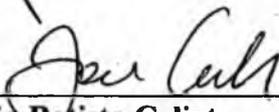
**“INFLUÊNCIA DAS ENDOTELINAS SOBRE AS RESPOSTAS
NOCICEPTIVAS DO CAMUNDONGO À FORMALINA E À
CAPSAICINA”**

POR

ANNA PAULA PIOVEZAN

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

Banca Examinadora:

 _____ Giles Alexander Rae	(FMC/UFSC-Membro-Titular)
 _____ Berenice Borges Lorenzetti	(UFPR)-Membro-Titular)
 _____ João Batista Calixto	(FMC/UFSC)-Membro Titular)

**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia**

Florianópolis, agosto de 1997.

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais Reni e Sueli e às minhas irmãs Liana e Luciana por saberem suportar a ausência, em nome do meu crescimento pessoal.

Agradeço a Deus, sem o qual nenhum esforço seria válido.

**“... Encontraremos o que merecemos,
porque merecemos o que buscamos...”**

EMMANUEL

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Giles Alexander Rae pela valiosa orientação e pelo profissionalismo com que conduziu-me no decorrer do curso e durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Rogério Tonussi, que efetivamente atuou como co-orientador deste trabalho e que muito contribuiu para o meu crescimento científico.

Ao Professor Doutor João Batista Calixto e seus alunos e auxiliares, em especial a Adair, Alessandra, Martha, Rosana e Zulma pelo auxílio nas execuções e discussões de técnicas de trabalho.

Aos colegas de turma Karina, Patrícia, Rodrigo, Sandro e Solange, dentre os quais encontrei amigos queridos e incentivadores.

Aos colegas Alcíbia, Josélia e Valdecir, também orientados pelo Professor Giles, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao Rubens e a Josélia, pelo grande apoio na confecção dos slides.

A todos os funcionários do departamento.

Ao Beto, que sempre esteve presente me auxiliando e incentivando.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 - Animais.....	17
3.2 - Drogas.....	17
3.3 - Nociceção e Edema de Pata Induzidos por Formalina.....	18
3.4 - Nociceção Induzida por Capsaicina.....	20
3.5 - Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 - Efeitos da formalina na pata traseira de camundongos.....	26
4.2 -Influência de diferentes mediadores na primeira fase da nociceção induzida por formalina 0,5% em camundongos.....	27
4.3 - Influência de diferentes mediadores na segunda fase da nociceção induzida por formalina 0,5% em camundongos.....	28
4.4 - Influência de diferentes mediadores sobre o edema de pata induzido por formalina 0,5% em camundongos	29
4.5 - Influência do bosentan sobre a potencialização da resposta nociceptiva e edematogênica na pata de camundongos.....	30

4.6 - Efeitos potencializadores dos agonistas endotelinérgicos e da histamina sobre as repostas à formalina 0,5% em camundongos.....	31
4.7 - Efeito nociceptivo da capsaicina na pata traseira de camundongos	36
4.8 - Efeito da capsaicina sobre o edema de pata em camundongos.....	37
4.9 - Potencialização pela endotelina-1 (10 pmol/pata) da nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	38
4.10- Influência de diferentes mediadores sobre a resposta nociceptiva à capsaicina.....	39
4.11- Influência do BMS 182874 e do bosentan na potencialização da resposta nociceptiva à capsacina em camundongos.....	40
4.12- Influência do BQ-123 e do BQ-788 na potencialização da resposta nociceptiva à capsacina em camundongos.....	41
4.13- Influência da endotelina-1 e do IRL 1620 na potencialização da resposta nociceptiva à capsaicina induzida por serotonina em camundongos.....	42
4.14- Efeito potencializador da endotelina-1 e da serotonina sobre a resposta nociceptiva à capsaicina em camundongos.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
SUMMARY.....	54
RESUMO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito da injeção intraplantar de formalina sobre o tempo de lambida e o edema da pata traseira de camundongos.....	26
FIGURA 2 - Influência de diferentes mediadores sobre a primeira fase da nocicepção induzida por formalina 0,5% em camundongos.....	27
FIGURA 3 - Influência de diferentes mediadores sobre a segunda fase da nocicepção induzida por formalina 0,5% em camundongos.....	28
FIGURA 4 - Influência de diferentes mediadores sobre o edema de pata induzido por formalina 0,5% em camundongos.....	29
FIGURA 5 - Influência do bosentan sobre a potencialização da resposta nociceptiva e edematogênica na pata de camundongos.....	30
TABELA 1 - Potência hiperalgésica e edematogêncica dos agonistas endotelinérgicos e da histamina sobre as respostas à formalina em camundongos	31
FIGURA 6 - Efeito nociceptivo da capsaicina na pata traseira de camundongos.....	36
FIGURA 7 - Efeito da capsaicina sobre o edema de pata em camundongos.....	37
FIGURA 8 - Potencialização pela endotelina-1 (10 pmol/pata) da nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	38
FIGURA 9 - Influência de diferentes mediadores sobre a nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	39

FIGURA 10- Influência do BMS 182874 e do bosentan na potencialização da resposta nociceptiva à capsacina em camundongos.....	40
FIGURA 11- Influência do BQ-123 e do BQ-788 na potencialização da resposta nociceptiva à capsacina em camundongos.....	41
FIGURA 12- Influência da endotelina-1 e do IRL 1620 na potencialização da resposta nociceptiva à capsaicina induzida por serotonina em camundongos.....	42
TABELA 2 - Potência hiperalgésica da endotelina-1 e da serotonina sobre a resposta nociceptiva à capsacina em camundongos	43

1 - INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta do organismo a lesão ou destruição de um tecido, que envolve eventos celulares e vasculares orquestrados por múltiplos tipos de leucócitos, mediadores químicos e fatores de crescimento teciduais ou circulatórios do sangue (para revisão ver WEAVER, 1995). O primeiro conceito de inflamação, atribuído ao cientista romano Celsus, caracterizou a inflamação pelos sinais cardinais *rubore* (vermelhidão), *calore* (aquecimento), *tumore* (edema), *dolore* (dor) e *functio laese* (função prejudicada ou perda de função) (*Apud* HANDWERKER e REEH, 1991). Acreditava-se que a dor, ao contrário dos demais sinais, representaria muito mais uma forma de sinalizar a lesão do local inflamado, do que uma entidade que participa efetivamente do processo. Em 1794, num dos primeiros estudos científicos sobre inflamação de que se tem notícia, John Hunter aponta em seu livro “A Treatise on the Blood, Inflammation and Gun-Shot Wounds” importantes observações sobre a vasodilatação e o extravazamento plasmático, que hoje sabe-se estarem relacionados com os fenômenos de rubor, calor e edema que acompanham a inflamação. Atualmente, os complexos processos envolvidos nos fenômenos da inflamação e da dor são melhor compreendidos, mas muito ainda permanece para ser investigado sobre a dor de origem inflamatória.

A sensação que denominamos de dor têm um caráter subjetivo e inclui aspectos complexos, como os componentes sensoriais e afetivo-

motivacionais, podendo ser modulada por uma larga escala de experiências comportamentais, de forma que uma experiência que é dolorosa para uns não o é necessariamente para outros (*Apud WILLIS, 1985*). Por isso mesmo, uma distinção entre dor e nocicepção se faz necessária. O termo nocicepção se refere à **recepção** pelo sistema nervoso central de sinais evocados pela ativação de receptores sensoriais especializados, que fornecem a informação de que um tecido foi lesado. Por outro lado, a dor seria a **percepção** da sensação aversiva ou desagradável, originada em uma região específica do corpo, que é processada em diversas estruturas cerebrais. Assim, como veremos a seguir, a ativação de vias nociceptivas periféricas (recepção da informação nociceptiva) pode levar (embora não necessariamente) à sensação de dor (percepção consciente da informação nociceptiva).

Distribuídos por todos os tecidos do nosso corpo, existem receptores que são sensíveis a diferentes modalidades de estímulos sensoriais, dentre os quais encontram-se os nociceptores (do latim *nocere* = prejudicar). Estes receptores são sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos e/ou químicos de alta intensidade e, quando estimulados adequadamente, ativam as fibras nervosas às quais encontram-se ligados. Os potenciais de ação propagados por estas fibras são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC) até atingir áreas específicas do cérebro, onde será interpretado e percebido. Ainda, uma vez que a ativação de tais fibras ocorre sob estimulação intensa, as informações que elas transmitem normalmente estão associadas à sensação dolorosa (para revisão ver CHAOUCH e BESSON, 1986).

As fibras nervosas (neurônios) a que tais nociceptores podem estar associados são classificadas de acordo com o seu diâmetro e grau de mielinização em fibras A δ ou C, que apresentam velocidades de condução rápida e lenta, respectivamente. Assim, os nociceptores podem ser de três tipos diferentes: 1) nociceptores mecanosensitivos, associados a fibras do tipo A δ ; 2) nociceptores mecanotérmicos, também associados a fibras do tipo A δ ; e 3) nociceptores polimodais - porque respondem a diferentes modalidades de estímulos como pressão, temperatura e agentes químicos - que estão associados às fibras aferentes do tipo C (para revisão ver CHAOUCH e BESSON, 1986; WILLIS, 1985; NOBACK et al., 1996).

Como já foi dito, a ativação de uma fibra aferente (sensitiva) nociceptiva, seja ela do tipo fibra A δ (finamente mielinizadas) ou fibra C (não-mielinizadas), gera potenciais de ação que são transmitidos pelos nervos periféricos e cranianos e alcançam a medula espinhal principalmente pelas raízes dorsais. Essa informação nociceptiva é processada no corno dorsal da medula espinhal, onde interações excitatórias ou inibitórias, que constituem o amplamente conhecido "sistema de controle da dor por comportas", podem modular a transmissão da informação para neurônios de tratos espinhais ascendentes (MELZACK e WALL, 1965). Atualmente, três principais vias ascendentes da dor são conhecidas, sendo elas o trato espino-talâmico lateral, o trato espino-reticular e o trato espino-mesencefálico, que terminam em diversos núcleos do tálamo e da formação reticular do tronco encefálico (para revisão ver WILLIS, 1985; VIERCK et al. 1986). A dor só é reconhecida

como tal quando a informação nociceptiva chega ao tálamo e é projetada à córtex cerebral a partir dessa estrutura. Também é ao nível mesencefálico que a informação nociceptiva é processada e integrada, originando uma resposta sujeita à modulação por múltiplos fatores motivacionais e afetivos.

A transmissão nociceptiva ao nível espinhal ainda está sujeita à regulação por neurônios descendentes originados de diversos centros cerebrais. Os corpos neuronais das fibras que formam este sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos incluindo o núcleo magno da rafe, rafe dorsal, reticular paragigantocelular, loco cerúleo, substância cinzenta periaquedutal, formação reticular mesencefálica, hipotálamo e córtex somatossensorial (para revisão ver HAMMOND, 1986). Tais fibras liberam diversos neurotransmissores inibitórios, incluindo a serotonina, a dopamina, a noradrenalina, peptídeos opióides e GABA (para revisão ver HAMMOND, 1986; MALCANGIO e BOWERY, 1996).

Em estados fisiopatológicos inflamatórios é comum a ocorrência de ampliação da percepção dolorosa, que reflete uma modificação do processamento da transmissão nociceptiva conhecida como *hiperalgesia*. A idéia da ocorrência de um estado hiperalgésico é antiga, pois o mesmo John Hunter em 1794 já havia registrado uma idéia básica sobre a hiperalgesia, sugerindo que durante estados inflamatórios os tendões se tornariam mais sensíveis às sensações dolorosas (*Apud* LEWIS, 1986). A hiperalgesia pode ocorrer após diversos tipos de lesão tecidual e é um aspecto muito importante durante a inflamação e em certas doenças do sistema nervoso,

caracterizada por um estado de sensibilização das fibras aferentes nociceptivas com diminuição do seu limiar de ativação e resposta aumentada a estímulos nocivos (para revisão ver BONICA, 1992). De acordo com sua localização em relação ao local da lesão, a hiperalgesia pode ser classificada em duas categorias: a) hiperalgesia primária, caracterizada por reatividade aumentada dos nociceptores a estímulos mecânicos, químicos e térmicos no local da lesão; e b) hiperalgesia secundária, uma reatividade aumentada a estímulos mecânicos na região circunjacente à área lesada (para revisão ver TREEDE e MAGERL, 1995).

Sugere-se, atualmente, que a hiperalgesia envolva processos de sensibilização periférica e de sensibilização central. Assim, no caso da hiperalgesia primária, mediadores inflamatórios podem atuar diretamente sobre nociceptores das fibras aferentes nociceptivas ou indiretamente liberando mediadores que atuam nestas células, excitando-as ou tornando-as mais propensas a serem ativadas por estímulos térmicos, químicos e mecânicos de baixa intensidade (para revisão ver CARSTENS, 1995; DEVOR, 1996). Ou seja, a inflamação pode aumentar a sensibilidade das terminações nociceptivas nos tecidos periféricos através da geração e ação de mediadores inflamatórios (HANDWERKER e REEH, 1991). Já a hiperalgesia secundária decorreria de um aumento da sensibilidade dos neurônios do corno medular dorsal que recebem e processam a informação sensorial da área ao redor da lesão, ou seja dos neurônios sensoriais de segunda ordem (para revisão ver CARSTENS, 1995).

Alguns dos mediadores inflamatórios que contribuem para a hiperalgesia são liberados por células residentes, incluindo histamina e serotonina de mastócitos, prostaglandinas de fibroblastos e de terminações simpáticas, bem como a bradicinina a partir do cininogênio tecidual ou do sangue. Outros são liberados por células do sistema imune, que são atraídos para o local da lesão, incluindo citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8, entre outras (para revisão ver WATKINS et al., 1995a). A bradicinina é capaz de ativar e de sensibilizar as fibras aferentes primárias, enquanto a serotonina e as prostaglandinas são capazes de sensibilizar estas fibras para a ação de outros agentes químicos (HANDWERKER e REEH, 1991). No teste de aplicação de pressão à pata de ratos, o efeito hiperalgésico (sensibilizador) da bradicinina parece ser devido ao desencadeamento da cascata de liberação de citocinas que medeiam a resposta hiperalgésica (FERREIRA et al., 1993). As citocinas parecem estar envolvidas também na hiperalgesia desencadeada por carragenina. De acordo com CUNHA et al. (1992), este processo envolve a liberação consecutiva de TNF- α , IL-1 β , IL-6, eicosanóides da via da ciclo-oxigenase, IL-8 e substâncias simpatomiméticas. Outros trabalhos também demonstram a capacidade destes agentes promoverem hiperalgesia. A IL-6, quando injetada intratecalmente, induz hiperalgesia térmica em modelo de dor neuropática em ratos (DeLEO et al., 1996). O TNF- α (intraperitonealmente) produz hiperalgesia térmica, de forma dependente de dose, no teste do "tail-flick" (WATKINS et al., 1995b). Além disso, recentemente um estudo

demonstrou que a IL-1 β pode ser responsável pelo aumento dos níveis plasmáticos de neurotrofina (fator de crescimento de nervo) que, por sua vez, estaria relacionada ao desenvolvimento de hiperalgisia inflamatória (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995).

Com relação aos produtos da ciclo-oxigenase, já há bastante tempo tem-se registrado que as prostaglandinas são capazes de potencializar as sensações dolorosas provocadas por agentes como a bradicinina e a histamina (CRUNKHORN e WILLIS, 1971; FERREIRA, 1972). O tratamento prévio com prostaglandinas aumenta a incidência de comportamentos de dor em vários modelos animais (WILLIS e CORNELESSEN, 1973; FERREIRA et al., 1978). Mais recentemente, estudos *in vitro* também relacionam a capacidade das prostaglandinas em aumentar a liberação de neuropeptídeos a partir dos neurônios sensoriais primários com a resposta comportamental aumentada observada *in vivo* em modelos de hiperalgisia (VASKO et al., 1994).

Contudo, deve-se levar em consideração que os efeitos hiperalgésicos causados por cada tipo de agente geralmente constituem apenas um dos componentes das suas ações pró-inflamatórias. Assim, ele ocorre simultaneamente com outras respostas inflamatórias desencadeadas em diferentes tipos celulares presentes no tecido. As ações sobre estas células compreendem fenômenos de regeneração e proliferação entre outros, enquanto as ações vasculares incluem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Frequentemente, parte destes efeitos pode ser

mediado através da liberação de substâncias do plasma, dos leucócitos, dos linfócitos, das plaquetas, dos mastócitos ou mesmo do endotélio vascular (para revisão ver LEWIS, 1986).

Um aspecto interessante, do ponto de vista do presente estudo, é que muitos mediadores inflamatórios são também capazes de induzir a liberação de endotelinas de diferentes tipos de células, incluindo o endotélio (ver abaixo). Uma vez que as endotelinas vêm sendo amplamente implicadas em processos inflamatórios (para revisão ver RAE e HENRIQUES, 1997), uma das ações desempenhadas por estes peptídeos poderia estar relacionado à hiperalgesia.

