

ALESSANDRA LIA GASPARETTI

**Envolvimento dos neurônios aferentes primários
sensíveis à capsaicina nas funções cardíacas de ratos**

CAMPINAS
2000



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ALESSANDRA LIA GASPARETTI

**Envolvimento dos neurônios aferentes primários
sensíveis à capsaicina nas funções cardíacas de ratos**

**Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS
2000

UNIDADE 82
L. CHAMADA:
TIUNICAMP
G213e
Ex. 1/20035
TOMBO BC 44035
PROC. 16-892/07
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 24/04/01
N.º CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM-00154023-6

G213e

Gasparetti, Alessandra Lia

Envolvimento dos neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina nas funções cardíacas de ratos / Alessandra Lia Gasparetti. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Edson Antunes

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Neuropeptídios. 2. Neurotransmissores. 3. Átrio. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antunes

2. Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

3. Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Edson Antunes', written over the list of members.

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 13/12/2000

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo por estar sempre iluminando os nossos caminhos.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos de minha vida. Com amor, dedico-lhes este trabalho, pois são eles os grandes responsáveis por mais esta conquista.

*Ao meu marido Rogério, pelo amor
e companheirismo, pois se não tivesse o
amor, eu nada seria.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes e Profa. Dra. Angelina Zanesco pela oportunidade e pela dedicada orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci pela importante colaboração na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pelo auxílio no método imunoenzimático.

A amiga Sônia Regina Riado, que esteve ao meu lado e me ensinou as técnicas de isolamento de átrio direito de ratos.

A Soraia Kátia P. Costa pela paciência e por estar sempre pronta para ajudar.

A Maria Helena Sartoran pela amizade e pelo auxílio na aprendizagem da técnica de coração isolado.

A Laura Cristina Marreto Esquisato e Enilton Camargo pelos bons momentos que compartilhados juntos.

A Raquel Lima Camacho por nossa amizade.

As amigas Fernanda e Tatiane que em pouco tempo conquistaram minha amizade.

Ao Adilson José Thomás e Miguel Borges da Silva pela dedicação com a qual cuidam dos animais utilizados no Departamento de Farmacologia da UNICAMP.

A Maria das Dores Ponciano (Dora) pelo carinho e por estar sempre disposta a nos ajudar no que precisamos.

Aos funcionários Aguinaldo Fernando de Azevedo, Gislaine Elias Alipio, Maria Rita de Lima, Wanderlei da Cunha Claro pela colaboração.

A todos os amigos do Departamento de Farmacologia que proporcionaram momentos de felicidade que ficarão marcados na minha vida.

Aos animais que doaram a própria vida por este trabalho, meu sincero agradecimento e respeito.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado (1998-2000).

“O homem não morre quando deixa de viver, e sim quando deixa de amar.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	xix
Lista de materiais.....	xxi
Lista de figuras.....	xxiii
Lista de tabelas.....	xxix
Resumo.....	xxxii

1 INTRODUÇÃO

1.1. Neurotransmissão autonômica clássica.....	2
1.1.1. Neurotransmissão colinérgica.....	2
1.1.2. Neurotransmissão adrenérgica.....	4
1.2. Neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica (NANC).....	7
1.2.1. Anatomia dos neurônios aferentes primários sensíveis à vanilóides (VSPA).....	8
1.2.2. Mecanismo de liberação de neuropeptídeos dos neurônios VSPA e substâncias moduladoras.....	10
1.2.3. Capsaicina.....	13
1.2.4. Neurotransmissores liberados de neurônios VSPA.....	16
1.2.5. Relação modulatória entre neurônios autonômicos e VSPA.....	19
1.3. Objetivos.....	21

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais.....	23
2.2. Ratos neonatos tratados com capsaicina.....	23
2.3. Átrios direitos isolados.....	23
2.3.1. Obtenção e análise das curvas concentração-efeito.....	24
2.4. Corações isolados (Langendorff).....	25
2.5. Dosagem de CGRP em tecido cardíaco.....	27
2.6. Análise estatística.....	28

3	RESULTADOS	
	3.1. Átrios isolados.....	30
	3.1.1. Freqüência basal.....	31
	3.1.2. Isoproterenol.....	32
	3.1.3. Carbacol.....	35
	3.1.4. Pilocarpina.....	37
	3.1.5. CGRP.....	39
	3.1.6. Capsaicina.....	42
	3.2. Corações isolados.....	44
	3.2.1. Fluxo coronariano basal.....	45
	3.2.2. Alterações do fluxo coronariano em resposta à fenilefrina.....	45
	3.2.3. Fluxo coronariano em resposta à capsaicina.....	48
	3.2.4. Freqüência cardíaca em resposta ao isoproterenol.....	50
	3.2.5. Freqüência cardíaca em resposta à capsaicina.....	53
	3.2.6. Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) em resposta ao isoproterenol.....	54
	3.2.7. Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) em resposta à capsaicina.....	57
	3.3. Conteúdo de CGRP em tecido cardíaco.....	59
4	DISCUSSÃO.....	60
5	CONCLUSÕES.....	66
6	SUMMARY.....	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE ABREVIACOES

SIGLAS

bpm	Batimentos por minuto
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CSPA	“Capsaicin-sensitive primary afferent neurons”
$E_{m\acute{a}x}$	Resposta máxima
NANC	Não-adrenérgica e não-colinérgica
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
PDVE	Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo
pEC_{50}	Potência
VSPA	“Vanilloid-sensitive primary afferent neurons”

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIAS	PROCEDÊNCIA
17- β Estradiol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Ácido Acético	Synth (Diadema, Brasil)
Ácido Ascórbico	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Capsaicina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Captopril	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Carbacol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
CGRP	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
CGRP ₈₋₃₇	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
DDT (DL-dithiothreitol)	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
EDTA	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Etanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Fenilefrina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Halotano	Halocarbon (New Jersey, EUA)
Heparina	Roche
Isoproterenol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Metanol	Synth (Diadema, Brasil)
Pilocarpina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Rat CGRP enzyme immunometric assay kit	SPI BIO (Cayman, EUA)
Tween 80	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Uréia	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia funcional do neurônio VSPA (neurônio sensorial).....	9
Figura 2. Mecanismos de liberação de neuropeptídeos à partir dos neurônios VSPA.....	11
Figura 3. Fórmula estrutural da capsaicina (8-metil-n-vanilil-6-nonenamida).....	13
Figura 4. Sistema de perfusão de coração pelo método de Langendorff.....	26
Figura 5. Balão inserido na cavidade ventricular.....	26
Figura 6. Curvas concentração-resposta ao isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	34
Figura 7. Curvas concentração-resposta ao carbachol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.....	36
Figura 8 Curvas concentração-resposta à pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.....	38
Figura 9. Curvas concentração-resposta ao CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	41
Figura 10. Resposta cronotrópica (bpm) à capsaicina (1 μ M) antes e após a adição do antagonista de receptores para CGRP (CGRP ₈₋₃₇) em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	43

Figura 11. Fluxo coronariano basal de corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 e 90 dias após tratamento.....	45
Figura 12. Alterações do fluxo coronariano em resposta a três doses de fenilefrina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	46
Figura 13. Alterações do fluxo coronariano em resposta a três doses de fenilefrina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	47
Figura 14. Variações do fluxo coronariano em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	48
Figura 15. Variações do fluxo coronariano em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	49
Figura 16. Efeito cronotrópico positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	51
Figura 17. Efeito cronotrópico positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	52
Figura 18. Efeito cronotrópico em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	53

Figura 19. Efeito cronotrópico em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	54
Figura 20. Efeito inotrópico (PDVE) positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	55
Figura 21. Efeito inotrópico (PDVE) positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	56
Figura 22. Efeito inotrópico (PDVE) em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento.....	57
Figura 23. Efeito inotrópico (PDVE) em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento.....	58
Figura 24. Concentração de CGRP em tecido cardíaco total de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência dos batimentos espontâneos atriais (bpm) de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	31
Tabela 2. Potência (pEC_{50}) do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	32
Tabela 3. Respostas máximas (bpm) do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	33
Tabela 4. Potência (pEC_{50}) e respostas máximas ($E_{máx}$, bpm) do carbacol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.....	35
Tabela 5. Potência (pEC_{50}) e respostas máximas ($E_{máx}$, bpm) da pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.....	37
Tabela 6. Potência (pEC_{50}) do CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	39
Tabela 7. Respostas máximas (bpm) do CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.....	40

RESUMO

Os neuropeptídeos liberados dos neurônios sensoriais modulam as funções cardíacas. Recentemente, sugeriu-se a existência de uma interação funcional entre as fibras simpáticas, parassimpáticas e sensoriais em corações e vasos. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento neonatal com capsaicina sobre a potência do isoproterenol, carbacol, pilocarpina e/ou CGRP em átrio direito isolado de rato, bem como, o cronotropismo, inotropismo e fluxo coronariano em resposta aos agonistas α - e β -adrenérgicos em coração isolado de rato. Ratos Wistar neonatos foram tratados com capsaicina (50 mg/Kg, subcutâneo) ou seu volume correspondente de veículo no segundo dia de vida. O coração e o átrio direito foram isolados 30, 60 e/ou 90 dias após tratamento. O tratamento com capsaicina determinou dessensibilização da resposta cronotrópica ao isoproterenol em átrios direitos de ratos de 30 dias, mas nenhuma alteração significativa foi observada nos animais com 60 ou 90 dias de idade. As respostas ao CGRP, carbacol e pilocarpina em átrios direitos não foram afetadas pelo tratamento neonatal com capsaicina em nenhum dos tempos estudados. A potência ao CGRP nos animais sacrificados aos 30 dias, para ambos os grupos, foi significativamente maior do que nos animais sacrificados aos 60 e 90 dias após o tratamento. O tratamento com capsaicina reduziu os conteúdos de CGRP no coração, em cerca de 74% em todos os tempos estudados; no entanto, a resposta funcional (cronotropismo positivo) à capsaicina exógena só foi significativamente atenuada aos 60 e 90 dias após tratamento. Em corações isolados, o fluxo coronariano basal foi reduzido aos 60 dias após tratamento, mas nenhuma alteração foi observada nas respostas cronotrópicas e inotrópicas positivas ao isoproterenol e na vasoconstrição coronariana em resposta à fenilefrina. Em resumo, a dessensibilização da resposta cronotrópica de átrios direitos nos animais com 30 dias de idade pode ser devido à intensa ativação do sistema simpato-adrenal acarretada pela capsaicina no período neonatal.

1- Introdução

A homeostase cardiovascular é resultado da integração dos sistemas nervoso, endócrino e da regulação local do fluxo sanguíneo. Os sistemas neurais envolvem mecanismos regulatórios centrais e periféricos; estes últimos são determinados pela inervação autonômica adrenérgica, colinérgica e uma categoria de neurônios classificada como não-adrenérgica e não-colinérgica. Assim, uma diversidade de substâncias está implicada no controle cardiovascular; dentre elas, catecolaminas, acetilcolina e neuropeptídeos como a vasopressina, substância P, neurocinina A, neurocinina B e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (BARNES, FERRARIO, CONOMY, 1979; PRIVITERA, THIODEAUX, YATES, 1994; LINDSEY, 1995).

1.1. NEUROTRANSMISSÃO AUTONÔMICA CLÁSSICA

O sistema nervoso autonômico periférico é subdividido em parassimpático (neurotransmissão pós-ganglionar colinérgica) e simpático (neurotransmissão pós-ganglionar adrenérgica), sendo respectivamente, a acetilcolina e a noradrenalina seus principais neurotransmissores químicos.

1.1.1. NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

Os receptores colinérgicos são classificados em dois tipos principais: nicotínicos que respondem à nicotina e muscarínicos que exibem resposta excitatória à muscarina. Os receptores nicotínicos compreendem dois subtipos: Nn (neuronal) e Nm (muscular e ganglionar), os quais estão presentes no sistema nervoso central, na junção neuromuscular, e nos gânglios autonômicos. São constituídos por quatro ou cinco subunidades alojadas na membrana, formando um canal iônico central, que atua como o sítio de ligação da acetilcolina, e está situado no domínio extracelular da molécula do receptor (EGLIN, HEDGE, WATSON, 1996). Farmacologicamente, os agonistas nicotínicos apresentam pequena seletividade entre os receptores ganglionares e neuromusculares.

Os receptores muscarínicos são classificados em cinco subtipos distintos, denominados M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅ (BONNER *et al.*, 1987; GOYAL, 1988; DORJE *et al.*, 1991; CAULFIELD, 1993).

Em coração de mamíferos, a população predominante de receptores muscarínicos é do subtipo M₂ (HAMMER & GIACHETTI, 1982), cujos efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos estão associados à inibição da atividade da adenilato ciclase, ocasionada pelo acoplamento do receptor às proteínas Gi ou Gk (PETERSON *et al.*, 1984; MAEDA *et al.*, 1988; EGLIN *et al.*, 1996). Nas células endoteliais do tecido vascular estão presentes os receptores muscarínicos M₃, os quais, após estimulação, induzem a liberação do óxido nítrico que se difunde para as células adjacentes do músculo liso causando relaxamento. A vasodilatação também pode ocorrer pela ação da acetilcolina em receptores pré-sinápticos dos terminais nervosos adrenérgicos, que promovem a inibição da liberação de noradrenalina (FURCHGOTT, 1984; PALMER *et al.*, 1988; MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991).

As fibras parassimpáticas colinérgicas estão distribuídas extensamente nos átrios e nos tecidos especializados de condução (nodos sinoatrial, atrioventricular e fibras de Purkinje), enquanto que no miocárdio ventricular, esta inervação é esparsa (KENT *et al.*, 1974; LEVY & SCHWARTZ, 1994). O impulso cardíaco normal é iniciado no nodo sinoatrial, pela despolarização espontânea das células do marca-passo. O potencial de ação é conduzido pelas fibras do músculo atrial do nodo atrioventricular e, em seguida, pelas fibras de Purkinje no músculo ventricular.

A acetilcolina diminui a frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo) e a frequência de condução em tecidos especializados dos nodos sinoatrial e atrioventricular (efeito dromotrópico negativo) através da diminuição da frequência de despolarização diastólica espontânea (a corrente do marca-passo) e pelo aumento da corrente de repolarização no nodo sinoatrial; retardando assim, o limiar do potencial e os sucessivos efeitos do ciclo cardíaco (DI FRANCESCO, 1993).

1.1.2. NEUROTRANSMISSÃO ADRENÉRGICA

As catecolaminas são os mediadores endógenos do sistema nervoso simpático os quais iniciam suas ações por interação com receptores de membrana, denominados adrenoceptores (AHLQUIST, 1948). Esses mediadores são representados pela noradrenalina (liberada das terminações nervosas pós-ganglionares simpáticas), adrenalina (liberada da medula adrenal) e dopamina. A ocupação dos adrenoceptores pelas catecolaminas é rápida, reversível, saturável, estereoseletiva e leva à formação de segundos mensageiros intracelulares que desencadeiam as respostas fisiológicas.

Os adrenoceptores foram inicialmente divididos em duas grandes categorias, α e β (LANDS *et al.*, 1967). Posteriormente, os adrenoceptores foram subdivididos em α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 e β_4 (este não está bem caracterizado) pelo uso de antagonistas seletivos e seqüenciamento dos aminoácidos que participam de suas estruturas protéicas. Os subtipos α são ainda subdivididos em α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} (LANDS *et al.*, 1967; LANGER, 1974; BERTHELSON & PETTINGER, 1977; STARKE, 1981; HAN, ABEL, MINNEMAN, 1987; McGRATH & WILSON, 1988; REGAN *et al.*, 1988; HAN, LI, MINNEMAN, 1990; FORD *et al.*, 1994; KAUMANN *et al.*, 1998).

Os adrenoceptores pertencem a uma super família de receptores de membrana estritamente relacionados e acoplados às proteínas G. Todas essas proteínas receptoras compartilham uma estrutura peptídica comum na qual a porção amino terminal (N) no lado extracelular da membrana é conectada à uma cadeia carboxílica terminal (C) no lado intracelular da membrana, por sete domínios transmembrana. O tamanho relativo das cadeias N- e C-terminais e da terceira alça intracelular varia consideravelmente de receptor para receptor (RAYMOND *et al.*, 1990; BIRNBAUMER, 1992). A terceira alça intracelular dos adrenoceptores β é o sítio de acoplamento desses receptores com a proteína G.

As proteínas G são heterotrímeros consistindo de uma subunidade hidrofílica α , e duas subunidades hidrofóbicas β e γ . Baseadas na presença de isoformas da subunidade α , foram identificadas vinte e cinco proteínas G distintas: quatro isoformas de Gs; três de Gi; duas isoformas de Go; uma Gz; cinco Gq e duas transducinas. Destas, somente oito foram purificadas livres e não associadas a outros elementos da membrana. Na ausência de

agonista, quando a proteína G está na forma inativa, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) encontra-se ligada à subunidade α , formando um complexo associado às subunidades β e γ . Na presença do agonista, o receptor ativado interage com a proteína G e induz a troca de GDP por guanosina trifosfato (GTP) na subunidade α . Após ligar-se ao GTP, a subunidade α dissocia-se das subunidades $\beta\gamma$ e torna-se ativada. A subunidade α permanece livre até que ocorra a hidrólise de GTP e a formação novamente de GDP, levando à sua reassociação com as subunidades $\beta\gamma$ (BIRNBAUMER, 1992). A subunidade α da proteína Gs, quando ativada, leva à estimulação da adenilato ciclase (RODBELL, 1980; GILMAN, 1987).

Os adrenoceptores α_1 , quando acoplados a proteína Gq, ativam a fosfolipase C levando à formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), os quais resultam no aumento de cálcio intracelular e na ativação da proteína quinase C (EXTON, 1985). Os adrenoceptores α_2 parecem mediar a resposta fisiológica através da inibição da adenilato ciclase (DOCHERTY, 1998).

As respostas dos adrenoceptores β são mediadas através da ativação da adenilato ciclase (EMORINE *et al.*, 1989; EMORINE, BLIN, STROBERG, 1994; COHEN *et al.*, 1999) e conseqüente estimulação de uma proteína G, denominada Gs, a qual leva a um aumento de AMP cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A (BRODDE, 1993). Sob determinadas condições, o adrenoceptor β_2 pode estar também acoplado a uma proteína G (Gi), inibitória de adenilato ciclase (DAAKA, LUTTRELL, LEFKOWITZ, 1997; XIAO *et al.*, 1999).

O adrenoceptor β_1 é o subtipo mais abundante (75-85%) no coração do mamífero, mas o receptor β_2 também é detectável no tecido cardíaco (BRISTOW *et al.*, 1986; BRODDE, 1993; KAUMANN & MOLENAAR, 1997). Estudos recentes tem demonstrado a existência de receptores β_3 e β_4 no miocárdio de ratos e humanos (GAUTHIER *et al.*, 1996; MOLENAAR, SARSERO, KAUMANN, 1997; KAUMANN *et al.*, 1998; COHEN *et al.*, 1999). O receptor adrenérgico β_3 parece promover efeito inotrópico negativo (GAUTHIER *et al.*, 1996); ao contrário, o β_1 , β_2 e β_4 promovem efeito inotrópico positivo (KAUMANN & MOLENAAR, 1997; KAUMANN *et al.*, 1998). A estimulação dos receptores β -adrenérgicos por catecolaminas circulantes ou agonistas

adrenérgicos exógenos leva ao aumento da frequência cardíaca (cronotropismo positivo), força de contração (inotropismo positivo) e automaticidade (POST, HAMMOND, INSEL, 1999).

Os adrenoceptores β podem ser regulados por diferentes estímulos, aumentando ou diminuindo sua expressão funcional e/ou numérica. A atenuação da resposta mediada pelos receptores é denominada dessensibilização. Este fenômeno envolve os processos de desacoplamento, seqüestração e "down-regulation" do receptor, resultando na perda de sua responsividade mesmo na presença de estímulo. O desacoplamento ocorre de segundos a minutos após a exposição do receptor ao agonista, e resulta na modificação da proteína do receptor pela fosforilação (LEFKOWITZ, 1998). O processo de seqüestração ocorre minutos após a exposição do receptor ao agonista, e envolve a mobilização dos receptores da superfície celular para compartimentos intracelulares que são inacessíveis aos agonistas hidrofílicos extracelulares. A "down-regulation" ocorre após horas de exposição do receptor ao agonista e resulta na perda de receptores das células por degradação ou diminuição de síntese (POST *et al.*, 1999).

Alterações na sensibilidade do tecido cardíaco às catecolaminas são importantes no controle e/ou tratamento das doenças cardiovasculares (ZANESCO *et al.*, 1999; KOCH, LEFKOWITZ, ROCKMAN, 2000). O aumento do efluxo de catecolaminas promove diminuição na expressão e no acoplamento dos receptores aos seus efetores. Os adrenoceptores β são alvos da fosforilação dos receptores ativados, levando ao desacoplamento da proteína G, e a resposta celular à estimulação dos adrenoceptores torna-se menos efetiva (LEFKOWITZ, 1998). Os receptores adrenérgicos ativados são fosforilados por quinases dependentes de segundo mensageiro (PKA e PKC) e por certas quinases de proteína G acoplada ao receptor (GRK) (INGLESE *et al.*, 1993). A seguir, estes receptores fosforilados interagem com a β -arrestina (proteína citosólica) inibindo a interação dos receptores com a proteína Gs, causando assim seu desacoplamento. Além das modificações dos receptores, alterações de outras proteínas envolvidas na regulação dos níveis de AMP cíclico podem contribuir para a perda da responsividade dos adrenoceptores ocasionada pelo prolongado tratamento com agonistas (POST *et al.*, 1999).

1.2. NEUROTRANSMISSÃO NÃO-ADRENÉRGICA E NÃO-COLINÉRGICA (NANC)

Durante muito tempo acreditou-se que a neurotransmissão química, a partir de neurônios autonômicos para os tecidos efetores periféricos, era mediada somente por noradrenalina e acetilcolina. Entretanto, mesmo após o bloqueio da neurotransmissão adrenérgica e colinérgica, os vasos sanguíneos dilatavam-se em resposta à estímulos nervosos. Com o isolamento e caracterização do CGRP e das taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B), revitalizou-se o conceito que alguns neurônios utilizam mecanismos de transmissão independentes dos mediadores clássicos autonômicos (LEVINE *et al.*, 1984; LUNDBERG *et al.*, 1985; HOLZER, 1992; MAGGI, 1995a). Assim, uma nova categoria de neurônios foi classificada como NANC.

Uma parte dos neurônios NANC transmite informações sensoriais, através de fibras aferentes ao reagir às mudanças internas e/ou ambientais. Estes neurônios apresentam também funções eferentes, atuando em tecido muscular liso, coração, na transmissão autonômica, em processos imunológicos e no crescimento tecidual (RUBINO, RALEVIC, BURNSTOCK, 1993; LUNDBERG, 1996; LI *et al.*, 1996; FERDINANDY *et al.*, 1997).

Embora o significado e modo de ação desses neurônios sensoriais no controle das funções vasculares tenham sido descritos recentemente, o descobrimento dessas fibras vasodilatadoras datam do século passado. STRICKER (1876) foi o primeiro a observar que a estimulação de terminações nervosas periféricas de raízes dorsais transectadas causava vasodilatação na área da pele inervada por fibras nervosas sensoriais. BAYLISS (1901) e BRUCE (1913) também demonstraram que a vasodilatação produzida por estimulação antidrômica é inalterada pela remoção de gânglios simpáticos ou separação das raízes dorsais entre o gânglio e a medula. Por outro lado, a remoção do gânglio da raiz dorsal e a conseqüente degeneração dos neurônios sensoriais pela capsaicina, previne completamente a vasodilatação induzida pela estimulação antidrômica. Com base nestas descobertas, concluiu-se que a vasodilatação era provocada por impulsos nervosos que se propagavam no sentido eferente das fibras nervosas sensoriais, promovendo a liberação de substâncias vasoativas, tais como substância P e CGRP (HOLZER, 1992).

1.2.1. ANATOMIA DOS NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS SENSÍVEIS À VANILÓIDES (VSPA)

Após o descobrimento das propriedades farmacológicas da capsaicina (substância irritante extraída de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*) pelo grupo húngaro liderado pelo Prof. NICHOLAS JANCSÓ (JANCSÓ, JANCSÓ-GABOR, SZOLCSANYI, 1967), as funções eferentes dos neurônios sensoriais passaram a ser intensamente estudadas. E para denotar uma subpopulação de neurônios aferentes primários susceptíveis à ação excitatória e inibitória da capsaicina (SZOLCSANYI, 1977; BUCK & BURKS, 1986), estes foram denominados ‘neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina’ (CSPA, “capsaicin-sensitive primary afferent neurons”). Recentemente, foi proposta uma nova denominação, neurônios aferentes primários sensíveis à vanilóides (VSPA, “vanilloid-sensitive primary afferent neurons”), tendo em vista que, além da capsaicina, outras substâncias são capazes de atuar nos mesmos receptores da capsaicina, os chamados receptores vanilóides (SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Os neurônios VSPA são divididos em neurônios com o corpo no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal. Com relação ao seu diâmetro e à modalidade sensorial, os mesmos são divididos em dois tipos: neurônios de pequeno diâmetro, não mielinizados, do tipo C, com funções nociceptoras polimodais, e neurônios de grande diâmetro, mielinizados finos, do tipo A δ , com funções nociceptoras térmicas e mecânicas (HOLZER, 1991; SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Anatomicamente, os neurônios VSPA são compostos pelo terminal central, pelo terminal periférico e pelo corpo do neurônio (pericário), onde postula-se que a síntese dos neuropeptídeos seja regulada, a partir do fator de crescimento do neurônio (Figura 1). Mediante estímulos adequados, os neuropeptídeos são transportados para os terminais nervosos periféricos e central, cuja liberação resulta nas respectivas funções eferentes e aferentes (MAGGI & MELLI, 1988; LUNDBERG, 1996). O terminal nervoso central faz sinapse com um neurônio de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal (para os neurônios ganglionares da raiz dorsal) ou no núcleo espinal do trato trigeminal (para os neurônios ganglionares trigeminais) (SZALLASI & BLUMBERG, 1999). A liberação de neuropeptídeos do terminal central determina a transmissão da percepção de dores

viscerais, somáticas e ativação de vários reflexos. Os neuropeptídeos liberados dos terminais periféricos atuam em células-alvo, produzindo várias ações biológicas, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (extravasamento de proteína plasmática), alterações na contratilidade do músculo liso, cronotropismo positivo, desgranulação de mastócitos e uma variedade de efeitos sobre leucócitos e fibroblastos, efeitos esses, caracterizados pela inflamação neurogênica (MAGGI, 1995b).

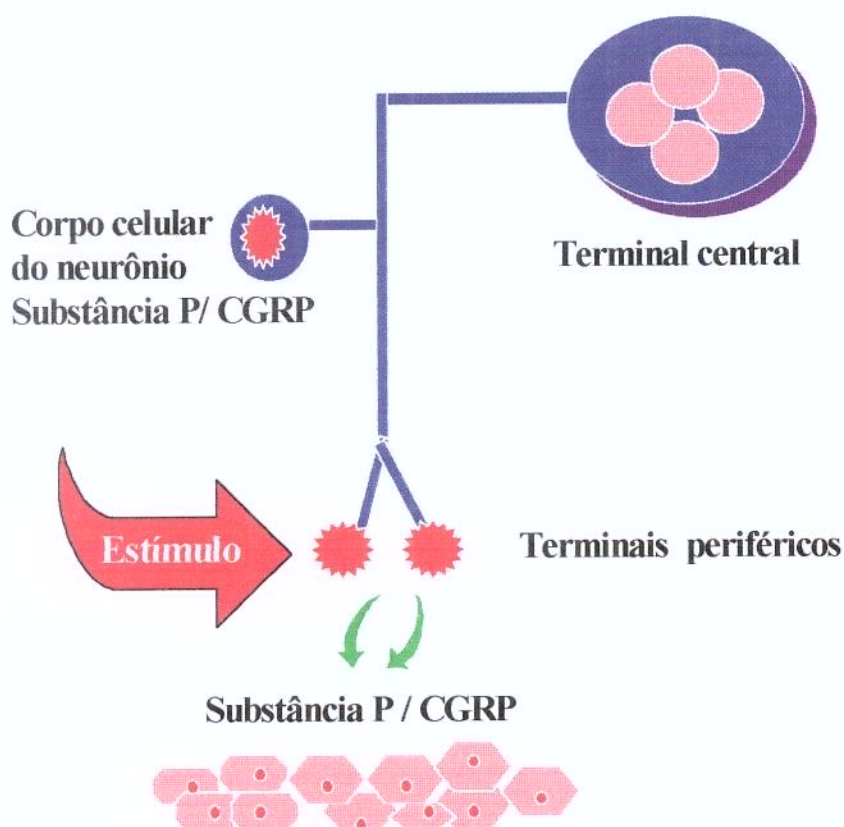


Figura 1. Anatomia funcional do neurônio VSPA (neurônio sensorial)

Adaptado (MAGGI, 1995a). CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina;

VSPA, neurônio aferente primário sensível à vanilóide.

1.2.2. MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE NEUROPEPTÍDEOS DOS NEURÔNIOS VSPA E SUBSTÂNCIAS MODULADORAS

À semelhança de outros terminais nervosos, a liberação de neuropeptídeos dos terminais nervosos sensoriais periféricos e centrais requer a presença de íons Ca^{++} . Baseado na susceptibilidade diferencial dos estímulos aplicados, dois mecanismos básicos e distintos regulam a liberação dos neuropeptídeos dos neurônios VSPA (MAGGI *et al.*, 1988; HOLZER, 1991).

O primeiro mecanismo de liberação de neuropeptídeos é realizado pela ativação dos receptores vanilóides e/ou do canal catiônico não seletivo acoplado ao receptor vanilóide. Este mecanismo de liberação é bloqueado pela capsazepina (antagonista de receptor vanilóide) e pelo vermelho de rutênio, e não envolve canais de Ca^{++} dependentes de voltagem, sendo, portanto, resistente aos seus bloqueadores (Figura 2).

A existência de sítios específicos de interação da capsaicina foi recentemente demonstrada através de estudos de ligação de membrana ou autoradiografia utilizando-se um potente análogo da capsaicina denominado resiniferatoxina (extraída da planta *Euphorbia resinifera*; SZALLASI & BLUMBERG, 1990), e tais estudos foram confirmados utilizando-se o antagonista de receptor vanilóide denominado capsazepina (BEVAN *et al.*, 1992). A existência do grupamento homovanilil em ambas estruturas da capsaicina e da resiniferatoxina levaram a denominar o sítio de interação da capsaicina como receptor vanilóide (SZALLASI & BLUMBERG, 1990). Em 1997, o receptor vanilóide foi clonado e denominado VR1 (CATERINA *et al.*, 1997).

O segundo mecanismo de liberação de neuropeptídeos se dá por estimulação elétrica ou outros estímulos despolarizantes (concentrações elevadas de K^{+}), envolvendo assim, canais de Ca^{++} dependentes de voltagem. Este mecanismo é sensível aos bloqueadores de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem, tais como as dihidropiridinas e conotoxinas. A liberação de neuropeptídeos sensoriais através desse mecanismo está sujeita a uma regulação inibitória ao nível pré-juncional através de transmissores como neuropeptídeo Y, opióides, galanina e outros (Figura 2).

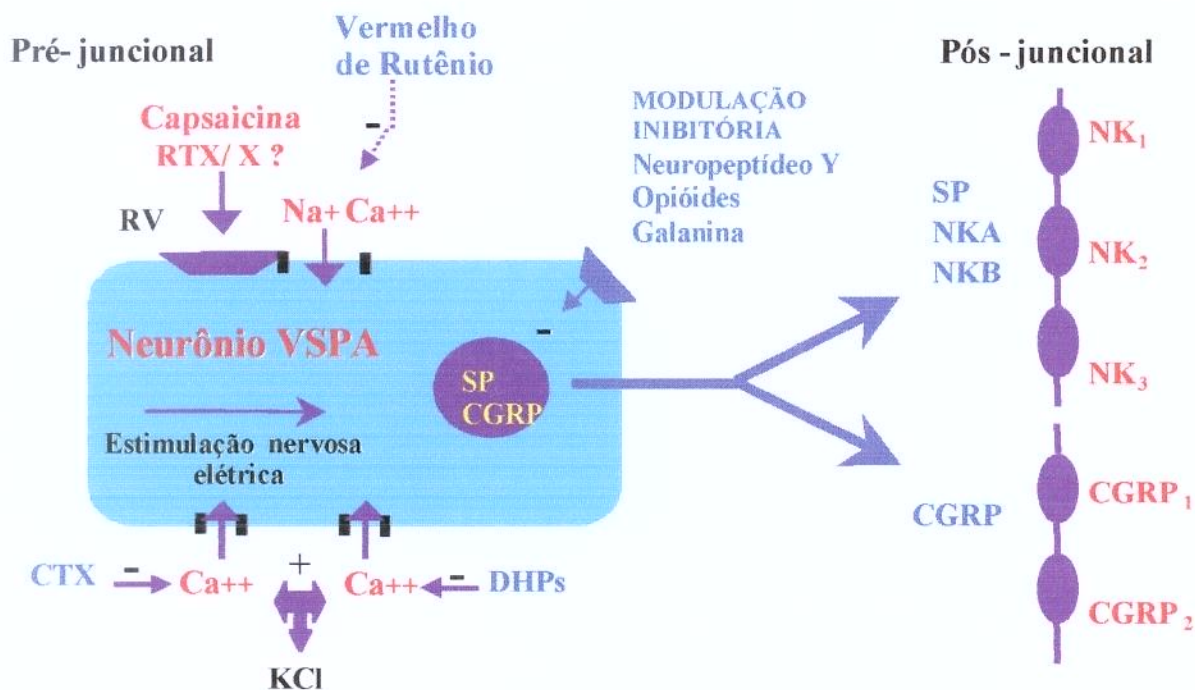


Figura 2. Mecanismos de liberação de neuropeptídeos à partir dos neurônios VSPA Adaptado (MAGGI, 1995a). CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; CTX, conotoxinas; DHPs, dihidropiridinas; NKA, neurocinina A; NKB, neurocinina B; RTX, resinferatoxina; RV, receptor vanilóide; SP, substância P; VSPA, neurônio aferente primário sensível à vanilóide.

A capsazepina, um análogo estrutural da capsaicina, é um antagonista seletivo e competitivo de receptores vanilóides, sendo capaz de bloquear as alterações evocadas pela capsaicina em diversas preparações *in vivo* e *in vitro* (DICKENSON & DRAY, 1991; BEVAN *et al.*, 1992; PERKINS & CAMPBELL, 1992). Entretanto, apesar da capsazepina suprimir a broncoconstrição induzida pela capsaicina em pulmões de cobaia, o mesmo não ocorre com o extravasamento plasmático induzido pela capsaicina nas vias aéreas inferiores

de rato (LOU & LUNDBERG, 1992; AUBERSON & LUNDBERG, 1993). Isto sugere a existência de subtipos de receptores vanilóides insensíveis à capsazepina (LIU *et al.*, 1997).

O vermelho de rutênio é um corante inorgânico que, dependendo da concentração utilizada, interfere com os movimentos de cálcio através da membrana. Dessa forma, atua como um antagonista de capsaicina ou de outros agonistas de receptores vanilóides e previne a abertura dos canais catiônicos (Na^+ e Ca^{++}) acoplados ao receptor vanilóide (AMANN & MAGGI, 1991). Entretanto, o vermelho de rutênio não inibe a liberação de neuropeptídeos dependente de estimulação elétrica ou concentrações elevadas de K^+ (AMANN, DONNERER, LEMBECK, 1990; BUCKLEY, BRAIN, WILLIAMS, 1990). O mecanismo exato pelo qual o vermelho de rutênio inibe as ações da capsaicina e de outros agonistas vanilóides ainda não está bem esclarecido. Acredita-se que seu efeito inibitório não esteja relacionado à ativação do receptor vanilóide, mas sim ao bloqueio do canal catiônico acoplado a este receptor (SZALLASI & BLUMBERG, 1990; DRAY, FORBES, BURGESS, 1990; MAGGI, 1991).

Os bloqueadores de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem (dihidropiridinas e conotoxinas) inibem a liberação de neuropeptídeos induzida por estimulação elétrica ou despolarização decorrente de elevadas concentrações de K^+ . Neste caso, a liberação de neuropeptídeos das terminações periféricas e centrais dos neurônios VSPA é mediada por diferentes subtipos de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem, já identificados (MAGGI *et al.*, 1988; MAGGI & GIULIANI, 1991; MAGGI, 1995a).

1.2.3. CAPSAICINA

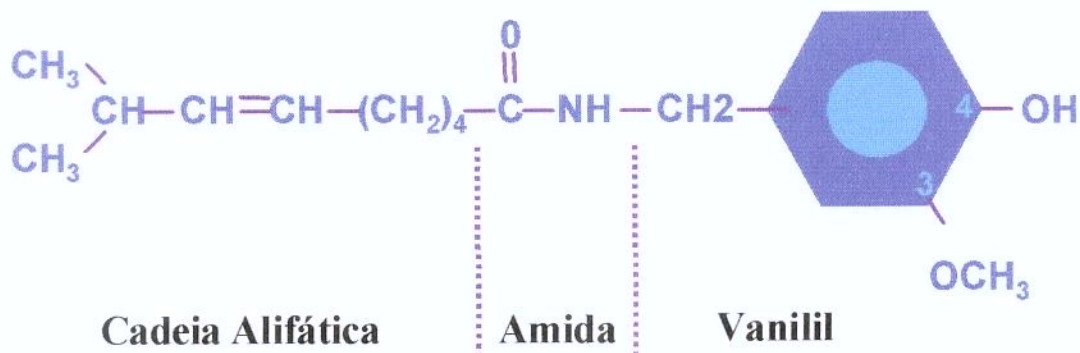


Figura 3. Fórmula estrutural da capsaicina (8-metil-n-vanilil-6-nonenamida)

THRESH, em 1846, foi o primeiro a isolar e denominar a substância irritante extraída da pimenta vermelha do gênero *Capsicum* como capsaicina. Várias décadas depois, sua exata estrutura química foi determinada (Figura 3), e sua síntese tornou-se possível (SPATH & DARLING, 1930). A capsaicina é um derivado vanilil amida (grupo 3-metoxi 4-hidroxibenzil – região aromática), a qual começou a ser amplamente utilizada como ferramenta farmacológica no estudo dos neurônios VSPA quando observou-se que ratos tratados com capsaicina não respondiam a estímulos de dor, bem como não desenvolviam a inflamação neurogênica (JANCSÓ *et al.*, 1967).

Em geral, as ações farmacológicas da capsaicina resumem-se a três fenômenos consecutivos: primeiro, a capsaicina estimula seletivamente subtipos de neurônios VSPA, tais como fibras do tipo C e A δ , levando à liberação de neuropeptídeos (JANCSÓ, JANCSÓ-GABOR, TAKÁTS, 1961; JANCSÓ *et al.*, 1967; SZOLCSANYI, 1988); em seguida, esses neurônios tornam-se dessensibilizados e impossibilitados de conduzir novos estímulos; e, finalmente, dependendo da concentração e duração da ação da capsaicina, ocorrem as ações neurotóxicas, com conseqüente degeneração desses neurônios (JANCSÓ *et al.*, 1967; MAGGI *et al.*, 1988; HOLZER, 1991).

As ações induzidas pela capsaicina nos neurônios VSPA (alterações estruturais e degeneração das fibras C e A δ) dependem da dose, da via de administração, da espécie e da idade dos animais (JANCSÓ *et al.*, 1987; SZOLCSANYI, 1990). Em humanos e em

animais de laboratório, repetidas exposições à capsaicina causam insensibilidade prolongada a estímulos dolorosos. Por outro lado, baixas doses de capsaicina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) exercem efeito excitatório nas terminações nervosas sensoriais periféricas (FITZGERALD, 1983; BUCK & BURKS, 1986), culminando na estimulação e liberação de quantidades significativas de neuropeptídeos, enquanto que doses elevadas de capsaicina (mg/Kg) promovem efeito neurotóxico na população de neurônios sensoriais resultando na degeneração das fibras sensoriais e conseqüente depleção dos estoques de neuropeptídeos. A lesão mais eficiente dos neurônios VSPA é obtida pelo tratamento de ratos neonatos com capsaicina, no qual uma dose única de $50 \text{ mg}/\text{Kg}$ resulta em perda permanente de cerca de 50-90% das fibras aferentes (JANCSÓ, KIRALY, JANCSÓ-GABOR, 1977; SCADDING, 1980; NAGY *et al.*, 1981, 1983). O tratamento de ratos adultos com capsaicina causa um efeito menos pronunciado sobre os neurônios VSPA resultando em degeneração parcial (JANCSÓ, 1981; PALERMO, BROWN, SMITH, 1981; JANCSÓ *et al.*, 1985) ou até mesmo ausência de degeneração (FITZGERALD, 1983; HANDWERKER *et al.*, 1984; SZOLCSANYI, 1984).

A capsaicina e seus análogos danificam os neurônios por dois mecanismos básicos. O primeiro está relacionado ao influxo de Ca^{++} e, provavelmente, envolve a ativação de enzimas dependentes de Ca^{++} , prejudicando as mitocôndrias. O segundo mecanismo, envolve o influxo de íons sódio através do canal catiônico ativado pela capsaicina. Este movimento iônico requer também o transporte passivo de íons cloreto. O influxo iônico é seguido pelo influxo de água que resulta na danificação celular por lise osmótica (BEVAN & SZOLCSANYI, 1990). Os axônios são mais susceptíveis à degeneração do que o corpo celular dos neurônios (SZOLCSANYI, 1990). Outros pesquisadores postularam que o tratamento neonatal com capsaicina danifica os neurônios através da redução do fator de crescimento do neurônio (KESSLER & BLACK, 1980; MILLER *et al.*, 1982; LINDSAY & HARMAR, 1989), tendo em vista que este fator trófico é essencial para a sobrevivência dos neurônios no gânglio da raiz dorsal, e regula a síntese dos neuropeptídeos e a sensibilidade à capsaicina (RUIT *et al.*, 1992). Esta bloqueia o transporte retrógrado do fator de crescimento do neurônio da periferia para o corpo do neurônio, onde os neuropeptídeos são sintetizados (TAYLOR, PIERAU, SZOLCSANYI, 1985).

A capsaicina tem a capacidade de influenciar as funções cardíacas (FUKUDA & FUJIWARA, 1969; MOLNAR *et al.*, 1969). Algumas ações da capsaicina no coração foram atribuídas à interação com canais de K⁺ (CASTLE, 1992), enquanto outras foram explicadas pela liberação de neuropeptídeos, principalmente CGRP, dos neurônios VSPA (FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1988; ONO *et al.*, 1989). Em coração isolado de cobaia, a administração de capsaicina em bolus, promove inicial efeito inibitório na força de contração, seguido de efeitos cardioestimulantes (FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1985), bem como evoca vasodilatação coronariana por liberação de CGRP (BRAIN *et al.*, 1985; FRANCO-CERECEDA & RUDEHILL, 1989; YAOITA *et al.*, 1994). As taquicininas também são liberadas pela capsaicina. A neurocinina A apresenta efeito cardioinibitório (LUNDBERG *et al.*, 1985) enquanto que a substância P é destituída de atividade cardíaca (LUNDBERG, HUA, FREDHOLM, 1984). Contrariamente, FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG (1988) relacionaram o efeito inibitório da capsaicina sobre a força de contração a uma ação não-colinérgica e independente da liberação de taquicininas. Além disso, um estudo recente mostra que a capsaicina pode diminuir a força de contração, a frequência cardíaca e o fluxo coronariano de coração isolado de rato por liberação de endotelina (SZOLCSANYI *et al.*, 1999). Portanto, a ação da capsaicina, como também a atuação do CGRP no coração não foram ainda bem esclarecidas.

Recentes estudos também propõem a possibilidade da capsaicina atuar diretamente em receptores vanilóides cardíacos (SZALLASI & BLUMBERG, 1999), uma vez que já foram reconhecidos e identificados receptores vanilóides em células não neuronais como cardiomiócitos e mastócitos de rato (CATERINA *et al.*, 1997; BIRÓ *et al.*, 1998). Embora estes receptores estejam presentes em tecidos não neuronais, ainda não são conhecidos os agonistas vanilóides endógenos (SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

1.2.4. NEUROTRANSMISSORES LIBERADOS DE NEURÔNIOS VSPA

Dentre os neuropeptídeos liberados dos terminais nervosos sensoriais, destacam-se as taquicininas e o CGRP (MAGGI, 1995a; HOLZER, 1998). Além desses peptídeos, outras substâncias biologicamente ativas foram detectadas e identificadas nos terminais nervosos VSPA e em processos inflamatórios de ordem neurogênica. Estes incluem opióides, polipeptídeo vasoativo intestinal, peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitário relacionado ao VIP, galanina, neurotensina, secretoneurina, fator liberador de corticotrofina, somatostatina, óxido nítrico e nucleotídeos purinérgicos (ATP, ADP e adenosina) (MAGGI, 1991; BRAIN, 1996; KHAKH & KENNEDY, 1998; HOLZER, 1998).

Taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) e antagonistas

A substância P, a neurocinina A e a neurocinina B pertencem à família das taquicininas. São também chamadas de neurocininas e possuem homologias estruturais entre si (MAGGI, 1995b).

Descoberta por VON EULER & GADDUM (1931), a substância P foi inicialmente isolada de extratos de cérebro e de intestino. Muitos anos depois, dois decapeptídeos semelhantes à substância P, denominados neurocinina A e neurocinina B, foram isolados do sistema nervoso central (KANGAWA *et al.*, 1983; KIMURA *et al.*, 1983).

As taquicininas exercem uma variedade de ações biológicas (PERNOW, 1983), muitas das quais são atribuídas à seqüência C-terminal e mediadas pelos seus respectivos receptores. Até o presente, foram identificados e descritos 3 receptores para as taquicininas, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G, denominados: NK₁, NK₂ e NK₃ (GUARD & WATSON, 1991). De acordo com os critérios de classificação, sabe-se que a substância P liga-se preferencialmente ao receptor NK₁, a neurocinina A ao receptor NK₂, e a neurocinina B ao receptor NK₃ (MAGGI & SCHWARTZ, 1997).

As taquicininas apresentam papel importante na transmissão da dor (GEPPETTI *et al.*, 1988), bem como efeito vasodilatador e hipotensor, mediado, principalmente, pelo óxido nítrico (WHITTLE, LOPES-BELMONTE, REES, 1989; MAGGI, 1995a).