As endotelinas constituem uma família de peptídeos estruturalmente relacionados que contém 21 resíduos de aminoácidos, sendo eles a endotelina-1, a endotelina-2 e a endotelina-3 (YANAGISAWA et al., 1988; INOUE et al., 1989). Esses peptídeos apresentam, ainda, grande homologia estrutural com as sarafotoxinas presentes no veneno da serpente israelense *Actractaspis engaddensis* (para revisão ver HAYNES e WEBB, 1993).

As endotelinas exercem suas ações através da interação com receptores específicos pertencentes à família de receptores acoplados a proteínas G, que possuem sete domínios transmembrana. Até o presente momento, dois receptores para endotelinas foram clonados em mamíferos: o receptor ET_A, que possui maior afinidade pela endotelina-1 do que pela endotelina-3 (ARAI et al., 1990); e o receptor ET_B, que apresenta igual afinidade entre os peptídeos (SAKURAI et al., 1990). Os efeitos mediados pelos dois tipos de

receptores podem ser diferenciados pelo uso de agonistas e antagonistas seletivos. O receptor ET_A é seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos tais como BQ-123, ou não-peptídicos tais como o BMS 182874 e o A-127722-5. Já o receptor ET_B é seletivamente estimulado por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala^{1,3,11,15}]endotelina-1, o BQ-3020 e o IRL 1620, e é seletivamente bloqueado por antagonistas peptídicos como BQ-788 e RES-701-1, ou pelo composto não-peptídico Ro 46-8443 (para revisões ver MASAKI et al., 1994; SOKOLOVSKY, 1995). Existem também diferentes antagonistas não-seletivos (ou mistos) para receptores ET_A/ET_B tais como o bosentan, o SB 217242 e o TAK-044. Um terceiro tipo de receptor (ET_C), que possui maior afinidade por endotelina-3 do que por endotelina-1, foi clonado em genoma do anfíbio *Xenopus laevis* (KARNE et al., 1993), mas até o momento existem apenas evidências funcionais da sua expressão em mamíferos (EMORI et al., 1990; DOUGLAS et al., 1995).

Diversos estímulos ou mediadores inflamatórios podem agir como liberadores de endotelinas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo um papel pró-inflamatório para as mesmas, que poderia estar diretamente relacionado à produção da hiperalgesia. O lipopolissacarídeo de membrana de bactérias gram-negativas (LPS; geralmente de *Escherichia coli*) aumentam a produção de endotelinas em cultura de células endoteliais de aorta (SUGIURA et al., 1989) ou artéria pulmonar (OHLSTEIN et al., 1991) bovina, de células epiteliais da traquéia de cobaias (NINOMYIA et al., 1991) ou de traquéia humana (NAKANO et al., 1994) e de macrófagos (EHRENREICH et al., 1990) e

monócitos humanos (EHRENREICH et al., 1993; CUNNINGHAM et al., 1991). Ainda, IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, bem como o $TNF-\alpha$, são capazes de aumentar os níveis de endotelinas no sobrenadante de células epiteliais de traquéia de cobaia em cultura (ENDO et al., 1992). O tratamento *ex vivo* com IL-2, em ratos, aumenta a liberação de endotelinas pelo mesentério isolado perfundido (MIYAMORI et al., 1991), e a IL-6 é capaz de promover sua liberação a partir de células amnióticas cultivadas humanas (MITCHELL et al., 1991). Além disso, o interferon- β estimula a produção de endotelinas em fibroblastos de pele humana (ZEBALOS et al., 1991), enquanto o interferon- γ é um estímulo efetivo para sua liberação em células endoteliais pulmonares bovinas (KANSE et al., 1991).

Por outro lado, as endotelinas também são capazes de induzir a liberação de agentes que têm sido envolvidos com a hiperalgesia inflamatória, de forma que elas poderiam estar indiretamente envolvidas em tal processo. A endotelina-1 estimula a produção de $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, “peptídeo quimiotático de monócitos-1” e “fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos” em cultura de macrófagos/monócitos humanos (HURIBAL et al., 1992; CUNNINGHAM et al., 1993; HELSET et al., 1993); libera IL-6 a partir de células endoteliais de ratos (XIN et al., 1995) e $TNF-\alpha$, IL-1 e IL-6 a partir de células endoteliais humanas (STANKOVA et al., 1996). Quanto aos eicosanóides, a endotelina-1 é um potente liberador de prostanóides em pulmão perfundido isolado de ratos ou cobaias, entre outros tecidos (De NUCCI et al., 1988; TOUVAY et al., 1990; D'ORLÉANS-JUSTE et al., 1992).

Também libera as prostaglandinas (PG) PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 e $PGF_{2\alpha}$ a partir de brônquio humano (HAY et al., 1993), além das PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ a partir de células epiteliais das vias aéreas de gato (WU et al., 1993) e PGE_2 e PGI_2 de baço e fígado perfundidos de coelho (RAE et al., 1989). Além disso, a endotelina-1 é capaz de liberar tromboxano A_2 (TXA_2) a partir de células das vias aéreas de cobaias (FILEP et al., 1991a), do brônquio humano (HAY et al., 1993) e de macrófagos das vias aéreas de cão (NINOMIYA et al., 1992). Em diferentes circunstâncias, a endotelina-1 também é capaz de liberar histamina de mastócitos de cobaia (UCHIDA et al., 1992) e de camundongos (YAMAMURA et al., 1994, 1995; EGGER et al., 1995). Embora não degranule diretamente os mastócitos da pele humana, a endotelina-1 pode ativar indiretamente estas células através da estimulação de nervos sensoriais (BRAIN et al., 1992).

Além dos efeitos já mencionados, as endotelinas possuem outras atividades pró-inflamatórias que dizem respeito ao aumento da permeabilidade vascular, o aumento da expressão de moléculas de adesão e a promoção da migração de leucócitos. Quando administrada sistemicamente (*i.v.*), a endotelina-1 aumenta o extravazamento de proteínas plasmáticas a partir da microvasculatura de estômago, duodeno, baço, coração, diafragma, traquéia e brônquio de ratos (FILEP, et al., 1991b; FILEP et al., 1994a; SIROIS et al., 1992; LOPEZ-BELMONTE, et al., 1995; KUROSE, et al., 1993). A infusão de endotelina-1 na artéria braquial induz edema no antebraço humano (DAHLOF et al., 1990). Além disso, as endotelinas endógenas parecem contribuir para o

desenvolvimento do edema induzido por injeção local de ovalbumina na pata de camundongos previamente sensibilizados a este antígeno (SAMPAIO, et al., 1995). Com relação à expressão de moléculas de adesão, sabe-se que a endotelina-1 aumenta de grande maneira a expressão de ICAM-I, VCAM e E-selectina em células endoteliais da microvasculatura humana cultivadas (DUPERRAY, et al., 1995). Além disso, é capaz de aumentar a adesão de leucócitos às células endoteliais pulmonares (HELSET et al., 1994) e coronárias (LOPES-FARRÉ et al., 1993; LEFER et al., 1994) e de neutrófilos às células endoteliais humanas em cultura (McGRECOR, et al., 1994). Por último, as endotelinas também podem atuar sobre a migração de leucócitos. A endotelina-1 induz agregação de neutrófilos via liberação de PAF (GOMEZ-GARRE et al., 1992), mas os outros peptídeos da família também possuem atividade quimiotática sobre neutrófilos humanos (WRIGHT et al., 1994). Ainda, a endotelina-1 pode servir como fator quimiotático para monócitos e macrófagos (ACHMAD e RAO, 1992), que interessantemente são capazes de gerar endotelina-1 na presença de estímulos inflamatórios tais como o LPS (EHRENREICH et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1991).

Além dos efeitos pró-inflamatórios mencionados acima, as endotelinas podem exibir propriedades nociceptivas. Quando administrada intraperitonealmente em camundongos, tanto a endotelina-1 quanto a endotelina-2 e a endotelina-3 promovem comportamento de dor (contorção abdominal), de forma dependente de dose (FERREIRA et al., 1989; RAFFA e JACOBY, 1991; RAFFA et al., 1991; RAFFA et al., 1996). Em humanos, a

injeção intradérmica de endotelina-1 no antebraço produz uma resposta composta por prurido intenso, sensibilidade aumentada ao toque direto da área injetada e à pressão numa área circunjascente à da sua aplicação (FERREIRA et al., 1989). Além disso, voluntários que se submeteram à infusão de endotelina-1 na artéria braquial também reportaram profunda dor muscular no antebraço, que foi aumentada pelo toque ou por contração muscular (DAHLOF et al., 1990). Por outro lado, a injeção intraplantar de endotelina-1 em ratos induz diminuição do limiar de resposta à aplicação de um estímulo mecânico na pata tratada, *i.e.* causa hiperalgesia (FERREIRA et al., 1989). Diante dessas evidências, o presente estudo foi desenvolvido com o propósito de investigar a influência hiperalgésica de endotelinas na nocicepção induzida por dois estímulos químicos álgicos reconhecidos: a formalina e a capsaicina.

O teste da formalina é um modelo comportamental de dor associada com lesão tecidual, no qual quantifica-se a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira de animais, geralmente ratos (TJØLSEN et al., 1992; ABBOTT et al., 1995), embora os trabalhos originais de DUBUISSON e DENNIS (1977) utilizassem também outras espécies animais. A injeção de formalina na pata acarreta diferentes tipos de resposta, como *licking* (lamber), *bitting* (morder), *shaking* (chacoalhar) e *favouring* (favorecimento/proteção) da pata injetada. Estas respostas seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), que dura cerca de 5 min e é seguido, após um breve intervalo de

quiescência, por um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de 1 h (DUBUISSON e DENNIS, 1977). Alguns trabalhos têm ainda subdividido temporalmente a segunda fase em fase 2A e fase 2B (para exemplo ver MALMBERG e YAKSH, 1992).

A primeira fase de nocicepção do modelo da formalina é geralmente atribuída a um efeito direto da formalina sobre os nociceptores, uma vez que ela é inibida apenas por drogas analgésicas que apresentam um forte componente de ação central (mesmo que também possam atuar fora do SNC), como a morfina, a aminopirina e o ácido mefenâmico (SHIBATA et al., 1989). Já a segunda fase deste modelo é relacionada ao desenvolvimento de inflamação no local da injeção e a uma sensibilização dos neurônios do corno dorsal, e parece ser susceptível à inibição por anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais tais como dexametasona e aspirina (SHIBATA et al., 1989), por agonistas de receptores opióides (SHIBATA et al., 1989; GOGAS et al., 1996) ou GABAérgicos (GABA_A e GABA_B) (DIRIG e YAKSH, 1995), bem como por bloqueadores da síntese de óxido nítrico (SHIBUTA et al., 1996). Além disso, o componente neuronal também parece ser importante para a manutenção da segunda fase uma vez que a injeção de lidocaína previamente à injeção de formalina inibiu ambas as fases da dor induzida por este agente (PUIG e SORKIN, 1995).

Por sua vez, já está bem estabelecido que a nocicepção induzida por capsaicina é decorrente da ativação de receptores específicos, chamados de

receptores vanilóides, presentes nas fibras sensoriais não-mielinizadas (tipo C) e/ou fibras pouco mielinizadas (A δ) (SZALASSI, 1995). Estas fibras sensoriais sensíveis à capsaicina possuem um conteúdo peptidérgico pronunciado, incluindo a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Sendo assim, a ativação de tais neurônios causa a liberação destes transmissores no corno dorsal, com conseqüente transmissão da informação nociceptiva. A substância P, ao atuar em receptores para taquicininas, parece ser muito importante para o processamento central desta informação uma vez que o CP 96,345, um antagonista de receptores NK₁, inibe a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de capsaicina (SAKURADA et al., 1993).

O modelo da nocicepção induzida por capsaicina apresenta uma clara vantagem sobre outros modelos de dor de origem química. Diferentemente de outros estímulos nociceptivos conhecidos como o ácido acético e fenilbenzoquinona e a própria formalina, a capsaicina ativa seletivamente os neurônios sensoriais primários periféricos (BAUMANN et al., 1991), pela estimulação de receptores vanilóides específicos (HOLZER, 1991; SZALLASI, 1995).

2 - OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal investigar os possíveis efeitos periféricos das endotelinas sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina ou capsaicina em camundongos, bem como os receptores endotelinérgicos responsáveis por tais ações.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Todos os experimentos foram conduzidos em camundongos suíços machos, pesando cerca de 30,0 g, criados até o desmame pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos até o uso no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso a água e ração. Nos dias de experimentos, os animais foram levados para a sala de experimentação, e aguardou-se um período de ambientação de aproximadamente 1 h. Todos os experimentos foram conduzidos entre 10:00 e 17:00 hs.

3.2- Drogas

Foram empregadas as seguintes drogas: endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c e IRL 1620 (Suc[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1₁₀₋₂₁) (todas da American Peptide Co., Sunnyvale, U.S.A.), cloridrato de histamina, capsaicina (Sigma Chemical Co., Saint Louis, U.S.A.), bosentan (gentilmente doado pela Dra. Martine Clozel, Hoffmann-La-Roche Laboratories, Basel, Suíça), cloridrato de serotonina, BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- γ -metileucil-D-1-metoxicarbonil-D-norleucina) (ambos da Research Biochemicals International, Natick, U.S.A.), BMS 182874 (5-[dimetilamino]-N-[3,4-dimetil-5-isoxazolil]-1-naftalenesulfonamida; gentilmente doado pela Bristol-Myers Squibb, Princeton,

U.S.A.), e BQ-123 (ciclo[DTTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]; da Bachem Laboratories, Torrance, U.S.A.). Soluções estoque (10 a 100 μM) de endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S_{6c}, IRL 1620, histamina, serotonina, BQ-788 e BQ-123 foram preparadas em salina tamponada com fosfato (PBS) e estocadas a uma temperatura de -18°C . As soluções de formalina foram preparadas por diluição de uma solução estoque a 5% em salina até as concentrações desejadas, no dia do experimento. Soluções estoque de capsaicina (240 $\mu\text{g/ml}$) foram preparadas em dimetilsulfóxido, que foram diluídas em salina até as concentrações desejadas no dia do experimento. O bosentan (F. Hoffmann La-Roche A.G., Basel, Switzerland) foi dissolvido no dia de uso em água destilada, aquecida em banho-maria ($50-55^{\circ}\text{C}$). O BMS 182874 foi diluído no dia do experimento em NaCO_3 1% ou 5% (10 ou 30 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente) e sonicado até sua completa dissolução.

3.3- Nociceção e Edema Induzidos por Formalina

Estes experimentos foram realizados conforme descrito anteriormente por Shibata et al. (1989). Cada animal recebeu uma injeção intraplantar (*i.pl.*) de formalina (0,1 a 2,5%) na pata traseira direita. A pata contralateral (controle) foi tratada com injeção semelhante do veículo (20 μl). Imediatamente após as injeções, cada animal foi colocado, separadamente, sob um funil de vidro com aproximadamente 20 cm de diâmetro. Para facilitar a visualização das patas dos animais em todos os tempos, apoiou-se um espelho atrás do funil com um ângulo de aproximadamente 90° em relação à bancada. Os animais foram

observados durante 30 min, durante os quais registrou-se o tempo (em s) que cada animal dispendeu lambendo (“licking”) cada pata. A resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina consiste de duas fases: a primeira fase, que ocorre nos primeiros 5 min após a injeção; e a segunda fase, que ocorre entre 10 e 30 min após a injeção. Desta forma, registrou-se o tempo total de lambida durante cada uma destas fases. Terminado o período de observação total (30 min), cada animal foi imediatamente sacrificado por deslocamento cervical e ambas patas foram cortadas na articulação do tornozelo e pesadas. A diferença de peso (em mg) entre as patas foi usada como índice do edema de pata.

Nos experimentos iniciais, examinou-se as relações dose-resposta entre as diferentes doses de formalina injetadas (0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 ou 2,5%; em 20 μ l) e a intensidade de cada uma das fases nociceptivas ou do edema. A partir destes experimentos, foi selecionada a concentração de 0,5% de formalina para os estudos subsequentes, porque ela provocou claramente níveis submáximos de resposta nociceptiva, na primeira e na segunda fases, e de edema de pata. Nos experimentos posteriores, endotelina-1, endotelina-3, sarafotoxina S6c (0,1 a 30 pmol/pata), histamina (0,3 a 3 nmol/pata) ou veículo foram injetadas simultaneamente com a formalina (concentração de 0,5% num volume total de 20 μ l). Em outro grupo de experimentos, os animais foram tratados por via intraperitoneal (*i.p.*) com o antagonista não-peptídico e não-seletivo (misto) de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , bosentan (17 μ mol/kg), ou salina 1 h antes da injeção *i.pl.* de formalina (0,5%) sozinha ou

junto com endotelina-1 (10 pmol/pata) ou histamina (3 nmol/pata). Para minimizar a interferência de possíveis flutuações espontâneas da reatividade dos animais, as respostas dos animais tratados com as drogas foi sempre avaliada em paralelo àquelas de animais tratados com veículo. Assim, as respostas de cada grupo tratado com droga foram comparadas àquelas do seu respectivo grupo controle.