Entretanto, em leito vascular mesentérico de rato, as taquicininas não exerceram efeito vasodilatador (BARJA, MATHISON, HUGGEL, 1983; KAWASAKI *et al.*, 1990a,b) e em coração isolado de rato, a substância P parece não modificar o tônus vascular (KULAKOWSKI *et al.*, 1983). Além disso, a substância P e a neurocinina A não reproduzem as respostas cardioestimulantes promovidas por estimulação elétrica ou por capsaicina (SAITO *et al.*, 1987; FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1988). Ao contrário, a neurocinina A possui efeitos inotrópico e cronotrópico negativos (FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1988). Os mesmos efeitos negativos são observados em corações isolados de cobaia quando a substância P é administrada. Estes efeitos são, bloqueados pela atropina, sugerindo que as ações cardíacas da substância P não são devidas à ativação direta de receptores seletivos de substância P no miocárdio (ou efeitos diretos em neurônios intracardíacos), mas ocorrem indiretamente através da liberação de acetilcolina (HOOVER, 1989; HOOVER & HANCOCK, 1988; ARMOUR, YUAN, BUTLER, 1990). Assim, os efeitos das taquicininas no sistema cardiovascular ainda são controversos e podem variar entre as espécies.

CGRP e antagonistas

O CGRP foi um dos primeiros neuropeptídeos descobertos através de técnicas de biologia molecular. Tanto no homem quanto no rato, foram isoladas duas isoformas moleculares do CGRP, denominadas CGRP- α e CGRP- β , sendo ambas semelhantes quanto à sua atividade biológica (LOTTI, HAUTMANN, PANCONESI, 1995; BRAIN, 1996). Este peptídeo é formado por 37 resíduos de aminoácidos resultante do processamento alternativo do gene da calcitonina (AMARA *et al.*, 1982; BRAIN *et al.*, 1985; HOLZER, 1988). A sequência N-terminal da molécula é responsável pela atividade agonista do neuropeptídeo (MAGGI *et al.*, 1990) e seus efeitos biológicos são dependentes da ativação de receptores específicos denominados CGRP₁ ou CGRP₂ (SIGRIST *et al.*, 1986; DENNIS *et al.*, 1989).

O CGRP causa vasodilatação por ativação de receptores do tipo CGRP₁ (DENNIS *et al.*, 1989). O efeito vasodilatador é, aparentemente, independente de endotélio (óxido nítrico) e, provavelmente, mediado pelo acúmulo de AMP cíclico na musculatura lisa

(GREENBERG, RHODEN, BARNES, 1987; HUGGES & BRAIN, 1994). Entretanto, em certos vasos, especialmente nas grandes artérias (aorta de rato), demonstrou-se que a vasodilatação induzida pelo CGRP é dependente do endotélio (GRACE *et al.*, 1987; FISCUS *et al.*, 1991; GRAY & MARSHALL, 1992; HOLZER, 1992). O relaxamento induzido pelo CGRP pode ainda envolver canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}). Segundo QUAYLE *et al.* (1994), o CGRP estimula a adenilato ciclase, a qual promove aumento do AMP cíclico e conseqüente ativação da proteína quinase A em musculatura lisa arterial resultando em ativação dos canais de K_{ATP} .

No coração, o CGRP é o principal neurotransmissor dos neurônios VSPA responsável pelos efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos (RUBINO & BURNSTOCK, 1996; SIGRIST *et al.*, 1986; FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1985; FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1988). Átrios de cobaias apresentaram respostas cronotrópicas positivas quando estimulados eletricamente. Estas respostas são mimetizadas quando da adição de CGRP no banho de incubação. Além disso, o pré-tratamento com capsaicina previne a resposta cronotrópica induzida pela estimulação elétrica (SAITO, KIMURA, GOTO, 1986; SAITO *et al.*, 1987).

Os efeitos mais importantes observados após a administração intravenosa de CGRP em animais envolvem alterações hemodinâmicas, tais como hipotensão, taquicardia e aumento de fluxo sanguíneo em diversos leitos vasculares. A estimulação da adenilato ciclase acoplada aos receptores de CGRP induz elevação de AMP cíclico e influxo de cálcio com conseqüente aumento da força de contração e ritmo cardíaco (ISHIKAWA *et al.*, 1987, 1988; ONO *et al.*, 1989). Em miócitos atriais isolados de sapo e cobaia, o CGRP aumenta o influxo de K^+ e de Ca^{++} via canais do tipo-L (ONO *et al.*, 1989; ONO & GILES, 1991). O efeito cronotrópico desencadeado pelo CGRP não envolve ativação dos receptores β adrenérgicos cardíacos, sendo, portanto, um transmissor excitatório NANC seletivo nos tecidos atriais do coração (FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1988; MANTELLI *et al.*, 1992).

Elevados níveis de CGRP foram detectados em átrio direito, seguido pelo esquerdo e pelos ventrículos direito e esquerdo, tanto em cobaias, como em ratos (MULDERRY *et al.*, 1985; SIGRIST *et al.*, 1986; FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1987,

1988). Os nodos sinoatrial e atrioventricular são também ricos em fibras contendo CGRP (WHARTON *et al.*, 1981a). Assim, a resposta cardioexcitatória da capsaicina e do CGRP é mais pronunciada para a frequência cardíaca do que para a força de contração no miocárdio ventricular (FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1985; RIGEL *et al.*, 1989).

Cobaias adultas pré-tratadas com capsaicina mostraram redução nos níveis de CGRP de aproximadamente 70% no coração e 60% no corno dorsal da medula espinhal (FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1987). Em ratos neonatos, o tratamento com capsaicina induz depleção de cerca de 50% do conteúdo de CGRP no tecido cardíaco (WIMALAWANSA, 1993; ZANESCO *et al.*, 1999).

Estudos imunohistoquímicos revelaram que, apesar da seqüência C-terminal do CGRP apresentar alta afinidade pelos seus receptores, estes fragmentos não possuem atividade intrínseca, ou seja, não desencadeiam qualquer ação farmacológica (MAGGI, CHIBA, GIULIANI, 1991). Assim, fragmentos das seqüências C-terminal do CGRP foram desenvolvidos e, atualmente, são empregados como antagonistas competitivos dos subtipos de receptores CGRP₁ e CGRP₂. Tais antagonistas incluem o CGRP₈₋₃₇, CGRP₁₂₋₃₇, Tyr⁰-CGRP₂₈₋₃₇ e BIBN4096BS (CHIBA *et al.*, 1989; DENNIS *et al.*, 1989; MAGGI *et al.*, 1991; DOODS *et al.*, 2000).

1.2.5. RELAÇÃO MODULATÓRIA ENTRE NEURÔNIOS AUTONÔMICOS E VSPA

Trabalhos prévios demonstraram que o CGRP possui ação inibitória direta na fibra parassimpática, enquanto que a acetilcolina através da ativação dos receptores nicotínicos presentes na fibra sensorial estimula a liberação de seus neuropeptídeos em coração e vasos de diferentes espécies. Assim, é proposto uma interação bidirecional entre as fibras sensoriais e as fibras parassimpáticas (FJALLBRANDT & IGGO, 1961; PARKHOUSE & LEQUESNE, 1988; RALEVIC *et al.*, 1992).

Diferentemente da interação entre as fibras parassimpáticas e fibras sensoriais, a interação entre as fibras simpáticas e as fibras sensoriais é unidirecional. Vários trabalhos mostram que as fibras simpáticas modulam a liberação dos neuropeptídeos da terminação sensorial. KESSLER, BELL, BLACK (1983) demonstraram que a simpatectomia em ratos

neonatos resulta em aumento da expressão gênica de CGRP e da liberação deste neuropeptídeo em diversos tecidos, tais como a íris e o miocárdio atrial de rato. Assim, a neurotransmissão dos neurônios sensoriais parece ser regulada pela noradrenalina e possivelmente por substâncias co-estocadas nas vesículas simpáticas como o neuropeptídeo Y e purinas (ATP) via receptores específicos pré-juncionais das fibras VSPA (AMERINI *et al.*, 1991, 1992; RUBINO *et al.*, 1992; RUBINO, RALEVIC, BURNSTOCK, 1993). Em leito mesentérico vascular de rato, bem como em artéria pulmonar de cobaia, a liberação de neuropeptídeos pelos neurônios VSPA é inibida pelo neuropeptídeo Y e pela noradrenalina, através, respectivamente, da ativação de receptores de neuropeptídeo Y e de adrenoceptores α_2 pré-juncionais presentes nas fibras VSPA (KAWASAKI *et al.*, 1990a; BUTLER *et al.*, 1993).

A modulação das fibras simpáticas pela inervação sensorial não foi demonstrada. Diversos trabalhos mostram que o tratamento neonatal de ratos ou cobaias com capsacina não provoca qualquer alteração na sensibilidade da resposta cronotrópica mediada pelos adrenoceptores β (FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1988; FIKE *et al.*, 1992; RUBINO *et al.*, 1993; ZANESCO *et al.*, 1999). Assim, a ausência de interação bidirecional entre as fibras simpáticas e fibras sensoriais não está completamente esclarecida, mas poderia ser devida a dois fatores. Primeiro, todos esses estudos foram realizados em animais adultos, ou seja, 3 a 4 meses após o tratamento com capsacina. Segundo, uma possível reinervação das fibras sensoriais pode estar ocorrendo no animal adulto, tendo em vista que, a reinervação das fibras sensoriais foi descrita em animais submetidos ao tratamento com capsacina.

Portanto, a proposta desse trabalho foi investigar a existência de uma possível interação entre a inervação sensorial e simpática em ratos jovens (30 dias), adulto-jovem (60 dias) e adultos (90 dias) tratados com capsacina no período neonatal.

1.3. OBJETIVOS

A participação dos neurônios VSPA na dinâmica cardiovascular e nas cardiopatias ainda é pouco compreendida. Partindo desta premissa, o objetivo geral desse estudo foi investigar o papel dos neurônios VSPA na fisiologia cardíaca de ratos. Os objetivos específicos foram:

Em átrios isolados

- Avaliar as respostas cronotrópicas de átrios direitos isolados de ratos controles e pré-tratados com capsaicina no período neonatal. Foram obtidas curvas concentração-efeito aos agonistas: isoproterenol, carbacol, pilocarpina e CGRP;
- avaliar as ações da capsaicina, adicionada exogenamente, na ausência e na presença do antagonista de receptor para CGRP (CGRP₈₋₃₇), em preparações de átrios direitos isolados de animais controles e pré-tratados com capsaicina no período neonatal.

Em corações isolados

- Avaliar a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo coronariano em corações isolados de ratos controles e de ratos pré-tratados com capsaicina na idade neonatal, em resposta ao isoproterenol e à capsaicina, bem como avaliar as alterações de fluxo coronariano em resposta à fenilefrina;
- avaliar o grau de depleção do CGRP dos neurônios VSPA pelo tratamento neonatal com capsaicina, através da quantificação de CGRP em tecido cardíaco pela técnica de ELISA (imunoenzimática).

2- Material e Métodos

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP, Campinas-SP). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de uso de animais de laboratório, regidos pela Universidade Estadual de Campinas. Durante o período de permanência no biotério, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

2.2. RATOS NEONATOS TRATADOS COM CAPSAICINA

O tratamento de ratos neonatos com capsaicina foi realizado de acordo com JANCSÓ *et al.* (1977). No segundo dia de vida, os ratos de ambos os sexos (7-8 g) foram anestesiados superficialmente com halotano e injetados subcutaneamente, na região dorsal, com dose única de capsaicina (50 mg/Kg, 100 µl). Os ratos controle receberam injeção subcutânea de 100 µl do veículo (10% de etanol e 10% de Tween 80, em solução de NaCl a 0,9%). Após o tratamento, os ratos foram mantidos aquecidos e sob observação por 1 hora, quando, então, foram colocados junto às respectivas mães, e retornaram ao biotério de manutenção. Os ratos foram amamentados até o 21^o dia de vida e, então, separados da mãe e alojados em gaiolas coletivas, separados por sexo. Os animais foram utilizados aleatoriamente para os diversos protocolos em diferentes tempos pós-tratamento (30, 60 e/ou 90 dias).

2.3. ÁTRIOS DIREITOS ISOLADOS

Os ratos foram anestesiados com halotano e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, os corações foram removidos e colocados em solução de Krebs Ringer bicarbonato composto por (mM): NaCl, 124,0; KCl, 4,75; MgSO₄, 1,30; CaCl₂, 2,25; NaHCO₃, 25,0; NaH₂PO₄, 0,6; glicose, 10,0; ascorbato, 0,3 e EDTA, 0,03. Nesta solução, o ascorbato e o EDTA foram adicionados a fim de evitar a oxidação e metabolização das catecolaminas (HUGHES & SMITH, 1978). Os átrios direitos foram isolados e montados em cubas para tecido isolado (20 ml volume) preenchidas com a

solução de Krebs Ringer bicarbonato que foi continuamente aerada com O₂: CO₂ (95:5 %), mantida à temperatura de 36,5°C e cujo pH variou entre 7,3 e 7,5.

2.3.1. OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO

As curvas concentração-efeito (efeitos cronotrópicos positivo ou negativo) aos agonistas isoproterenol, carbacol, pilocarpina e CGRP foram obtidas em átrios de ratos controles ou pré-tratados com capsaicina, por meio da adição cumulativa de concentrações crescentes do agonista, em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963).

Os efeitos dos agonistas sobre os batimentos espontâneos dos átrios direitos foram avaliados pelo aumento ou diminuição da frequência de batimentos. Os dados obtidos foram avaliados segundo a equação descrita a seguir:

$$E = E_{\text{máx}} / ((1 + (10^x / 10^{\text{EC}_{50}})^n) + \Phi)$$

A letra E representa o aumento da frequência dos batimentos atriais em resposta ao agonista (efeito); E_{máx} representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC₅₀, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida e, finalmente, o símbolo Φ representa a frequência de batimentos atriais observada na ausência do agonista.

A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros E_{máx}, log EC₅₀ e n foi obtida utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), considerando-se o valor basal da frequência de batimentos atriais igual a zero (Φ = zero).

2.4. CORAÇÕES ISOLADOS (LANGENDORFF)

Os ratos foram anestesiados com halotano e, para evitar o surgimento de trombozes nas artérias coronarianas durante a retirada do coração, os animais foram tratados previamente (5 min) com heparina (500 UI/Kg, i.p.), para posterior toracotomia bilateral (DÖRING & DEHNERT, 1988). O princípio deste método consiste em perfundir o coração através de um sistema de pressão de perfusão conectado à aorta (Figura 4). Assim, os corações foram rapidamente removidos com aproximadamente 1 cm de aorta, na qual foi inserida uma cânula conectada ao sistema (Figura 5).

Para perfusão do coração isolado, foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit composto por (mM): NaCl, 188,0; NaHCO₃, 25,0; glicose, 11,1; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O, 1,17 e CaCl₂.6H₂O, 2,5. A solução de perfusão foi continuamente aerada com O₂ : CO₂ (95:5 %) a 37°C e o sistema foi mantido sob pressão constante de 65 mmHg.

Através de uma pequena incisão no átrio esquerdo foi introduzido um balão de látex acoplado a uma cânula (PE 160), atravessando o orifício mitral até atingir o ventrículo esquerdo (Figura 5). Esta cânula foi então acoplada ao transdutor de pressão (marca Ugo Basile), para obtenção dos registros de pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) e de frequência cardíaca, através de um polígrafo (Gemini 7070). O fluxo coronariano foi medido, coletando-se o efluente coronariano, em intervalos regulares de tempo.

Os parâmetros cardíacos: pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, frequência cardíaca e fluxo coronariano foram monitorados antes da injeção dos agonistas (tempo 0 - basal) e em intervalos de 0,25, 1, 5 e 10 minutos após a injeção. O volume máximo dos agonistas injetados nos corações isolados não ultrapassou 100 µl. A fisiologia de corações isolados de ratos controles e de ratos pré-tratados com capsaicina foi avaliada pela administração intraórtica do isoproterenol (agonista β-adrenérgico não-seletivo) e de capsaicina. O fluxo coronariano foi avaliado em resposta à fenilefrina (agonista seletivo de adrenoceptores α₁).

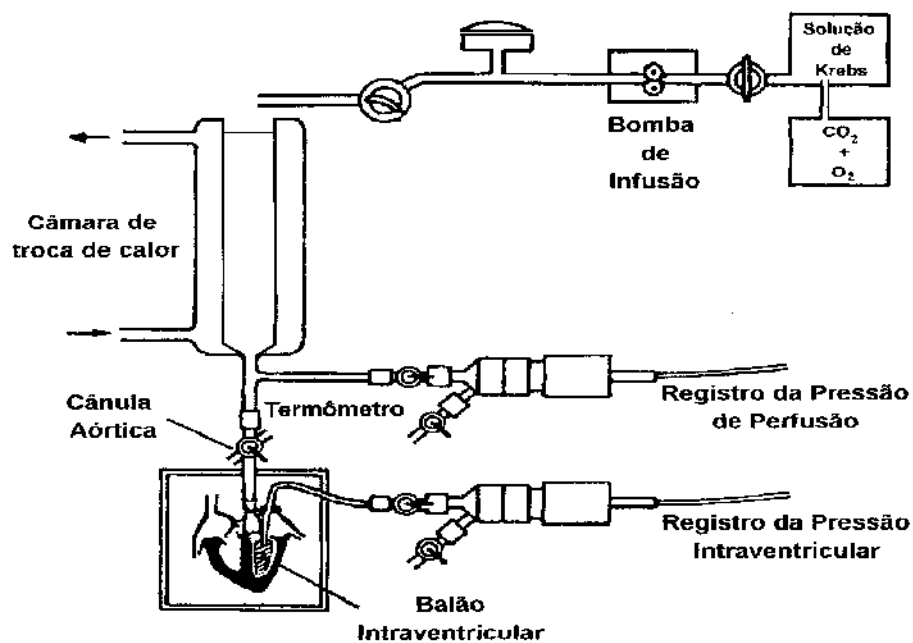


Figura 4. Sistema de perfusão de coração pelo método de Langendorff

Adaptado (DÖRING & DEHNERT, 1988)

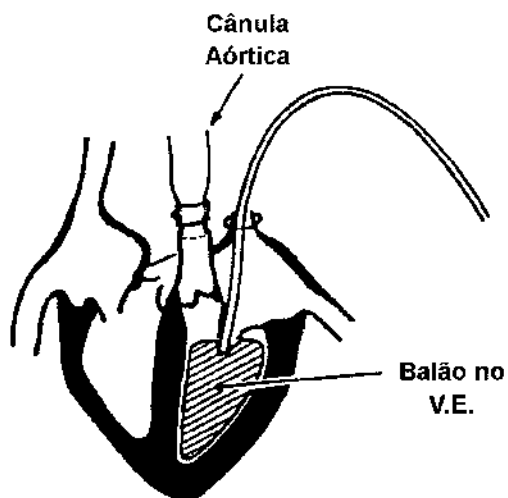


Figura 5. Balão inserido na cavidade ventricular

Adaptado (DÖRING & DEHNERT, 1988)

2.5. DOSAGEM DE CGRP EM TECIDO CARDÍACO

A dosagem de CGRP, pelo método de ELISA foi empregada com o intuito de avaliar a eficácia do tratamento neonatal com capsaicina e de quantificar o grau de depleção dos neuropeptídeos no tecido cardíaco. Assim, foram utilizados corações de ratos Wistar controles e de ratos tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados após 30, 60 e 90 dias do tratamento.

Os animais foram anestesiados com halotano. Os corações foram rapidamente removidos, com aproximadamente 1 cm de aorta, e perfundidos por aproximadamente 10 min (tempo necessário para eliminação de sangue do órgão), através de um sistema de pressão de perfusão constante de 65 mmHg conectado à aorta. Para perfusão do coração isolado, foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit a 37°C, continuamente aerada com O₂: CO₂ (95:5 %) e composta por (mM): NaCl, 188,0; NaHCO₃, 25,0; glicose, 11,1; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O, 1,17; CaCl₂.6H₂O, 2,5; EDTA, 5,0; DTT, 0,5 e captopril, 0,005. Nesta solução, o EDTA, DTT e captopril foram adicionados com o propósito de evitar a oxidação e destruição dos neuropeptídeos. Após a perfusão, os corações foram congelados em nitrogênio líquido e conservados em refrigeração até a sua utilização.

Os tecidos foram descongelados, pesados e homogeneizados em 20 ml de solução de ácido acético 1 M. O homogenato foi aquecido à 95°C por 10 min, centrifugado a 4000 rpm, por 45 min, a 4°C, e o sobrenadante foi liofilizado. As amostras liofilizadas foram reconstituídas em um total de 20 ml de 1:4 de solução de ácido acético a 4%, e novamente centrifugadas a 4000 rpm, por 30 min, a 4°C, para obtenção de um sobrenadante límpido. O sobrenadante foi purificado por meio de passagem por colunas de cromatografia de fase reversa (3 ml, C-18), previamente ativadas com 5 ml de metanol, 10 ml de uréia 8 M e 10 ml de água Milli-Q. Após a passagem das amostras através das colunas, estas foram lavadas com 10 ml de ácido acético concentrado, e eluídas com 3 ml de uma solução contendo metanol:ácido acético (90:10, v/v). O volume eluído foi seco através da evaporação em banho-maria a 37°C, com auxílio de nitrogênio.

As amostras foram reconstituídas em tampão, utilizando-se o kit comercial para a dosagem de CGRP (Cayman, EUA). A placa de 96 poços foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (300 µl/poço) e montada segundo indicação do fabricante. A mesma foi coberta

com filme plástico, e incubada a 4°C, por 16-20 horas. A seguir, a placa foi lavada 6 vezes com tampão de lavagem e 200 µl de reagente Ellman's foi acrescentado a cada poço. A placa foi coberta com papel alumínio, para proteção contra luz, e agitada durante 30-60 min. A leitura da placa foi realizada por leitor de ELISA em comprimento de onda de 410 nm para CGRP.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão das médias (E.P.M). O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises estatísticas. Teste 't' de Student pareado e não-pareado e a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni foram utilizados para comparações múltiplas de variáveis independentes. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3- Resultados

3.1. ÁTRIOS ISOLADOS

3.1.1. FREQUÊNCIA BASAL

A frequência dos batimentos espontâneos não foi afetada pelo tratamento neonatal com capsaicina em nenhum dos tempos estudados. Porém, as frequências basais dos animais sacrificados aos 30 dias de idade foram significativamente maiores do que as dos animais mais velhos (60 e 90 dias), para ambos os grupos, controles e pré-tratados com capsaicina (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos batimentos espontâneos atriais (bpm) de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle	Tratado
30 DIAS	316 ± 6 *	311 ± 7 *
60 DIAS	279 ± 8	277 ± 6
90 DIAS	289 ± 8	282 ± 8

Os dados estão representados como médias ± E.P.M.

* P< 0,05, comparação com 60 e 90 dias, de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

3.1.2. ISOPROTERENOL

O tratamento de ratos neonatos com capsaicina determinou dessensibilização, de cerca de 4 vezes ($P < 0,05$), da resposta cronotrópica ao isoproterenol em átrios direitos de ratos sacrificados 30 dias após o tratamento. No entanto, essa subsensibilidade ao isoproterenol não foi observada quando os animais foram sacrificados 60 e 90 dias após o tratamento com capsaicina (Figura 6).

Além disso, a potência (pEC_{50}) do isoproterenol em átrios direitos de animais sacrificados 30 dias após tratamento foi menor em relação aos demais tempos estudados (60 e 90 dias) (Tabela 2). A resposta máxima ao isoproterenol não foi afetada pelo tratamento com capsaicina em quaisquer dos grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 2. Potência (pEC_{50}) do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle	N	Tratado	Desvio ^a	N
30 DIAS	8,72 ± 0,17	5	8,18 ± 0,13 ^{*#}	3,5	8
60 DIAS	8,81 ± 0,12	6	8,90 ± 0,11	1,2	6
90 DIAS	9,06 ± 0,09	6	8,94 ± 0,10	1,3	7

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

^a Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC_{50} do grupo tratado com capsaicina e seu respectivo grupo controle.

* $P < 0,05$, comparação dos valores da pEC_{50} com o respectivo grupo controle, de acordo com o teste *t* de Student não pareado.

$P < 0,05$, comparação dos valores da pEC_{50} entre os grupos de 30, 60 e 90 dias após o tratamento com capsaicina, de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Tabela 3. Respostas máximas (bpm) do isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle	N	Tratado	N
30 DIAS	122 ± 16	5	125 ± 19	8
60 DIAS	107 ± 10	6	147 ± 26	6
90 DIAS	133 ± 13	6	153 ± 16	7

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

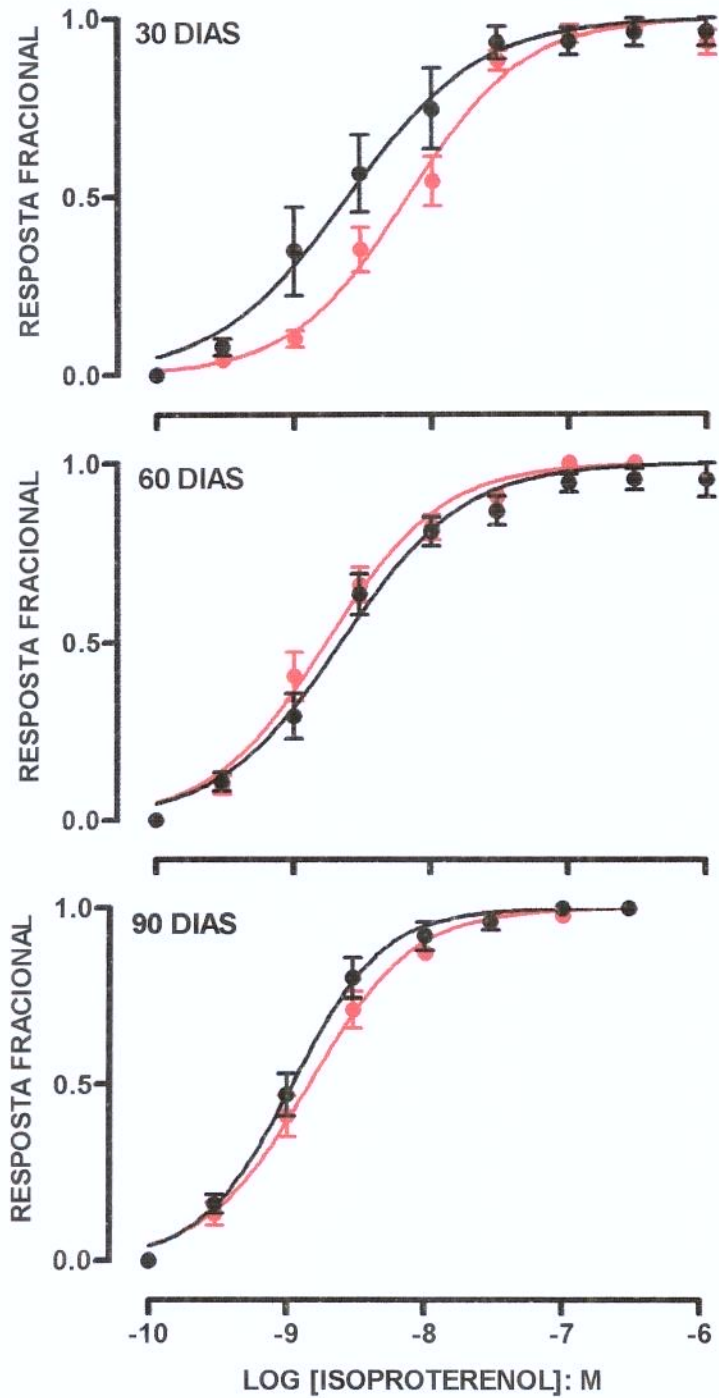


Figura 6. Curvas concentração-resposta ao isoproterenol em átrios direitos isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 5 a 8 experimentos.

3.1.3. CARBACOL

A potência e a resposta máxima do carbacol em átrios direitos isolados não foram afetadas pelo tratamento neonatal com capsaicina, tanto aos 30 quanto aos 60 dias após tratamento (Tabela 4, Figura 7).

Tabela 4. Potência (pEC_{50}) e respostas máximas ($E_{máx}$, bpm) do carbacol em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle		Tratado	
	pEC_{50}	$E_{máx}$	pEC_{50}	$E_{máx}$
30 DIAS	$6,43 \pm 0,09$	-193 ± 31	$6,57 \pm 0,04$	-125 ± 17
60 DIAS	$6,56 \pm 0,08$	-225 ± 15	$6,75 \pm 0,10$	-157 ± 35

Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6-9 experimentos.

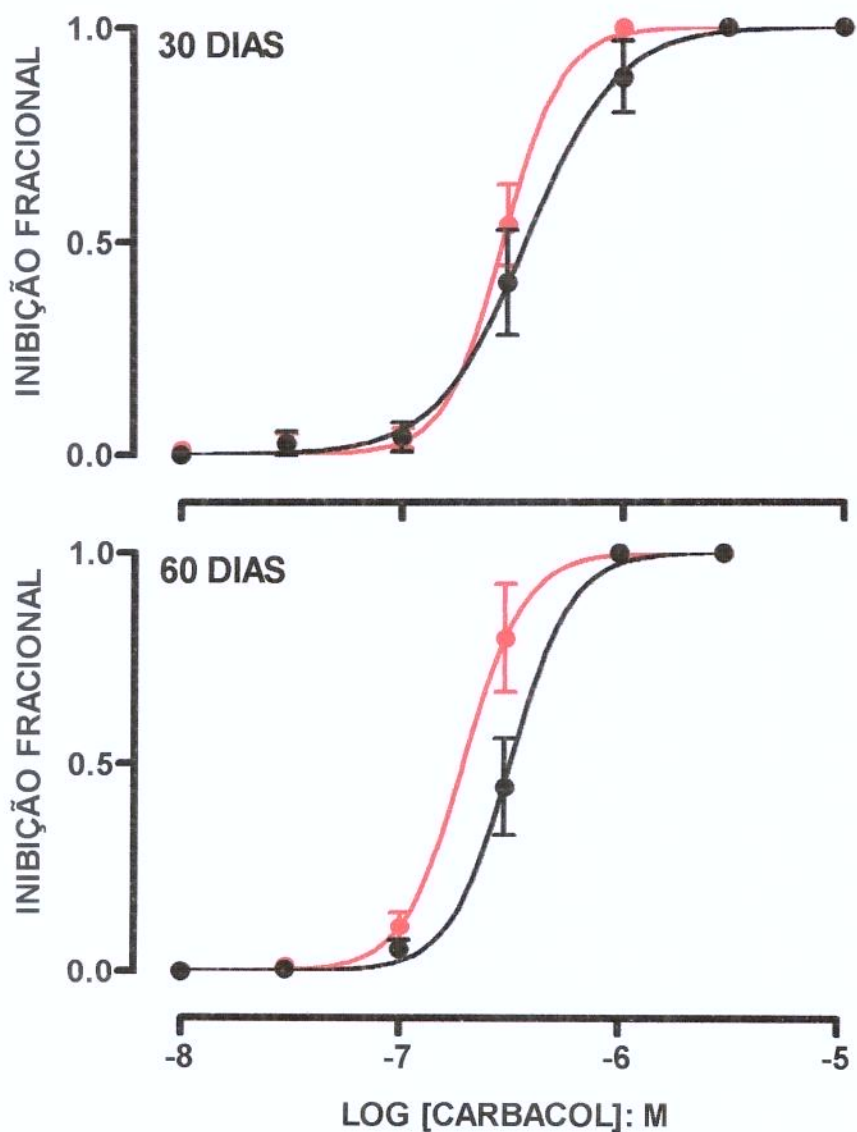


Figura 7. Curvas concentração-resposta ao carbachol em átrios direitos isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 9 experimentos.

3.1.4. PILOCARPINA

A potência e a eficácia da pilocarpina em átrios direitos isolados não foram afetadas pelo tratamento neonatal com capsaicina, tanto aos 30 quanto aos 60 dias após tratamento (Tabela 5, Figura 8).

Tabela 5. Potência (pEC_{50}) e respostas máximas ($E_{máx}$, bpm) da pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle		Tratado	
	pEC_{50}	$E_{máx}$	pEC_{50}	$E_{máx}$
30 DIAS	$5,42 \pm 0,10$	-87 ± 7	$5,47 \pm 0,04$	-73 ± 6
60 DIAS	$5,68 \pm 0,08$	-68 ± 4	$5,53 \pm 0,03$	-58 ± 5

Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6-9 experimentos.

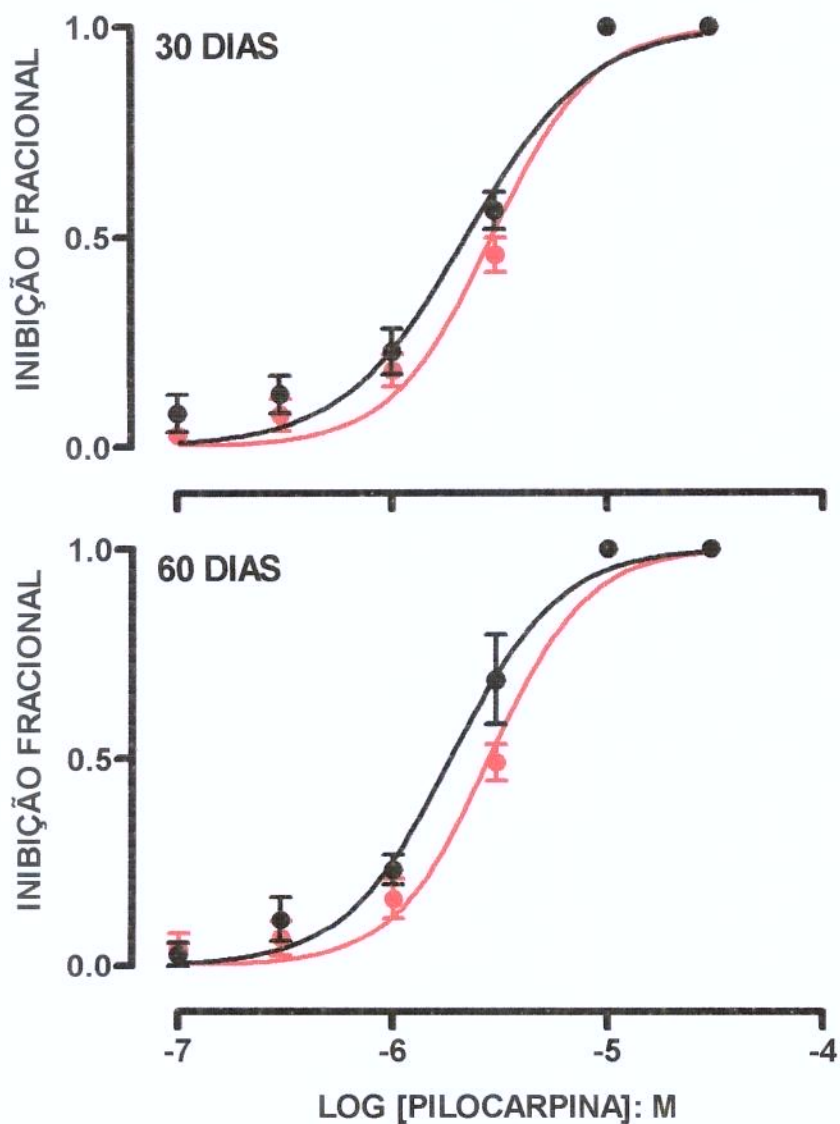


Figura 8. Curvas concentração-resposta à pilocarpina em átrios direitos isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 30 e 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 9 experimentos.

3.1.5. CGRP

A resposta cronotrópica positiva ao agonista CGRP em átrios direitos isolados não foi afetada 30, 60 ou 90 dias após tratamento com capsaicina em relação aos respectivos animais controles. Curiosamente, observamos que a potência do CGRP nos animais sacrificados após 30 dias, para ambos os grupos, foi significativamente maior (cerca de 6 vezes) quando comparada com os animais sacrificados após 60 e 90 dias (Tabela 6, Figura 9).

Tabela 6. Potência (pEC_{50}) do CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle	N	Tratado	Desvio ^a	N
30 DIAS	8,71 ± 0,10*	6	8,74 ± 0,10*	1,1	7
60 DIAS	7,90 ± 0,11	9	8,06 ± 0,10	1,4	10
90 DIAS	7,95 ± 0,19	6	8,00 ± 0,10	1,1	8

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

^a Antilogaritmo da diferença entre os valores da pEC_{50} do grupo tratado com capsaicina e seu respectivo grupo controle.

* $P < 0,05$, comparação com os animais sacrificados com 60 e 90 dias de idade, de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

A eficácia do CGRP nos átrios de animais controle com 90 dias de idade foi significativamente menor quando comparada com os animais sacrificados aos 30 e 60 dias. Essa diferença não foi estatisticamente significativa para os animais tratados com capsaicina, apesar de mostrar uma tendência de diminuição da resposta máxima similar aos animais do grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7. Respostas máximas (bpm) do CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles ou tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento.

GRUPOS	Controle	N	Tratado	N
30 DIAS	92 ± 5	6	80 ± 7	7
60 DIAS	73 ± 6	9	67 ± 5	10
90 DIAS	50 ± 7*	7	66 ± 7	8

Os dados estão representados como médias ± E.P.M. para N experimentos.

* P < 0,05, comparação com os animais controle sacrificados após 30 e 60 dias do tratamento, de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

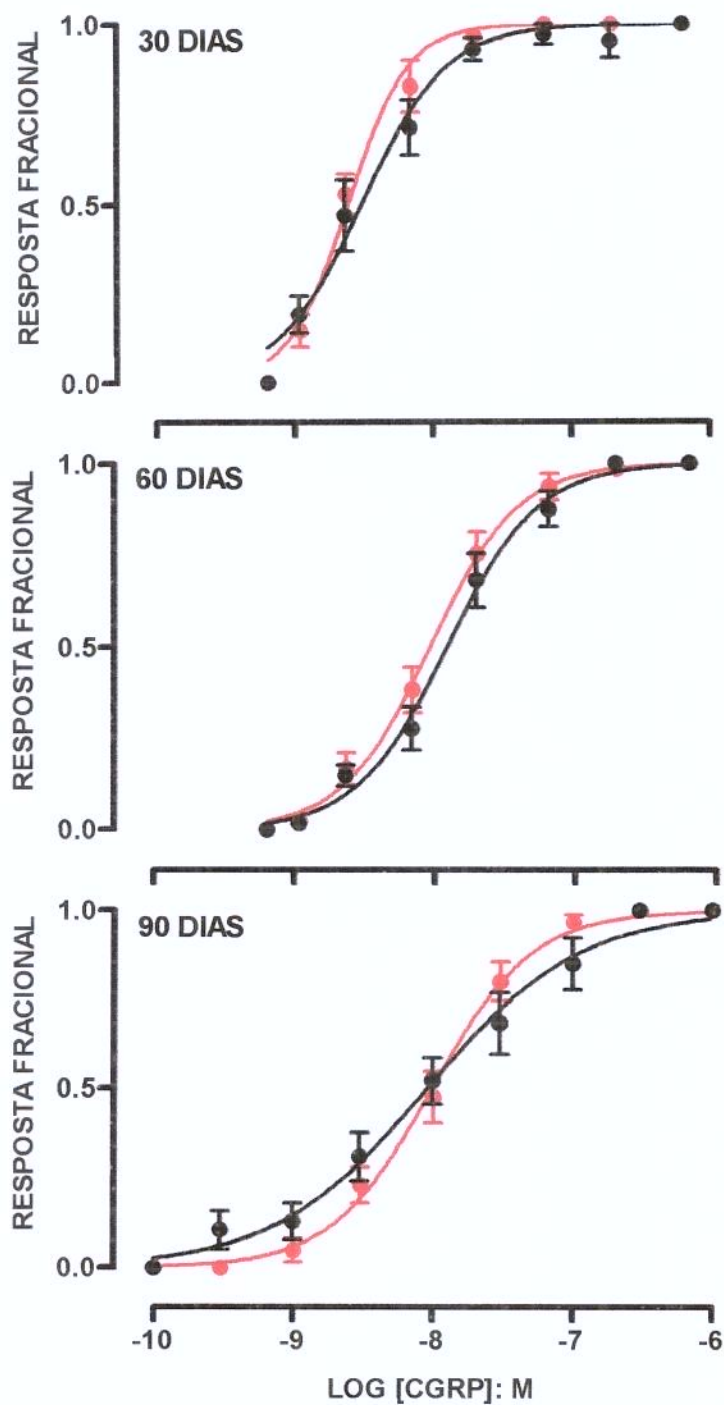


Figura 9. Curvas concentração-resposta ao CGRP em átrios direitos isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 10 experimentos.

3.1.6. CAPSAICINA

A adição exógena de capsaicina (1 μM) ao banho provocou cronotropismo positivo nos átrios direitos isolados de ratos. Nos animais sacrificados com 30 dias de idade esse cronotropismo foi semelhante para ambos os grupos, controle e tratado. Entretanto, essa resposta cronotrópica positiva foi significativamente atenuada nos animais tratados com capsaicina de 60 e 90 dias de idade, quando comparados com seus respectivos controles. Semelhante ao observado na resposta cronotrópica ao CGRP, os átrios isolados de animais com 90 dias de idade foram menos responsivos à capsaicina quando comparados com os animais de 30 ou 60 dias de idade. O antagonista CGRP₈₋₃₇ (1 μM) antagonizou as respostas cronotrópicas à capsaicina em átrios direitos isolados, de maneira similar em todos os grupos estudados (Figura 10).

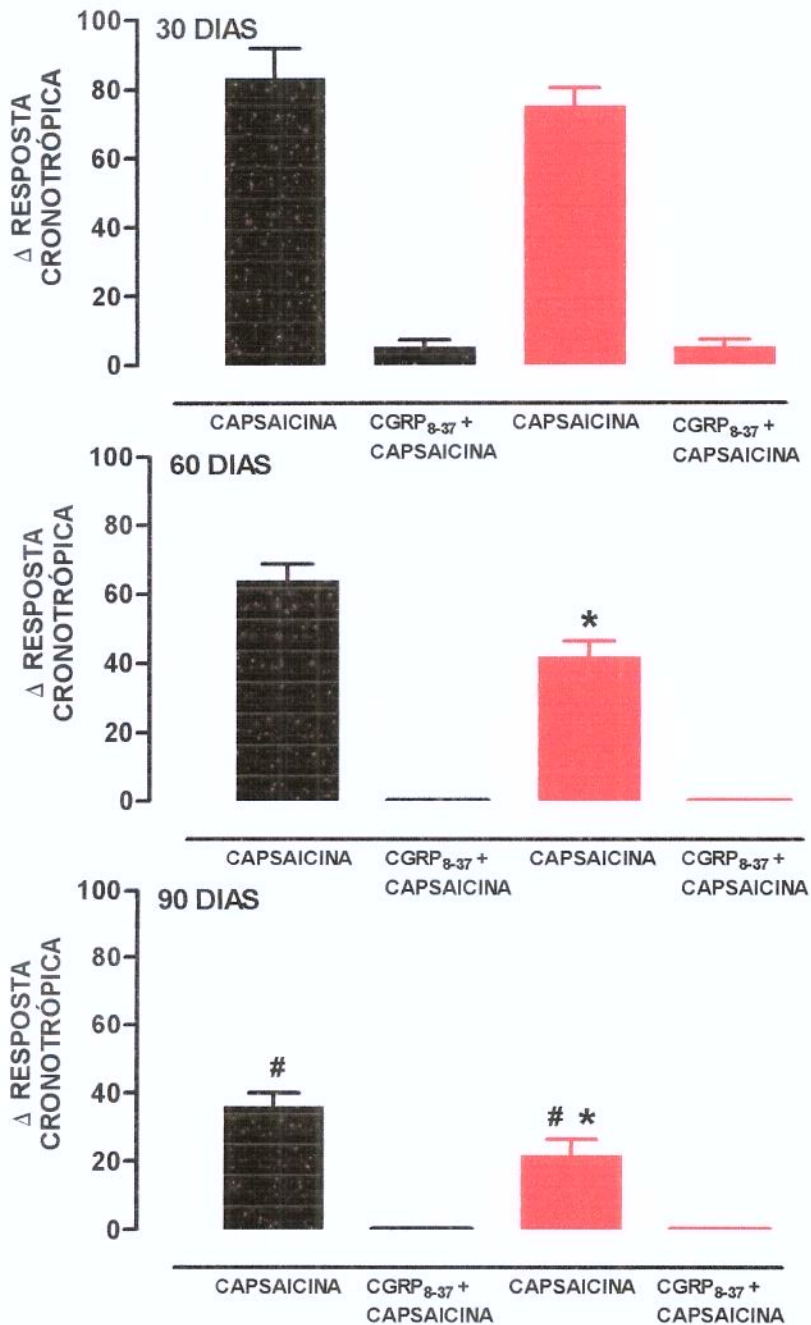


Figura 10. Resposta cronotrópica (bpm) à capsaicina (1 μ M) antes e após a adição do antagonista de receptores para CGRP (CGRP₈₋₃₇) em átrios direitos isolados de ratos controles (■) ou tratados com capsaicina (■) no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 8 experimentos.* P < 0,05 comparado ao seu respectivo controle; # P < 0,05 comparação com 30 e 60 dias.

3.2. CORAÇÕES ISOLADOS

3.2.1. FLUXO CORONARIANO BASAL

O fluxo coronariano basal dos animais tratados com capsaicina e sacrificados 60 dias após tratamento mostrou-se significativamente atenuado quando comparado com o fluxo coronariano basal do seu respectivo grupo controle. Após 90 dias do tratamento com capsaicina, o fluxo coronariano basal foi semelhante ao seu respectivo grupo controle (Figura 11).