3.4- Nocicepção Induzida por Capsaicina

A metodologia utilizada nos estudos com capsaicina foi baseada no modelo proposto por SAKURADA et al. (1992), com pequenas modificações. Nesses experimentos, cada animal recebeu uma injeção *i.pl.* na pata traseira direita, de capsaicina (0,06 a 3,2 µg/ pata). A exemplo dos experimentos realizados com a formalina, imediatamente após as injeções, os animais foram colocados separadamente sob um funil de vidro e o tempo (em s) dispendido lambendo a pata injetada foi observado por 5 min. Ainda, no teste da formalina foi observado que os animais não manifestaram nenhum comportamento indicativo de nocicepção na pata tratada apenas com salina. Assim, nos experimentos com capsaicina os animais normalmente receberam apenas injeção de capsaicina na pata direita, sem administração de veículo à pata contralateral, exceto quando especificado.

Nos experimentos iniciais, analisou-se a relação entre a dose de capsaicina injetada (0,06; 0,1; 0,4; 1,6; 2,4 ou 3,2 µg; em 20 µl) e a intensidade da resposta nociceptiva induzida. Nos estudos subseqüentes, passou-se a

utilizar a dose de 0,1 μg , visto que esta claramente produziu níveis submáximos de nocicepção.

Em alguns experimentos os animais foram tratados, 30 min antes da injeção *i.pl.* de capsaicina, *in situ* com veículo, endotelina-1 (1 a 30 pmol/pata), sarafotoxina S6c (0,3 a 30 pmol/pata), IRL 1620 (3 a 100 pmol/pata) ou serotonina (0,6 a 3 nmol/pata) num volume total de 20 μl . Outros grupos de animais receberam injeção intravenosa (*i.v.*; através de uma veia caudal e 1 h antes da administração de endotelina-1 10 pmol/pata) de bosentan (17 e 52 $\mu\text{mol/kg}$), um antagonista misto de receptores ET_A/ET_B ; BMS 182874 (10 e 30 $\mu\text{moles/kg}$), um antagonista seletivo de receptores ET_A ; ou do veículo correspondente. Alternativamente, alguns animais receberam injeção *i.pl.* (10 min antes da endotelina-1 10 pmol/pata) de BQ-123, um antagonista seletivo de receptores ET_A , ou BQ-788, um antagonista seletivo de receptores ET_B (ambos na dose de 1 nmol/pata). Em uma série final de experimentos, os animais receberam injeção simultânea de serotonina (2 nmol/pata) mais endotelina-1 (30 pmol/pata) ou IRL 1620 (30 pmol/pata) *in situ*, num volume total de 20 μl , 30 min antes da injeção *i.pl.* de capsaicina.

3.5- Análise Estatística

Os resultados relativos a respostas nociceptivas à formalina ou à capsaicina são apresentados como a média \pm E.P.M. dos valores absolutos, ou como as diferenças entre as respostas provocadas pela injeção do agente nociceptivo sozinho ou após injeção simultânea ou prévia de agentes

hiperalgésicos (*i.e.*, Δ tempo de licking). Os resultados relativos ao edema induzido pela formalina são apresentados de modo análogo, *i.e.* em valores absolutos ou como Δ peso das patas. A potência hiperalgésica ou edematogênica dos diversos agonistas foi avaliada ao nível da DE_{50} (*i.e.*, a dose necessária para causar a metade do efeito máximo do próprio agonista). As potências são apresentadas como a média geométrica acompanhada dos limites de confiança para 95%. Todos os dados foram estatisticamente analisados por análise de variância ANOVA, seguido pelos testes de Bonferroni ou Dunn's, utilizando o programa estatístico *Instat*. Diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4 - RESULTADOS

4.1- Nocicepção e Edema Induzidos por Formalina

A injeção *i.pl.* de formalina induziu nocicepção e edema de pata de forma dependente de dose (Figura 1). Em todas as doses testadas (0,1 a 2,5%), a resposta nociceptiva provocada foi tipicamente caracterizada por duas fases: a primeira ocorrendo dentro dos 5 min iniciais, e a segunda que se manifesta a partir de 10 a 15 min após a injeção e geralmente se estende até os 30 min, quando é observado um nítido efeito edematogênico do agente nociceptivo. Esses achados corroboram, essencialmente, os resultados relatados de CAMPOS et al. (1995), embora os autores daquele trabalho tenham encontrado uma potência nociceptiva discretamente maior. É possível que a variabilidade entre os resultados de ambos os trabalhos reflita diferenças na manipulação dos animais ou na padronização da observação de comportamentos nociceptivos. Em nosso estudo, as respostas provocadas pela formalina 0,5% (primeira fase $30,1 \pm 1,4$ s; segunda fase $102,0 \pm 10,7$ s; edema $31,8 \pm 3,1$ mg) foram claramente submáximas, uma vez que diferiram significativamente ($p < 0.05$) daquelas obtidas com a injeção de formalina 2,5% ($51,9 \pm 2,7$ s; $157,5 \pm 10,5$ s; e $55,0 \pm 3,8$ mg, respectivamente, $n = 6$ animais por grupo). Assim, utilizou-se formalina a 0,5% em todos os experimentos subseqüentes que fizeram uso desse agente nociceptivo.

Conforme ilustra a figura 2, a primeira fase da nocicepção induzida por formalina foi potencializada, de maneira graduada, pela injeção simultânea de

endotelina-1 ou endotelina-3, mas não pelo agonista seletivo de receptores ET_B sarafotoxina S6c. Esta potencialização foi estatisticamente significativa com 30 pmol/pata de endotelina-1, e com 3 e 10 pmol/pata de endotelina-3. As DE_{50} s para os efeitos hiperalgésicos da ET-1 e da ET-3 sobre a primeira fase de resposta nociceptiva à formalina foram semelhantes e são apresentadas na Tabela 1. Também não foi detectada diferença entre as respostas hiperalgésicas máximas a ambos os peptídeos.

Em contraste, a segunda fase da nocicepção induzida por formalina foi aumentada, também de forma dependente de dose, pela injeção simultânea de cada um dos três peptídeos com formalina. Uma potencialização significativa foi obtida com 1 a 30 pmol/pata de endotelina-3, ou com 3 a 30 pmol/pata de endotelina-1 ou de sarafotoxina S6c (Figura 3). As DE_{50} s e respostas máximas para os efeitos hiperalgésicos da ET-1, ET-3 e sarafotoxina S6c sobre a segunda fase de resposta nociceptiva à formalina são apresentadas na Tabela 1. As potências e eficácias hiperalgésicas máximas dos três peptídeos foram semelhantes.

Por outro lado, o edema de pata induzido por formalina foi significativamente potencializado pela endotelina-1 (10 a 30 pmol/pata), mas não pela endotelina-3 ou pela sarafotoxina S6c (até 30 pmol/pata), como mostrado na Figura 4. A DE_{50} s e o efeito potenciativo máximo sobre o edema induzido por formalina também estão dispostas na Tabela 1.

A histamina, injetada simultaneamente com a formalina, também potencializou ambas as fases da nocicepção e o edema de pata induzidos por

formalina. No entanto, a amina foi consideravelmente (720 a 800 vezes) menos potente do que a endotelina-1, ao comparar-se as DE_{50} s de ambos para cada um dos três efeitos (Figuras 2, 3 e 4, Tabela 1). Considerando que a resposta máxima obtida para a histamina neste estudo pode não ser a $E_{m\acute{a}x}$ real, a DE_{50} calculada a partir deste valor pode estar subestimada. Se isso for verdade, as potências da ET-1 relativa às da histamina podem ser maiores do que o calculado.

O tratamento com o antagonista não-peptídico misto (*i.e.* não-seletivo) de receptores ET_A/ET_B , bosentan (17 $\mu\text{mol/kg}$, *i.p.*, 1 h antes das injeções *i.pl.*) não modificou as respostas desencadeadas pela formalina sozinha (*i.e.*, na ausência de ET-1) ou pela injeção simultânea de formalina com histamina (3 nmol/pata), mas bloqueou significativamente a potencialização da nociceção (ambas as fases) e do edema provocados pela injeção simultânea de formalina com endotelina-1 (10 pmol/pata). Estes resultados são apresentados na Figura 5.

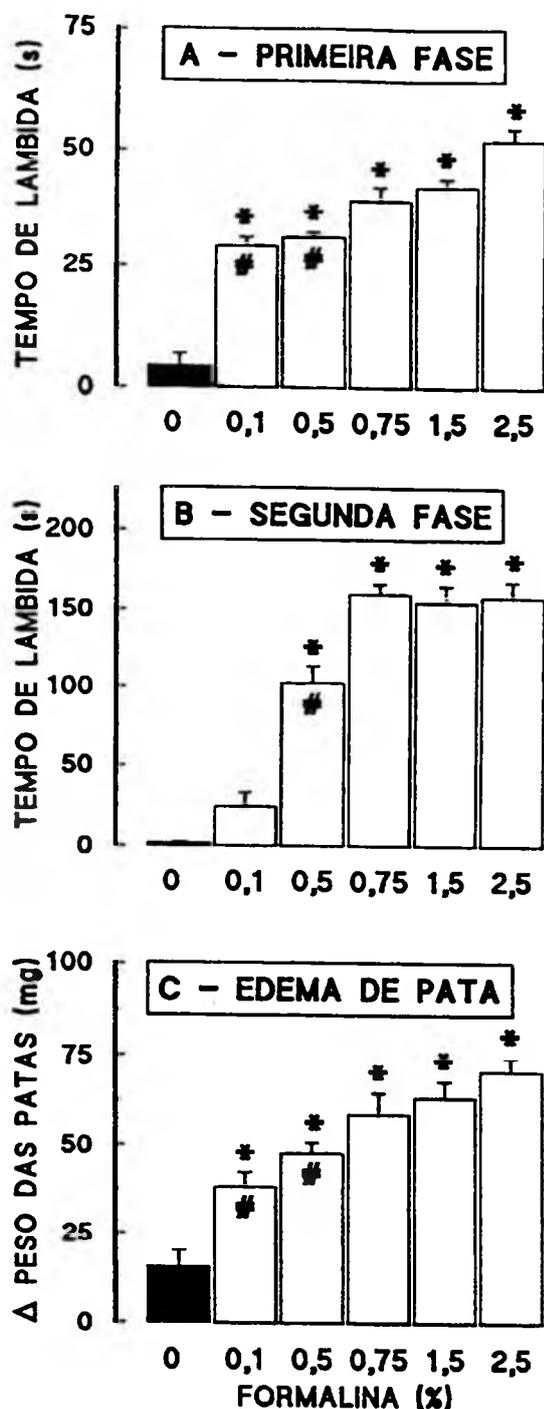


FIGURA 1: Efeito da injeção intraplantar de formalina sobre os tempos de lambida e o edema da pata traseira de camundongos. Na pata tratada, a formalina promoveu uma resposta nociceptiva dependente de dose composta de uma fase inicial (primeira fase) e uma fase mais tardia (segunda fase), além da resposta edematogênica. A formalina (□) foi injetada nas doses indicadas. A dose 0% corresponde à injeção do veículo somente (controle; 20 µl de salina; ■). Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 observações. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor do controle ou da maior dose de formalina (2,5%), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

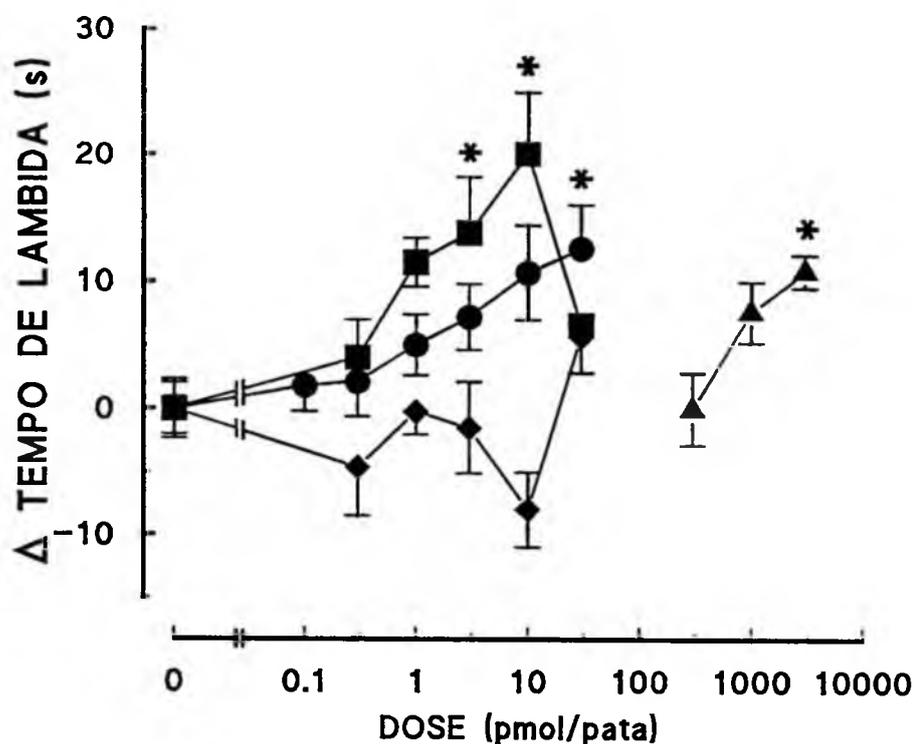


FIGURA 2: Influência da endotelina-1 (●), endotelina-3 (■), sarafotoxina S6c (◆) e histamina (▲) sobre a PRIMEIRA FASE da nocicepção induzida por formalina (0,5% em 20 μ l) em camundongos. Os resultados são apresentados como a diferença entre as respostas provocadas pela injeção simultânea das drogas junto com a formalina e a resposta média induzida pela formalina sozinha no respectivo grupo controle, e representam a média \pm E.P.M. de no mínimo 6 animais por dose. Asteriscos (*) indicam que os valores são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com os animais do grupo controle (ANOVA seguida por teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

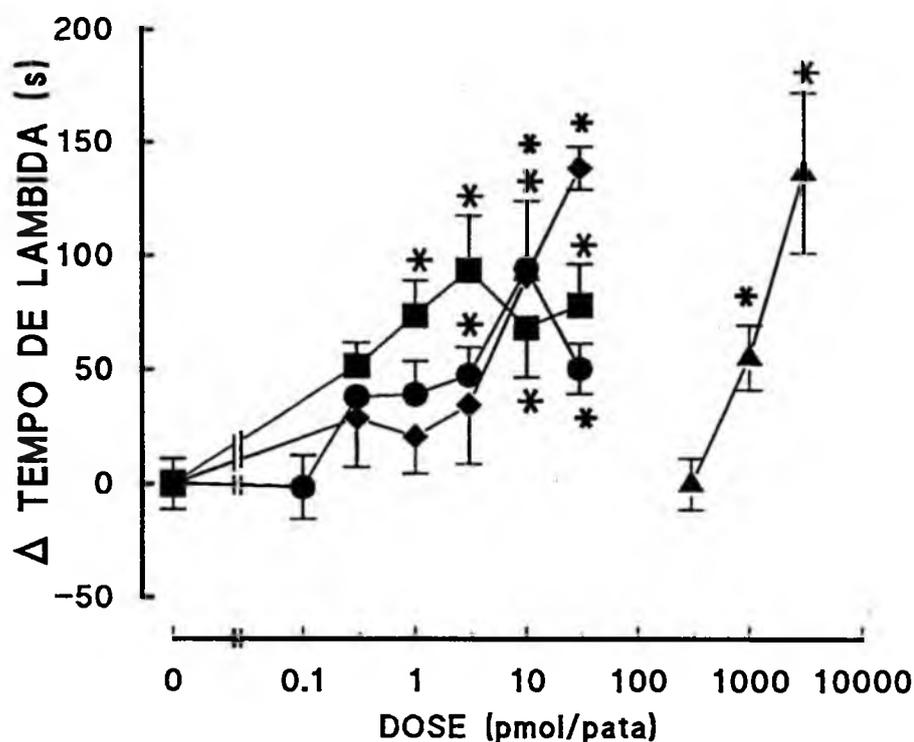


FIGURA 3: Influência da endotelina-1 (●), endotelina-3 (■), sarafotoxina S6c (◆) e histamina (▲) sobre a SEGUNDA FASE da nocicepção induzida por formalina (0,5% em 20 μ l) em camundongos. Os resultados são apresentados como a diferença entre as respostas provocadas pela injeção simultânea das drogas junto com a formalina e a resposta média induzida pela formalina sozinha no respectivo grupo controle, e representam a média \pm E.P.M. de no mínimo 6 animais por dose. Asteriscos (*) indicam que os valores são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com o respectivo grupo controle (ANOVA seguido por teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