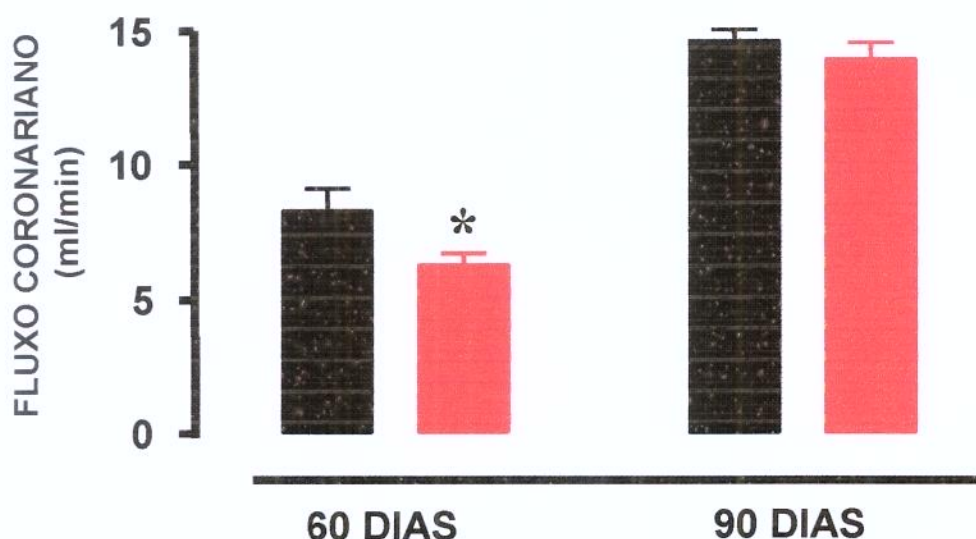


Figura 11. Fluxo coronariano basal de corações isolados de ratos controles (■) ou tratados com capsaicina (■) no período neonatal e sacrificados 60 e 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos. * $P < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle.

3.2.2. ALTERAÇÕES DO FLUXO CORONARIANO EM RESPOSTA À FENILEFRINA

A injeção do agonista α adrenérgico, fenilefrina (0,01 - 0,1 μ g, bolus) causou redução dose-dependente do fluxo coronariano de corações isolados de ratos controles, sacrificados aos 60 e 90 dias (Figuras 12 e 13, respectivamente). Entretanto, o tratamento neonatal com capsaicina não afetou significativamente a diminuição do fluxo coronariano em corações isolados de ratos sacrificados aos 60 e 90 dias após o tratamento (Figuras 12 e 13, respectivamente).

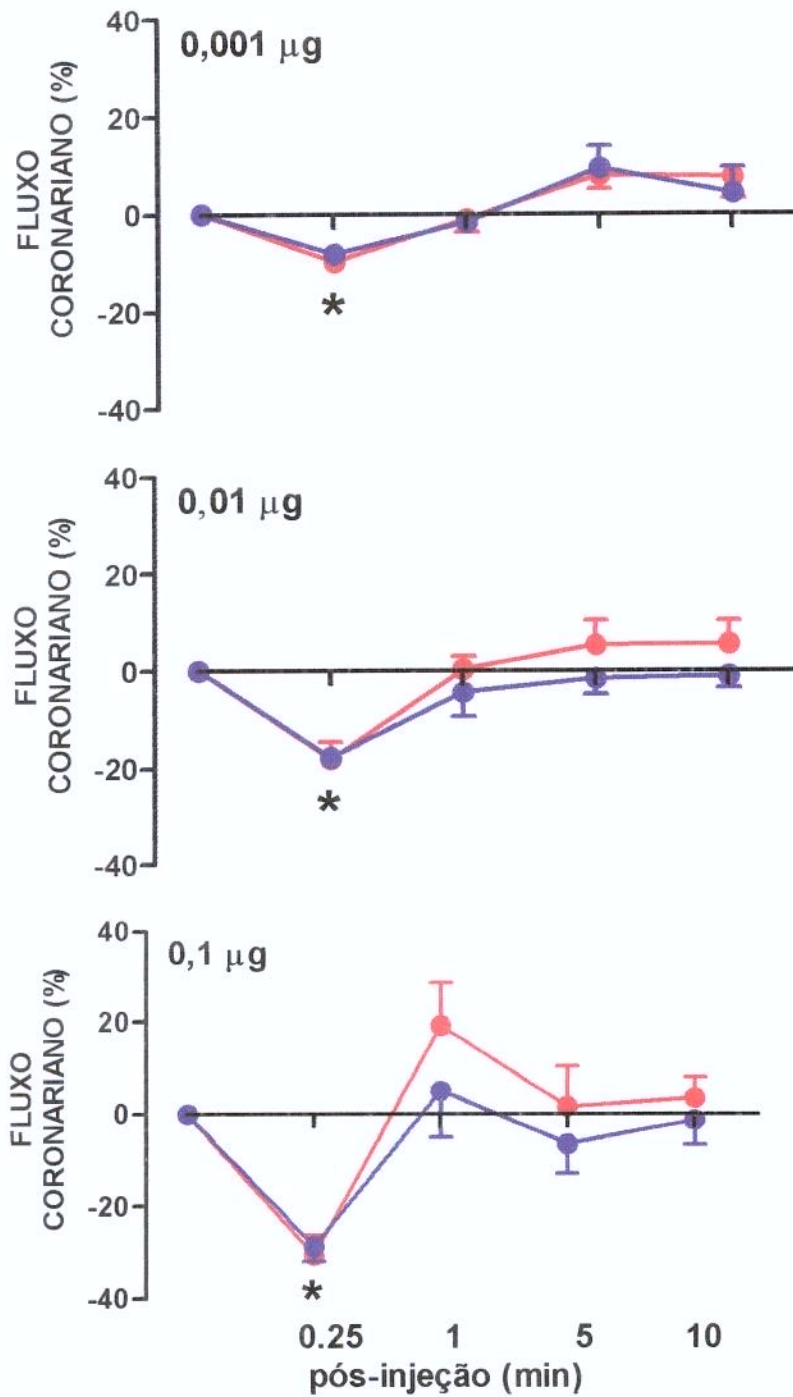


Figura 12. Alterações do fluxo coronariano em resposta a três doses de fenilefrina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

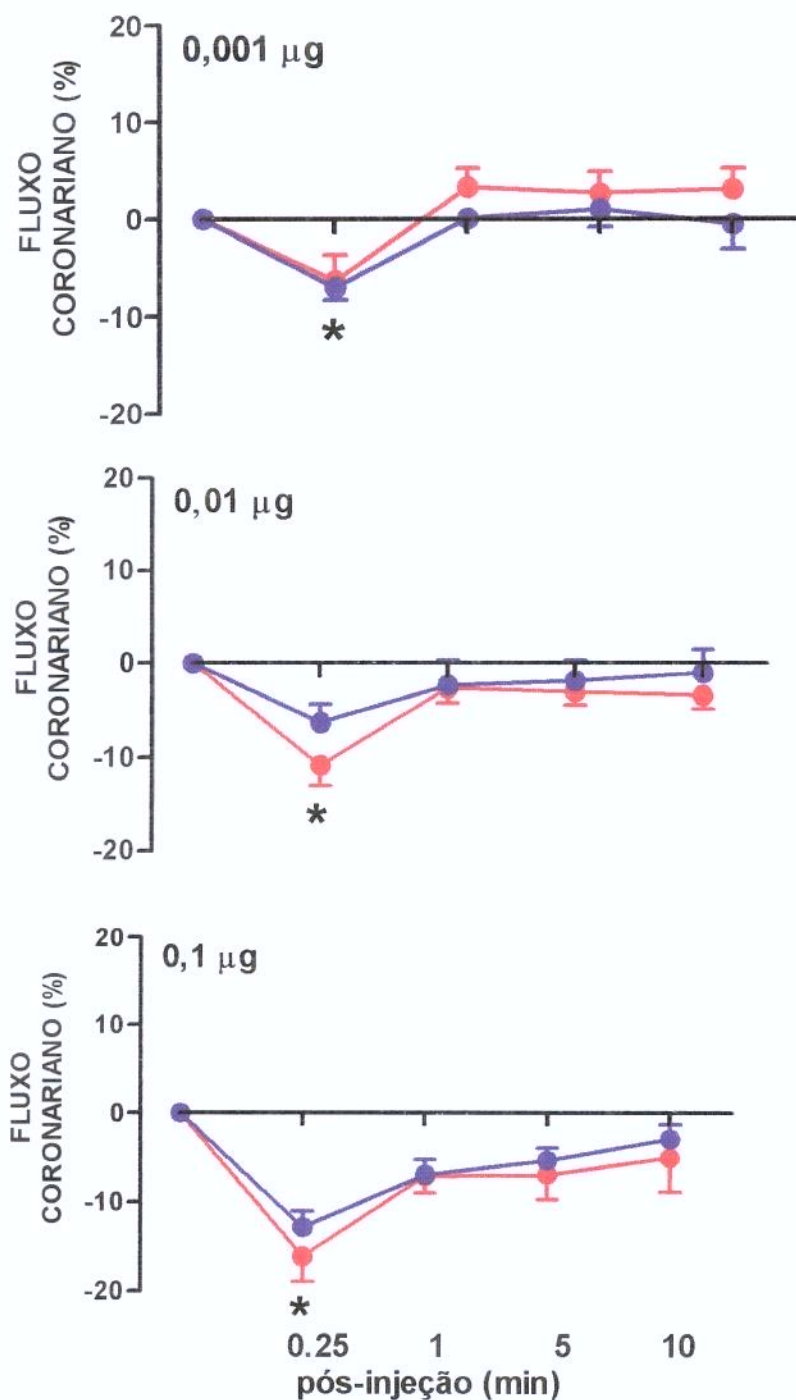


Figura 13. Alterações do fluxo coronariano em resposta a três doses de fenilefrina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

3.2.3. FLUXO CORONARIANO EM RESPOSTA À CAPSAICINA

A adição de capsaicina (30 e 100 μg) não determinou qualquer alteração significativa nos fluxos coronarianos basais, tanto para os grupos tratados quanto para os controles, em ambos os tempos estudados (Figuras 14 e 15, respectivamente).

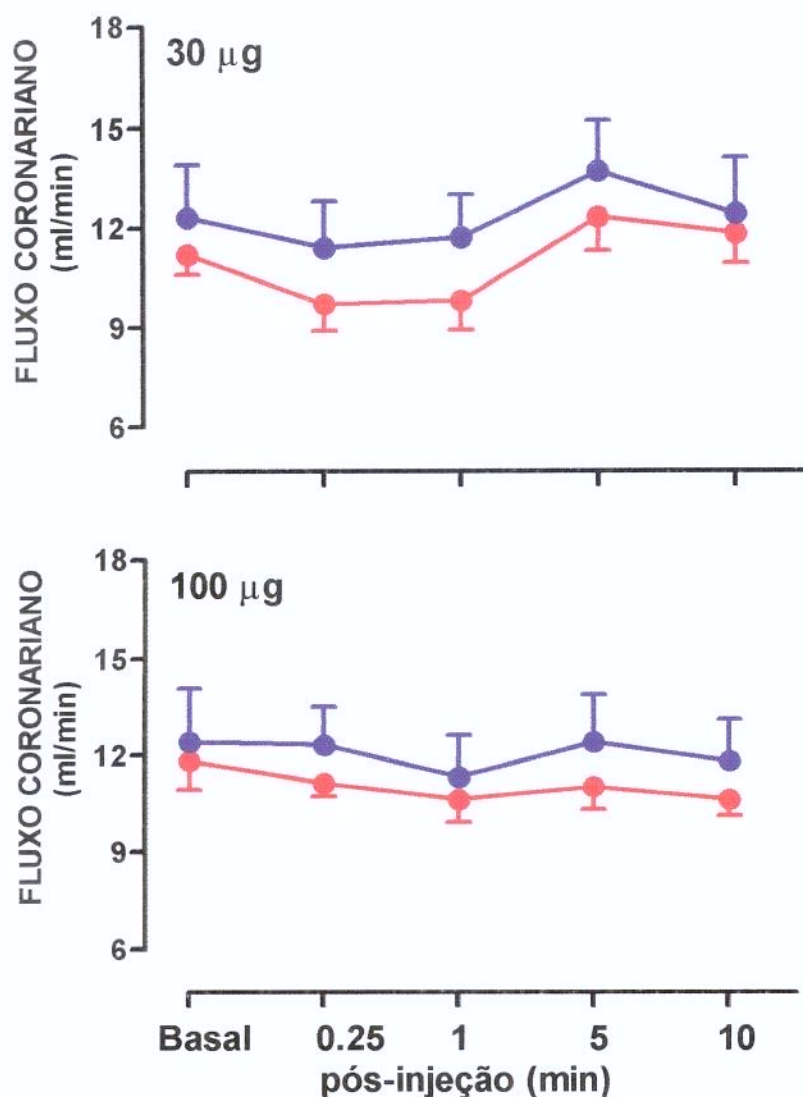


Figura 14. Variações do fluxo coronariano em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 5 experimentos.

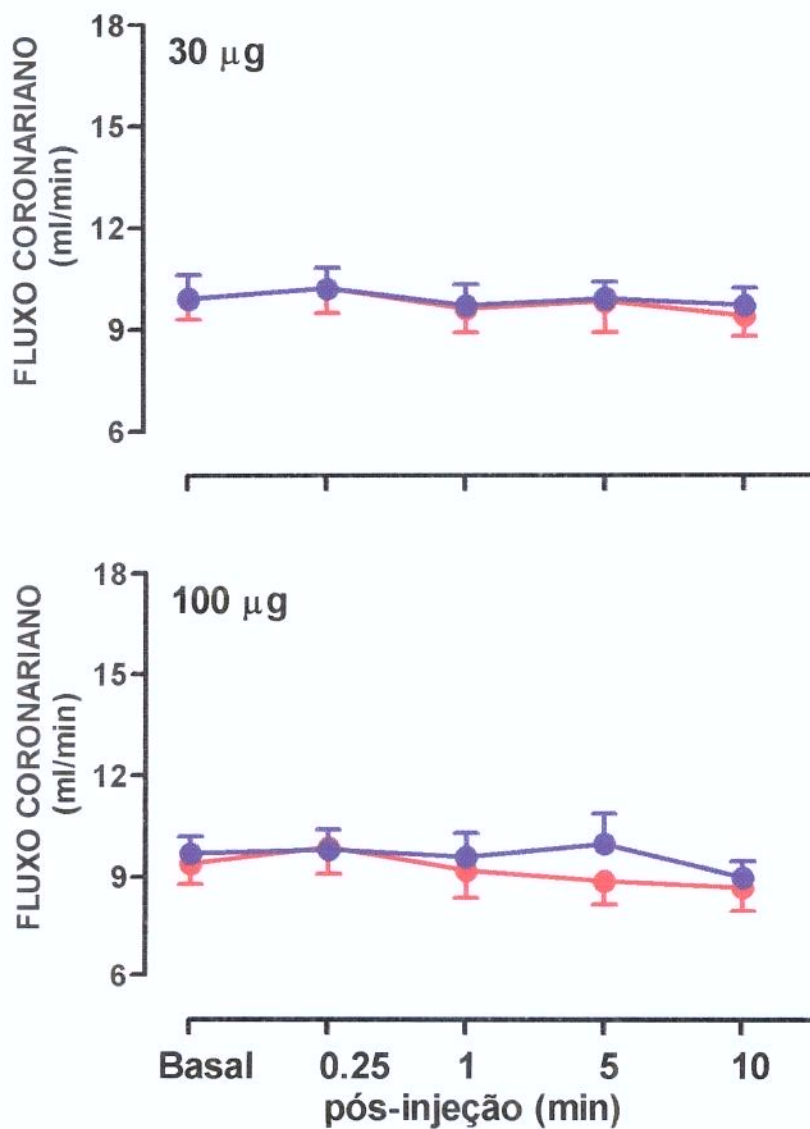


Figura 15. Variações do fluxo coronariano em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos.

3.2.4. FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RESPOSTA AO ISOPROTERENOL

O isoproterenol causou cronotropismo positivo dose-dependente em corações isolados. As ações cronotrópicas do isoproterenol em animais tratados com capsaicina no período neonatal e sacrificados 60 e 90 dias após tratamento foram similares às respostas cronotrópicas de corações isolados de seus respectivos controles (Figuras 16 e 17, respectivamente).

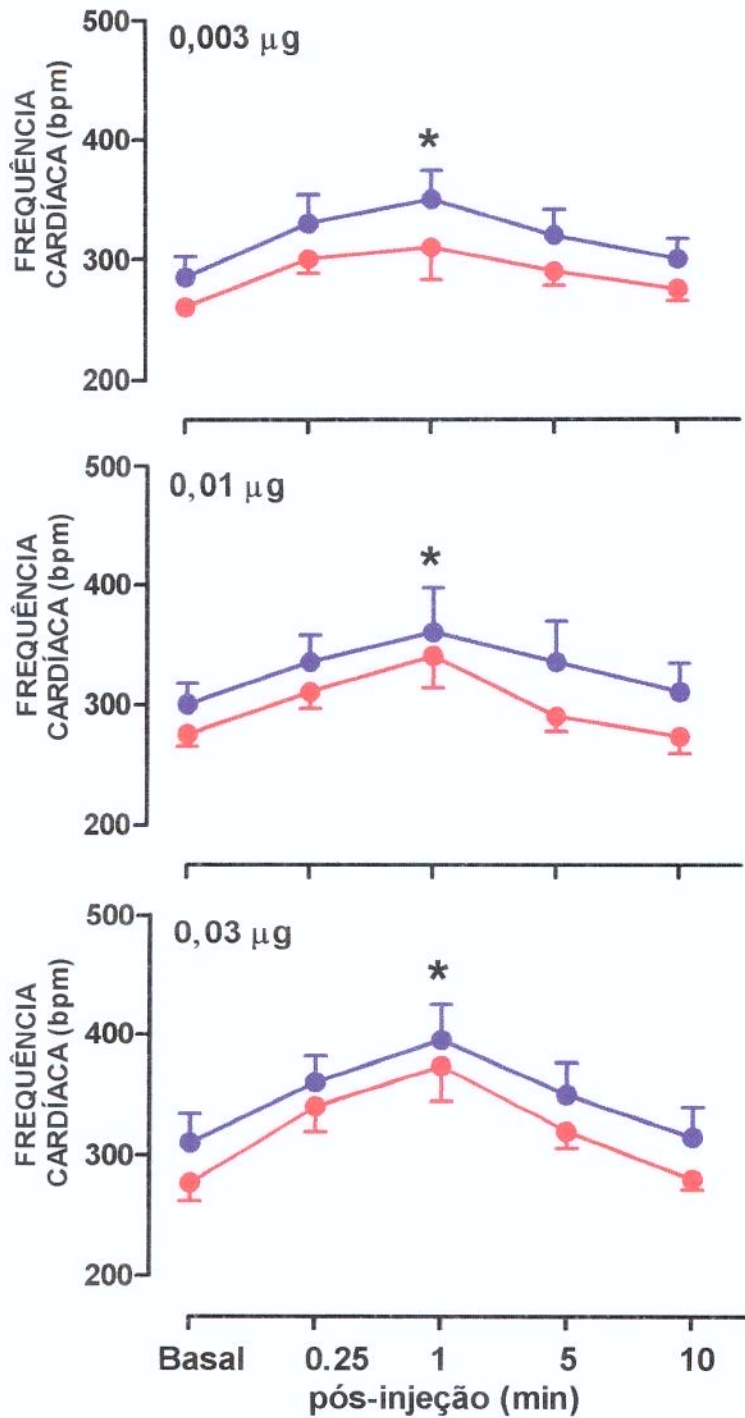


Figura 16. Efeito cronotrópico positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

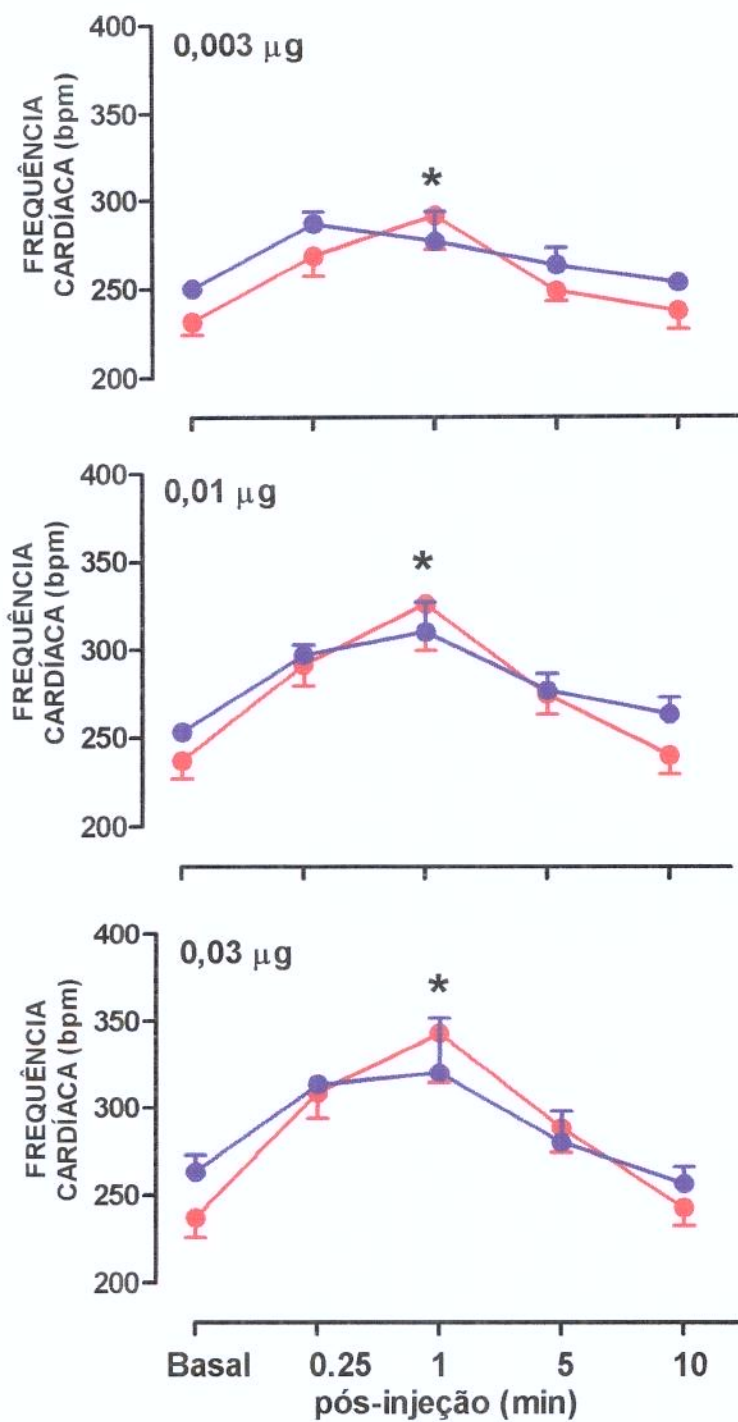


Figura 17. Efeito cronotrópico positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados (●) com capsaicina no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

3.2.5. FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RESPOSTA À CAPSAICINA

A adição de 30 μg de capsaicina causou um discreto aumento da frequência cardíaca basal que foi semelhante para ambos os grupos, controle e tratado com capsaicina, tanto em 60 quanto aos 90 dias após tratamento. A dose de 100 μg de capsaicina causou uma discreta redução da frequência basal após 5 min de sua injeção. Este efeito foi semelhante para ambos os grupos, controle e tratado com capsaicina, e sacrificados 60 e 90 dias após tratamento (Figuras 18 e 19, respectivamente).

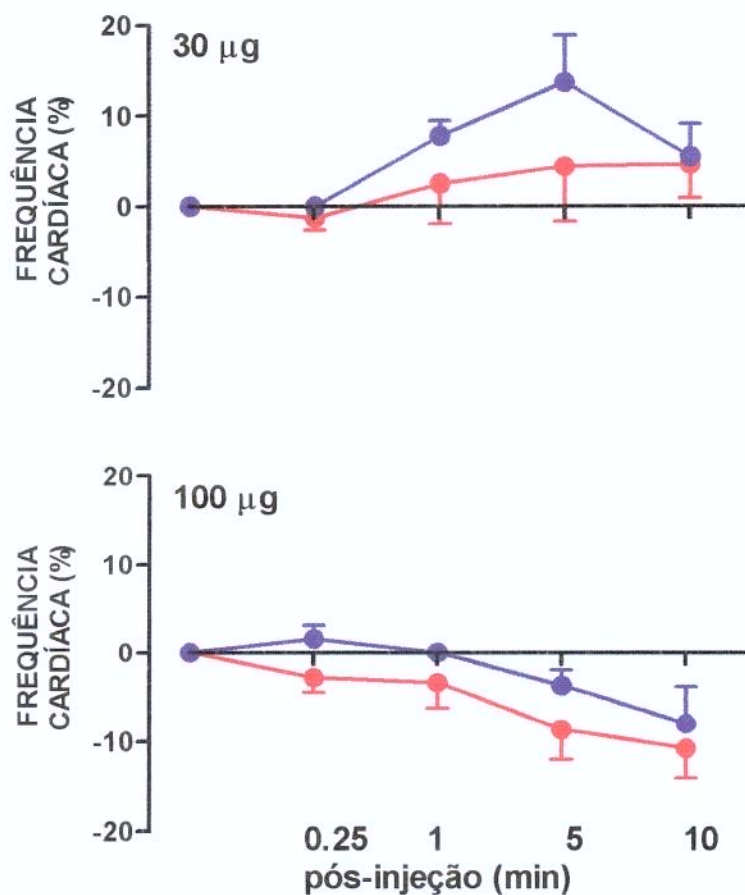


Figura 18. Efeito cronotrópico em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 5 experimentos.

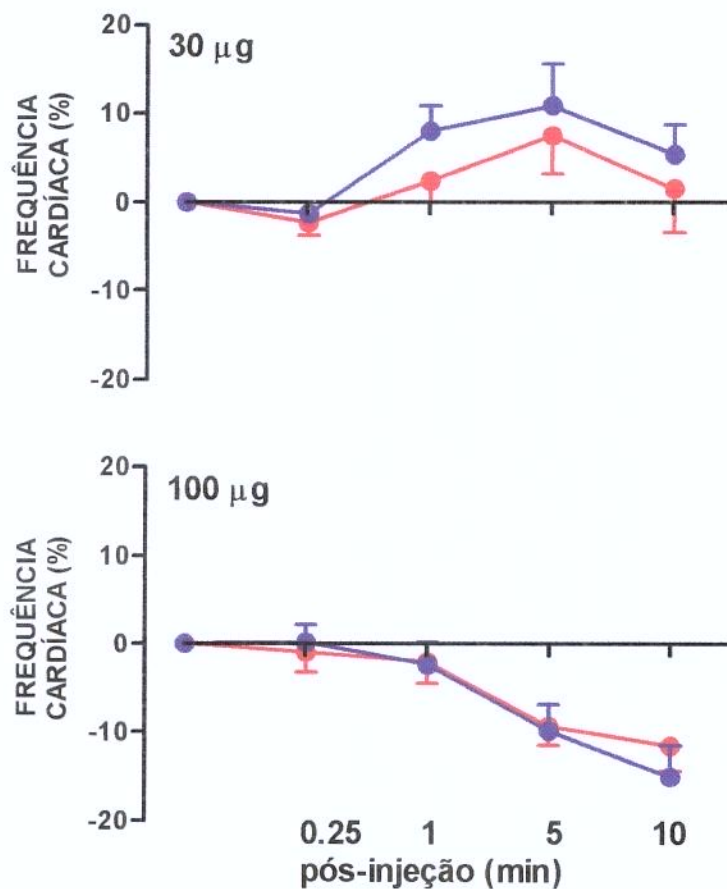


Figura 19. Efeito cronotrópico em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos.

3.2.6. PRESSÃO DESENVOLVIDA NO VENTRÍCULO ESQUERDO (PDVE) EM RESPOSTA AO ISOPROTERENOL

O isoproterenol causou inotropismo positivo dose-dependente em corações isolados de animais de ambos os grupos, controles ou tratados com capsaicina e sacrificados após 60 e 90 dias. As ações inotrópicas do isoproterenol em corações isolados de ratos tratados com capsaicina não foram diferentes dos animais controles, tanto aos 60 quanto aos 90 dias após tratamento (Figuras 20 e 21, respectivamente).

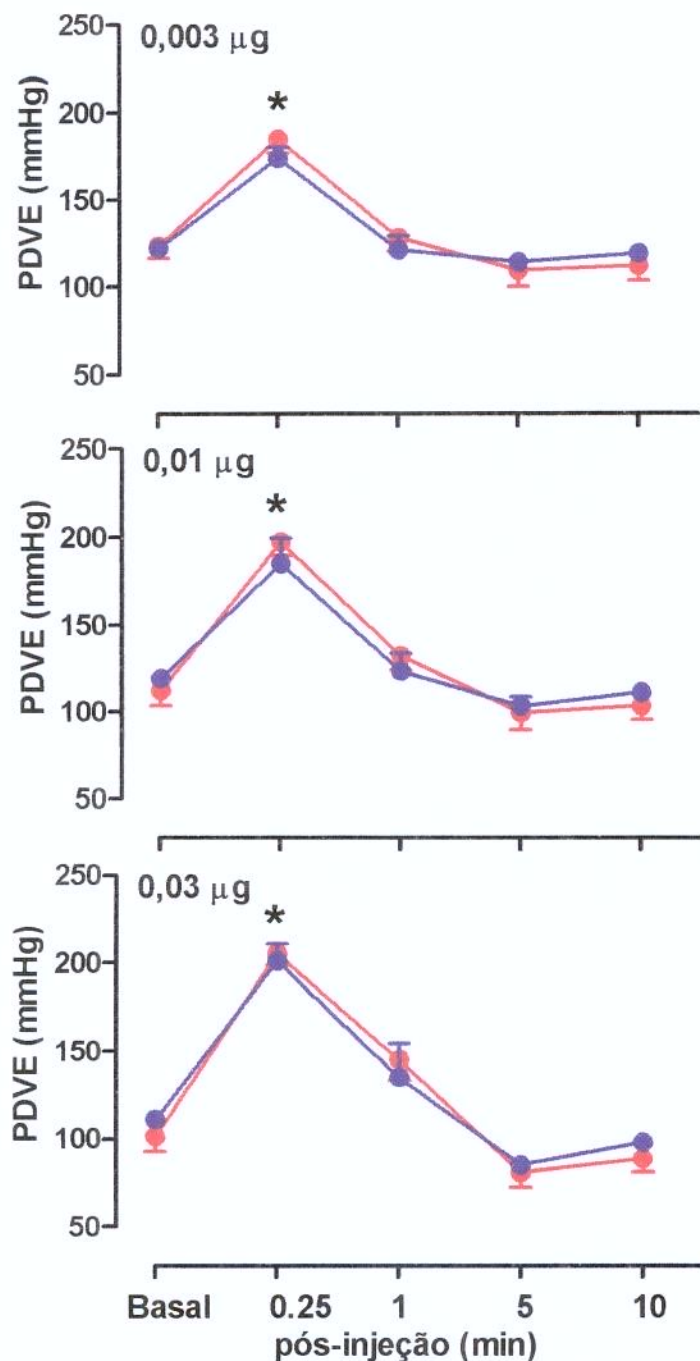


Figura 20. Efeito inotrópico (PDVE) positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

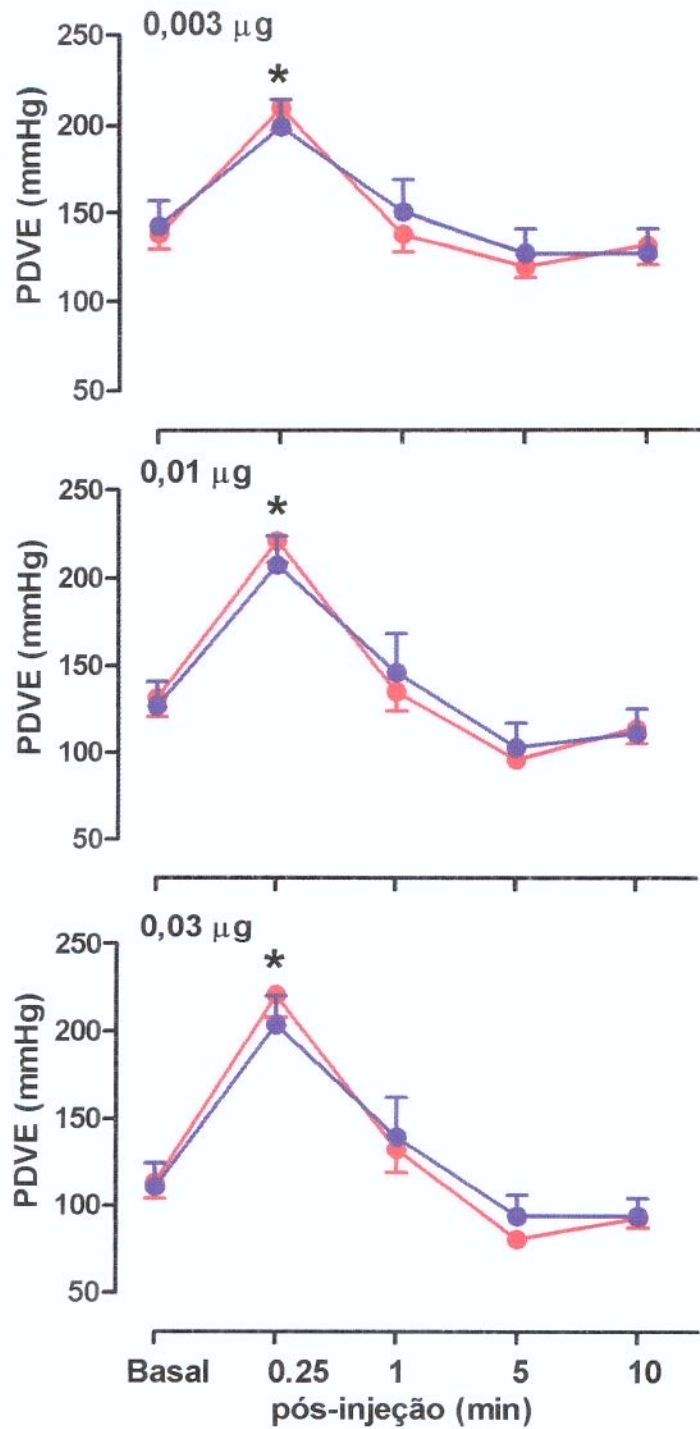


Figura 21. Efeito inotrópico (PDVE) positivo em resposta a três doses de isoproterenol em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

3.2.7. PRESSÃO DESENVOLVIDA NO VENTRÍCULO ESQUERDO (PDVE) EM RESPOSTA À CAPSAICINA

A adição de capsaicina produziu resposta inotrópica negativa em corações isolados de animais com 60 dias de idade, sendo que na dose de 30 μg , o inotropismo negativo foi mais acentuado ($P < 0,05$) do que na dose de 100 μg . Entretanto, não houve diferenças entre os grupos controles e tratados com capsaicina no período neonatal (Figura 22). Nos animais sacrificados aos 90 dias, o inotropismo negativo induzido pela capsaicina foi significativamente atenuado em ambos os grupos controle e tratado (Figura 23).

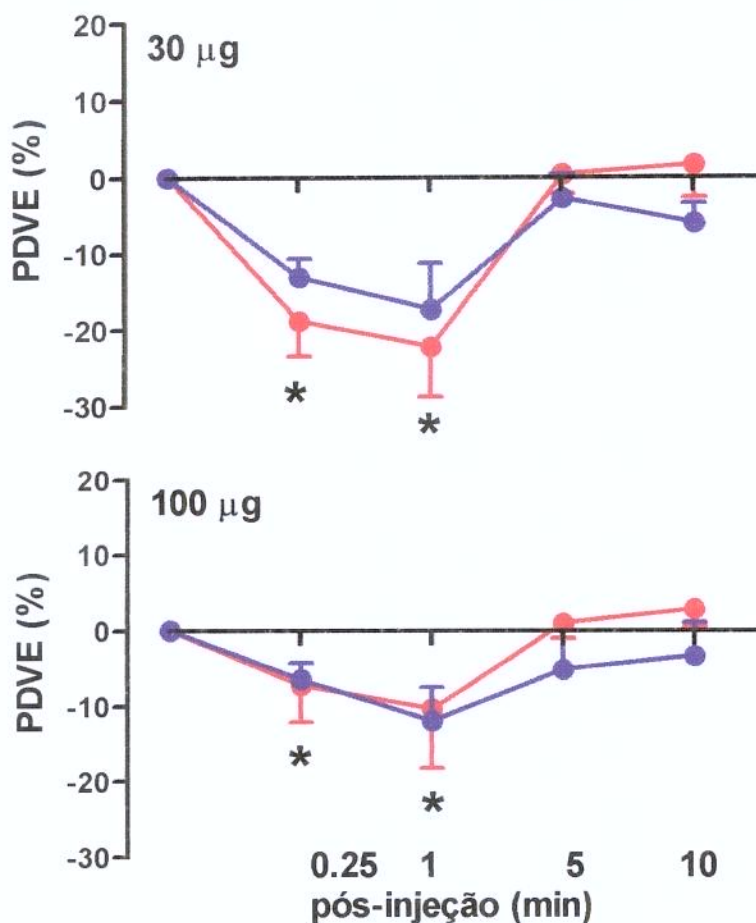


Figura 22. Efeito inotrópico (PDVE) em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 60 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 5 experimentos. * $P < 0,05$ comparação com os respectivos basais e entre as doses.

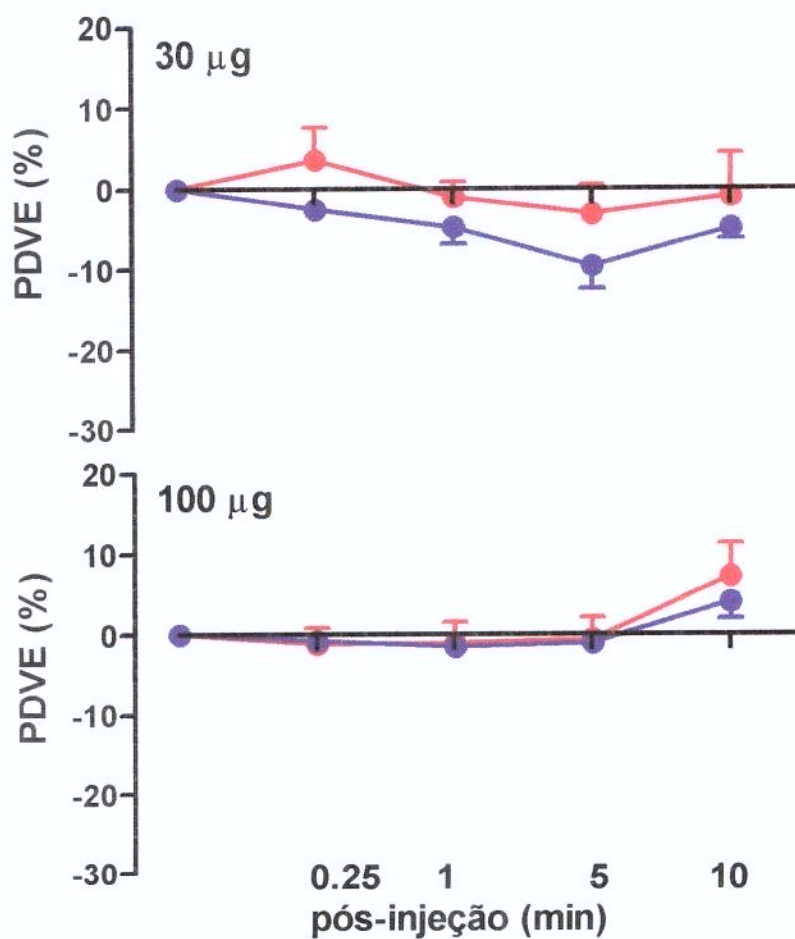


Figura 23. Efeito inotrópico (PDVE) em resposta a duas doses de capsaicina em corações isolados de ratos controles (●) ou tratados com capsaicina (●) no período neonatal e sacrificados 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 a 7 experimentos.

3.3. CONTEÚDO DE CGRP EM TECIDO CARDÍACO

A eficiência do método utilizado em depletar as fibras VSPA foi avaliada pela quantificação das concentrações de CGRP em corações de ratos neonatos tratados com capsaicina e seus respectivos grupos controles. Nossos resultados mostraram que o tratamento com capsaicina causou uma depleção do conteúdo de CGRP no coração de cerca de 74% quando comparado com seus respectivos grupos controles. Este nível de depleção foi similar em todos os tempos estudados (Figura 24).

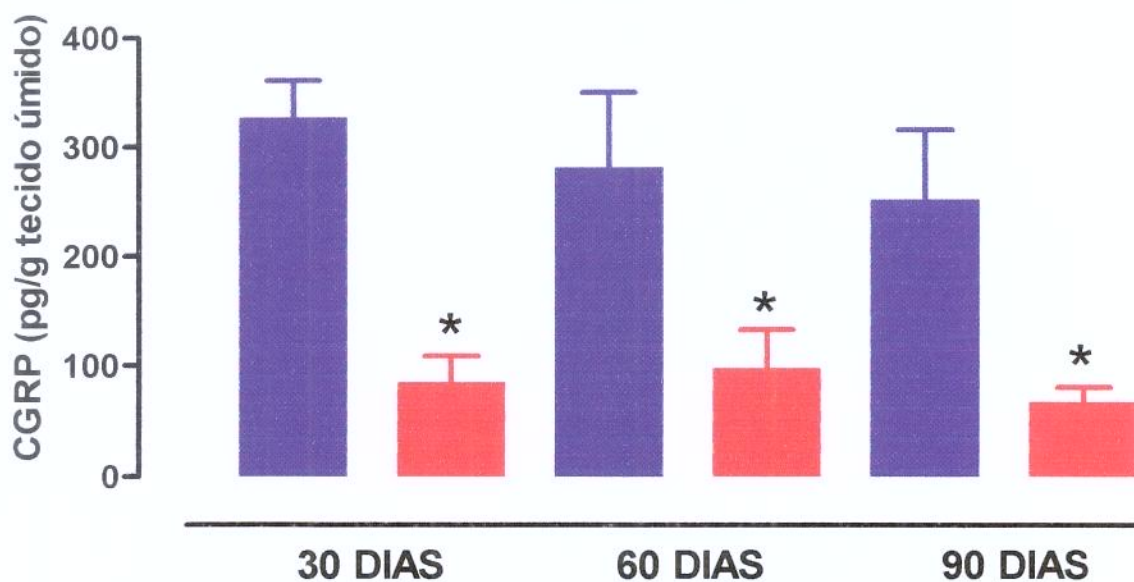


Figura 24. Concentração de CGRP em tecido cardíaco total de ratos controles (■) ou tratados com capsaicina (■) no período neonatal e sacrificados 30, 60 e 90 dias após tratamento. Os dados estão representados como médias \pm E.P.M. para 6 experimentos.

* $P < 0,05$ comparado ao seu respectivo controle.

4- Discussão

Alguns trabalhos sugerem uma interação funcional e regulação modulatória entre os terminais nervosos das fibras autonômicas simpáticas ou parassimpáticas e as fibras sensoriais no tecido cardíaco. Postula-se que a interação funcional entre as fibras do sistema nervoso simpático e as fibras sensoriais seja unidirecional, onde a noradrenalina, através dos adrenoceptores α_2 pré-sinápticos presentes nas fibras sensoriais, inibe a liberação de neuropeptídeos por estes neurônios (AMERINI *et al.*, 1992; RUBINO *et al.*, 1992, 1993). Nossos resultados mostram que o tratamento neonatal com capsaicina diminui a sensibilidade da resposta mediada pelos adrenoceptores β de átrios direitos isolados de ratos com 30 dias de idade. Por outro lado, átrio direito de ratos sacrificados aos 60 e aos 90 dias de idade não apresentaram nenhuma alteração da resposta cronotrópica. Nossa hipótese para explicar a dessensibilização observada nos animais jovens (30 dias) é que o tratamento com capsaicina determinaria ativação do sistema simpato-adrenal produzindo maior liberação de catecolaminas plasmáticas acarretando assim dessensibilização da resposta mediada pelos adrenoceptores β cardíacos. Sabe-se que a exposição de tecidos a elevadas concentrações de agonistas, tais como catecolaminas, promove alterações na expressão e/ou no acoplamento de receptores aos mecanismos de transdução celular, processo este denominado dessensibilização (STILES, CARON, LEFKOWITZ, 1984; POST *et al.*, 1999). Assim é plausível que a ativação das fibras simpáticas em resposta à injeção neonatal de capsaicina acarrete aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas e intensa ativação do complexo agonista-receptor resultando no fenômeno de dessensibilização. Um estudo prévio demonstrou que a administração de capsaicina em porcos adultos ativa o sistema simpato-adrenal levando ao aumento da liberação de catecolaminas plasmáticas (ALVING, MATRAN, LUNDBERG, 1991). No entanto, também foi relatado neste trabalho que os níveis plasmáticos de catecolaminas retornam a seus valores basais, dois dias após a administração de capsaicina, mostrando que a ativação simpato-adrenal em porcos é normalizada nesse período. Nosso trabalho possui duas variáveis diferentes desse estudo; primeiro, a espécie animal empregada e, segundo, o tratamento com capsaicina foi feito no período neonatal. Assim, o tratamento neonatal de ratos com capsaicina poderia acarretar intensa ativação do sistema nervoso simpato-adrenal desencadeando estimulação dos adrenoceptores que ainda se refletiria após 30 dias de tratamento. Essa hipótese é corroborada pelos estudos de TANAKA &

SHIGENOBU (1990) que mostraram que a sensibilidade da resposta cronotrópica e a ativação do complexo receptor-proteína G-adenilato ciclase é maior em animais neonatos do que em animais adultos.

A ausência de alterações das respostas cronotrópicas ao isoproterenol aos 60 e 90 dias após tratamento pode ser um indicativo de mecanismos compensatórios ocorrendo em estágios tardios, como restauração do acoplamento do complexo receptor-proteína G, maturação e maior resistência do tecido cardíaco ao estresse. Vale ainda ressaltar que a hipótese de reinervação descrita em ratos (MARFURT, ELLIS, JONES, 1993) e humanos (SIMONE *et al.*, 1998), para explicar este resultado, foi descartada pela dosagem dos conteúdos de CGRP no tecido cardíaco, cujo grau de depleção (cerca de 74%) de CGRP nos ratos neonatos tratados com capsaicina foi similar em todos os tempos estudados.

Diferentemente das fibras simpáticas, tem sido postulada uma interação bidirecional entre as fibras nervosas do sistema nervoso parassimpático e as fibras sensoriais (RUBINO, 1993; RUBINO & BURNSTOCK, 1996), onde a acetilcolina modularia a liberação dos neuropeptídeos presentes nas fibras sensoriais (HOOVER, 1989; CHIAO & CALDWELL, 1995), e os neuropeptídeos, por sua vez, também modulariam as fibras parassimpáticas (ARMOUR *et al.*, 1990). Verificamos que as respostas cronotrópicas negativas ao carbacol e ao agonista parcial, pilocarpina, em átrios direitos isolados de ratos tratados com capsaicina no período neonatal não foram alteradas, tanto em animais com 30 quanto com 60 dias após tratamento. Este resultado mostra que as fibras sensoriais não modulam as respostas cronotrópicas mediadas pelos receptores muscarínicos em átrios direitos de ratos. Vale salientar que se estas discrepâncias podem ser reflexo do uso de diferentes espécies; os trabalhos descritos acima foram realizados em cobaias e não em ratos.