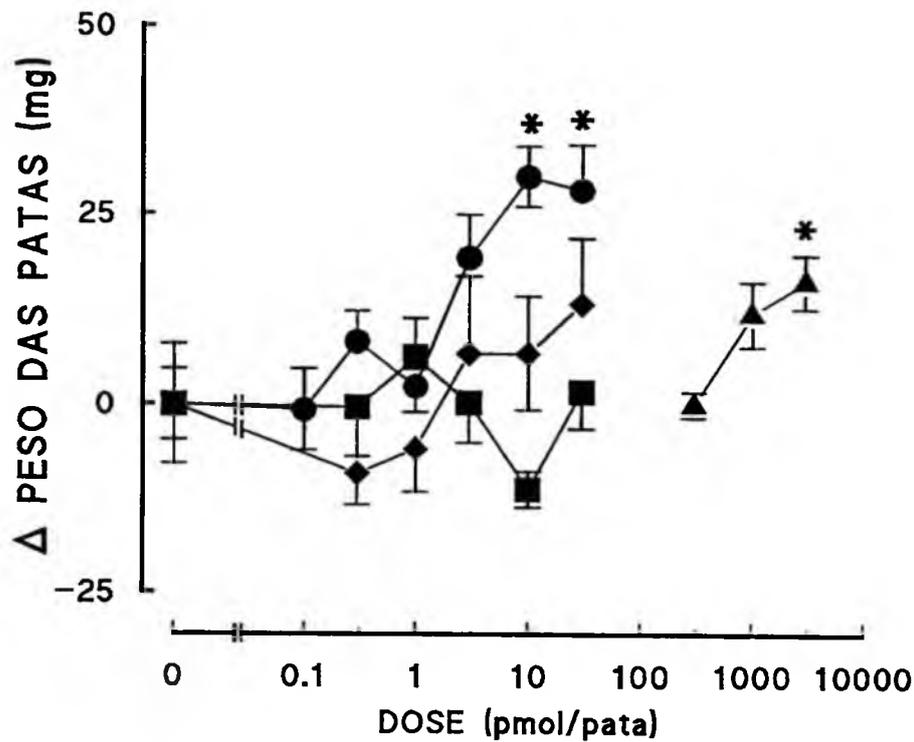


FIGURA 4: Influência da endotelina-1 (●), endotelina-3 (■), sarafotoxina S6c (◆) e histamina (▲) sobre o EDEMA DE PATA induzido por formalina (0,5% em 20 μ l) em camundongos. Os resultados são apresentados como a diferença entre as respostas provocadas pela injeção simultânea das drogas junto com a formalina e a resposta média induzida pela formalina sozinha no respectivo grupo controle. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de no mínimo 6 animais por dose. Asteriscos (*) indicam que os valores são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com os animais do respectivo grupo controle que foram tratados apenas com formalina (ANOVA seguida por teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

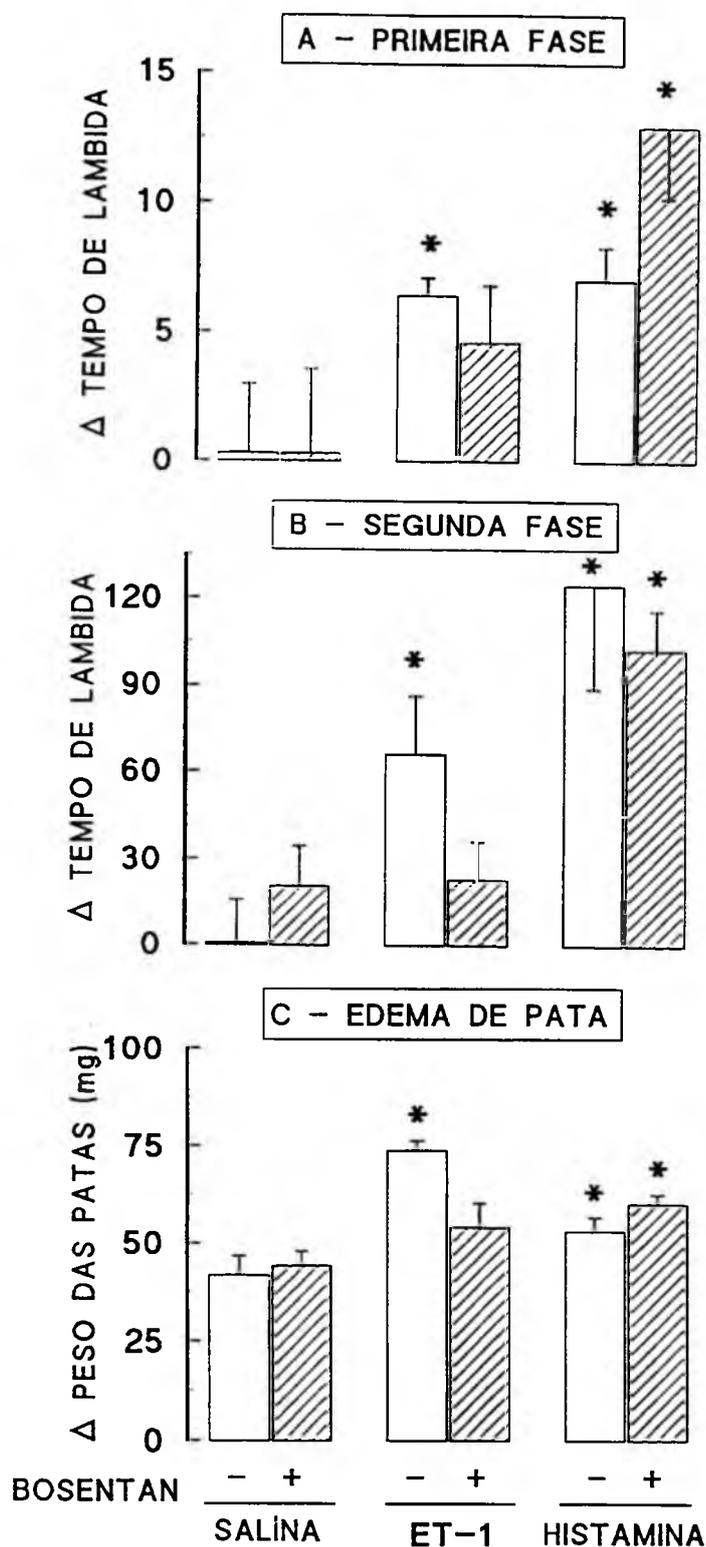


FIGURA 5: Influência do tratamento com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B , bosentan (10 mg/Kg; i.p.; 1 h antes dos agonistas), sobre a nocicepção (primeira e segunda fase) e o edema de pata induzidos por formalina sozinha ou combinada com endotelina-1 (ET-1, 10 pmol/pata) ou histamina (3 nmol/pata). Os valores representam a diferença entre as respostas dos animais tratados com agonistas e as respostas paralelas apresentadas pelos animais tratados com veículo (i.e. Δ Tempo de Lambida ou Δ Peso das Patas) \pm E.P.M. de 6 observações. Asteriscos (*) indicam que os valores são estatisticamente diferentes dos correspondentes valores obtidos para a formalina sozinha em animais tratados com salina (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

TABELA 1: Efeitos potencializadores dos agonistas endotelinérgicos e da histamina sobre a nocicepção e o edema de pata induzidos pela formalina 0,5% em camundongos.

AGONISTA	NOCICEPÇÃO				EDEMA	
	PRIMEIRA FASE		SEGUNDA FASE		DE ₅₀ ^a (pmol/pata)	E _{MAX} ^c (em mg)
	DE ₅₀ ^a (pmol/pata)	E _{MAX} ^b (em s)	DE ₅₀ ^a (pmol/pata)	E _{MAX} ^b (em s)		
Endotelina-1	2,0 (0,3-13,4)	12,6 ± 3,4	1,8 (0,5-7,3)	94,4 ± 4,2	2,0 (0,4-9,3)	28,2 ± 6,0
Endotelina-3	1,9 (0,9-4,2)	20,1 ± 4,9	0,9 (0,2-4,7)	90,7 ± 24,0	—	—
Sarafotoxina S6c	—	—	6,2 (3,0-13,1)	138,8 ± 9,5	—	—
Histamina	1.520 (0,7-3,1)	10,7 ± 1,3	1.300 (1,3-1,4)	136,9 ± 35,6	1.600 (0,9-2,6)	16,0 ± 3,5

a = Média geométrica da dose do agonista necessária para causar 50% do efeito máximo, e limites de confiança para 95%.

b = Resposta hiperalgésica máxima causada por cada um dos agonistas. Os valores representam a diferença de tempo (s) entre as médias obtidas para o grupo tratado com droga e o grupo que recebeu apenas formalina.

c = Resposta edematogênica máxima causada por cada um dos agonistas. Os valores representam a diferença de peso (mg) entre as médias obtidas para o grupo tratado com droga e o grupo que recebeu apenas formalina.

O modelo da formalina foi utilizado no início deste trabalho com grande interesse, visto que ele permite dissociar a dor inflamatória da dor não-inflamatória (SHIBATA et al., 1989). Contudo, no momento em que iniciava-se a série de experimentos destinada a caracterizar os receptores endotelinérgicos que modulam a nocicepção induzida pela formalina, observou-se que a resposta dos animais na segunda fase do modelo começou a declinar, de forma que não se conseguia reproduzir os resultados obtidos nos experimentos iniciais. Interessantemente, não obstante o fato de que a segunda fase (inflamatória) variava muito de um dia para o outro, as respostas comportamentais dos animais frente à formalina continuavam sendo consistentes na primeira fase (não-inflamatória). Esta alteração no padrão de resposta dos animais foi observada com a chegada da estação do inverno. Variações sazonais na intensidade de respostas inflamatórias têm sido encontradas, tanto em outros modelos experimentais de inflamação em animais, quanto em humanos (para revisão ver LABRECQUE et al., 1995).

Preocupados com a consistência dos resultados a serem obtidos a partir deste momento, procurou-se outro modelo experimental com perfil que fosse semelhante ao da formalina na primeira fase e que acarretasse ativação seletiva de nociceptores. Optou-se então pelo teste da capsaicina, que além de atender a esta primeira condição, utiliza-se da mesma metodologia básica empregada no teste da formalina, evitando assim dispêndio maior de tempo na consolidação da técnica.

4.2- Nociceção Induzida por Capsaicina

A capsaicina induziu um comportamento nociceptivo claramente relacionado à dose (Figura 6), que se manifestou integralmente dentro dos primeiros 5 min após a injeção. As respostas nociceptivas produzidas pela injeção de capsaicina nas doses de 0,06 ou 0,1 μg foram nitidamente submáximas, ou seja, diferiram estatisticamente da resposta produzida pela dose de 3,2 μg ($19,6 \pm 2,8$ s; $38,8 \pm 4,0$ s e $60,4 \pm 4,8$ s, respectivamente), que foi a maior dose testada neste estudo. Porém, como a reatividade dos animais à dose de 0,06 μg de capsaicina variavam muito de um dia para o outro, optou-se por adotar a dose de 0,1 μg , que evocava respostas mais consistentes, nos experimentos subseqüentes. Conforme ilustrado na Figura 7, essa dose de capsaicina não induziu resposta edematogênica maior do que a causada pelo veículo (DMSO 12,5%), que parece ser mediado por degranulação de mastócitos (SWANSTON et al., 1982). Tal fato impediu um estudo consistente dos efeitos dos agonistas endotelinérgicos sobre o edema causado pela capsaicina, que só se manifesta em doses iguais ou maiores que 1,6 μg . É importante ainda mencionar que, de acordo com CASTRO et al. (1995), a concentração de dimetilsulfóxido (DMSO 12,5%) utilizada neste estudo, não altera a atividade locomotora em camundongos.

A endotelina-1, na dose de 10 pmol/pata, foi capaz de potencializar a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina quando injetada simultaneamente ou até 30 min antes, mas não em intervalos maiores de tempo (Figura 8). A potencialização máxima foi observada quando a

endotelina-1 foi administrada 30 min antes da capsaicina ($194 \pm 18\%$ de aumento). Desse modo, esse intervalo foi estabelecido para caracterizar as curvas dose-resposta aos efeitos hiperalgésicos da endotelina-1 e outros agonistas endotelinérgicos, bem como da serotonina.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que a endotelina-1 potencializou, de modo pronunciado e dependente da dose, a resposta nociceptiva à capsaicina, com uma DE_{50} de aproximadamente 2,46 pmol/pata e uma E_{MAX} de $70,95 \pm 7,0$ s (Tabela 2). Esta potencialização foi estatisticamente significativa para a endotelina-1 nas doses de 3, 10 e 20 pmol/pata, e desapareceu por completo com a dose de 30 pmol/pata. Contudo, os agonistas seletivos de receptores ET_B sarafotoxina S6c e IRL 1620 mostraram-se inefetivos até a dose de 30 e 100 pmol/pata, respectivamente. Por outro lado, a serotonina, injetada 30 min antes, também potencializou a nocicepção causada pela capsaicina, sendo, no entanto, muito menos potente do que a endotelina-1 (DE_{50} de aproximadamente 0,9 nmol; E_{MAX} de $43,9 \pm 11,4$ s; Tabela 2).

O tratamento *i.v.* com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B bosentan (17 ou 52 $\mu\text{mol/ Kg}$; 1 h antes, Fig. 10B), ou com o antagonista seletivo de receptores ET_A BMS 182874 (10 ou 30 $\mu\text{mol/ Kg}$; 1 h antes, Fig. 10A), ou ainda, o tratamento local (*i.pl.*) com o antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 (1 nmol/pata; 10 min antes, Fig. 11A) inibiram o efeito hiperalgésico da endotelina-1 (10 pmol/pata, 30 min antes da capsaicina) em 54 e 86%, 21 e 59%, ou 72%, respectivamente. Contudo, nenhum bloqueio significativo foi

observado após o tratamento local com BQ-788 (1nmol/pata; 10 min antes, Fig. 11B), um antagonista seletivo de receptores ET_B. A eficácia do BQ-788 utilizado foi confirmada por sua capacidade de bloquear as contrações induzidas por sarafotoxina S6c em vesícula biliar isolada de cobaia (CARDOZO et al., 1997). Nas mesmas condições, nenhum dos antagonistas alterou a resposta à capsaicina (resultados não apresentados), ou a potencialização desta pela serotonina (Figuras 10 e 11).

Por último, a injeção simultânea de endotelina-1 (30 pmol/pata) ou de IRL 1620 (30 pmol/pata) juntamente com a serotonina (2 nmol/pata, 30 min antes da capsaicina), inibiu o efeito hiperalgésico da serotonina sobre a nocicepção evocada pela capsaicina. Estes resultados estão dispostos na Figura 12.

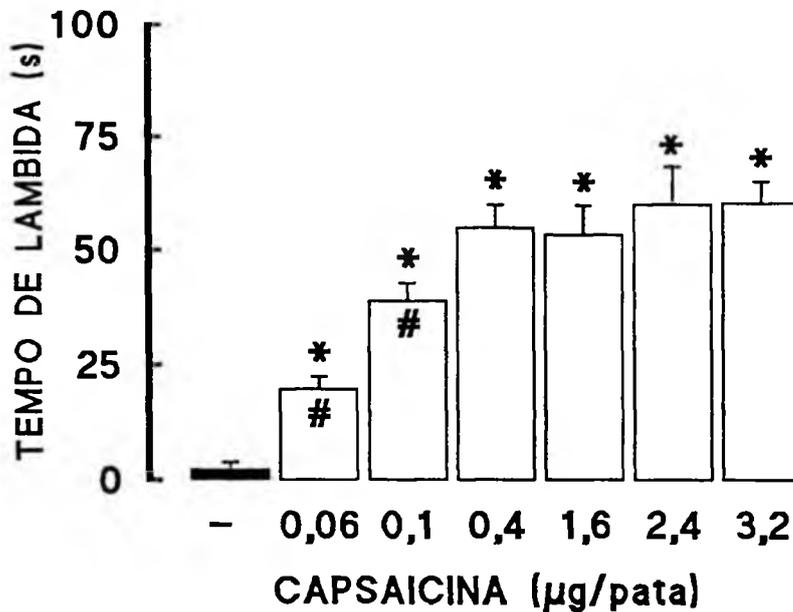


FIGURA 6: Efeito da injeção intraplantar de capsaicina sobre o tempo de lambida da pata traseira em camundongos. As barras abertas (□) e fechadas (■) indicam valores observados após a injeção de capsaicina (nas doses indicadas) ou veículo (controle; 20 µl de DMSO 12,5%), respectivamente. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 animais. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor do controle ou da maior dose de capsaicina, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

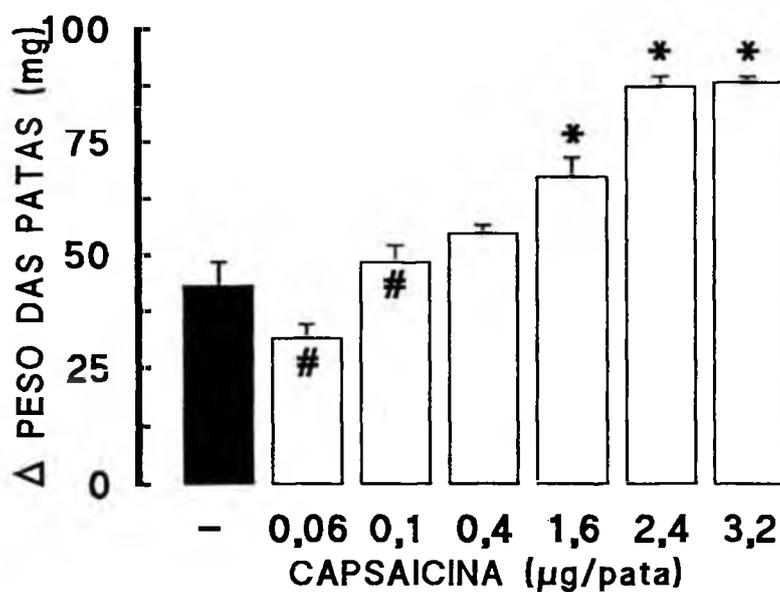


FIGURA 7: Efeito da injeção intraplantar de capsaicina sobre o edema de pata em camundongos. As barras abertas (□) e fechadas (■) indicam valores observados após a injeção de capsaicina (nas doses indicadas) ou veículo (controle; 20 μl de DMSO 12,5%), respectivamente. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6 animais. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor do controle ou da maior dose de capsaicina, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

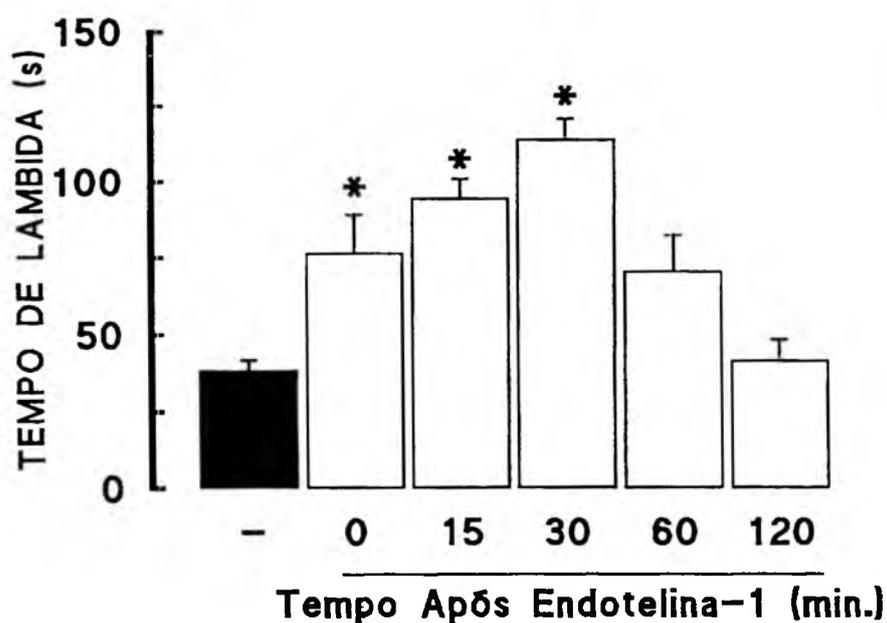


FIGURA 8: Potencialização pela endotelina-1, da nocicepção induzida por capsaicina na pata traseira de camundongos. A capsaicina ($0,1 \mu\text{g}$) foi injetada tanto sozinha (controle; ■) ou em vários intervalos de tempo após a injeção ipsilateral de endotelina-1 (10 pmol/pata ; □). O valor de tempo "0 min" corresponde àquele obtido por injeção simultânea de endotelina-1 e capsaicina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Asteriscos (*) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor do controle (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

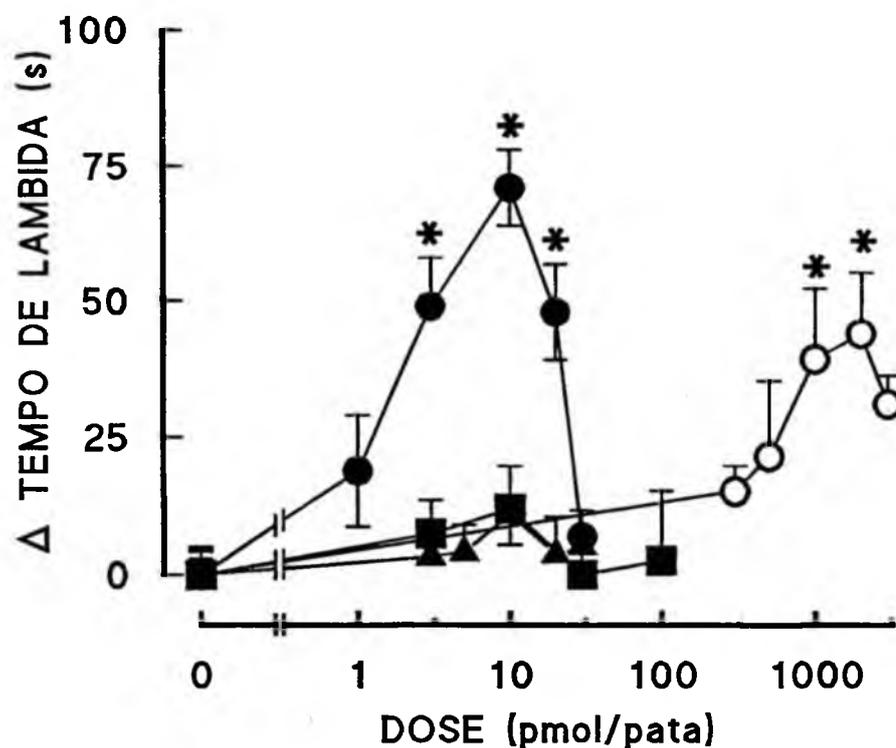


FIGURA 9: Aumento do tempo de lambida da pata traseira em camundongos induzido por capsaicina, após injeção ipsilateral de endotelina-1 (●), dos agonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET_B sarafotoxina S6c (▲) e IRL 1620 (■), ou de serotonina (○), nas doses indicadas. Cada agonista foi injetado intraplantarmente 30 min antes da capsaicina. Os resultados são apresentados como a diferença entre as respostas dos animais tratados com agonistas e as respostas paralelas apresentadas pelos animais tratados com veículo (i.e. Δ Tempo de Lambida), e representam a média \pm E.P.M. de 6-10 animais por dose. Asteriscos (*) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor do controle (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

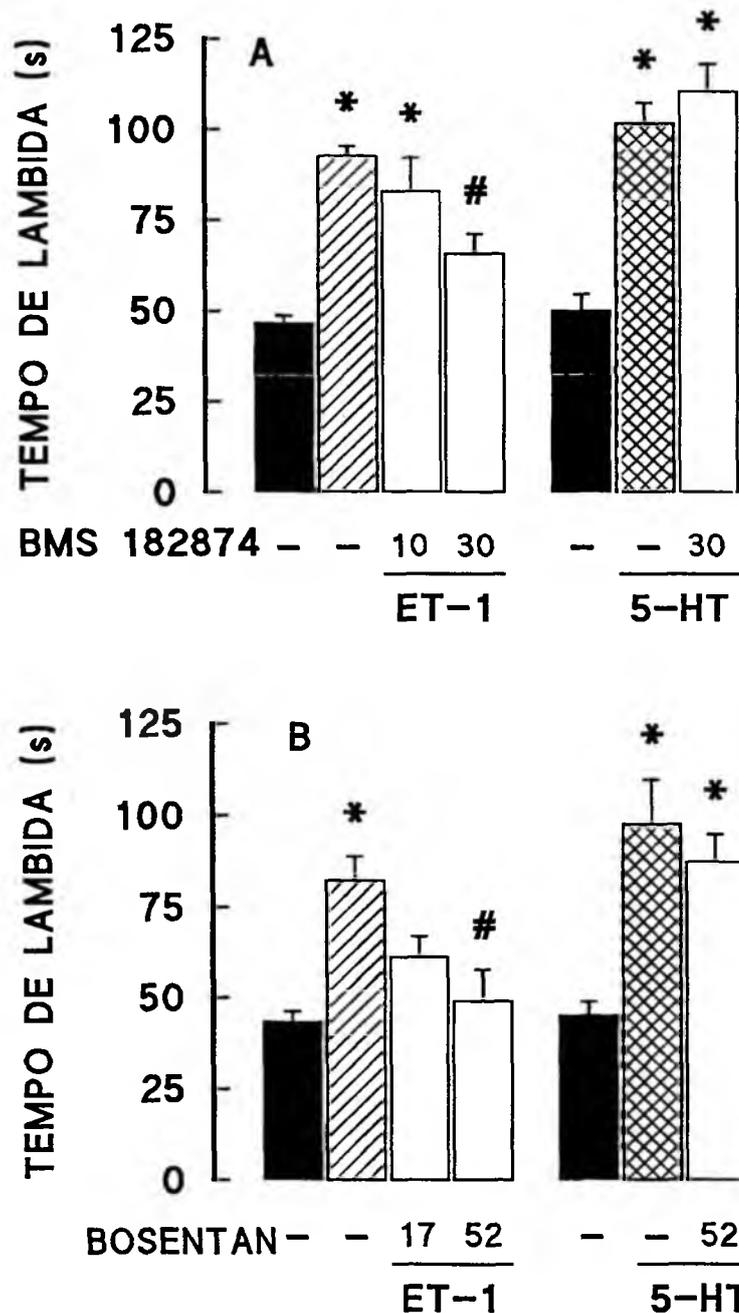


FIGURA 10 - Influência do tratamento sistêmico com o antagonista seletivo de receptores endotelinérgicos ET_A , BMS 182874 (10 ou 30 $\mu\text{mol/Kg}$; Painel A), ou o antagonista misto (não-seletivo) de receptores ET_A/ET_B , Bosentan (17 e 52 $\mu\text{mol/Kg}$; Painel B) sobre a potencialização da resposta nociceptiva à capsaicina, induzida por endotelina-1 (ET-1; 10 pmol/pata) ou por serotonina (5-HT; 2 nmol/pata) na pata de camundongos. Estes antagonistas não-peptídicos foram injetados *i.v.* 60 e 90 min antes do agonista e das injeções de capsaicina (□), respectivamente. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 observações. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor dos camundongos tratados com capsaicina sozinha (■) ou com capsaicina mais endotelina-1 (▨) ou serotonina (▩), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

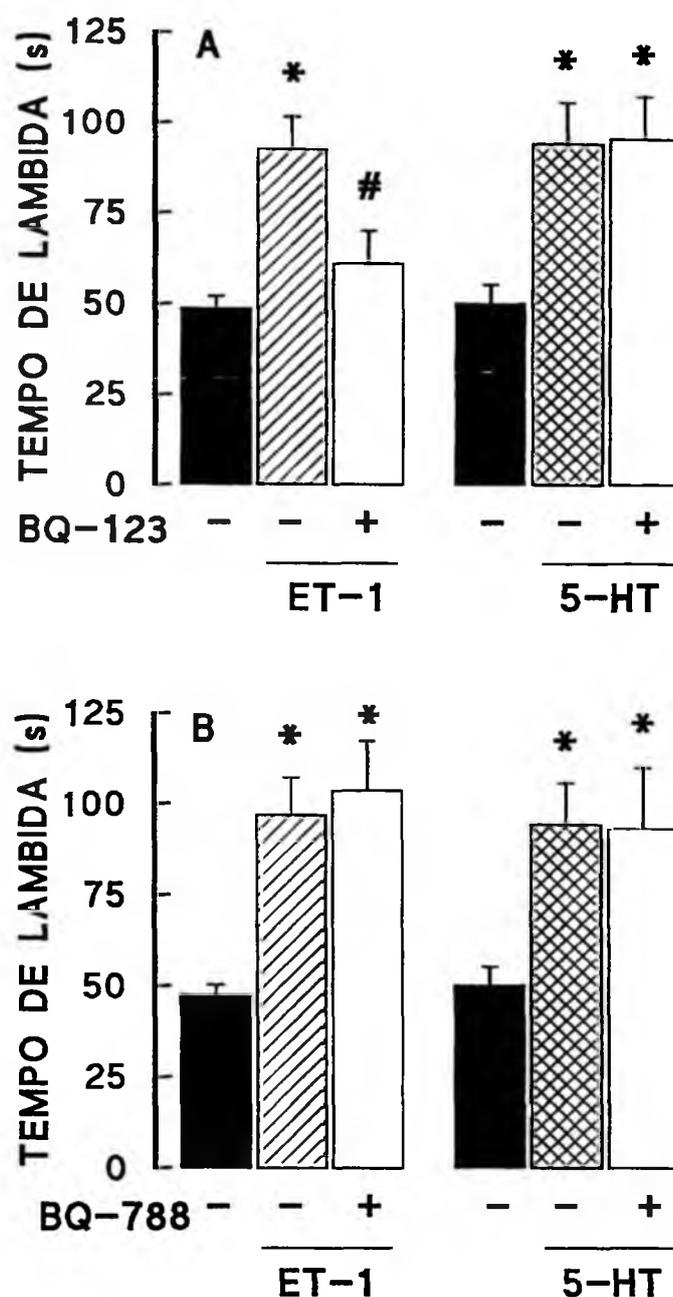


FIGURA 11: Influência do tratamento local com o antagonista seletivo de receptores endotelinérgicos ET_A , BQ-123 (1 nmol/pata; Painel A) ou o antagonista de receptores endotelinérgicos ET_B , BQ-788 (1 nmol/pata; Painel B) sobre a potencialização da resposta nociceptiva à capsaicina, induzida por endotelina-1 (ET-1; 10 pmol/pata) ou por serotonina (5-HT; 2 nmol/pata) na pata de camundongos. Estes antagonistas peptídicos foram injetados 10 e 40 min antes dos agonistas e das injeções de capsaicina (□), respectivamente. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6-8 observações. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado ao valor dos camundongos tratados com capsaicina sozinha (■) ou com capsaicina mais endotelina-1 (▨) ou serotonina (▩), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

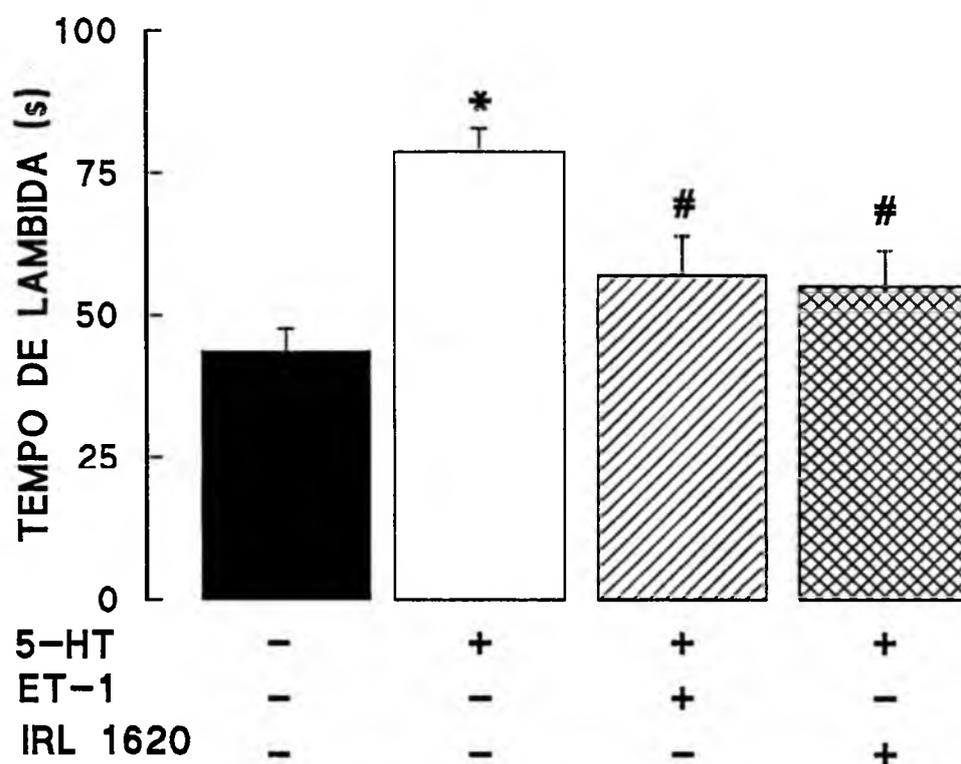


FIGURA 12: Influência da endotelina-1 (ET-1; 30 pmol/pata) ou do agonista seletivo de receptores endotelinérgicos ET_B IRL 1620 (30 pmol/pata) sobre a potencialização da resposta nociceptiva à capsaicina (0,1 µg/pata) na pata traseira de camundongos. Endotelina-1 (▨) e IRL 1620 (▩) foram injetados juntamente com serotonina (5-HT) 30 min antes da injeção de capsaicina. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 6-10 observações. Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam que $p \leq 0,05$ quando comparado aos valores de camundongos tratados com capsaicina sozinha (■) ou com capsaicina mais serotonina (□), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

TABELA 2: Efeito potencializador da endotelina-1 e da serotonina sobre a nocicepção induzida por capsaicina 0,1 μ g em camundongos.

AGONISTA	NOCICEPÇÃO	
	DE ₅₀ ^a (em pmol/pata)	E _{MAX} ^b (em s)
Endotelina-1	2,5 (1,6- 3,7)	70,9 \pm 7,0 (s)
Serotonina	860 (0,5-1,6)	43,9 \pm 11,4(s)

a = Média geométrica da dose do agonista necessária para causar 50% do efeito máximo e limites de confiança para 95%.

b = Resposta hiperalgésica máxima causada por cada um dos agonistas. Os valores representam a diferença de tempo (s) entre as médias obtidas para o grupo tratado com droga e o grupo que recebeu apenas formalina.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou claramente as propriedades hiperalgésicas da endotelina-1 nos modelos de nocicepção induzida por injeção *i.pl.* de formalina ou capsaicina na pata de camundongos. Este efeito foi obtido utilizando-se doses consideravelmente menores do que aquelas de histamina ou serotonina necessárias para causar efeitos similares nos dois modelos, respectivamente. Além disso, o efeito hiperalgésico da endotelina-1 manifestou-se imediatamente após sua injeção e, no caso da capsaicina, atingiu um pico máximo quando a endotelina-1 foi administrada 30 min antes do estímulo químico. Parece muito provável que os efeitos dos agonistas de receptores endotelinérgicos dependam de ações locais, i.e. na região injetada, uma vez que não houve aumento da nocicepção induzida por capsaicina quando a endotelina-1 foi injetada 30 min antes na pata contralateral (dados não mostrados).

Algumas evidências coletadas neste estudo indicam que os efeitos hiperalgésicos da endotelina-1 no teste da capsaicina ou na primeira fase do teste da formalina, sejam mediados via estimulação de receptores ET_A. No modelo da capsaicina, as evidências incluem: 1) os agonistas de receptores ET_B, sarafotoxina S6c e IRL 1620 (MASAKI et al., 1994), não produziram hiperalgesia em doses de até 30 e 100 pmol/pata, respectivamente; 2) a injeção local prévia do antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 (MASAKI et al., 1994) preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia induzida

pela endotelina-1, enquanto o tratamento semelhante com o antagonista seletivo de receptores ET_B BQ-788 (ISHIKAWA et al., 1994) não foi efetivo; 3) o tratamento sistêmico com o antagonista não-peptídico seletivo de receptores ET_A BMS 182874 (STEIN et al., 1994) também inibiu a potencialização pela endotelina-1 da nocicepção induzida por capsaicina, uma ação que foi mimetizada por tratamento análogo com bosentan, um antagonista misto de receptores ET_A/ET_B (CLOZEL et al., 1994). Neste estudo, os antagonistas de receptores endotelinérgicos não apresentaram efeito anti-nociceptivo próprio, uma vez que não alteraram a resposta dos animais à injeção de capsaicina e formalina na ausência de endotelinas. Além disso, nenhum deles, nem o BQ-788, modificou a hiperalgesia provocada pela histamina ou serotonina. A hiperalgesia causada por esta última amina provavelmente é mediada via estimulação de receptores $5-HT_{2A}$ (ABBOTT et al., 1996). Quanto ao envolvimento de receptores ET_A na mediação da hiperalgesia observada na primeira fase do teste da formalina, as evidências incluem: 1) ao contrário da endotelina-1 e da endotelina-3, a sarafotoxina $S6c$, um agonista seletivo de receptores ET_B (MASAKI et al., 1994), não potencializou a dor induzida por formalina; 2) a ação hiperalgésica da endotelina-1 neste modelo foi completamente revertida pelo tratamento (intraperitoneal) prévio com bosentan. Infelizmente, pelos problemas já mencionados na secção anterior, com relação à flutuação anual nos valores da segunda fase de nocicepção deste modelo, não foi possível testar outros antagonistas de receptores endotelinérgicos contra esse efeito da endotelina-1 na primeira fase da

nocicepção induzida por formalina. Contudo, a especificidade do bosentan (CLOZEL et al., 1994) também foi confirmada neste modelo, uma vez que o mesmo não alterou a resposta nociceptiva induzida pela formalina na ausência das endotelinas, nem a sua potencialização pela histamina.

Apesar do paralelismo marcado entre os efeitos da endotelina-1 (e a falta de efeitos da sarafotoxina S6c) na primeira fase da resposta à formalina e na resposta à capsaicina reforçar a hipótese da mediação através de receptores ET_A , a observação de que a endotelina-3 é tão potente quanto a endotelina-1 em potencializar a primeira fase da formalina é intrigante, pois sua afinidade pelo receptor ET_A é no mínimo 10 vezes menor (LEVIN, 1995). Embora já se tenha demonstrado a existência de receptores endotelinérgicos ET_C , que apresentam maior afinidade pela endotelina-3 que pela endotelina-1 (KARNE et al., 1993), evidências de sua expressão em tecidos de mamíferos tem sido apenas funcionais (EMORI et al., 1990). Além disso, não se sabe nada sobre a susceptibilidade desse tipo de receptor ao bloqueio por antagonistas de receptores endotelinérgicos ET_A e/ou ET_B .

Embora efeitos hiperalgésicos periféricos da endotelina-1 já tenham sido registrados utilizando o teste modificado de Randall-Selitto em ratos (estímulo nociceptivo mecânico; FERREIRA et al., 1989), este trabalho parece ser o primeiro a detectar essa ação do peptídeo em modelos de nocicepção a estímulos nociceptivos químicos, bem como a tentar caracterizar os receptores envolvidos em tais ações através do uso de antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos. Nossos achados, de que apenas os receptores

ET_A medeiam a hiperalgesia induzida por endotelina-1 a estímulos químicos na pata de camundongos, contrastam com os relatos da participação conjunta de receptores ET_A e ET_B nos efeitos nociceptivos das endotelinas (e sarafotoxinas) no teste de contorção abdominal (“writhing test”) nesta espécie (RAFFA et al., 1996). Contudo, é importante destacar que a nocicepção e a hiperalgesia são processos distintos, que poderiam envolver a ativação de receptores e mecanismos distintos, e que as fibras aferentes sensitivas primárias presentes em regiões diversas do organismo também poderiam apresentar diferentes populações de receptores endotelinérgicos. Os achados de que os agonistas seletivos de receptores ET_B, sarafotoxina S6c e IRL 1620, não potencializaram a nocicepção induzida por capsaicina alinham-se bem à ineficácia da sarafotoxina S6c em aumentar a primeira fase da nocicepção induzida por formalina, que, como aquela induzida por capsaicina, muito provavelmente representa um modelo de dor de origem não-inflamatória decorrente da ativação direta de fibras do tipo C (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989;).

Surpreendentemente, a faixa de doses em que a endotelina-1 foi capaz de evocar efeitos hiperalgésicos foi muito estreita. A curva dose-resposta em forma de sino ao efeito hiperalgésico da endotelina-1 sobre a resposta à capsaicina foi tão abrupta que 30 pmol/pata do peptídeo, uma dose apenas 3 vezes maior do que aquela que causou hiperalgesia máxima, não mais influenciou a resposta nociceptiva. Na verdade, em doses mais altas (30 pmol/pata), tanto a endotelina-1 quanto o IRL 1620 bloquearam

significativamente o desenvolvimento de hiperalgisia desencadeada por 5-HT, mas não inibiram as respostas nociceptivas para a capsaicina sozinha (i.e., na ausência de ET-1 ou 5-HT). Estes resultados preliminares sugerem que, em altas doses, a endotelina-1 possa também desencadear mecanismos anti-hiperalgésicos mediados por receptores do tipo ET_B na pata de camundongos, mascarando assim sua ação hiperalgésica sobre receptores ET_A. Seria interessante confirmar este aspecto em estudos futuros.

Os mecanismos implicados no efeito hiperalgésico da endotelina-1 nos modelos de nocicepção induzido por formalina ou por capsaicina permanecem a ser elucidados. Porém, dentro do que já se conhece sobre os mecanismos intracelulares envolvidos nas ações das endotelinas, poderia-se sugerir algumas hipóteses plausíveis. Dentre os possíveis mecanismos que poderiam mediar a hiperalgisia causada pela endotelina-1 merecem destaque, ao nosso ver, a estimulação da síntese de prostanóides (HYSLOP e De NUCCI, 1992; RAE et al., 1989), a liberação de citocinas pró-inflamatórias (STANKOVA, et al., 1996), a degranulação de mastócitos (YAMAMURA et al., 1994) e a despolarização direta das terminações periféricas de neurônios aferentes primários (YOSHIZAWA et al., 1989).

A última possibilidade é reforçada pelo fato de que a endotelina-1 potencializa marcadamente a liberação de substância P e CGRP induzida por capsaicina em neurônios sensoriais primários, enquanto praticamente não estimula a liberação destes neuropeptídeos quando administrada às células sozinha (DYMSHITZ e VASKO, 1994). Além disso, como a hiperalgisia

provocada pela endotelina-1 no presente estudo foi observada imediatamente após a administração do agente químico (i.e., dentro dos primeiros 5 min), parece possível aventar a ocorrência de eventos celulares rápidos, tais como a abertura de canais iônicos. Assim, por esta visão, a endotelina-1 poderia se ligar a receptores do tipo ET_A presentes nas ramificações periféricas de fibras aferentes sensoriais, causando sua despolarização e conseqüentemente aumentando a probabilidade de liberação de seus neurotransmissores (neuropeptídeos e glutamato) em resposta a estímulos algícos, tanto na periferia (hiperalgesia periférica) quanto no corno medular dorsal, onde sensibilizariam os neurônios de segunda ordem do corno dorsal com quem fazem sinapse (hiperalgesia central). Com respeito aos canais iônicos neuronais que poderiam ser ativados, tem-se mostrado que a endotelina-1 é capaz de despolarizar diferentes células ao ativar canais de cálcio dependentes de voltagem ou operados por receptor, ou ainda bombas antiporte de Na^+/H^+ ou Na^+/K^+ (para revisão ver SOKOLOVSKY, 1995 e McMILLEN e SUMPIO, 1995). Ainda, YOSHIZAWA e cols. (1989) demonstraram que a endotelina-1 foi capaz de induzir uma rápida despolarização de neurônios da raiz ventral da medula espinhal isolada de rato neonato que foi inibida pela nicardipina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L, e por um antagonista não-seletivo de receptores para neurocininas. Embora estes neurônios não sejam as fibras nervosas sensoriais, a possibilidade que a despolarização tenha sido deflagrada por liberação de uma

neurocinina (e.g. substância P) reforça a idéia de uma ação direta da endotelina-1 sobre neurônios sensoriais aferentes primários.

Por outro lado, uma vez que a sarafotoxina S6c causou hiperalgesia na segunda fase do modelo da formalina, mas não na primeira fase, poderia-se pensar também que a ativação de receptores ET_B estimula vias intracelulares de transdução de sinal distintas dos receptores ET_A , ou ainda que estes receptores sejam expressos em células diferentes. Nestes casos, a ativação dos receptores ET_B poderia ser simultânea à dos receptores ET_A , mas o reflexo de sua ativação apareceria mais tarde que o destes últimos. Alternativamente, os mediadores inflamatórios envolvidos na segunda fase da resposta nociceptiva à formalina poderiam exercer papel permissivo na ativação dos receptores ET_B . Quanto ao possível mecanismo anti-hiperalgésico da endotelina-1, é possível especular que, em doses mais altas (30,0 pmol/pata) do que aquelas que causam hiperalgesia máxima, o peptídeo possa estar estimulando a liberação de óxido nítrico através de receptores ET_B (HYSLOP e De NUCCI, 1992). Esse mediador gasoso, produzido por vários tipos celulares incluindo o endotélio vascular, tem sido implicado nos efeitos anti-hiperalgésicos da dipirona, do diclofenaco e dos opióides (LORENZETTI e FERREIRA, 1996; DUARTE et al., 1992; TONUSSI e FERREIRA, 1994; FERREIRA et al., 1995). Certamente o esclarecimento desses aspectos importantes depende de estudos adicionais extensos.

Outro dado interessante coletado neste trabalho diz respeito à capacidade da endotelina-1 em potencializar o edema de pata causado pela formalina em

camundongos. A atividade edematogênica da endotelina-1 tem sido amplamente registrada em diferentes modelos em ratos (RODMAN et al., 1992; DROMA et al., 1996; ISHIZAKI, et al., 1995) e parece ser mediado pela estimulação de receptores do tipo ET_A (FILEP et al., 1993; SAMPAIO et al., 1995;) e ET_B (FILEP et al., 1996) através de aumento do influxo de cálcio extracelular (FILEP et al., 1996), liberação de tromboxano A_2 (ERCAN et al., 1993; FILEP et al., 1994b) e PAF (FILEP et al., 1994b), e estimulação da interação entre leucócitos e células endoteliais (HELSET et al., 1994). Porém, os pouquíssimos estudos que têm sido realizados sobre esse aspecto em camundongos apresentam resultados aparentemente contraditórios. HENRIQUES et al. (1992) relataram que a endotelina-1 inibe seletivamente o edema de pata induzido pelo PAF (mas não pela carragenina), enquanto SAMPAIO et al. (1995) observaram que antagonistas seletivos de receptores endotelinérgicos ET_A atenuam o edema de pata causado por ovalbumina em animais previamente sensibilizados ao antígeno. Nossos dados reforçam a idéia de que a endotelina-1 causa edema de pata em camundongos através de receptores específicos uma vez que o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B bosentan inibiu tal resposta. Contudo, são necessários estudos adicionais para discriminar qual o subtipo de receptor envolvido neste efeito edematogênico da endotelina-1.

Diversos trabalhos têm sugerido a participação de endotelinas endógenas em diferentes modelos experimentais de inflamação (para revisão ver RAE e HENRIQUES, 1997). Em camundongos, o tratamento prévio com o

antagonista de receptores endotelinérgicos ET_A BQ-123, ou com o antagonista misto (não-seletivo) de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B SB 209670, reduziu o número de eosinófilos no lavado bronco-alveolar, bem como inibiu a infiltração de neutrófilos para os pulmões induzida por ovalbumina em animais previamente sensibilizados ao antígeno (ANDERSSON et al., 1996). Ainda, ratos que foram previamente tratados com bosentan, outro antagonista misto de receptores endotelinérgicos ET_A/ET_B , apresentaram uma redução da resposta inflamatória à instilação intratecal de dextrana (FINSNES et al., 1997). O tratamento diário *per os* com esse mesmo antagonista também inibiu de forma pronunciada a extensão de lesões da mucosa do cólon em um modelo de colite ulcerativa em ratos (HOGABOAM et al., 1996). Juntos, estes dados apontam um potencial papel para as endotelinas endógenas no desenvolvimento de processos inflamatórios. Esta idéia, somada aos nossos achados de que as endotelinas são capazes de modular a nocicepção induzida pela formalina e pela capsaicina, pode sugerir que estes peptídeos também contribuem para o desenvolvimento de estados hiperalgésicos. Apesar disso, não há até o presente evidências da participação das endotelinas endógenas na mediação da dor associada a estados fisiopatológicos. Ao que parece, o único estudo já publicado que tentou analisar esse aspecto foi o de MAY et al., (1996). Os autores verificaram que, embora o bosentan iniba a inflamação neurogênica em vasos da dura mater de rato (confirmando relato anterior de BRÄNDLI et al. (1996), o antagonista não atenua crises de enxaqueca em humanos. Assim sendo, a implicação direta

das endotelinas endógenas na fisiopatologia da dor ainda está por ser demonstrada.

Concluindo, o presente estudo sugere que a endotelina-1, atuando em receptores ET_A , possa modular a reatividade de neurônios sensoriais primários da pata de camundongos a agentes álgicos químicos como a capsaicina e a formalina, causando hiperalgesia. Além disso, o mesmo peptídeo, em concentrações locais mais elevadas poderia promover um efeito anti-hiperalgésico por ativação de receptores ET_B . Considerando que diversos estímulos inflamatórios, tais como a carragenina, o LPS e várias citocinas podem desencadear hiperalgesia (ver Introdução para referências) bem como a liberação de endotelinas, pode-se sugerir que as endotelinas endógenas possam contribuir importantemente para a produção de estados hiperalgésicos. No caso desta possibilidade vir a ser confirmada por estudos adicionais, o presente achado de que a administração sistêmica de antagonistas não-peptídicos de receptores endotelinérgicos (BMS 182874 e bosentan) bloqueiam a hiperalgesia induzida por endotelina-1, sugere que tais agentes possam constituir uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da dor inflamatória.

6. SUMMARY

The present study investigated the effects of endothelin(ET)-related peptides on nociception and edema induced by formalin (0.5%) and on nociception induced by capsaicin (0.1 μ g) in the mouse hindpaw; as well as the ET receptors involved in this effect. The following agonists were used: endothelin-1 (ET-1, a non-selective ET receptor agonist), ET-3 (preferential but non-selective ET_B receptor agonist), sarafotoxin S6c (SRTX-c) and IRL 1620 (selective ET_B receptor agonists). These drugs were administered locally in the right hindpaw of the animals, either before or together with injection of the algescic agent.

Concerning to the formalin test, our results demonstrated that:

1. The nociceptive responses elicited by 0.5% formalin were clearly submaximal, as they differed significantly from those detected following 2.5% formalin.
2. Formalin-induced first phase nociception was potentiated, in graded fashion, by simultaneous injection of ET-1 or ET-3, but not by SRTX-c. In contrast, the second phase of formalin-induced nociception was increased in a dose-related manner by simultaneous injection of each of the 3 peptides, whereas paw edema induced by formalin was significantly potentiated by ET-1, but not by ET-3 or SRTX-c.

3. Histamine also potentiated both phases of nociception and paw edema induced by formalin, but was considerably (30 -to 100-fold) less potent than ET-1.
4. Treatment with the mixed ET_A/ET_B receptor antagonist bosentan (10 mg/kg, *i.p.*) did not modify the responses triggered by formalin alone or by simultaneous injection with histamine (3 nmol/paw), but significantly blocked the potentiation of nociception and edema elicited by simultaneous injection of ET-1 (10 pmol/paw).

The results obtained with the model of capsaicin-induced nociception revealed that:

1. Capsaicin induced a short-lasting and dose-related nociceptive behaviour. The nociception induced by capsaicin injection at doses of 0.06 and 0.1 µg (in 20 µl) were submaximal, *i.e.*, they differed significantly from those responses elicited by the dose of 3.2 µg, the highest dose used in this study.
2. ET-1 (10 pmol/paw) potentiated capsaicin-induced nociception when injected simultaneously, or 15 and 30 min before capsaicin, but not at greater intervals of time.
3. The nociception induced by capsaicin was potentiated, in graded manner, in animals previously treated with ET-1 (3 to 20 pmol/paw), but not with SRTX-c or IRL 1620 (doses to 30 and 100 pmol/paw, respectively). Serotonin (2 nmol/paw) also potentiated the nociception

induced by capsaicin, but was considerably less potent (200-fold) than ET-1.

4. The systemic treatment with either the mixed ET_A/ET_B receptor antagonist bosentan (52 $\mu\text{mol/Kg}$; 1 h before) or the selective ET_A receptor antagonist BMS 182874 (30 $\mu\text{mol/Kg}$; 1 h before), or still the local treatment with the selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (1 nmol/paw; 10 min before), prevented the hyperalgesic effects of ET-1. However, no blockade was observed following local treatment with BQ-788 (1 nmol/paw; 10 min before), a selective ET_B receptor antagonist.
5. A simultaneous injection of ET-1 (30 pmol/paw) or IRL 1620 (30 pmol/paw) together with serotonin (2 nmol/paw) abolished the hyperalgesic effect of serotonin on nociceptive responses to capsaicin.

In conclusion, the present study demonstrates that nociception induced by capsaicin and formalin (both phases), as well as the edema triggered by the latter agent, in the mouse hindpaw can be potentiated by stimulation of specific ET receptors. The profile of action of selective agonists and/or antagonists suggests that the potentiating effects of ET-1 are mediated by stimulation of ET_A receptors. However it is possible that another type of receptor (ET_B) may be responsible for the effects of endothelins on the second phase of formalin-induced nociception.

Considering that several inflammatory stimuli, such as carrageenan, bacterial endotoxins and various cytokines can trigger hyperalgesia as well as endothelin release, endogenous endothelins may contribute importantly to

production of hyperalgesic states. The present finding that systemic administration of non-peptidic ET receptor antagonists (BMS 182874 and bosentan) can block ET-1-induced hyperalgesia suggests that such agents may constitute a new viable therapeutic strategy for the treatment of inflammatory pain.

Finally, the fact that ET-1 and IRL 1620 can each inhibit hyperalgesia induced by serotonin raises the possibility of using selective ET_B receptor agonists as anti-hyperalgesic agents.

7 - RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos dos peptídeos relacionados às endotelinas (ET) sobre a nocicepção e o edema induzido pela injeção de formalina (0,5%) e sobre a nocicepção induzida pela capsacina (0,1 µg) na pata de camundongos; bem como os receptores endotelinérgicos envolvidos neste efeito. Os seguintes agonistas foram utilizados: endothelina-1 (ET-1, um agonista seletivo de receptores ET_A e ET_B), ET-3 (agonista preferencial mas não seletivo de receptores ET_B), sarafotoxina S6c (SRTX-c) e IRL 1620 (ambos agonistas seletivos de receptores ET_B). Estas drogas foram administradas por via intraplantar na pata traseira direita do camundongo, antes ou juntamente com a injeção dos agentes álgicos.

Com relação ao teste da formalina, nossos resultados demonstraram que:

1. As respostas nociceptivas provocadas pela injeção de formalina 0,5% foram claramente submáximas, uma vez que diferiram significativamente daquelas causadas pela injeção de formalina 2,5%.
2. A primeira fase da nocicepção induzida por formalina foi potencializada, de modo pronunciado, pela injeção simultânea de ET-1 ou ET-3, mas não por SRTX-c. Em contraste, a segunda fase da nocicepção induzida por formalina foi aumentada de uma forma dependente de dose pela injeção simultânea com cada um dos três

peptídeos, enquanto o edema de pata induzido por formalina foi significativamente potencializado apenas pela ET-1.

3. A histamina também potencializou ambas as fases da nocicepção e o edema de pata induzido por formalina, mas foi consideravelmente (700 a 800 vezes) menos potente do que a ET-1.
4. O tratamento com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B bosentan (10 mg/kg, *i.p.*) não modificou as respostas desencadeadas pela formalina sozinha ou pela injeção simultânea com histamina (3 nmol/pata), mas bloqueou significativamente a potencialização da nocicepção e do edema causados pela injeção simultânea de ET-1 (10 pmol/pata).

Os resultados obtidos com o modelo da nocicepção induzida por capsaicina revelaram que:

1. A capsaicina induziu um comportamento nociceptivo relacionado com a dose de curta duração (cerca de 5 min). A nocicepção induzida pela injeção de capsaicina nas doses de 0,06 e 0,1 μ g (em 20 μ l) foram submáximas, i.e., diferiram significativamente daquelas causadas pela dose de 3,2 μ g, a maior dose utilizada neste estudo.
2. A ET-1 (10 pmol/pata) potencializou a nocicepção induzida por capsaicina quando injetada simultaneamente, ou 15 e 30 min antes da capsaicina, mas não em intervalos maiores de tempo.
3. A nocicepção induzida pela capsaicina foi potencializada, de forma marcante, em animais previamente tratados 30 min antes com ET-1 (3

a 20 pmol/pata), mas não com SRTX-c ou IRL 1620 (doses até 30 e 100 pmol/pata, respectivamente). A serotonina (2 nmol/pata) também potencializou a nocicepção induzida pela capsaicina, mas foi consideravelmente menos potente (350 vezes) do que a ET-1.

4. O tratamento sistêmico com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B bosentan (52 $\mu\text{mol/Kg}$; 1 h antes) ou o antagonista seletivo de receptores ET_A BMS 182874 (30 $\mu\text{mol/Kg}$; 1 h antes), ou ainda o tratamento local com o antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123 (1 nmol/pata; 10 min antes), bloqueou completamente os efeitos hiperalgésicos da ET-1. Contudo, nenhum bloqueio foi observado após o tratamento local com BQ-788 (1 nmol/pata; 10 min antes), um antagonista seletivo de receptores ET_B .
5. A injeção simultânea de ET-1 (30 pmol/pata) ou IRL 1620 (30 pmol/pata) junto com serotonina (2 nmol/pata) aboliu o efeito hiperalgésico da amina sobre a resposta nociceptiva à capsaicina.

Concluindo, o presente estudo demonstrou que a nocicepção induzida pela capsaicina e pela formalina (ambas fases), bem como o edema de pata desencadeado pela formalina na pata de camundongos podem ser potencializados pela estimulação de receptores endotelinérgicos. O perfil de ação dos agonistas e/ou antagonistas seletivos sugere que os efeitos potencializadores da ET-1 são mediados pela estimulação de receptores ET_A . Contudo é possível que outro tipo de receptores (ET_B) possa ser

responsável pelos efeitos das endotelinas sobre a segunda fase da nocicepção induzida por formalina.

Considerando que diversos estímulos inflamatórios, tais como a carragenina, a endotoxina bacteriana e várias citocinas podem desencadear hiperalgisia bem como liberação de endotelinas, as endotelinas endógenas podem contribuir importante para a produção de estados hiperalgésicos. O presente achado de que a administração sistêmica de antagonistas não-peptídicos de receptores endotelinérgicos (BMS 182874 e bosentan) podem bloquear a hiperalgisia induzida pela ET-1 sugere que tais agentes possam vir a constituir uma nova estratégia para o tratamento da dor inflamatória.

Por último, a inibição do efeito hiperalgésico da serotonina pela ET-1 ou pelo IRL 1620 (agonista seletivo de receptores ET_B) avança a possibilidade, a ser melhor investigada, de que agonistas de receptores endotelinérgicos do tipo ET_B possam, futuramente, ser utilizados como agentes anti-hiperalgésicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; HONG, Y. e BLIER, P. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. **Neuropharmacol.**, 35: 99-110, 1996.
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J. e WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, 60: 91-102, 1995.
- ACHMAD, T.H. e RAO, G.S. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin 1 and the influence of calcium channel blockers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189: 944-1000, 1992.
- ANDERSSON S.E.; HEMSEN, A. e LUNDBERG, J.M. The effect of endothelin receptor blockade on the development of the Sephadex-induced inflammation in the rat lung. **Acta Physiol. Scand.**, 158: 189-193, 1996.
- ARAI, H.; HORI, S.; AMORI, I.; OHKUBO, H. e NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348: 730-732, 1990.
- BAUMANN, T.K., SIMONE, D.A., SHAIN, C.N. e LaMOTTE, R.H. Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. **J. Neurophysiol.**, 66: 21-217, 1991 .

BONICA, J.J. Clinical Importance of Hyperalgesia. In: Hyperalgesia and Allodynia. Ed. William D. Willis, Jr, Raven Press, New York, p.17-43,1992.

BRAIN, S.D.; THOMAS, G.; CROSSMAN, D.C.; FULLER, R. e CHURCH, M.K. Endothelin-1 induces a histamine-dependent flare in vivo, but does not activate human skin mast cells in vitro. **Br.J. Pharmacol.**, 33: 117-120, 1992.

BRÄNDLI, P.; LÖFFLER, B.-M.; BREU, V.; OSTERWALDER, R.; MAIRE, J.-P. e CLOZEL, M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. **Pain**, 64: 315-322, 1995.

CAMPOS, M.M.; MATA, L.V. e CALIXTO, J.B. Expression of B1 kinin receptors mediating paw edema and Formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73: 812-819, 1995.

CARDOZO, A.M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; YANO, M.; FRANK Jr., P. e RAE, G.A. Influence of ET_A and ET_B receptor antagonist on endothelin-induced contractions of the guinea pig isolated gall bladder. **Reg. Pept.**, 69: 15-23, 1997.

CARSTENS, E. Neural Mechanisms of Hyperalgesia: peripheral or central sensitization. **Neur. in Physiol. Sci.**, 10: 260-265, 1995.

CASTRO, C.A.; HOGAN, J.B.; BENSON, K.A.; SHEHATA, C.W. e LANDAUER, M.R. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, tween-20, tween-80 and emulphor-620. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 50: 521-526, 1995.

CHAOUCH, A. e BESSON, J.M. Mécanismes périphériques et médullaires de la nociception. **Rev. Neurol.**, 142: 173-200, 1986.

CLOZEL, M.; BREU, V.; GRAY, G.A.; KALINA, B.; LÖFFLER, B.-M.; BURRI, K.; CASSAL, J.-M.; HIRTH, G.; MÜLLER, M.; NEIDHART, W. e RAMUZ, H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Therp.**, 270: 228-235, 1994.

CRUNKHORN, P. e WILLIS, A.L. Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, 41: 49-56, 1971.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 660-664, 1992.

CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN, M.A. Endothelin-stimulated monocytes produce IL-1 β , IL-8 and GM-CSF. **Mol. Biol. Cell**, 4: 415A, 1993.

CUNNINGHAM, M.E.; HURIBAL, M. e McMILLEN, M.A. Endotoxin-stimulated monocytes produce endothelin. **FASEB J.**, 8: A214, 1991.

D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M. e YANO, M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET_A receptors in the rat perfused lung. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 773-775, 1992.

DAHLOF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, D.; JERN, S. e HANSSON, L.

Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. **J. Hypert.**, 8: 811-818, 1990.

DeLEO, J.A.; COLBURN, R.W.; NICHOLS, M. e MALHOTRA, A.

Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. **J. Interf. Cytok. Res.**, 16: 695-700, 1996.

DeNUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ANTUNES, E.;

WALDER,C.; WARNER, T.D. e VANE, J.R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85: 9797-9800, 1988.

DEVOR, M. Pain mechanisms. **Neuroscientist**, 2: 233-244, 1996.

DIRIG, D.M. e YAKSH, T.L. Intrathecal baclofen and muscinol, but not

midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, 275: 219-227, 1995.

DOUGLAS, S.A.; BECK, Jr., G.R.; ELLIOT, J.D. e OHLSTEIN,E.H.

Pharmacological evidences for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1529-1540, 1995.

DROMA, Y.; HAYANO, T.; TAKABAYASHI, Y.; KOIZUMI, T. e SEKIGUCHI, M.

Endothelin-1 and interleukin-8 in high altitude pulmonary oedema. **Eur. Respir. J.**, 9: 1947-1949, 1996.

DUARTE, I.D.; DOS SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H.

Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 217:225, 1992.

DUBUISSON, D. e DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the

analgesic effects of morphine, mepiridine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4: 161-174, 1977.

DUPERRAY, A.; MANTOVANI, A.; INTRONA, M. e DEJANA, E. Endothelial cell

regulation of leucocyte infiltration in inflammatory tissues. **Mediat. Inflamm.**, 4: 322-330, 1995.

DYMSHITZ, J. e VASKO, M.R. Endothelin-1 enhances capsaicin-induced

peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. **Neurosci. Lett.**, 167: 128-132, 1994.

EGGER, D.; GEUENICH, S.; DENZLINGER, C.; SCHMITT, E.; MAILHAMMER,

R.; EHRENREICH, H.; DORMER, P. e HULTNER, L. IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. **J. Immunol.**, 154: 1830-1837, 1995.

EHRENREICH, H.; RIECKMANN, P.; SINOWATZ, F.; WEIH, K.A.; ARTHUR,

L.O.; GOEBEL, F.D.; BURD, P.R.; COLIGAN, J.E. e CLOUSE, K.A. Potent

stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. **J. Immunol.**, 150: 4601-4609, 1993.

EHRENREICH, H.; ANDERSON, R.W.; FOX, C.H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G.S.; TRAVIS, W.D.; COLIGAN, J.E.; KEHRL, J.H. e FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **J. Exp. Med.**, 173: 1741-1748, 1990.

EMORI, T.; HIRATA, Y. e MARUMO, F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. **FEBS Lett.**, 263: 261-264, 1990.

ENDO, T.; UCHIDA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI, N.; NOMURA, A.; HIRATA, F. e HASEGAWA, S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 186: 1594-1599, 1992.

ERCAN, Z.S.; KILINC, M.; YAZAR, O.; KORKUSUS, P. e TURKER, R.K. Endothelin-1-induced oedema in rat and guinea-pig isolated perfused lungs. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, 323: 74-84, 1993.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DEVISSAGUET, M.; LESIEUR, D. e TSOUDEROS, Y. S14080, a peripheral analgesic acting by release of an endogenous circulating opioid-like substance. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 303-308, 1995.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. e POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1227-1231, 1993.

FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M. e De NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13(suppl.5): S220-S222, 1989.

FERREIRA, S.H. NAKAMURA, M. e De ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. **Prostaglandins**, 16: 31-37, 1978.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, 240: 200-203, 1972.

FILEP, J.G.; SKIROBIK, Y.; FOURNIER, A. e FÖLDES-FILEP, E. Effects of calcium antagonists on endothelin-1-induced myocardial ischaemia and oedema in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 118: 893-900, 1996.

FILEP, J.G.; CLOZEL, M.; FOURNIER, A. e FÖLDES-FILEP, É. Characterization of receptors mediating vascular responses to endothelin-1 in the conscious rat. **Br. J. Pharmacol.**, 112: 845-852, 1994a.

FILEP, J.G.; FOURNIER, A. e FÖLDES-FILEP, E. Endothelin-1-induced myocardial ischaemia and oedema in the rat: involvement of the ET_A receptor,

platelet-activating factor and thromboxane A₂. **Br. J.Pharmacol.**, 112: 963-971, 1994b.

FILEP, J.G.; SIROIS, M.G.; FOLDES-FILEP, E.; ROUSSEAU, A.; PLANTE, G.E.; FOURNIER, A.; YANO, M. e SIROIS, P. Enhancement by endothelin-1 of microvascular permeability via the activation of ET_A receptors. **Br. J. Pharmacol.**, 109: 880-886, 1993.

FILEP, J.G.; SIROIS, M.G.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A. e SIROIS, P. Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor. **Br. J. Pharmacol.**, 104: 797-804, 1991a.

FILEP, J.G.; BATTISTINI, B. e SIROIS, P. Pharmacological modulation of endothelin-induced contraction of guinea-pig isolated airways and thromboxane release. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1633-1640, 1991b.

FINSNES, F.; SKJONBERG, O.H.; TONNESSEN, T.; NAESS, O.; LYBERG, T. e CHRISTENSEN, G. Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155: 1404-1412, 1997.

GOGAS, K.R.; LEVINE, J.D. e BASBAUM, A.I. Differential contribution of descending controls to the antinociceptive actions of *kappa* and *mu* opioids: an analysis of formalin-evoked c-fos expression. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, 276: 801-809, 1996.

GOMEZ-GARRE, D.; GUERRA, M.; GONZALES, E.; LOPEZ-FARRE, A.; RIESCO, A.; CAMELO, C.; ESCANERO, K. e EGIDO, J. Aggregation of human polymorphonuclear leucocytes by endothelin: role of platelet activating factor. **Eur. J. Pharmacol.**, 224: 167-172, 1992.

HAMMOND, D.L. Control Systems for Nociceptive Afferent Processing-The Descending Inhibitory Pathways. In: "Spinal Afferent Processing". Ed. Tony L. Yaksh, Plenum Publishing Corporation, p. 366-390, 1986.

HANDWERKER, H.O e REEH, P.W. Pain and Inflammation. *Proceedings of the VIth World Congress on Pain*. Eds. M.R. Bond, J.E. Charlton & C.J. Woolf, p. 59-69, 1991.

HAY, D.W.; LUTTMANN, M.A.; HUBBARD, W.C. e UNDEM, B.J. Endothelin receptor subtypes in human and guinea pig pulmonary tissues. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1175-1183, 1993.

HAYNES, W.G. e WEBB, D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? **Clinical Sci.**, 84: 485-500, 1993.

HELSET, E.; YTREHUS, K.; TVEITA, T.; KJÆVE, T.; JØRGENSEN, L. Endothelin-1 causes accumulation of leucocytes in the pulmonary circulation. **Circ. Shock**, 44: 201-209, 1994.

HELSET, E.; SILDNES, T.; SELKELID, R. e KONOPSKI, Z.S. Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF- α , IL- β and IL-6. **Med. Inflamm.**, 2: 417-422, 1993.

HENRIQUES, M.G.M.O.; RAE, G.A.; CORDEIRO, R.S.B. e WILLIAMS, T.J. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw oedema and pleurisy in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 106: 579-582, 1992.

HOGABOAM, C.M.; MULLER, M.J.; COLLINS, S.M. e HUNT, R.H. An orally active non-selective endothelin receptor antagonist, bosentan, markedly reduces injury in a rat model of colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, 309: 261-269, 1996.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43: 144, 1991.

HUNSKAAR, S. e K. HOLE. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.

HURIBAL, M.; KUMAR, R.; CUNNINGHAM, M.; SUMPPIO, B.E. e McMILLEN, M.A. Endothelin causes production of interleukin 6 but not interleukin 1 by human monocytes. **FASEB J.**, 6: A1613, 1992.

HYSLOP, S. e De NUCCI, G. Vasoactive mediators released by endothelins. **Pharmacol. Res.**, 26: 223, 1992.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAGUCHI, T.; GOTO, K. e MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptide predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 2863-2867, 1989.

ISHIKAWA, K.; IHARA, M.; NOGUCHI, K.; MASE, T.; MINO, N.; SAEKI, T.; FUKURODA, T.; FUKAMI, T.; OZAKI, S.; NAGASE, T.; NISHIKIBE, N. e YANO, M. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 4892-4896, 1994.

ISHIZAKI, T.; SHIGEMORI, K.; NAKAI, T.; MIYABO, S.; HAYAKAWA, M.; OZAWA, T.; VOELKEL, N.F. e CHANG, S.W. Endothelin-1 potentiates leukotoxin-induced edematous lung injury. **J. Appl. Physiol.**, 79: 1106-1111, 1995.

JESSEL, T.M. e KELLY, D.D. Pain and Analgesia. In: "*Principles in Neural Science*". Eds. Eric R. Kandell, James H. Schwartz, Thomas M. Jessel. New York, New York, USA. 3a edição, p 385-399, 1991.

KANSE, S.M.; TAKAHASHI, K.; LAM, H.C.; REES, A.; WARREN, J.B.; PORTA, M.; MOLINATTI, P.; GHATEI, M. e BLOOM, S.R. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. **Life Sci.**, 48: 1379-1384, 1991.

KARNE, S.; JAYAWICKEME, C.K. e LERNER, M.R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from

Xenopus laevis dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, 269: 19126-19133, 1993.

KLEMM, P.; WARNER, T.D.; HOHLFELD, T.; CORDER, R. e VANE, J.R. Endothelin-1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 2691-2695, 1995.

KUROSE, I.; FUKUMURA, D.; MIURA, S.; SEKIZUKA, E.; NAGATA, H.; SUEMATSU, M. e TSUCHIYA, M. Nitric oxide mediates vasoactive effects of endothelin-3 on rat mesenteric microvascular beds in vivo. **Angiology**, 44: 483-490, 1993.

LABRECQUE, G., BUREAU, J.-P. e REINBERG, A.E., Biological Rhythms in the inflammatory response and in the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmacol. Ther.**, 66: 285-300, 1995.

LEFER, A.M.; ALBERTINE, K.H.; WEYRICH, A.S. e MA, X.L. Polymorphonuclear (PMN) leucocytes accumulate intravascularly but not migrate to the myocardium following ischaemia/reperfusion in the cat. **FASEB J.**, 7: A344, 1994.

LEVIN, E. R. Endothelins. In: "Mechanisms of Disease". The New England Journal of Medicine. Ed. Franklin H. Epstein. p. 356-363, 1995.

LEWIS, G.P. Mediators of inflammation. Ed. G. P.Lewis. p. 1-10. IOP Publishing Limited, Bristol, 1986.

LIN, Q., PENG, Y.B. e WILLIS, W.D. Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. **J. Neurosci.**, 16:3026-34, 1996.

LIU, H., P.W. MANTHY e BASBAUM A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, 386: 721-724, 1997.

LOPES-FARRÉ, A.; RIESCO, A.; ESPINOSA, G.; DIGIUNI, E.; CERNADAS, M.R.; ALVAREZ, V. e MONTON, M. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. **Circulation**, 88: 1166-1171, 1993.

LOPEZ-BELMONTE, J. e WHITTLE, B.R.J. Endothelin-1 induced neutrophil-independent vascular injury in the rat gastric microcirculation. **Eur. J.Pharmacol.**, 278: R7-R9, 1995.

LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrene-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm. Res.**, 45: 308-311, 1996.

MALCANGIO, M. e BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends in Pharmacol. Sci.**, 17: 457-462, 1996.

MALMBERG, A.B. e 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. Neurosci.**, 15:2768-2776, 1995.

MASAKI, T.; VANE, J.R. e VANHOUTTE, P.M. International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol. Rev.**, 46: 137-142, 1994.

MAY, A.; GIJSMAN, H.J.; WALLNOFER, A.; JONES, R.; DIENER, H.C. e FERRARI, M.D. Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine. **Pain**, 67: 375-378, 1996.

McGREGOR, P.E.; AGERAWAL, D.K.; EDWARDS, J.D. Technique for assessment of leucocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, 32: 73-77, 1994.

McMILLEN, M.A. e SUMPIO, B.E. Endothelins: polifunctional cytokines. **J. Am. Coll. Surg.**, 180: 621-637, 1995.

MELZACK, R. e WALL, P.D. Pain Mechanisms: a new theory. **Science**, 150: 971-979, 1965.

- MITCHELL, M.D.; LUNDIN-SCHILLER, S. e EDWIN, S.S. Endothelin production by amnion and its regulation by cytokines. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 165: 120-124, 1991.
- MIYAMORI, I.; TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; IKI, K. e TAKEDA, R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from the rat mesenteric artery. **Life Sci.** 49: 1295-1300, 1991.
- MUSTAFA, S.B., C.R. GANDHI, S.A. HARVEY e M.S. OLSON. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. **Hepatology**, 21: 545- 553, 1995.
- NAKANO, J.; TAKIZAWA, H.; OHTOSHI, T.; SHOJI, S.; YAMAGUCHI, M.; ISHII, A.; YANAGISAWA, M. e ITO, K. Endotoxin and pro inflammatory cytokines stimulate endothelin 1 expression and release by airway epithelial cells. **Clin. Exp. Allergy**, 24: 330-336, 1994.
- NINOMIYA, H.; YU, X.Y.; HASEGAWA, S. e SPANHAKE, E.W. Endothelin-1 induced stimulation of prostaglandins synthesis in cells obtained from canine airways by bronchoalveolar lavage. **Prostaglandins**, 43: 401-411, 1992.
- NINOMIYA, H.; UCHIDA, Y.; ISHII, Y.; NOMURA, A.; KAMEYAMA, M.; SAOTOME, M.; ENDO, T. e HASEGAWA, S. Endotoxin-stimulates endothelin-1 release from cultured epithelial cells of guinea pig trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, 203: 299-302, 1991.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. The human nervous system-structure and function. In: "Pain and temperature", p.123-37. Eds. Williams & Wilkins. 5^a ed. New York, 1996.

OHLSTEIN, E.H.; STORER, B.L.; BUTCHER, J.A.; DEBOUCK, C. e FEUERSTEIN, G. Platelets stimulates expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. **Circ. Res.**, 69: 832-841, 1991.

PALECEK, J.; PALECKOVÁ, V.; DOUGHERTY, P.M. e WILLIS, W.D. The effect of phorbol esters on the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical and thermal stimuli. **J. Neurophysiol.**, 71:529-537, 1994.

PUIG, S. e SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, 64:345-355, 1995.

RAE, G.A. e HENRIQUES, M.G.M.O. Endothelins in inflammation, In: "Pro-inflammatory and anti-inflammatory peptides", Ed. By S. Said, Marcel e Dekker, Inc., New York, 1997 (no prelo).

RAE, G.A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G. e VANE, J.R. Endothelin-1 release eicosanoids from rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13 (Suppl. 5): S89-S92, 1989.

RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J. e JACOBY, H.I. Endothelin-induced-nociception in mice: mediation by ET_A and ET_B receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 276: 647-651, 1996.

RAFFA, R.B. e JACOBY, H.I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sci.**, 48: PL85-PL90, 1991.

RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J. e MARTINEZ, R.P. Endothelin-1 induced nociception. **Life Sci.**, 49: PL61-PL65, 1991.

RODMAN, D.M.; STELZNER, T.J.; ZAMORA, M.R.; BONVALLET, S.T.; OKA, M.; SATO, K.; O'BRIEN, R.F. e McMURTRY, I.F. Endothelin-1 increases the pulmonary microvascular pressure and causes pulmonary edema in salt solution but not blood-perfused rat lungs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 20: 658-663, 1992.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J. e WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 115:1265-1275, 1995.

SAITO, N.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y.; TANAKA, C. Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. **J. Neurosci.**, 8:369-382, 1988.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S. e KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neurosci. Lett.**, 151: 142-145, 1993.

SAKURADA, T., KATSUMATA, K., TAN-NO, K., SAKURADA, S. e KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacol.**, 31: 1279-1285, 1992.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYASAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K. e MASAKI, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, 348: 732-735, 1990.

SAMPAIO, A.L.; RAE, G.A.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. e HENRIQUES, M.G. ET_A receptor antagonists inhibit allergic inflammation in the mouse. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 26 (Suppl 3):S416-S418, 1995.

SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H. e INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38:347-352, 1989.

SHIBUTA, S.; MASHIMO, T.; ZHANG, P.; OHARA, A. e YOSHIYA, I. A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits antinociceptive effect in the rat formalin model. **J. Neurol. Sci.**, 141: 1-5, 1996.

SIROIS, M.G.; FILEP, J.G.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; PLANTE, G.E. e

SIROIS, P. Endothelin-1 increases protein extravasation in conscious rats: role of thromboxane A₂. **Eur. J. Pharmacol.**, 214: 119-125, 1992.

SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmac. Ther.**, 68: 435-471, 1995.

STANKOVA, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P. e ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Endothelin-1 induces IL-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells: synergistic effect of IL-1. **Am. J. Physiol.**, 271: C1073-C1078, 1996.

STEIN, P.D.; HUNT, J.T.; FLOYD, D.M.; MORELAND, S.; DICKENSON, K.E.J.; MITCHELL, C.; LIU, E.C.-K.; WEBB, M.L.; MURUGESAN, N.; DICKEY, J.; McMULLEN, D.; ZHANG, R.; LEE, V.G.; SERAFINO, R.; DELANEY, C.; SCHAEFFER, T.R. e KOZLOWSKI, M. The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ET_A antagonist 5-(dimethylamino)-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1-naphthalenesulfonamide. **J. Med. Chem.**, 37: 329-331, 1994.

SUGIURA, M.; INAGAMI, T. e KON, V. Endotoxin stimulates endothelin-release *in vivo* and *in vitro* as determined by ratio-immunoassay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 161:1220-1227, 1989.

SWANSTON, D.W.; GLEADLE, R.I.; COLGRAVE, H.F. e MARRS, T.C.

Cutaneous histamine-releasing activity of dimethylsulphoxide (DMSO) in guinea pigs. **Toxicol. Lett.**, 10: 87-90, 1982.

SZALASSI, A. Autoradiographic visualization and pharmacological

characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. **Acta Physiol. Scand.**, 155(Suppl 629):1-36, 1995.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAN, J.H. e HOLE, K. The

formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.

TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct

blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, 251: 173, 1994.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; PONS, F.; CHABRIER, P.E.; MENCIA-HUERTA, J.M.

e BRAQUET, P. Bronchopulmonary and vascular effect of endothelin in the guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, 176: 23-33, 1990.

TREEDE, R.-D. e MAGERL, W. Modern concepts of pain and hyperalgesia:

beyond the polymodal C-nociceptor. **News Physiol. Sci.**, 10:216-228, 1995.

UCHIDA, Y.; HAMADA, M.; KAMEYAMA, M.; OHSE, H.; NOMURA, A.;

HASEGAWA, S. e HIRATA, F. Endothelin-1 induced bronchoconstriction in the early phase but not late phase of anesthetized dogs is inhibited by indomethacin and ICI 198615. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 183: 1197-12202, 1992.

- VASKO, M.R. CAMPBELL, W.B. e WAITE, K.J. Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **J. Neurosci.**, 14: 4987-4997, 1994.
- VIERCK Jr, A.J.; GREENSPAN, J.D.; RITZ, L.A. e YEOMANS, D.C. The spinal pathways contributing to the ascending conduction and the descending modulation of pain sensations and reactions. In: Spinal Afferent Processing. Ed. Tony L. Yaksh, Plenum Publishing Corporation, p. 275-329, 1986.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. e GOEHLER, L.S. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, 63: 289-302, 1995a.
- WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M.T. e MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res.**, 692: 244-250, 1995b.
- WEAVER, D.L. Normal Inflammatory Response to Injury. In: Inflammation I, eds. Thornborough, p. 13-68. McGraw-Hill International Editions, 1995, Singapore.
- WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, B308: 253-268, 1985.
- WILLIS, A.L. e CORNELESEN, M. Repeated injection of prostaglandin E₂ in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. **Prostaglandins**, 3: 353-357, 1973.

WORLEY, P.F.; BARABAN, J.M. e SNYDER, S.H. Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding. **J. Neurosci.**, 6:199-207, 1986.

WRIGHT, C.D.; CODY, W.L.; DUNBAR Jr, J.B.; DOHERTY, A.M.; HINGORANI, G.P. e RAPUNDALO, S.T. Characterization of endothelins as chemoattractants for human neutrophils. **Life Sci.**, 21: 1633-1641, 1994.

WU, T.; RIEVES, R.D.; LARIVÉE, P.; LOGUN, C.; LAWRENCE, M.G. e SHELFHAMER, J.H. Production of eicosanoids in response to endothelin-1 binding sites in airway epithelial cells. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.**, 8: 282-290, 1993.

XIN, X.; CAI, Y.; MATSUMOTO, K. e AGUI, T. Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells. **Endocrinology**, 136: 132-137, 1995.

YAMAMOTO, T., SHIMOYAMA, N., ASANO, H. e MIZUGUCHI, T. Analysis of the role of endothelin-A and endothelin-B receptors on nociceptive information transmission in the spinal cord with FR139317, an endothelin-A receptor antagonist, and sarafotoxin S6c, an endothelin-B receptor agonist, **J. Pharmacol. Physiol. Therap.**, 271:156-163, 1994.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S. e OHATA, K. Mechanism of histamine release by endothelin 1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow derived mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 188: 268-275, 1995.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S. e OHATA, K. Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 265: 9-15, 1994.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YASAKI, Y.; GOTO, K. e MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332: 441-445, 1988.

YOSHIZAWA, T.; KIMURA, S.; KANAZAWA, I.; UCHIYAMA, Y.; YANAGISAWA, M. e MASAKI, T. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. **Neurosci. Lett.**, 102 : 179-184, 1989.

ZEBALOS, G.A.; AN, S. e WU, J.M. ET-1 secretion by human fibroblasts in culture: effects of cell density and IFN- β . **Biochem. Int.**, 25: 845-852, 1991.