Nossos resultados mostram ainda que o tratamento neonatal com capsaicina e, conseqüentemente, a depleção do conteúdo endógeno de CGRP no coração não desencadeia alterações significativas nas respostas cronotrópicas (potência e resposta máxima) mediadas pelo CGRP, em todos os tempos estudados. Curiosamente, a potência do CGRP exógeno nos animais de 30 dias de idade ($8,71 \pm 0,10$) é maior do que nos animais adultos ($7,95 \pm 0,19$) sugerindo maior densidade de receptores e/ou de fibras contendo CGRP em átrios direitos de ratos jovens (30 dias) do que nos animais adultos.

A adição de capsaicina ao banho determinou aumento dos batimentos atriais tanto nos animais do grupo controle quanto nos grupos tratados com capsaicina no período neonatal. As respostas cronotrópicas à capsaicina exógena nos átrios de ratos com 60 e 90 dias de idade foram significativamente atenuadas nos animais pré-tratados com capsaicina em aproximadamente 30-35%, enquanto que nos animais com 30 dias o tratamento neonatal com capsaicina não alterou a resposta cronotrópica à capsaicina exógena. Estes resultados mostram que o conteúdo 'residual' de CGRP no coração é ainda suficiente para desencadear ações cronotrópicas positivas em resposta à capsaicina exógena e novamente corroboram os dados obtidos com CGRP, onde a densidade dos receptores e/ou de fibras contendo CGRP parece ser maior nos animais jovens. Isso é confirmado por um estudo anterior que mostrou que a capsaicina exógena foi mais efetiva em promover a liberação de CGRP em ratos jovens que em adultos (MIYAKE *et al.*, 1996). O antagonista de receptores de CGRP (CGRP₈₋₃₇) aboliu as respostas cronotrópicas induzidas pela capsaicina em todos os grupos estudados, confirmando que os efeitos positivos da capsaicina são decorrentes de liberação de CGRP endógeno, conforme proposto por estudos anteriores (FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1988; LUNDBERG, 1996).

Para o estudo com corações isolados, os animais foram tratados com capsaicina no período neonatal, e analisados 60 ou 90 dias após tratamento, com o intuito de avaliar a evolução temporal dos parâmetros cardíacos em resposta aos agonistas isoproterenol, fenilefrina e capsaicina. Não foi possível analisar os corações isolados de animais com 30 dias de idade por inviabilidade metodológica.

Observamos que o fluxo coronariano basal de corações isolados 60 dias após tratamento de ratos neonatos com capsaicina foi significativamente atenuado quando comparado ao seu respectivo grupo controle, enquanto tal diferença não foi observada 90 dias após o tratamento. Nossos resultados foram consistentes com estudos prévios, os quais sugerem que o tratamento neonatal com capsaicina reduz o fluxo coronariano basal via depleção (ou redução) de neuropeptídeos vasoativos endógenos (YAOITA *et al.*, 1994; ZANESCO *et al.*, 1999). Assim, é provável que a redução do fluxo coronariano basal seja reflexo de uma função intrínseca dos neuropeptídeos vasoativos *in vivo*, participando da regulação do tônus basal coronariano (BRAIN *et al.*, 1985). Tanto CGRP como a substância P causam vasodilatação (FRANCO-CERECEDA & RUDEHILL, 1989;

LUDMAN *et al.*, 1991; EZRA *et al.*, 1986), entretanto em artérias coronárias humanas *in vitro*, o CGRP é mais potente do que a substância P em relaxar artérias pré-contraídas (FRANCO-CERECEDA & RUDEHILL, 1989). Além disso, em leito vascular mesentérico de rato, tanto as neurocininas quanto a substância P não possuem efeitos no controle vascular de coração isolado de rato (BARJA *et al.*, 1983; KULAKOWSKI *et al.*, 1983; KAWASAKI *et al.*, 1990a). Assim, a substância P parece não contribuir para a regulação do tônus vascular coronariano em ratos (KULAKOWSKI *et al.*, 1983; BRAIN *et al.*, 1985; YAOITA *et al.*, 1994). Portanto, a redução do fluxo coronariano basal observada 60 dias após tratamento neonatal com capsaicina é, provavelmente, devida à depleção de CGRP. A ausência de redução do fluxo coronariano basal observada aos 90 dias pode ser explicada pela participação de outros agentes vasodilatadores presentes no coração, e envolvidos no controle do tônus vascular coronariano (prostaciclina, óxido nítrico, EDHF, adenosina).

O cronotropismo positivo em resposta ao isoproterenol nos animais tratados com capsaicina no período neonatal não apresentou diferenças quando comparados com os animais do grupo controle, tanto nos ratos sacrificados aos 60 quanto aos 90 dias após tratamento. Estes resultados confirmam os dados de átrio direito isolado de rato onde também observamos ausência de alteração na sensibilidade ao isoproterenol aos 60 e 90 dias após tratamento. A ausência de alterações nas respostas inotrópicas de corações isolados era esperada uma vez que nos ventrículos, o número de fibras sensoriais é muito reduzido comparado aos átrios (WHARTON *et al.*, 1981a, b).

Em coração isolado de cobaia, a capsaicina inibe a força de contração, aumenta a frequência cardíaca (FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG, 1985) e promove vasodilatação coronariana por liberação de CGRP (BRAIN *et al.*, 1985; FRANCO-CERECEDA & RUDEHILL, 1989; YAOITA *et al.*, 1994). As taquicinininas também são liberadas pela capsaicina e apresentam efeito cardioinibitório sobre a contratilidade ventricular (LUNDBERG *et al.*, 1985; SZALLASI & BLUMBERG, 1999). Contrariamente, FRANCO-CERECEDA & LUNDBERG (1988) relacionaram o efeito inibitório da capsaicina sobre a força de contração a uma ação não-colinérgica e independente da liberação de taquicinininas. Além disso, estudo recente mostrou que a capsaicina diminui a força de contração, a frequência cardíaca e o fluxo coronariano de coração isolado de rato por liberação de endotelina (SZOLCSANYI *et al.*, 1999). Em

nossos experimentos, a adição de capsaicina em corações isolados de rato não determinou qualquer alteração significativa no fluxo coronariano basal, tanto para os grupos tratados quanto para os controles, em ambos os tempos estudados. Levando-se em consideração que o CGRP é o principal mediador das fibras sensoriais no controle vascular coronariano e que a vasodilatação induzida pela capsaicina é bloqueada em ratos pré-tratados com capsaicina (KAKUYAMA, VALLANCE, AHLUWALIA, 1998), a ausência de resposta à administração em bolus de capsaicina nos animais controle não é clara ainda para nós, uma vez que nesses animais as fibras sensoriais estão funcionalmente ativas e seus conteúdos de CGRP estão intactos. Com relação aos efeitos inotrópicos, a adição da menor dose de capsaicina gerou efeito inotrópico negativo e discreto efeito cronotrópico positivo, enquanto que a adição subsequente de dose maior de capsaicina reduziu a magnitude do inotropismo negativo com aparecimento de efeito cronotrópico negativo. Assim, esses dados sugerem possível taquifilaxia ou até mesmo dessensibilização da resposta mediada pelos receptores vanilóides (SZALLASI & BLUMBERG, 1999). De modo geral, os resultados obtidos em corações isolados em resposta à capsaicina exógena são bastante controversos, porém estas discrepâncias podem estar relacionadas a diferenças no tratamento com capsaicina, no tempo de utilização do animal após tratamento, na espécie animal utilizada, e até mesmo na forma de administração exógena de capsaicina (bolus ou infusão).

Concluindo, a dessensibilização da resposta cronotrópica mediada pelos β -adrenoceptores em átrios isolados de ratos 30 dias após tratamento sugere a existência de uma interação bi-direcional entre as fibras sensoriais e simpáticas. O restabelecimento dessa alteração funcional ocorrida 60 e 90 dias após tratamento não pode ser atribuída a reinervação sensorial, tendo em vista que semelhantes níveis de depleção de CGRP foram detectados em todos os tempos estudados dos grupos tratados com capsaicina. A ausência de alterações das respostas cronotrópicas negativas, mediadas pelos receptores muscarínicos nos animais tratados com capsaicina, indica que as fibras sensoriais não exercem influências sobre as fibras parassimpáticas dos tecidos cardíacos de ratos.

5- Conclusões

1. O tratamento de ratos neonatos com capsaicina promoveu a dessensibilização da resposta cronotrópica mediada pelos adrenoceptores β , 30 dias após tratamento. Sendo assim, as fibras sensoriais modulam as respostas cronotrópicas positivas mediadas por adrenoceptores β em átrio direito isolado de ratos jovens (30 dias);
2. Aos 60 e 90 dias após tratamento neonatal com capsaicina observou-se ausência de alterações da resposta cronotrópica;
3. As fibras sensoriais não modulam as respostas cronotrópicas negativas mediadas por receptores muscarínicos em átrio direito isolado de rato;
4. O tratamento neonatal com capsaicina promove redução do fluxo coronariano basal em coração isolado aos 60 dias após tratamento;
5. As fibras sensoriais não modulam a resposta vasoconstritora mediada por receptores α -adrenérgicos;
6. A resposta inotrópica ao agonista β -adrenérgicos avaliada em coração isolado de ratos, não foi afetada pelo tratamento neonatal com capsaicina;
7. O nível de depleção do neuropeptídeo vasoativo CGRP pelo tratamento neonatal com capsaicina foi semelhante em todos os tempos estudados demonstrando ausência de reinervação das fibras sensoriais até 90 dias após o tratamento.

6- Summary

Sensory nerves in the heart are known to modulate cardiac functions by releasing neuropeptides. A functional cross-talk among sympathetic, parasympathetic and sensory nerves have been suggested in the heart and vascular beds. The aim of this work was to evaluate the effects of capsaicin treatment on the cardiac parameter changes, such as the potency of isoproterenol, carbachol, pilocarpine and/or CGRP in the rat isolated right atria, as well as, the changes of chronotropism, inotropism and/or coronary flow in response to α - (phenylephrine) and/or β -(isoproterenol) adrenoceptor agonists using the Langendorff apparatus. Neonatal Wistar rats of both sexes were treated on the second day of life with capsaicin (50 mg/kg, sc.) or the corresponding volume of vehicle solution. The heart and right atria were isolated at 30, 60 and/or 90 days after neonatal capsaicin-treatment. The neonatal capsaicin-treatment caused a four-fold rightward shift at pEC_{50} level on the concentration-response curve (CRC) to isoproterenol at 30 days, whereas no changes were observed at 60 and 90 days. The CRC to CGRP, carbachol, and pilocarpine were not changed in all studied time. The potency of CGRP in isolated right atria in 30-day-old rats was significantly higher than 60- and 90-day-old rats, as observed in both control and capsaicin groups. The increase of basal rate to addition of capsaicin on 90-day-old rats was markedly lower than 30- and 60-day-old animals in both studied groups. The CGRP receptor antagonist CGRP₈₋₃₇ abolished the increased chronotropism to capsaicin in all studied groups. The neonatal capsaicin treatment reduced by approximately 74% the CGRP content in the heart and the depletion percent was similar in all studied time. We found that neonatal capsaicin-treatment caused a significant reduction in basal coronary flow only at 60 days post-treatment. The positive chronotropic and inotropic responses to isoproterenol and the contractile response to phenilephrine were unaffected by the neonatal capsaicin-treatment at either 60 or 90 days. Our findings suggest that the desensitization of chronotropic response mediated by β -adrenoceptors observed at 30 days after neonatal capsaicin-treatment is due to a massive activation of the sympato-adrenal system. It can not be attributed to sensory reinnervation since similar CGRP depletion was detected in all capsaicin-treated groups. No changes on the negative chronotropic responses to muscarinic agonists in isolated right atria were seen in neonatal capsaicin-treated rats indicating that sensory fibers do not influence parasympathetic fibers in rat cardiac tissue. The blockade of positive chronotropic responses to capsaicin by the CGRP₈₋₃₇ indicate that capsaicin

actions are fully mediated by CGRP. The highest potency for both CGRP and exogenous capsaicin, as well as, the basal rate in 30-day-old rats suggest that the density of CGRP-containing fibers in young rats is greater than aged ones. The reduction of basal coronary flow at 60 days after capsaicin-treatment is a consequence of CGRP depletion. The restoration of coronary flow at 90 days post-capsaicin-treatment can be indicative of adaptive mechanisms to reverse this effect. The absence of changes on the cardiac parameters of isolated heart in response to adrenergic agents after neonatal capsaicin-treatment at 60 and 90 days, exclude the existence of a cross-talk between sensory and sympathetic fibers at aged rats.

7- Referências Bibliográficas

- AHLQUIST, R.P. - A study of adrenergic receptors. **Am J Physiol**, **153**: 586-600, 1948.
- ALVING, K.; MATRAN, R.; LUNDBERG, J.M. - Capsaicin-induced local effector responses, autonomic reflexes and sensory neuropeptide depletion in the pig. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **343**: 37-45, 1991.
- AMANN, R.; DONNERER, J.; LEMBECK, F. - Activation of primary afferent neurons by thermal stimulation. Influence of ruthenium red. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **341**: 108-113, 1990.
- AMANN, R. & MAGGI, C.A. - Ruthenium red as a capsaicin antagonist. **Life Sci**, **49**: 849-856, 1991.
- AMARA, S.G.; JONAS, V.; ROSENFELD, M.G.; ONG, E.S.; EVANS, R.M. - Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, **298**: 240-244, 1982.
- AMERINI, S.; RUBINO, A.; FILIPPI, S.; LEDDA, F.; MANTELLI, L. - Modulation by adrenergic transmitters of the efferent function of capsaicin-sensitive nerves in cardiac tissue. **Neuropeptides**, **20**: 225-232, 1991.
- AMERINI, S.; RUBINO, A.; MANTELLI, L.; LEDDA, F. - α -Adrenoceptor modulation of the efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurones in guinea-pig isolated atria. **Br J Pharmacol**, **105**: 947-953, 1992.
- ARMOUR, J.A.; YUAN, B.X.; BUTLER, C.K. - Cardiac responses elicited by peptides administered to canine intrinsic cardiac neurons. **Peptides**, **11** (4): 753-761, 1990.
- AUBERSON, S. & LUNDBERG, J.M. - Lactic acid-induced plasma protein extravasation in rat airways by stimulation of sensory nerves and NK₁ receptor activation. **Pharmacol toxicol**, **73**: 305-310, 1993.
- BARJA, F.; MATHISON, R.; HUGGEL, H. - Substance P-containing nerve fibers in large peripheral blood vessels of the rat. **Cell Tissue Res**, **229**: 411-422, 1983.
- BARNES, K.L.; FERRARIO, C.M.; CONOMY, J.P. - Comparison of the hemodynamic changes produced by electrical stimulation of the area postrema and nucleus tractus solitarius in the dog. **Circ Res**, **45**: 136-143, 1979.

- BAYLISS, W.M. - On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibers of the hind limb and the nature of these fibers. **J Physiol**, **27**: 173-207, 1901.
- BERTHELSON, S. & PETTINGER, W.A. - A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. **Life Sci**, **1**: 171-183, 1977.
- BEVAN, S. & SZOLCSANYI, J. - Sensory neuron-specific action of capsaicin- mechanism and application. **Trends Pharmacol Sci**, **11**: 330-333, 1990.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.A.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; SHAH, K.; WALPOLE, C.S.J.; YEATES, C.J. - Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **Br J Pharmacol**, **107**: 544-552, 1992.
- BIRNBAUMER, L. - Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. **Cell**, **71** (7): 1069-1072, 1992.
- BIRÓ, T.; MAURER, M.; MODARRES, S.; LEWIN, N.E.; BRODIE, C.; ACS, G.; ACS, P.; PAUS, R.; BLUMBERG, P.M. - Characterisation of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. **Blood**, **91**: 1332-1340, 1998.
- BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. - Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, **237**: 527-531, 1987.
- BRAIN, S.D. - Sensory neuropeptides in the skin. In: Geppetti, P. & Holzer, P., ed. - Neurogenic Inflammation. Boca Raton, CRC Press, 1996. p. 229-244.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J.; TIPPINS, J.R.; MORRIS, H.R.; MACINTYRE, I. - Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature**, **313** (5997): 54-56, 1985.
- BRISTOW, M.R.; GINSBURG, R.; UMANS, V.; FOWLER, M.; MINOBE, W.; RASMUSSEN, R.; ZERA, P.; MENLOVE, R.; SHAH, P.; JAMIESON, S. - Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. **Circ Res**, **59** (3): 297-309, 1986.

- BRODDE, O.E. - Beta-adrenoceptors in cardiac disease. **Pharmacol Ther**, **60**: 405-430, 1993.
- BRUCE, A.N. - Vasodilator axon reflex. **Q J Physiol**, **6**: 339-354, 1913.
- BUCK, S.H. & BURKS, T.F. - The neuropharmacology of capsaicin-review of some recent observations. **Pharmacol Rev**, **38**: 179-226, 1986.
- BUCKLEY, T.L.; BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. - Ruthenium red selectively inhibits oedema formation and increased blood flow induced by capsaicin in rabbit skin. **Br J Pharmacol**, **199**: 7-8, 1990.
- BUTLER, A.; WORTON, S.P.; O'SHAUGHNESSY, C.T.; CONNOR, H.E. - Sensory nerve-mediated relaxation of guinea-pig isolated pulmonary artery: prejunctional modulation by alpha 2-adrenoceptor agonists but not sumatriptan. **Br J Pharmacol**, **109** (1): 126-130, 1993.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. - The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, **389**: 816-824, 1997.
- CASTLE, N.A. - Differential inhibition of potassium currents in rat ventricular myocytes by capsaicin. **Cardiovasc Res**, **26**: 1137-1144, 1992.
- CAULFIELD, M.P. - Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, **58**: 319-379, 1993.
- CHIAO, H. & CALDWELL, R.W. - Local cardiac effects of substance P: roles of acetylcholine and noradrenaline. **Br J Pharmacol**, **114**: 283-288, 1995.
- CHIBA, T.; YAMAGUCHI, A.; YAMATANI, T.; NAKAMURA, A.; MORISHITA, T.; INUI, T.; FUKASE, M.; NODA, T.; FUJITA, T. - Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). **Am J Physiol**, **256** (2 Pt 1): E331-335, 1989.

- COHEN, M. L.; BLOOMQUIST, W.; KRIAUCIUNAS, A.; SHUKER, A.; CALLIGARO D. - Aryl propanolamines: comparison of activity at human beta3 receptors, rat beta3 receptors and rat atrial receptors mediating tachycardia. **Br J Pharmacol**, **126** (4): 1018-1024, 1999.
- DAAKA, Y.; LUTTRELL, L.M.; LEFKOWITZ, R.J. - Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, **390**: 88-91, 1997.
- DENNIS, T.; FOURNIER, A.; ST PIERRE, S., QUIRION, R. - Structure-activity profile of calcitonin gene related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. **J Pharmacol Exp Ther**, **251** (2): 718-725, 1989.
- DI FRANCESCO, D. - Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. **Annu Rev Physiol**, **55**: 455-472, 1993.
- DICKENSON, A.H. & DRAY, A. - Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. **Br J Pharmacol**, **104**: 1045-1049, 1991.
- DOCHERTY, J.R. - Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, **13**: 1-15, 1998.
- DOODS, H.; HALLERMAYER, G.; WU, D.; ENTZEROTH, M.; RUDOLF, K.; ENGEL, W.; EBERLEIN, W. - Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. **Br J Pharmacol**, **129** (3): 420-423, 2000.
- DÖRING, H.J. & DEHNERT, H. - The isolated perfused heart. In: Biomesstechnik - Verlag. Germany, March, 1988. p. 1-116.
- DORJE, F.; WESS, J.; LAMBRECHT, G.; TACKE, R.; MUTSCHLER, E.; BRANN, M.R. - Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther**, **256**: 727-733, 1991.
- DRAY, A.; FORBES, C.A.; BURGESS, G.M. - Ruthenium red blocks capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurons, as well as the activation of peripheral nociceptors *in vitro*. **Neurosci Lett**, **110**: 52-59, 1990.

- EGLIN, R.M.; HEDGE, S.S.; WATSON, N. - Muscarinic receptor and smooth muscle function. **Pharmacol Rev**, **48** (4): 532-556, 1996.
- EMORINE, L.; BLIN, N.; STROBERG, A.D. - The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci**, **15**: 3-7, 1994.
- EMORINE, L.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M.M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C.; STROBERG, A.D. - Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. **Science**, **245**: 1118-1121, 1989.
- EXTON, J.H. - Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. **Am J Physiol**, **248**: E663-668, 1985.
- EZRA, D.; LAURINDO, F.R.M.; EIMERL, J.; GOLDSTEIN, R.E.; PECK, C.C.; FEUERSTEIN, G. - Tachykinin modulation of coronary blood flow. **Eur J Pharmacol**, **122**: 135-138, 1986.
- FERDINANDY, P.; CSONT, T.; CSONKA, C.; TOROK, M.; DUX, M.; NEMETH, J.; HORVATH, L.I.; DUX, L.; SZILVASSY, Z.; JANCsó, G. - Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **356**: 356-363, 1997.
- FIKE IV, E.A.; SIMONS, E.; BOSWELL, C.; SMITH, P.G. - Sensory nerves impair sympathetic reinnervation and recovery of smooth muscle function. **Exp Neurol**, **118**: 85-94, 1992.
- FISCUS, R.R.; ZHOU, H.L.; WANG, X.; HAN, C.; ALI, S.; JOYCE, C.D.; MURAD, F. - Calcitonin-gene related peptide (CGRP)-induced cyclic AMP, cyclic GMP and vasorelaxant responses in rat thoracic aorta are antagonized by blockers of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). **Neuropeptides**, **20**: 133-143, 1991.
- FITZGERALD, M. - Capsaicin and sensory neurones. **Pain**, **15** (2): 109-130, 1983.
- FJALLBRANDT, N. & IGGO, A. - The effect of histamine, 5-hydroxytryptamine and acetylcholine on cutaneous afferent nerve fibres. **J Physiol**, **156**: 578-590, 1961.

- FORD, A.P.D.W.; WILLIAMS, T.J.; BLUE, D.R.; CLARKE, D.E. - α_1 -adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. **Trends Pharmacol Sci**, **15**: 167-170, 1994.
- FRANCO-CERECEDA, A. & LUNDBERG, J.M. - Actions of calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to the contractile effects of capsaicin in the guinea-pig and rat heart in vitro. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **337**: 649-655, 1988.
- FRANCO-CERECEDA, A. & LUNDBERG, J.M. - Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of heart contractile rate and force. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **331**: 145-151, 1985.
- FRANCO-CERECEDA, A.; HENKE, H.; LUNDBERG, J.M.; PETERMANN, J.B.; HÖKFELT, T.; FISHER, J.A. - Calcitonin gene-related peptide in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. **Peptides**, **8**: 399-410, 1987.
- FRANCO-CERECEDA, A.; LUNDBERG, J.R.; SARIA, A.; SCHREIBMAYER, W.; TRITTHART, H.A. - Calcitonin gene-related peptide: release by capsaicin and prolongation of the action potential in the guinea-pig heart. **Acta Physiol Scand**, **132**: 181-190, 1988.
- FRANCO-CERECEDA, A. & RUDEHILL, A. - Capsaicin-induced vasodilatation of human coronary arteries in vitro is mediated by calcitonin gene-related peptide rather than substance P or neurokinin A. **Acta Physiol Scand**, **136**: 575-580, 1989.
- FUKUDA, N. & FUJIWARA, M. - Effect of capsaicin on the guinea-pig isolated atrium. **J Pharm Pharmacol**, **21**: 622-624, 1969.
- FURCHGOTT, R.F. - The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, **24**: 175-197, 1984.
- GAUTHIER, C.; TAVERNIER, G.; CHARPENTIER, F.; LANGIN, D.; LE MAREC, H. - Functional beta 3-adrenoceptor in the human heart. **J Clin Invest**, **98**: 556-562, 1996.

- GEPPETTI, P.; FRILLI, S.; RENZI, D.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A.; THEODORSSON, E.; FANCIULLACCI, M. - Distribution of calcitonin gene-related peptide – like immunoreactivity in various rat tissues: correlation with substance P and other tachykinins and sensitivity to capsaicin. **Regul Pept**, **23** (3): 289-298, 1988.
- GILMAN, A.G. - G-proteins: transducers of receptors-generated signals. **Ann Rev Biochem**, **56**: 615-649, 1987.
- GOYAL, R.K. - Identification, localization and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. **Life Sci**, **43**: 2209-2220, 1988.
- GRACE, G.C.; DUSTING, G.J.; KEMP, B.E.; MARTIN, T.J. - Endothelium and the vasodilator action of rat CGRP. **Br J Pharmacol**, **91**: 729-733, 1987.
- GRAY, D.W. & MARSHALL, I. - Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. **Br J Pharmacol**, **107** (3): 691-696, 1992.
- GREENBERG, B.; RHODEN, K.; BARNES, P. - Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a potent non-endothelium-dependent inhibitor of coronary vasomotor tone. **Br J Pharmacol**, **92**: 789-794, 1987.
- GUARD, S. & WATSON, S.P. - Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. **Neurochem Int**, **18**: 149-165, 1991.
- HAMMER, R. & GIACHETTI, A. - Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2. Biochemical and functional characterization. **Life Sci**, **31**: 2991-2998, 1982.
- HAN, C.; ABEL, P.W.; MINNEMAN, K.P. - Alpha₁ adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. **Nature**, **329**: 333-335, 1987.
- HAN, C.; LI, J.; MINNEMAN, K.P. - Subtypes of alpha₁ adrenoceptors in rat blood vessels. **Eur J Pharmacol**, **190**: 97-104, 1990.

- HANDWERKER, H.O.; HOLZER-PETSCHKE, U.; HEYM, C.; WELK, E. - C-fibre functions after topical application of capsaicin to a peripheral nerve and after neonatal capsaicin treatment. **In:** Chahl, L.A.; Szolcsanyi, J.; Lembeck, F., ed. - Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1984. p. 57-78.
- HOLZER, P. - Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev**, **43**: 143-200, 1991.
- HOLZER, P. - Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, **24**: 739-768, 1988.
- HOLZER, P. - Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmac**, **30**: 5-11, 1998.
- HOLZER, P. - Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, **121**: 49-146, 1992.
- HOOVER, D.B. - Effects of substance P on rate and perfusion pressure in the isolated guinea pig heart. **J Pharmacol Exp Ther**, **252**: 179-184, 1989.
- HOOVER, D.B. & HANCOCK, J.C. - Distribution of substance P binding sites in guinea pig heart and pharmacological effects of substance P. **J Auton Nerv Syst**, **23**: 189-197, 1988.
- HUGGES, S.R. & BRAIN, S.D. - Nitric-oxide dependent release of vasodilator quantities of CGRP from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. **Br J Pharmacol**, **111**: 425-430, 1994.
- HUGHES, I.E. & SMITH, J.A. - The stability of noradrenaline in physiological salt solutions. **J Pharm Pharmacol**, **30**: 124-126, 1978.
- INGLESE, J.; FREEDMAN, N.J.; KOCH, W.J.; LEFKOWITZ, R.J. - Structure and mechanisms of the G protein-coupled receptor kinases. **J Biol Chem**, **268**: 23735-23738, 1993.

- ISHIKAWA, T.; OKAMURA, N.; SAITO, A.; GOTO, K. - Effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and isoproterenol on the contractility and adenylate cyclase activity in the rat heart. **J Molec Cell Cardiol**, **19**: 723-727, 1987.
- ISHIKAWA, T.; OKAMURA, N.; SAITO, A.; MASAKI, T.; GOTO, K. - Positive inotropic effect of calcitonin gene-related peptide mediated by cyclic AMP in guinea-pig heart. **Circ Res**, **63**: 726-734, 1988.
- JANCSÓ, G. - Intracisternal capsaicin: selective degeneration of chemosensitive primary sensory afferents in the adult rat. **Neurosci Lett**, **27**: 41-45, 1981.
- JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JANCSÓ-GABOR, A. - Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, **270**: 741-743, 1977.
- JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JOÓ, F.; SUCH, G.; NAGY, A. - Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. **Neurosci Lett**, **59**: 209-214, 1985.
- JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; SUCH, G.; JOÓ, F.; NAGY, A. - Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. **Acta Physiol Hung**, **69**: 295-313, 1987.
- JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. - Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br J Pharmacol**, **31**: 138-151, 1967.
- JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; TAKÁTS, I. - Pain and inflammation induced by nicotine, acetylcholine and structurally related compounds and their prevention by desensitisation agents. **Acta Physiol Hung**, **14**: 113-131, 1961.
- KAKUYAMA, M.; VALLANCE, P.; AHLUWALIA, A. - Endothelium-dependent sensory NANC vasodilatation: involvement of ATP, CGRP and a possible NO store. **Br J Pharmacol**, **123**: 310-316, 1998.
- KANGAWA, H.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATSUO, H. - Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. **Biochem Biophys Res Commun**, **114**: 533-540, 1983.

- KAUMANN, A.J. & MOLENAAR, P. - Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **355**: 667-681, 1997.
- KAUMANN, A.J.; PREITNER, F.; SARSERO, D.; MOLENAAR, P.; REVELLI, J.P.; GIACOBINO, J.P. - (-)-CGP12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, **53** (4): 670-675, 1998.
- KAWASAKI, H.; NUKI, C.; SAITO, A.; TAKASAKI, K. - Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel. *Brain Res*, **506** (2): 287-290, 1990a.
- KAWASAKI, H.; NUKI, C.; SAITO, A.; TAKASAKI, K. - Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther*, **252**: 403-409, 1990b.
- KENT, K.M.; EPSTEIN, S.E.; COOPER, T.; JACOBWITZ, D.M. - Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlation. *Circulation*, **50**: 948-955, 1974.
- KESSLER, J.A.; BELL, W.O.; BLACK, I.B. - Interactions between the sympathetic and sensory innervation of the iris. *J Neurosci*, **3**: 1301-1307, 1983.
- KESSLER, J.A. & BLACK, I.B. - Nerve growth factor stimulates the development of SP in sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci*, **77**: 649-652, 1980.
- KHAKH, B.S. & KENNEDY, C. - Adenosine and ATP: progress in their receptors' structures and functions. *Trends Pharmacol Sci*, **19**: 39-41, 1998.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E. - Novel neuropeptides, neurokinin A and B, isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad Sci*, **59B**: 101-104, 1983.
- KOCH, W.J.; LEFKOWITZ, R.J.; ROCKMAN, H.A. - Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu Rev Physiol*, **62**: 237-260, 2000.

- KULAKOWSKI, E.C.; LAMPSON, W.G.; SCHAFFER, S.W.; LOVENBERG, W. - Action of substance P on the working rat heart. **Biochem Pharmacol**, **32**: 1097-1100, 1983.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J.P.; LUDUENA, F.R.; BROWN, T.B. - Differentiation of receptor systems activated by sympatomimetic amines. **Nature**, **214**: 597-598, 1967.
- LANGER, S.Z. - Presynaptic regulation of catecholamine release. **Biochem Pharmacol**, **23** (13): 1793-1800, 1974.
- LEFKOWITZ, R.J. - G Protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, **243**: 18677-18680, 1998.
- LEVINE, J.D.; CLARK, R.; DEVOR, M.; HELMS, C.; MOSKOWITZ, M.A.; BASBAUM, A.I. - Intra-neural substance P contributes to severity of experimental arthritis. **Science**, **226**: 547-549, 1984.
- LEVY, M.N. & SCHWARTZ, P.J., ed. - Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical Implications. N.Y., Futura Publishing Co., Armonk, 1994.
- LI, Y.J.; XIAO, Z.S.; PENG, C.F.; DENG, H.W. - Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **Eur J Pharmacol**, **311**: 163-167, 1996.
- LINDSAY, R.M. & HARMAR, A.J. - NGF regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. **Nature**, **337**: 362-364, 1989.
- LINDSEY, C.J. - Central bradykinin receptor in the SHR and blood pressure. **Progress in Hypertension**, **3**: 109-125, 1995.
- LIU, L.; LO, Y.C.; CHEN, I.J.; SIMON, S.A. - The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceril nonamide. **J Neurosci**, **17**: 4101-4111, 1997.
- LOTTI, T.; HAUTMANN, G.; PANCONESI, E. - Neuropeptides in skin. **J Am Acad Dermatol**, **33** (3): 482-496, 1995.

- LOU, Y.P. & LUNDBERG, J.M. - Inhibition of low pH evoked activation of airway sensory nerves by capsazepine, a novel capsaicin-receptor antagonist. **Biochem Biophys Res Commun**, **189** (1): 537-544, 1992.
- LUDMAN, P.F.; MASERI, A.; CLARK, P.; DAVIES, G.J. - Effects of calcitonin gene-related peptide on normal and atheromatous vessels and on resistance vessels in the coronary circulation in humans. **Circ Res**, **84**: 1993-2000, 1991.
- LUNDBERG, J.M. - Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacol Rev**, **48**: 113-178, 1996.
- LUNDBERG, J.M.; FRANCO-CERECEDA, A.; HUA, X.; HOKFELT, T.; FUSHER, J.A. - Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstriction effects of capsaicin. **Eur J Pharmacol**, **108**: 315-319, 1985.
- LUNDBERG, J.M.; HUA, X.; FREDHOLM, B. - Capsaicin-induced stimulation of the guinea-pig atrium. Involvement of a novel sensory transmitter or a direct action on myocytes? **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **325**: 176-182, 1984.
- MAEDA, A.; KUBO, T.; MISHINA, M.; NUMA, S. - Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **FEBS Lett**, **239**: 339-342, 1988.
- MAGGI, C.A. - The mammalian tachykinin receptors. **Gen Pharmacol**, **26**: 911-944, 1995b.
- MAGGI, C.A. - The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. **J Autonom Pharmacol**, **11**: 173-208, 1991.
- MAGGI, C.A. - Tachykinins and calcitonin gene-related peptide as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, **45**: 1-98, 1995a.
- MAGGI, C.A.; CHIBA, T.; GIULIANI, S. - Human α -calcitonin gene-related peptide-(8-37) as an antagonist of exogenous and endogenous calcitonin gene-related peptide. **Eur J Pharmacol**, **192**: 85-88, 1991.

MAGGI, C.A. & GIULIANI, S. - The neurotransmitter role of calcitonin gene-related

peptide in the rat and guinea pig ureter: effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist and species-related differences in the action of omega conotoxin on calcitonin gene-related peptide release from primary afferents. **Neuroscience**, **43** (1): 261-8, 1991.

MAGGI, C.A. & MELLI, A. - The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Gen Pharmacol**, **19**: 1-43, 1988.

MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; LIPPE, I.T.; GIULIANI, S.; GEPPETTI, P.; DEL BIANCO, E.; SELLERI, S.; MELLI, A. - The effect of omega conotoxin GVIA, a peptide modulator of the N-type voltage sensitive calcium channels, on motor responses produced by activation of efferent and sensory nerves in mammalian smooth muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, **338**: 107-113, 1988.

MAGGI, C.A.; ROVERO, P.; GIULIANI, S.; EVANGELISTA, S.; REGOLI, D.; MELI, A. - Biological activity of N-terminal fragments of CGRP. **Eur J Pharmacol**, **179**: 217-219, 1990.

MAGGI, C.A. & SCHWARTZ, T.W. - The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. **Trends Pharmacol Sci**, **18**: 351-355, 1997.

MANTELLI, L.; AMERINI, S.; FILIPPI, S.; LEDDA, F. - Positive inotropic effects of CGRP and isoprenaline: analogies and differences. **Neuropeptides**, **23**: 193-198, 1992.

MARFURT, C.F.; ELLIS, L.C.; JONES, M.A. - Sensory and sympathetic nerve sprouting in the rat cornea following neonatal administration of capsaicin. **Somatosens Mot Res**, **10** (4): 377-398, 1993.

McGRATH, J. & WILSON, V. - Alpha-adrenoceptor subclassification by classical and response-related methods: same question, different answers. **Trends Pharmacol Sci**, **9**: 162-165, 1988.

- MILLER, M.S.; BUCK, S.H.; SIPES, I.G.; YAMAMURA, H.I.; BURKS, T.F. - Regulation of substance P by nerve growth factor. Disruption by capsaicin. **Brain Res**, **250**: 193-196, 1982.
- MIYAKE, H.; INABA, N.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. - Increased susceptibility of rat gastric mucosa to ulcerogenic stimulation with aging. Role of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Dig Dis Sci**, **41** (2): 339-345, 1996.
- MOLENAAR, P.; SARSERO, D.; KAUMANN, A.J. - Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the putative beta-4 adrenoceptor in mammalian heart. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, **24**: 647-656, 1997.
- MOLNAR, J.; GYORGY, L.; UNYI, G.; KENYERES, J. - Effect of capsaicin on the isolated ileum and auricle of the guinea-pig. **Acta Phys Acad Hung**, **35P**: 369-374, 1969.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, **43**: 109-142, 1991.
- MULDERRY, P.K.; GHATEI, M.A.; RODRIGO, J.; ALLEN, J.M.; ROSENFELD, M.G.; POLAK, J.M.; BLOOM, S.R. - Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissue of the rat. **Neuroscience**, **14**: 947-954, 1985.
- NAGY, J.I.; HUNT, S.P.; IVERSEN, L.L.; EMSON, P.C. - Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. **Neuroscience**, **6**: 1923-1934, 1981.
- NAGY, J.I.; IVERSEN, L.L.; GOEDERT, M.; CHAPMAN, D.; HUNT, S.P. - Dose dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. **J Neuroscience**, **3**: 399-406, 1983.
- ONO, K.; DELAY, M.; NAKAJIMA, T.; IRISAWA, H.; GILES, W. - Calcitonin gene-related peptide regulates calcium current in heart muscle. **Nature**, **340**: 721-724, 1989.
- ONO, K. & GILES, W.R. - Electrophysiological effects of calcitonin gene-related peptide in bull-frog and guinea-pig atrial myocytes. **J Physiol**, **436**: 195-217, 1991.

- PALERMO, N.N.; BROWN, H.K.; SMITH, D.L. - Selective neurotoxic action of capsaicin on glomerular C-type terminals in rat substantia gelatinosa. **Brain Res**, **208** (2): 506-510, 1981.
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. - L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Comm**, **153**: 1251-1256, 1988.
- PARKHOUSE, N. & LEQUESNE, P.M. - Quantitative objective assessment of peripheral nociceptive C fibre function. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, **51**: 28-34, 1988.
- PERKINS, M.N. & CAMPBELL, E.A. - Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo. **Br J Pharmacol**, **107**: 329-333, 1992.
- PERNOW, B. - Substance P. **Pharmacol Rev**, **35**: 85-141, 1983.
- PETERSON, G.L.; HERRON, G.S.; YAMAKI, M.; FULLERTON, D.S.; SCHIMERLIK, M.I. - Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. **Proc Natl Acad Sci**, **81**: 4993-4997, 1984.
- POST, S.R.; HAMMOND, H.K.; INSEL, P.A. - Beta-Adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, **39**: 343-360, 1999.
- PRIVITERA, P.J.; THIODEAUX, H.; YATES, P. - Rostral ventrolateral medulla as a site for the central hypertensive action of kinins. **Hypertension**, **23**: 52-57, 1994.
- QUAYLE, J.M.; BONEY, A.D.; BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. - CGRP activated ATP-sensitive K currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase. **Am J Physiol**, **475**: 9-13, 1994.
- RALEVIC, V.; KHALIL, Z.; DUSTING, G.J.; HELME, R.D. - Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin microvasculature. **Br J Pharmacol**, **106**: 650-655, 1992.
- RAYMOND, J.R.; HNATOWICH, M.; LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G. - Models for regulation of signal transduction processes. **Hypertension**, **15**: 119-131, 1990.

- REGAN, J.W.; KOBILKA, T.S.; YANG-FENG, T.L.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J.; KOBILKA, B.K. - Cloning e expression of kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtypes. **Proc Natl Acad Sci**, **85**: 6301-6305, 1988.
- RIGEL, D.F.; GRUPP, I.L.; BALASUBRAMANIAM, A.; GRUPP, G. - Contractile effects of cardiac neuropeptides in isolated canine atrial and ventricular muscles. **Am J Physiol**, **257**: H1082-1087, 1989.
- RODBELL, M. - The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, **284**: 17-22, 1980.
- RUBINO, A. - Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) neural control of the atrial myocardium. **Gen Pharmacol**, **24** (3): 539-545, 1993.
- RUBINO, A.; AMERINI, S.; LEDDA, F.; MANTELLI, L. - ATP modulates the efferent function of capsaicin-sensitive neurones in isolated guinea-pig atria. **Br J Pharmacol**, **105**: 516-520, 1992.
- RUBINO, A. & BURNSTOCK, G. - Capsaicin-sensitive sensory-motor neurotransmission in the peripheral control of cardiovascular function. **Cardiovasc Res**, **31**: 467-479, 1996.
- RUBINO, A.; RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. - The P1-purinoceptors that mediate the prejunctional inhibitory effect of adenosine on capsaicin-sensitive nonadrenergic noncholinergic neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed are of the A1 subtype. **J Pharmacol Exp Ther**, **267**: 1100-1104, 1993.
- RUIT, K.G.; ELLIOTT, J.L.; OSBORNE, P.A.; YAN, Q.; SNIDER, W.D. - Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor during embryonic development. **Neuron**, **8** (3): 573-87, 1992.
- SAITO, A.; ISHIKAWA, S.; KIMURA, S.; GOTO, K. - Role of CGRP as cardiogenic neurotransmitter in guinea-pig left atria. **J Pharmacol Exp Ther**, **243**: 731-737, 1987.
- SAITO, A.; KIMURA, S.; GOTO, K. - Calcitonin gene-related peptide as potential neurotransmitter in guinea pig right atrium. **Am J Physiol**, **250** (4 Pt 2): H693-8, 1986.

- SCADDING, J.W. - The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. **J Anat**, **131**: 473-484, 1980.
- SIGRIST, S.; FRANCO-CERECEDA, A.; MUFF, R.; HENKE, H.; LUNDBERG, J.M.; FISHER, J.A. - Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. **Endocrinology**, **119**: 381-389, 1986.
- SIMONE, D.A.; NOLANO, M.; JOHNSON, T.; WENDELSCHAFFER-CRABB, G.; KENNEDY, W.R. - Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. **J Neurosci**, **18** (21): 8947-8959, 1998.
- SPATH, E. & DARLING, S.F. - Synthesis of capsaicin. **Ber Chem Ges**, **63B**: 737-740, 1930.
- STARKE, K. - Alpha-adrenoceptor subclassification. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, **88**: 199-236, 1981.
- STILES, G.L.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. - Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. **Physiol Rev**, **64** (2): 661-743, 1984.
- STRICKER, S. Untersuchungen über die Gefäßwurzeln des Ischiadicus. **Sitzungsber Kaiserl Acad Wiss (Wien)**, **3**: 173-185, 1876.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P.M. - Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analogue by dorsal root ganglion membranes. **Brain Res**, **524**:106-111, 1990.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P.M. - Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, **51**:159-211, 1999.
- SZOLCSANYI, J. - Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. **Agents Actions**, **23**: 4-11, 1988.
- SZOLCSANYI, J. - Capsaicin, irritation and desensitization. Neurophysiological basis and future perspectives. **In**: Green, B.G.; Mason, J.R.; Kare, M.R., ed. – Irritation. New York, Dekker, 1990. p. 141-168.

- SZOLCSANYI, J. - Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In: Chahl, L.A.; Szolcsanyi, J.; Lembeck, F., ed. - Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation. Budapest, Akademiai Kiadó, 1984. p. 7-25.
- SZOLCSANYI, J. - A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediating pain. **J Physiol**, **73**: 251-259, 1977.
- SZOLCSANYI, J.; OROSZI, G.; NEMETH, J.; SZILVASSY, Z.; TOSAKI, A. - Endothelin release by capsaicin in isolated working rat heart. **Eur J Pharmacol**, **376** (3): 247-250, 1999.
- TANAKA, H. & SHIGENOBU, K. – Role of β -adrenoceptor-adenylate cyclase system in the developmental decrease in sensitivity to isoprenaline in foetal and neonatal rat heart. **Br J Pharmacol**, **100** (1): 138-142, 1990.
- TAYLOR, D.C.; PIERAU, F.K.; SZOLCSANYI, J. - Capsaicin-induced inhibition of axoplasmic transport is prevented by nerve growth factor. **Cell Tissue Res**, **240**: 569-573, 1985.
- VAN ROSSUM, J.M. - Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. **Arch Inter Pharmacodyn Ther**, **143**: 229-330, 1963.
- VON EULER, U.S. & GADDUM, J.H. - An unidentified depressor substance in certain tissues extracts. **J Physiol**, **72**: 577-583, 1931.
- WHARTON, J.; POLAK, J.M.; MCGREGOR, G.P.; BISHOP, A.E.; BLOOM, S.R. - The distribution of substance P like immunoreactive nerves in the guinea pig heart. **Neuroscience**, **6**: 2193-2204, 1981a.
- WHARTON, J.; POLAK, J.M.; PROBERT, L.; DEMEY, J.; MCGREGOR, G.P.; BRYANT, M.G.; BLOOM, S.R. – Peptide containing nerves in the ureter of the guinea-pig and cat. **Neuroscience**, **6**: 969-982, 1981b.
- WHITTLE, B.J.R.; LOPES-BELMONTE, J.; REES, D.D. - Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. **Br J Pharmacol**, **98**: 646-652, 1989.

- WIMALAWANSA, S.J. - The effects of neonatal capsaicin on plasma levels and tissue contents of CGRP. **Peptides**, **14** (2): 247-252, 1993.
- XIAO, R.P.; AVDONIN, P.; ZHOU, Y.Y.; CHENG, H.; AKHTER, S.A.; ESCHENHAGEN, T.; LEFKOWITZ, R.J.; KOCH, W.J.; LAKATTA, E.G. - Coupling of β_2 -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. **Circ Res**, **84** (1): 43-52, 1999.
- YAOITA, H.; SATO, E.; KAWAGUCHI, M.; SAITO, T.; MAEHARA, K.; MARUYAMA, Y. - Nonadrenergic noncholinergic nerves regulate basal coronary flow via release of capsaicin-sensitive neuropeptides in the rat heart. **Circ Res**, **45** (4): 780-788, 1994.
- ZANESCO, A.; COSTA, S.K.; RIADO, S.R.; NATHAN, L.P.; DE OLIVEIRA, C.F.; DE LUCA, I.M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. - Modulation of coronary flow and cardiomyocyte size by sensory fibers. **Hipertension**, **34**: 790-794, 1999.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE