

LAURA CRISTINA MARRETTO ESQUISATTO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS INDUZIDO PELA
ADENOSINA E ANÁLOGOS EM RATOS: ENVOLVIMENTO DE MASTÓCITOS E
NEURÔNIOS SENSORIAIS***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Laura Cristina Marretto Esquisatto.

Campinas, 22 de junho de 2001.

*Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -*

Campinas

2001

LAURA CRISTINA MARRETTO ESQUISATTO

***EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS INDUZIDO PELA
ADENOSINA E ANÁLOGOS EM RATOS: ENVOLVIMENTO DE MASTÓCITOS E
NEURÔNIOS SENSORIAIS***

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

2001

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
ES69e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 46121
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 17-08-01
 4.º CPD

CM00158832-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

Es69e

Esquisatto, Laura Cristina Marretto

Extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pela adenosina e análogos em ratos: envolvimento de mastócitos e neurônios sensoriais / Laura Cristina Marretto Esquisatto. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Edson Antunes

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

1. Purinas. 2. Inflamação I. Edson Antunes. II. Glauce Aparecida Pinto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Data: 22/06/01

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

*“Olhe para seu trabalho como se
ele tivesse sido realizado por seu
inimigo. Se você olha para
admirá-lo, então está perdido”*

Samuel Butler

*À este Deus Maravilhoso, que pela
infinita misericórdia me fez
chegar ao fim de mais uma
jornada em busca do
conhecimento.
Minha Eterna Gratidão.*

Aos meus pais

*Antônio Carlos e Maria do Carmo,
Obrigada por terem me proporcionado todas as condições para
que eu chegasse até aqui, pela paciência de ajudar, sem
perguntar porquê, pela minha formação moral, intelectual e
profissional, dando-me carinho, dedicação, compreensão,
muito amor e principalmente pelo exemplo de vida, meu
especial agradecimento.*

*À vocês **DEDICO** este trabalho.*

Ao meu irmão

Marcelo Augusto,

Pelo grande amor que nos une, pelo incentivo que sempre me deu, com palavras de estímulo e carinho em todos os momentos difíceis da minha vida. Sempre dedicado, compreensivo e amoroso, meu muito abrigada.

*À você, também **DEDICO** este trabalho*

Ao meu Orientador

Prof. Dr. Edson Antunes,

Em determinados momentos, as palavras são pequenas e insignificantes para expressar tudo o que eu sinto, e sobre toda a emoção vivida durante estes anos. Obrigada pela sua orientação científica, sem a qual não teria sido possível a realização desta tese. Pelo carinho com que me recebeu e confiança em mim depositada. Por ter acreditado em mim. Pela sua compreensão, pronta disposição e dedicação na transmissão dos conhecimentos sempre doados com muita paciência e amor.

Pelas valiosas críticas e sugestões, que contribuíram de modo fundamental para que eu conseguisse galgar mais um passo nos árduos e difíceis caminhos do mundo científico. Pelo incentivo, atenção, apoio, palavras de estímulo e carinho em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo seu ombro amigo, onde muitas vezes eu pude chorar e sair confortada. Obrigada pela grande amizade, mútuo respeito e pelos bons momentos que desfrutamos nestes anos de convivência.

Meu sincero Agradecimento.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela ajuda financeira e técnica durante a realização deste trabalho.

À minha amiga Soraia K. P. Costa, pela sua preciosa colaboração e dedicação na idealização de parte deste trabalho. Por estes anos de convivência, pela sua palavra sempre amiga e incentivadora, e principalmente pelo seu apoio emocional naqueles momentos mais difíceis de minha vida.

Ao meu amigo Enilton Ap. Camargo, pela sua grandiosa e preciosa amizade, pela constante ajuda e apoio em todos os momentos deste trabalho, pelas palavras animadoras e boas conversas ao longo desses anos.

À minha grande e eterna amiga Alessandra Lia Gasparetti, pelo convívio agradável, pela constante ajuda, dedicação, carinho e principalmente pelo exemplo de garra e força sempre presente em todos os momentos desses anos.

Aos demais amigos que sempre me proporcionaram um convívio agradável e que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho: Fernanda Priviero, Tatiane, Fernanda e Marcelo, Paula Rubya, Rachel, Marta Valéria, Rogério Wichi, Adriano, Raquel (Itú), Luciana Nathan, Renata Pereira, Renata Pennachin, Sisi, Cristiane, Sônia, Lara, Nicola, Pamela, Carla, Simone, Lúcia, Ivani, Alessandra Linardi, Alessandra Gambero, Sara, Cleber, Juliano, Marcos, Jaqueline, Cristian, Alice, Heloísa, Edmar, Demian, Donato.

À Prof. Dra. Maria Teresa P. Ribella (IPEN-USP), pela gentileza na marcação da albumina sérica radioativa.

Aos Profs. e colaboradores do Departamento de Farmacologia-FCM (UNICAMP): Angelina Zanesco, Elen Landucci, Stephen Hyslop e Heitor Moreno Jr., pela amizade, discussões e disponibilidade em colaborar sempre.

À todos os técnicos e funcionários do Departamento de Farmacologia-FCM (UNICAMP), pela atenção, dedicação e carinho com que sempre me trataram, pela ajuda técnica, administrativa e apoio com que me proporcionaram durante a realização deste trabalho.

Aos meus eternos amigos: Ana Paula, Humberto, André, André Nardi, Evelyn, Antônia, Maria, Andreia, Sandra, Alessandra, Ivanete, Carla, pela atenção, palavras de apoio e conforto, carinho e constante presença em todos os momentos difíceis de minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Mestrado (1999).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado (1999-2001).

SUMÁRIO

<i>Lista de materiais.....</i>	<i>xiii</i>
<i>Lista de figuras.....</i>	<i>xv</i>
<i>Lista de tabelas.....</i>	<i>xvii</i>
<i>Resumo.....</i>	<i>xix</i>
 1 INTRODUÇÃO	
1.1 <i>Histofisiologia da pele.....</i>	<i>22</i>
1.2 <i>Inflamação Aguda: resposta vascular e celular.....</i>	<i>25</i>
1.3 <i>Neurotransmissão Não-Adrenérgica Não-Colinérgica (NANC) e inflamação neurogênica.....</i>	<i>27</i>
1.4 <i>Substâncias Liberadas dos CSPA</i>	<i>30</i>
1.4.1 <i>Taquicininas e antagonistas.....</i>	<i>30</i>
1.4.2 <i>Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e antagonistas.....</i>	<i>32</i>
1.5 <i>Papel das purinas na inflamação neurogênica experimental....</i>	<i>33</i>
1.6 <i>Objetivos.....</i>	<i>41</i>
 2 MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. <i>Animais.....</i>	<i>43</i>
2.2. <i>Determinação do aumento da permeabilidade microvascular cutânea em pele dorsal de ratos.....</i>	<i>43</i>
2.3. <i>Obtenção de mastócitos e dosagem de histamina.....</i>	<i>44</i>
2.4. <i>Tratamento neonatal com capsaicina.....</i>	<i>45</i>
2.5. <i>Depleção dos estoques de histamina e 5-HT de mastócitos....</i>	<i>45</i>
2.6. <i>Análise estatística</i>	<i>46</i>

3	RESULTADOS	
3.1.	Efeito da injeção intradérmica de adenosina e dos agonistas de receptores A_1 , A_2 e A_3 em pele dorsal de ratos.....	48
3.2.	Efeito de antagonistas não seletivo e seletivos.....	48
3.3.	Papel dos mastócitos nas respostas induzidas pela adenosina, CPA, NECA e IB-MECA in vivo e in vitro.....	55
3.4.	Efeito do tratamento neonatal com capsaicina.....	63
3.5.	Efeito de antagonistas de receptores NK_1 e NK_2 de taquicíninas.....	67
4	DISCUSSÃO.....	74
5	CONCLUSÕES.....	81
6	SUMMARY.....	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIAS

PROCEDÊNCIA

Adenosina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Albumina Bovina Marcada I ¹²⁵	IPEN (USP, São Paulo, Brasil) e ICN
Azul de Evans	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Capsaicina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Ciproheptadina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Composto 48/80	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
CPA	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
DMPX	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
DMSO	Mallinckrodt Chem. (Paris, França)
DPCPX	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Etanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Glucose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. e Farm. (Itapira, SP)
HCl	Chemco (Campinas, Brasil)
Heparina	Roche
IB-MECA	RBI (MA, EUA)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MgCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NECA	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Pentobarbital Sódico	Rhone Merieux (Irlanda)
Salina	Frenesius (Campinas, Brasil)
SR140333	Sanofi Synthelabo (Montpellier, França)
SR48968	Sanofi Synthelabo (Montpellier, França)
Substância P	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Teofilina	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
Tween 80	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Extravasamento proteínas plasmáticas induzido pela adenosina e agonistas de receptores A ₁ (CPA), A ₂ (NECA) e A ₃ (IB-MECA) em pele dorsal de ratos	50
Figura 2 Efeito do antagonista de receptores A ₁ de adenosina, DPCPX, no aumento de permeabilidade microvascular induzido por CPA (agonista A ₁)	52
Figura 3 Efeito do tratamento com antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina, no edema induzido pela adenosina	57
Figura 4 Efeito do tratamento com antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina, no edema induzido por CPA (agonista A ₁)	58
Figura 5 Efeito do tratamento com antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina, no edema induzido por NECA	59
Figura 6 Efeito do tratamento com antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina, no edema induzido por IB-MECA	60
Figura 7 Efeito do tratamento crônico com o composto 48/80 no edema induzido pelo CPA e NECA	61
Figura 8 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por adenosina em pele dorsal de ratos	64
Figura 9 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por CPA e NECA em pele dorsal de ratos	65
Figura 10 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por IB-MECA em pele dorsal de ratos	66

Figura 11 Efeito do antagonista de receptores NK_1 , SR140333, no aumento de permeabilidade vascular induzido pela adenosina	68
Figura 12 Efeito do antagonista de receptores NK_1 , SR140333, no aumento de permeabilidade vascular induzido por CPA	69
Figura 13 Efeito do antagonista de receptores NK_1 , SR140333, no aumento de permeabilidade vascular induzido por NECA	70
Figura 14 Efeito do antagonista de receptores NK_1 , SR140333, no aumento de permeabilidade vascular induzido por IB-MECA.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito da co-injeção de teofilina no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina, CPA, NECA e IB-MECA.....	51
Tabela 2 Efeito do tratamento agudo com o antagonista de receptor A_1 , DPCPX, no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina e agonistas de receptores A_2 e A_3	53
Tabela 3 Efeito da co-injeção de DMPX no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina, CPA, NECA e IB-MECA	54
Tabela 4 Efeito da incubação de mastócitos peritoneais isolados de ratos com adenosina, CPA, NECA, IB-MECA, composto 48/80 e substância P	62
Tabela 5 Efeito do tratamento com o antagonista de receptor NK_2 de taquicinas, SR48968, no edema induzido pela adenosina e agonista de receptores A_1 e A_2	72

RESUMO

O extravasamento de proteína plasmática evocado pela adenosina e agonistas de receptores A_1 (N_6 -ciclopentiladenosina, CPA; 3-30 nmol/sítio), A_2 (5'-etilcarboxamidoadenosina, NECA; 1-10 nmol/sítio) e A_3 (N_6 -[3-iodobenzil]- N -metil-5'-carboxiamidoadenosina, IB-MECA; 0.01-3 nmol/sítio) foi avaliado na microvasculatura de pele de ratos através do acúmulo local da mistura de albumina bovina marcada com I^{125} e azul de Evans previamente administrada pela via endovenosa (e.v.). A injeção intradérmica (i.d.) de adenosina e análogos induziu aumento na permeabilidade microvascular de maneira dose-dependente (IB-MECA>NECA>CPA>adenosina). O antagonista não-seletivo de receptor de adenosina, teofilina (5.7-57 nmol/sítio) inibiu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela adenosina, CPA e NECA, mas não interferiu na resposta evocada pelo IB-MECA. O antagonista seletivo de receptores A_1 , DPCPX (0.1-1.0 mg/kg, e.v.) reduziu marcadamente o extravasamento plasmático induzido pelo CPA, sem afetar as respostas evocadas pela adenosina, NECA e IB-MECA. O antagonista seletivo de receptores A_2 , DMPX (0.45-45 nmol/sítio) inibiu significativamente o extravasamento plasmático evocado pelo NECA, sem interferir nas respostas induzidas pela adenosina, CPA e IB-MECA. O antagonista de receptores NK_1 de taquicininas, SR140333, mas não de receptores NK_2 de taquicininas, SR48968, inibiu significativamente o extravasamento plasmático evocado por doses elevadas de adenosina (100 nmol/sítio), CPA (100 nmol/sítio), NECA (1 nmol/sítio) e IB-MECA (0.1-1 nmol/sítio). Em ratos tratados com capsaicina, o extravasamento plasmático induzido por doses altas de adenosina, CPA e NECA, mas não por IB-MECA, foi significativamente inibido. Os efeitos da adenosina e análogos foram marcadamente inibidos pelo antagonista de receptores de histamina e 5-HT, ciproheptadina bem como pelo tratamento crônico com o composto 48/80. Contudo, tanto a adenosina (1-100 μ M) como os análogos (CPA 10-100 μ M; NECA 1-100 μ M e IB-MECA

100 μM) não foram capazes de induzir liberação de histamina *in vitro* de mastócitos peritoneais isolados de ratos. Em resumo, nossos resultados fornecem evidências que agonistas de receptores A_1 e A_2 , mas não A_3 , podem funcionar como mediadores neurogênicos pró-inflamatórios.

INTRODUÇÃO

1.1. Histofisiologia da pele

A pele, ou tegumento externo, além de funcionar como um revestimento protetor do corpo, é também uma fronteira ativa que se interpõe entre o organismo e o meio ambiente (WILKINSON & MOORE, 1990). Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele compreende uma área de $1,8 \text{ m}^2$, representando aproximadamente 16% do peso corpóreo. É constituída por duas camadas principais: uma camada superficial de células epiteliais intimamente unidas, de origem ectodérmica, a *epiderme*; e uma camada mais profunda de tecido conjuntivo denso não modelado, de origem mesodérmica, a *derme*. Abaixo da pele e em continuidade com a derme está a *hipoderme*, que embora tenha a mesma origem da derme, não é parte da pele, mas é importante pois serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1985). A hipoderme é formada de tecido conjuntivo frouxo, freqüentemente tendo células adiposas depositadas entre as fibras.

A epiderme é constituída essencialmente por uma camada de células epiteliais de revestimento sobrepostas definida como epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. É avascular e sua nutrição se faz por mecanismos de difusão, a partir da derme papilar. A derme é constituída de tecido conjuntivo, sendo este caracterizado por apresentar diversos tipos celulares separadas por abundante material intercelular. Parte desse material é representado por estruturas definidas tais como fibras colágenas, elásticas e reticulares; outra parte é do tipo não estruturada, a substância fundamental amorfa, a qual está envolvida por uma pequena quantidade de fluido, o plasma intersticial, onde situam-se as estruturas vasculares, nervosas e os órgãos anexos tais como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. A hipoderme é formada basicamente por tecido conjuntivo adiposo agrupados em lóbulos, separados por septos de tecido conjuntivo, que assumem

disposições especiais. Além de sua função como depósito nutritivo de reserva, a hipoderme tem como função a proteção mecânica de amortecimento, sobretudo, ao nível dos órgãos internos, bem como a função de termogênese, essencial na homeotermia.

A pele é innervada por fibras autonômicas simpáticas as quais innervam, principalmente, os folículos pilosos e plexos cutâneos de todo o corpo, bem como por fibras nervosas aferentes primárias sensoriais. Morfologicamente, as fibras nervosas aferentes são divididas em duas grandes classes: A-delta (A- δ) e C. As fibras A- δ são mielínicas, de grande diâmetro e de rápida condutância, ao passo que as fibras C possuem diâmetro pequeno, são amielínicas e têm velocidade de condução mais lenta (HOLZER, 1991). A capacidade dessas fibras nervosas sensoriais em receber e transmitir informações e determinar reações inflamatórias em tecidos periféricos têm sido vastamente demonstrada. Grande parte dos neurônios que dão origem a essas fibras tem o corpo celular localizado no gânglio dos nervos espinais ou na raiz espinal dorsal (ou cranial), e axônios que terminam na medula espinal ou no tronco do encéfalo (YOUNG *e col.*, 1998). São designados neurônios de primeira ordem, tendo apenas um prolongamento, o axônio, que se bifurca em um ramo periférico e em um ramo central. O ramo central penetra na raiz dorsal do nervo espinal ou na raiz sensorial do nervo craniano, passando para a medula espinal ou tronco encefálico, respectivamente. O ramo periférico penetra no nervo espinal ou craniano, finalmente, culminando em terminações nervosas que respondem a tipos específicos de estímulos, denominados receptores sensoriais (YOUNG *e col.*, 1998). Os receptores podem ser divididos em três grupos: mecanoreceptores (respondem à informação originada no próprio receptor ou nos tecidos que o circundam, e são associados ao tato, à pressão, à vibração e às sensibilidades de posição dos membros e ao movimento), nociceptores (respondem à dor) e os termoreceptores (respondem aos estímulos quentes e

frios). Com base em critérios funcionais, existem três tipos de nociceptores associados a dois tipos de fibras nervosas aferentes: 1) nociceptores mecanossensíveis com fibras A-delta; 2) nociceptores mecanotérmicos com fibras A-delta; 3) nociceptores polimodais com fibras C, os quais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (NOBACK *et al.*, 1999). Com a ocorrência de trauma ou inflamação, os tecidos lesados liberam mediadores químicos que podem sensibilizar ou mesmo ativar os nociceptores A-delta e C a liberarem neuropeptídeos tais como a substância P, que pode, por sua vez, estimular mastócitos locais a liberar histamina que ativaria os nociceptores (NOBACK *et al.*, 1999). Essas substâncias atuam causando efeitos pró-inflamatórios diversos tais como vasodilatação e conseqüente formação de edema.

A pele possui uma rede vascular importante ao nível da hipoderme e da derme que é formada por dois grandes grupos de vasos: o primeiro compreende as artérias, capilares e veias nutritoras. O segundo grupo compreende o plexo venoso subcutâneo e anastomoses artério-venosas, que formam comunicações entre os plexos arteriais e venosos. As células endoteliais, as quais estão estrategicamente dispostas no vaso sanguíneo como interface entre sangue e o músculo liso vascular, desempenham papel importante no controle do tônus e permeabilidade microvascular. Ao contrário de outras partes do corpo, o controle do fluxo sanguíneo cutâneo é regulado, principalmente, por mecanismos nervosos e não por controle local. Inervações sensoriais estão presentes entre a camada muscular e as células endoteliais da microcirculação cutânea. Assim, é possível que estímulos nervosos que por ventura atinjam a mucosa, possam também estimular a liberação de neuropeptídeos sensoriais.

Os principais objetivos da microcirculação cutânea são suprir de oxigênio e nutrientes os tecidos e drenar os produtos oriundos do metabolismo celular, impedindo que

se acumulem e atinjam níveis tóxicos, sendo assim, considerada o sítio de controle da irrigação tecidual e volume sanguíneo. Cada uma dessas funções está relacionada com um segmento microvascular específico. Em geral, as alterações do tônus, vasodilatação e vasoconstrição ocorrem nas arteríolas. Tais estruturas são comumente conhecidas como vasos de resistência devido à sua estrutura histológica e capacidade controladora da pressão e fluxo sanguíneo periférico. Os esfíncteres pré-capilares apresentam importante função no controle do tônus microvascular. Ao contrário das arteríolas, os capilares não possuem células musculares lisas, mas desempenham papel fundamental na troca de nutrientes do sangue para os tecidos. Embora menos pronunciada do que as arteríolas, as vênulas pós-capilares também possuem uma camada de células musculares lisas. Tais estruturas possuem um papel importante no desencadeamento dos eventos inflamatórios, incluindo extravasamento de proteínas plasmáticas (aumento de permeabilidade microvascular), formação de edema e migração de células inflamatórias. Consequentemente, as vênulas pós-capilares são consideradas alvo importante no processo inflamatório (FORREST & WILLIAMS, 1989). Assim, a pele, como qualquer outro órgão, é passível de ser atingida por fenômenos patológicos básicos que irão determinar as alterações anatomopatológicas do tecido, isto é, inflamação, degeneração e disfunção.

1.2. Inflamação Aguda: resposta vascular e celular

O termo inflamação provém do latim *enflamare*, que significa “atear fogo”. Um símbolo hieroglífico em papiro egípcio de 3.500 anos representado por um braseiro, foi traduzido como inflamação. O processo inflamatório é uma sequência completa de eventos que, segundo Celsus (30 A.C. – 38 D.C.), compreende quatro sinais cardinais clássicos:

calor, rubor, edema e dor. O quinto sinal clínico, a perda a função, foi posteriormente caracterizado por Galeno (130 A.C. – 200 D.C.).

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação causada por danos teciduais, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. É caracterizada sumariamente pelas seguintes fases: 1) alterações no calibre vascular, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo; 2) alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos; 3) migração de células de defesa (leucócitos) e acúmulo no espaço extravascular.

A agressão tecidual é o agente desencadeador da resposta inflamatória, por induzir o rompimento da homeostasia mantida através da relação célula-meio, este último representado pelos fluidos extracelulares e a microcirculação. A agressão tecidual pode ser de origem biológica (microrganismos, imunocomplexos, produtos metabólicos), física (mecânica, térmica e radiação) ou química; a qual estimula a liberação de vários mediadores químicos no local afetado. Essas substâncias modulam uma série de eventos locais, sendo os principais: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor (Para Revisão Ver: SIQUEIRA JR., 2000). Em determinadas situações, os efeitos mediados por essas substâncias também podem ser sistêmicos, como a febre.

A magnitude da resposta inflamatória depende muito mais da intensidade e do tempo de ação do estímulo agressor do que propriamente do tipo de agressão. Em outras palavras, equívale afirmar que a intensidade da resposta inflamatória depende mais da quantidade do que da qualidade do estímulo. Assim, a intensidade da resposta inflamatória, independentemente da causa, será diretamente proporcional à quantidade de tecido lesado.

Comumente, a resposta inflamatória aguda consiste na primeira linha de defesa do organismo contra um agente agressor. Faz parte de uma imunidade inata induzida, de caráter inespecífico, cuja sequência de eventos usualmente independe do tipo de agente agressor. A sequência de eventos inicia-se pelo aumento de fluxo sanguíneo na área lesada causando, conseqüentemente, aumento da temperatura local, seguida de aumento na permeabilidade de vênulas pós-capilares. O aumento de permeabilidade promove extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial que, somado ao aumento de pressão hidrostática de filtração e pressão osmótica intersticial, leva à formação de edema. Em geral, as alterações do fluxo e do calibre vasculares iniciam-se rapidamente após a agressão e se desenvolvem em velocidades variáveis que dependem da gravidade do agente lesivo, das características do tecido afetado, da espécie animal e da coexistência de estados patológicos (ALI *e col.*, 1997).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas fases: aguda e crônica. A resposta aguda tem duração relativamente curta, durando de minutos, horas a alguns dias e ao contrário da resposta imunológica adaptativa, não possui especificidade para o combate ao agente agressor. Este caráter inespecífico deve-se ao fato de que, na inflamação aguda, os mecanismos envolvidos permitem apenas o reconhecimento de uma lesão aos tecidos, não distinguindo o agente agressor, tampouco o que é próprio ou não do organismo (SIQUEIRA JR., 2000).

1.3. Neurotransmissão Não-Adrenérgica Não-Colinérgica (NANC) e Inflamação Neurogênica

Durante muito tempo acreditou-se que a neurotransmissão, a partir de neurônios autonômicos para os tecidos efetores periféricos, era mediada somente por noradrenalina e acetilcolina. Contudo, mesmo após o bloqueio dos neurotransmissores adrenérgicos e colinérgicos, os vasos sanguíneos dilatavam-se em resposta à estímulos nervosos. Com a descoberta de neuropeptídeos tais como a substância P (VON EULER & GADDUM, 1931), revitalizou-se o conceito de que alguns neurônios utilizam mecanismos de transmissão independentes dos mediadores clássicos noradrenalina e acetilcolina. Embora as ações desses neurônios sensoriais tenham sido descritas recentemente, o descobrimento dessas fibras datam do milênio passado. STRICKER (1876) *apud* HOLZER (1992) foi o primeiro pesquisador a observar que a estimulação elétrica de terminações nervosas periféricas de raízes dorsais transectadas causava vasodilatação na área da pele inervada por fibras nervosas sensoriais. BAYLISS (1901) e BRUCE (1913) *apud* HOLZER (1992) também demonstraram que a vasodilatação produzida pela 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. A partir daí, conclui-se que a vasodilatação era provocada por impulsos nervosos que se propagavam no sentido eferente das fibras nervosas sensoriais, promovendo liberação de substâncias vasoativas tais como substância P e CGRP (Peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina; HOLZER, 1992).

Após descobrimento das propriedades farmacológicas da capsaicina (substância irritante extraída de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*) pelo grupo do Prof. Jancsó (JANCSÓ, JANCSÓ-GABOR, SZOLCSANYI, 1967), as funções eferentes dos neurônios

sensoriais passaram a ser melhor compreendidas. Para denotar uma subpopulação de neurônios aferentes primários susceptíveis à ação da capsaicina (SZOLCSANYI, 1977), foram denominados neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina (CSPA, “capsaicin-sensitive primary afferent neurons”).

Histologicamente, os CSPA são compostos por terminais nervosos periféricos, terminal central e corpo do neurônio (pericário), onde postula-se que os neuropeptídeos são sintetizados a partir de seus precursores no gânglio da raiz dorsal e imediatamente, transportados para os terminais nervosos periféricos e central, cuja liberação resulta nas respectivas funções eferentes e aferentes (LÜNDBERG, 1996). A transmissão nervosa do CSPA para o SNC se dá através de sinapses localizadas 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) entre seus respectivos terminal central e o neurônio de segunda ordem (YAKSH *e col.*, 1999). A liberação de neuropeptídeos dos terminais nervosos periféricos caracteriza a função eferente dos CSPA, cuja resposta resulta, por exemplo, em inflamação neurogênica. A função aferente dos CSPA representa a liberação de neuropeptídeos do terminal central, cuja resposta determina percepção de dores viscerais, somáticas e ativação de vários reflexos.

A inflamação neurogênica compreende uma série de eventos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade microvascular) decorrentes da liberação de neuropeptídeos, tais como a substância P (SP) e o CGRP, de neurônios aferentes primários, frente à estimulação química, mecânica ou térmica (LEMBECK & HOLZER, 1979; BALUK, 1997). Uma vez liberadas, essas substâncias atuam em células-alvo através de receptores específicos, causando efeitos pró-inflamatórios diversos, tais como vasodilatação arteriolar, com aumento do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade venular,

alterações na contratilidade do músculo liso, desgranulação de mastócitos e uma variedade de efeitos sobre o recrutamento de leucócitos e fibroblastos (HOLZER, 1992, 1998; MAGGI, 1995). Alguns neuropeptídeos estão também implicados na fisiopatologia de doenças inflamatórias, incluindo asma, artrite, nefrite e doenças de pele (psoríase, urticárias e dermatites atópicas; LEMBECK *e col.*, 1979; GAMSE & SARIA, 1987; NAUKKARIEN *e col.*, 1989; HERNANZ *e col.*, 1989; COULSON & HOLDEN, 1990; MAGGI, 1995; BRAIN & CAMBRIDGE, 1996).

1.4. *Substâncias liberadas dos CSPA*

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

1.4.1. *Taquicininas e antagonistas*

Descoberta por VON EULER & GADDUM (1931), a substância P, inicialmente isolada de extratos de cérebro e de intestino, apresentava ações hipotensoras semelhantes às da ACh (acetilcolina); contudo, as mesmas não eram bloqueadas por antagonistas muscarínicos. Anos depois, a presença de substância P em neurônios sensoriais e a sua

sensibilidade à capsaicina foram descritas. A presença de decapeptídeos semelhantes à substância P, denominados neurocinina A e neurocinina B, foram também isolados do sistema nervoso central (GASPAROVIC *e col.*, 1964; KIMURA *e col.*, 1983).

A substância P e as neurocininas A (NKA) e B (NKB) pertencem à família das taquicininas e possuem homologia estrutural entre si. Muitos dos efeitos fisiopatológicos atribuídos à sequência C-terminal das taquicininas são mediados pela ativação de receptores NK₁, NK₂ e NK₃ (MAGGI, 1995). Em geral, as taquicininas atuam como agonistas de seus respectivos receptores, diferindo apenas com relação à afinidade. Sabe-se que a substância P liga-se preferencialmente ao receptor NK₁, enquanto a NKA e NKB ligam-se preferencialmente aos receptores NK₂ e NK₃, respectivamente (MAGGI, 1995). As taquicininas, quando liberadas do terminal central dos CSPA, apresentam papel importante na transmissão da dor (GEPPETTI *e col.*, 1988); contudo, quando liberadas de terminais periféricos, resulta no processo inflamatório neurogênico (MAGGI & SCHWARTZ, 1997). A substância P é o principal mediador responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, pelo extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema na pele de roedores e humanos (XU *e col.*, 1992). Sugere-se que o aumento de permeabilidade vascular induzido pela substância P seja mediado por dois mecanismos: estimulação direta dos receptores NK₁, localizados nas células endoteliais de vênulas pós-capilares, e ativação de mastócitos através da interação entre cargas iônicas deste peptídeo e substâncias presentes na membrana dos mastócitos, que secundariamente leva a liberação de histamina e 5-HT (BRAIN & WILLIAMS, 1989). A existência de receptores NK₁ de taquicininas em mastócitos também tem sido descrita (OGAWA *e col.*, 1999), sugerindo que a substância P pode desgranular mastócitos via ativação direta de receptores de taquicininas presentes nestas células. Contudo, alguns

estudos mostram que a substância P, quando administrada exogenamente, atua sobre mastócitos ao passo que a mesma, quando liberada endogenamente, não possui esta capacidade (KOWALSKI *e col.*, 1990). Ao contrário da substância P, a NKA não desgranula mastócitos. Isto deve-se à ausência do N-terminal básico na sua estrutura química (BRAIN & WILLIAMS, 1989).

Os primeiros antagonistas de receptores de taquicinas foram descritos no início dos anos 80. Contudo, eram pouco estáveis e seletivos (LEANDER *e col.*, 1981). Posteriormente, iniciou-se o desenvolvimento e síntese de antagonistas não-peptídicos potentes com ações seletivas para os receptores NK₁ (SR140333 e CP96345) e o NK₂ (SR48968; GARRET *e col.*, 1991). Estudos *in vivo* mostraram que o SR140333, mas não o SR48968, reduz significativamente o extravasamento plasmático induzido por estimulação térmica e antidrômica na pele de ratos, bem como aquele induzido pelo GR73632, agonista de receptores NK₁ (TOWLER & BRAIN, 1998).

1.4.2. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e antagonistas

O CGRP foi um dos primeiros peptídeos vasoativos descobertos a partir de estudos imunohistoquímicos em células de tireóide de ratos idosos e células cancerosas de tireóide humana (AMARA *e col.*, 1985). Tanto no homem quanto no rato, foram isoladas duas isoformas moleculares do CGRP, denominadas CGRP- α e CGRP- β , sendo ambas semelhantes quanto à atividade biológica (BRAIN, 1996). É formado por 37 resíduos de aminoácidos resultante do tratamento alternativo do gene da calcitonina (AMARA *e col.*, 1985) e está presente em várias espécies, incluindo a humana (HOLZER, 1998).

Muitos efeitos biológicos atribuídos ao CGRP são decorrentes da ativação de receptores CGRP₁ e CGRP₂. Ao contrário da substância P, o CGRP não causa

extravasamento de proteínas plasmáticas, mas aumenta as respostas exsudativas evocadas pela substância P (BRAIN & WILLIAMS, 1985). O CGRP causa vasodilatação, sendo esse efeito independente de endotélio e provavelmente mediado pelo acúmulo de AMPc na musculatura lisa vascular (HUGHES & BRAIN, 1994). Entretanto, em determinados leitos vasculares, especialmente em grandes artérias, a vasodilatação induzida pelo CGRP é parcialmente dependente da liberação de óxido nítrico (GRAY & MARSHALL, 1992). Estudos imunohistoquímicos revelaram que, apesar da sequência C-terminal do CGRP apresentar alta afinidade para seus receptores, estes fragmentos não possuem atividade intrínseca, ou seja, não desencadeiam qualquer ação farmacológica (MAGGI *e col.*, 1991). Assim, fragmentos das sequências C-terminal do CGRP foram sintetizados 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 (MAGGI *e col.*, 1991; DOODS *e col.*, 2000).

1.5. *Papel das purinas na inflamação neurogênica experimental*

A adenosina e os nucleotídeos purinérgicos, em particular o ADP (adenosina difosfato), ATP (5'-adenosina trifosfato), UDP (uridina difosfato) e o UTP (uridina trifosfato), produzem uma variedade de efeitos farmacológicos não diretamente relacionados a seus papéis no metabolismo energético. Em 1929, foi demonstrado que a injeção de adenosina em ratos anestesiados gerava redução da frequência cardíaca, queda na pressão arterial, vasodilatação e inibição das contrações intestinais (DRURY & SZENT-GYORGY, 1929). A partir daí, sugeriu-se que a adenosina ou ATP estivessem implicados em outros mecanismos fisiológicos, tais como a regulação do fluxo coronariano,

vasodilatação antidrômica produzida pela estimulação retrógrada dos nervos sensitivos e agregação plaquetária (BURNSTOCK, 1978).

Na última década, numerosos trabalhos vem reforçando a idéia que a adenosina e nucleotídeos relacionados, juntamente com a substância P e CGRP, são importantes moduladores endógenos da atividade neuronal de terminações sensoriais (NISHIMURA *e col.*, 1990; SAWYNOK & REID, 1997; DOWD *e col.*, 1998; KAKUYAMA *e col.*, 1998). Há trabalhos ainda que indicam que a adenosina possa ser um anticonvulsivante endógeno e possuir ação ansiolítica através da modulação dos receptores de benzodiazepínicos (CHIN, 1989). Entretanto, dependendo do receptor ativado, modelo experimental e espécie animal, a adenosina e nucleotídeos, principalmente o ATP e ADP, atuam como agentes inibitórios ou excitatórios dos terminais nervosos sensoriais (AHLUWALIA & CELLEK, 1997).

Tantos em humanos quanto em animais de experimentação, os receptores purinérgicos estão presentes em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo as células hematopoiéticas, mastócitos, miocárdio, epitélio intestinal, células musculares, endotélio e células secretoras (MARTIN, 1992; PEAKMAN & HILL, 1994, 1996; MAQUARDT & WALKER, 1994; PUFFINBARGER *e col.*, 1995).

Os receptores de adenosina e nucleotídeos relacionados foram, durante muito tempo, classificados em subtipos P_1 e P_2 , onde os primeiros eram tidos como os responsáveis pelos efeitos biológicos da adenosina, enquanto os últimos, pelos efeitos biológicos do ADP e ATP (BURNSTOCK, 1978). Entretanto, em vista do grande avanço na clonagem e expressão molecular dos subtipos de receptores purinérgicos, uma nova avaliação e classificação desses receptores foi recentemente feita pelo *Committee on*

Receptor Nomenclature and Drug Classification pela IUPHAR (FREDHOLM *e col.*, 1997).

De acordo com essa nova classificação, os receptores P_1 passaram a ser classificados em A_1 , e divididos em 3 novas classes, denominados A_1 , A_2 e A_3 . O receptor A_2 foi subdividido em dois subtipos: A_{2A} e A_{2B} (ONGINI & FREDHOLM, 1996). Em relação ao mecanismo de transdução desses receptores, sabe-se que a ativação dos receptores A_1 e A_3 determina inibição da adenilato ciclase, reduzindo a formação do AMPc intracelular (CARRUTHERS & FOZARD, 1993). Ao contrário, os subtipos A_{2A} e A_{2B} são acoplados à proteína G e, uma vez estimulados, determinam ativação da adenilato ciclase. Mais recentemente, foi relatado que algumas das ações mediadas pelos receptores A_{2B} são moduladas por outras vias que não a do AMPc (FREDHOLM *e col.*, 1996).

Estudos de clonagem, purificação e sequenciamento mostraram que os receptores A_1 de adenosina apresentam 36.600 daltons e 326 aminoácidos. São encontrados em grande número no cérebro (cerebelo e hipocampo), medula espinhal, testículos e tecido adiposo e, em menor número nos rins, baço e coração. A ativação desses receptores e a resposta celular envolvem vários segundos mensageiros, podendo haver inibição da adenilato ciclase (MUNSHI *e col.*, 1991), aumento da corrente de potássio (TRUSSEL & JACKSON, 1985), estimulação da fosfolipase C (GERWINS & FREDHOLM, 1992) e inibição da hidrólise do fosfatidilinositol (DELAHUNTY *e col.*, 1988).

Os receptores A_2 possuem peso molecular em torno de 45.000 daltons e alta afinidade para adenosina, estando presentes em grande número no cérebro, timo, plaquetas e células endoteliais (SCHIFFMANN *e col.*, 1991). Os receptores A_{2B} tem peso molecular em torno de 36.350 daltons e baixa afinidade pela adenosina, e são encontrados principalmente no cólon, esôfago, antro gástrico e mastócitos (SHEPHERD *e col.*, 1996).

Os receptores A_3 foram clonados de testículos de rato e cérebro de ratos, ovelhas e humanos (ZHOU *e col.*, 1992). Sua estimulação produz inibição da adenilato ciclase, ativação do metabolismo dos fosfoinosítídeos com formação de IP_3 , além de ativar enzimas antioxidantes (ALI *e col.*, 1990).

O receptor A_1 está envolvido na regulação da liberação de neurotransmissores, sendo seletivamente ativado por análogos estáveis da adenosina com nitrogênio na posição N^6 . Estes incluem principalmente a N^6 -ciclopentiladenosina (CPA), N^6 -ciclohexiladenosina (CHA), 2-cloro- N^6 -ciclopentiladenosina (CCPA) e (S)- N^6 -endonorborniladenosina ((S)-ENBA). Os receptores A_2 são ativados seletivamente por análogos estáveis da adenosina que possuem nitrogênio na posição 2 ou 5; o mais comum é o 5'-N-etilcarboxiamidoadenosina (NECA; VAN CALKER, 1979).

De modo geral, a administração da adenosina e nucleotídeos purinérgicos (principalmente o ATP) em animais de experimentação e preparações biológicas diversas determina efeitos proinflamatórios complexos. Isto deve-se em parte à capacidade destes compostos de causarem tanto efeitos diretos quanto indiretos sobre terminações nervosas.

Além de ações pró-inflamatórias, a adenosina interage com células inflamatórias, particularmente o neutrófilo (CRONSTEIN, 1994), determinando efeitos anti-inflamatórios tais como prevenção da diapedese ou da adesão de neutrófilos (CRONSTEIN *e col.*, 1987; LESCH *e col.*, 1991) e redução da geração de água oxigenada (CRONSTEIN *e col.*, 1987), através de receptores do tipo A_2 .

A ativação de receptores A_1 determina inibição da liberação de neurotransmissores e outras funções neuronais (PATON *e col.*, 1981; DUNWIDDIE & FREDHOLM, 1989). Ao contrário, a ativação de receptores A_2 promove, de modo geral, efeito excitatório relacionado ao aumento da liberação de neurotransmissores incluindo a acetilcolina,

substância P, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), dopamina e noradrenalina (SEBASTIÃO E RIBEIRO, 1996). A ação inibitória ou excitatória no terminal nervoso pode resultar, por exemplo, em inibição (pela ativação de receptores A_1) ou estimulação (pela ativação dos receptores A_2) de hiperalgesia (SAWYNOK, 1998). Assim, a ativação de receptores A_1 causa efeito antinoceptivo em roedores, enquanto que a ativação do subtipo A_2 produz efeito hiperalgésico (DOAK & SAWYNOK, 1995). No coração, a liberação da adenosina em resposta ao processo isquêmico evoca dor anginosa devido, provavelmente, à ativação dos receptores A_{2A} em neurônios aferentes nociceptivos (KHAKH & KENNEDY, 1998). A ativação dos receptores A_3 também resulta em dor inflamatória, mas, nesse caso, o fenômeno parece ser dependente da liberação de histamina e 5-HT mastocitários, substâncias essas capazes de atuar diretamente em terminais nervosos sensoriais, liberando outros fatores inflamatórios já conhecidos (SAWYNOK, 1998). À semelhança da dor inflamatória, a vasodilatação neurogênica induzida pela capsaicina (substância capaz de ativar seletivamente fibras sensoriais) em leito arterial mesentérico de rato é inibida por agonistas de receptores A_1 , mas não por agonistas de receptores A_2 (RUBINO *et al.*, 1993).

Em preparações vasculares isoladas com endotélio íntegro (ou destituído do mesmo), as ações vasodilatadoras induzidas pela adenosina são ainda pouco compreendidas, especialmente quanto à importância do óxido nítrico (NO) como mediador desse fenômeno (FEOKTISTOV & BIAGGIONI, 1997).

Grande parte das ações inflamatórias da adenosina envolve ativação de mastócitos. Esta célula possui o receptor A_3 e A_{2B} , que, uma vez ativado pela adenosina desgranula e, conseqüentemente, libera histamina e 5-HT de seus estoques intracelulares (CHURCH *et al.*, 1986; LINDEN, 1994; FOZARD *et al.*, 1996). Porém, muito dos efeitos da adenosina observados *in vitro* em mastócitos e basófilos são contraditórios. A capacidade da

adenosina em potencializar ou inibir a liberação de mediadores de mastócitos parece depender de um número grande de variáveis incluindo tipo celular, concentração de adenosina, tempo de incubação, grau de histamina liberada e estímulo usado (CAMPOS *et al.*, 2000). MARQUARDT *et al.* (1978) observaram que a adenosina, nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-4} M, potencializa a liberação de histamina induzida por antígeno, concanavalina A, composto 48/80 e ionóforo de cálcio A23187 em mastócitos peritoneais de ratos, e sugeriram que a adenosina atua na membrana celular. Outros autores comprovaram que esse efeito é dependente da concentração de adenosina por atuar em diferentes tipos de receptores (CHURCH *et al.*, 1985). Contudo, dependendo da concentração, a adenosina pode atuar tanto em sítios intracelulares como em receptores de superfície nos mastócitos (LOHSE *et al.*, 1987). Por outro lado, NISHIBORI *et al.* (1983) demonstraram que em doses baixas (10^{-9} a 10^{-8} M), a adenosina causa inibição da liberação de mediadores de mastócitos, e em doses acima de 10^{-6} M causa potencialização. Acredita-se que a inibição da liberação de histamina de mastócitos é decorrente da interação com receptores intra e extracelulares (PEACHELL *et al.*, 1989). Trabalhando com fragmentos de pulmão humano, OTT *et al.* (1992) observaram que a adenosina causa dois efeitos opostos na liberação de histamina: potencialização, por um efeito em receptores intracelulares, e inibição, por um efeito em receptores extracelulares, provavelmente em receptores A_2 .

Estudos recentes demonstraram que a adenosina, quando administrada localmente na pata traseira de ratos, produz edema o qual é bloqueado por antagonistas de receptores de histamina (mepiramina) e serotonina (cetanserina), confirmando o envolvimento de mastócitos (SAWYNOK *et al.*, 1999). Como mastócitos de ratos expressam receptores A_{2B}

e A_3 , a ativação dos mesmos resultaria na liberação de mediadores que contribuiria para a formação do edema (LINDEN, 1994).

É sabido que os mastócitos estão localizados próximos de terminais nervosos sensoriais, e desta forma, a estimulação das fibras nervosas pode resultar na liberação de substâncias capazes de desgranular estas células (DIMITRIADOU *e col.*, 1991). Além disso, a histamina liberada é capaz de ativar os terminais dos neurônios sensoriais levando à liberação de neuropeptídeos vasoativos, potencializando a dor inflamatória (SIMONE *e col.*, 1987; SARIA *e col.*, 1988; HILL, 1990). Recentemente, demonstrou-se que a injeção intraplantar de N_6 -benzil-NECA (etilcarboxiamidoadenosina), agonista A_3 , produz edema de pata em ratos, o qual é inibido por antagonistas de receptores de histamina e 5-HT, mas não por antagonistas de receptores A_1 ou A_2 . Estes resultados sugerem que a resposta proinflamatória resultante da ativação de receptores A_3 é mediada pela liberação direta de histamina e 5-HT de mastócitos, independentemente da participação das fibras sensoriais (SAWYNOK *e col.*, 1997). Em preparações de bochecha de hamster, a adenosina (e um agonista seletivo de receptor A_3) causou vasoconstrição dependente da ativação de receptores A_3 localizados em mastócitos periarteriolas (SHEPHED *e col.*, 1996). Os mastócitos parecem também mediar os efeitos da adenosina na resposta inflamatória das vias aéreas. Sabe-se que a inalação de adenosina (ou seus precursores) determina broncoconstrição em pacientes asmáticos, mas não em indivíduos normais (CUSHLEY *e col.*, 1984). Apesar do mecanismo não estar inteiramente estabelecido, sugere-se que este efeito seja decorrente da ativação de mastócitos locais (KHAKH & KENNEDY, 1998). Estudos prévios demonstram que os receptores A_1 não estão expressos em mastócitos, e, aparentemente, a ação broncoconstritora induzida pela adenosina (supostamente dependente da ativação de mastócitos) ocorreria através da estimulação de receptores A_{2B} ,

os quais já foram identificados em mastócitos humanos (WALDAY & AAS, 1991). É curioso que nas vias aéreas de cobaias, a adenosina inibe a contração de bronquíolos induzida pela estimulação elétrica (KAMIKAWA & SHIMO, 1991), através da redução da liberação de substância P das fibras nervosas sensoriais (KAMIKAWA & SHIMO, 1991). Reforçando estes achados, MORIMOTO *e col.* (1993) demonstraram que agonistas de receptores A_2 , mas não A_1 , inibem a contração das vias aéreas induzida pela capsaicina em cobaias, bem como o extravasamento plasmático causado pelo cigarro em traquéia de rato. Esses dados, em conjunto, sugerem que, em vias aéreas de cobaias e ratos, a atividade nervosa sensorial é negativamente modulada por receptores A_2 . Por outro lado, em ratos anestesiados, a adenosina ativa fibras C pulmonares sendo este efeito inibido por antagonista de receptores A_1 (DPCPX), mas não por antagonista A_2 , o que indica que a estimulação das fibras C pulmonares ocorre via estimulação de receptores A_1 (HONG *e col.*, 1998).

Vários estudos sugerem que as purinas endógenas (ou compostos análogos sintéticos) funcionam como agentes inflamatórios (ou antiinflamatórios em algumas situações) mas, em virtude da ausência de ferramentas farmacológicas seletivas, o papel desses nucleotídeos como mediadores inflamatórios não está totalmente elucidado. Embora vários estudos tenham revelado alguns eventos moleculares e fisiopatológicos do sistema purinérgico no processo inflamatório, a compreensão exata das múltiplas vias onde os nucleotídeos modulam a transmissão neurogênica requer melhor entendimento. Assim, acredita-se que o sistema purinérgico represente um alvo importante para o desenvolvimento de uma nova classe de drogas com potencial para o tratamento de doenças inflamatórias neurogênicas.

OBJETIVOS

Em visto do exposto acima, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Investigar a capacidade da adenosina e agonistas seletivos de receptores A_1 (CPA), A_2 (NECA) e A_3 (IB-MECA) de promover aumento da permeabilidade microvascular na pele dorsal de ratos;
- 2) Investigar o papel dos mastócitos e neurônios sensoriais no aumento da permeabilidade microvascular induzida pela adenosina e análogos relacionados;
- 3) Investigar a capacidade da adenosina e agonistas seletivos de receptores A_1 , A_2 e A_3 de liberar histamina de mastócitos peritoneais isolados de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Os experimentos foram conduzidos com o emprego de ratos machos adultos (200-250 g) da linhagem Wistar, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP; Campinas/SP). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e, dependendo do protocolo experimental, os mesmos foram mantidos conscientes ou anestesiados de forma apropriada com pentobarbital sódico (Sagatal 40 mg/kg; i.p.) ou halotano (inalado). Os protocolos experimentais apresentados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP/SP; protocolo nº 152-2

2.2. Determinação do aumento da permeabilidade microvascular cutânea em pele dorsal de ratos

Os animais foram superficialmente anestesiados com dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.). O extravasamento de proteína plasmática em resposta aos agentes administrados intradermicamente (i.d.) foi avaliado em função do acúmulo local da mistura de albumina bovina marcada com I¹²⁵ (2.5 µCi/kg) e azul de Evans (0.3 ml/kg, 2.5% w/v), previamente administrada pela via endovenosa (e.v.) peniana ou caudal (BRAIN & WILLIAMS, 1985). A pele dorsal desses animais foi previamente depilada, e os agentes diluídos em solução Tyrode (em mM; NaCl 137, KCl 2.7, MgCl 0.5, NaH₂PO₄ 0.4,

NaHCO₃ 11.9, glucose 5.6) foram administrados em sítios randomizados, sempre em volume de 100 µl. Os antagonistas utilizados foram injetados pela via intradérmica, intraperitoneal ou endovenosa, conforme descrito em Resultados. Após 30 min, uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada através de punção cardíaca e os animais sacrificados por superdosagem anestésica. A pele dorsal foi removida e os sítios injetados foram recortados (15 mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada amostra de tecido e sangue foi quantificada em contador gama. A resposta obtida em cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

2.3. Obtenção de mastócitos e dosagem de histamina

Os animais foram anestesiados em uma câmara saturada com halotano e exangüinados seccionando-se os vasos cervicais. Em seguida, 10 ml de tampão Krebs-Ringer (KRP, pH 7,3) foram injetados na cavidade abdominal dos animais, massageando-se delicadamente o abdômem dos mesmos, para melhor distribuição por toda a cavidade. Os lavados peritoneais foram coletados em tubos de polipropileno e levados à centrifugação durante 3 min (800 rpm), à temperatura ambiente. Os sedimentos foram lavados (2 vezes) com tampão KRP e novamente levados à centrifugação por 3 min (800 rpm). Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos com KRP (6.5 ml) em tubos de vidro. Estimulos como o composto 48/80 (10 µg/ml), substância P (100 µg/ml) ou agonistas purinérgicos (1-100 µM) foram adicionados à suspensão celular (volume final de 1.0 ml) e esta incubada durante 20 min à 37 °C. Após centrifugação, ao sobrenadante de cada tubo foi adicionado 200 µl de uma solução de HCl (1 N), enquanto o precipitado foi ressuspendido

em 1 ml da solução HCl (0,1 N), e incubado durante 10 min à 100 °C. Nova centrifugação foi realizada e os sobrenadantes foram removidos e estocados à -20 °C para a determinação de histamina, através da metodologia de cromatografia líquida (mod. Hewlett-Packard 100) acoplada ao espectômetro de massa (mod. micromass Quatro II). A dosagem de histamina foi realizada tanto no resíduo quanto no sobrenadante, sendo a porcentagem de histamina liberada calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ de histamina liberada} = \frac{\text{resíduo}}{\text{resíduo} + \text{sobrenadante}} \times 100$$

Todos os valores obtidos foram descrito no gráfico como % de histamina liberada, corrigidos subtraindo-se o valor de liberação espontânea.

2.4. Tratamento neonatal com capsaicina

Após o segundo dia de vida, ratos neonatos de ambos os sexos (6-8 g) foram superficialmente anestesiados com halotano, e submetidos a injeção subcutânea (s.c.) de capsaicina (50 mg/kg) na região dorsal. Ratos controle receberam igual volume (100 µl) do veículo (1:1:8; Tween 80:etanol:NaCl 0,9 %; JANCÓS, JANCÓS-GABOR & SZOLCSANYI, 1967). Os animais foram mantidos aquecidos e sob observação durante 1 h e devolvidos às respectivas mães para aleitamento até o 21º dia, quando foram separados por sexo, em caixas coletivas, até o momento do experimento (60º- 90º dia de vida).

2.5. Depleção dos estoques de histamina e 5-HT de mastócitos

Para depleção dos estoques de histamina e 5-HT, os ratos (200-250 g) receberam injeções do composto 48/80 (5 mg/kg, s.c.), por um período de 3 dias consecutivos, enquanto o grupo controle recebeu salina (100 µl/rato; AHLUWALIA *e col.*, 1994). Os experimentos foram realizados no terceiro dia de tratamento. Para confirmar a eficiência do tratamento, foi avaliado o edema de pele induzido pelo próprio composto 48/80.

2.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como valores da média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para *n* animais. Para a análise dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste modificado de Bonferroni's ou Student-Newman-Keuls (Software US. 04a Graphpad Instat, 1990). Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos e demonstrados com os seguintes símbolos: *, **, ***.

RESULTADOS

3.1. *Efeito da injeção intradérmica de adenosina e dos agonistas de receptores A₁, A₂ e A₃ em pele dorsal de ratos*

A injeção intradérmica (i.d.) de adenosina (30-300 nmol/sítio) causou, de maneira dependente da dose, extravasamento de proteínas plasmáticas em pele dorsal de ratos quando comparado à resposta obtida com o Tyrode (Fig. 1). O mesmo aconteceu com os agonistas de receptores A₁ (ciclopentiladenosina; CPA; 3-30 nmol/sítio), A₂ (5'-N-etilcarboxiamidoadenosina; NECA; 1-10 nmol/sítio) e A₃ (N⁶-[3-iodobenzil]-N-metil-5'-carboxiamidoadenosina; IB-MECA; 0.01-3 nmol/sítio) que induziram extravasamento de proteína plasmática significativo em doses aproximadamente 10 a 30 vezes menores do que as da adenosina (Fig. 1). Dentre os agonistas de receptores de adenosina utilizados, o mais potente em aumentar a permeabilidade venular foi o IB-MECA (Fig. 1).

3.2. *Efeito de antagonistas não seletivos e seletivos*

A tabela 1 mostra que o extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina (30-300 nmol/sítio), CPA (3 nmol/sítio) e NECA (1 nmol/sítio) foi inibido ($P < 0.05$) de forma marcante pela co-injeção com a teofilina, antagonista não-seletivo de receptores de adenosina, nas doses de 5.7 a 57 nmol/sítio. Contudo, o extravasamento de proteína plasmática induzido pelo IB-MECA (1 nmol/sítio) não foi inibido de modo significativo pela co-injeção com a teofilina. Injetada isoladamente, a teofilina não causou extravasamento plasmático significativo (13 ± 2.3 , 6.5 ± 0.7 e 8 ± 1.0 μ l/sítio para 5.7, 17 e 57 nmol/sítio, respectivamente) quando comparado ao Tyrode (7 ± 0.4 μ l/sítio).

O tratamento prévio (15 min) dos ratos com DPCPX (1 mg/kg, e.v.), antagonista seletivo de receptor A_1 , causou inibição significativa do extravasamento de proteína plasmática evocado pelo CPA (10-30 nmol/sítio), conforme ilustrado na Fig. 2. Este antagonista não interferiu nas respostas evocadas pela adenosina (30-300 nmol/sítio), NECA (0.1-1 nmol/sítio) e IB-MECA (0.01-3 nmol/sítio; Tabela 2).

O extravasamento de proteína plasmática induzido por NECA (1 nmol/sítio) foi inibido ($P < 0.05$) de forma marcante pela co-injeção com DMPX, antagonista seletivo de receptor A_2 , nas doses de 0.45 a 45 nmol/sítio (Tabela 3). A co-injeção de DMPX com adenosina (300 nmol/sítio), CPA (3 nmol/sítio) ou IB-MECA (1 nmol/sítio) não interferiu significativamente nas respostas evocadas pelos mesmos (Tabela 3). Injetado isoladamente, o DMPX não causou extravasamento de proteína plasmática significativo (10 ± 2.0 , 10 ± 1.6 e 7 ± 1.4 μ l/sítio para 0.45, 4.5 e 45 nmol/sítio, respectivamente) quando comparado ao Tyrode (6 ± 0.7 μ l/sítio).

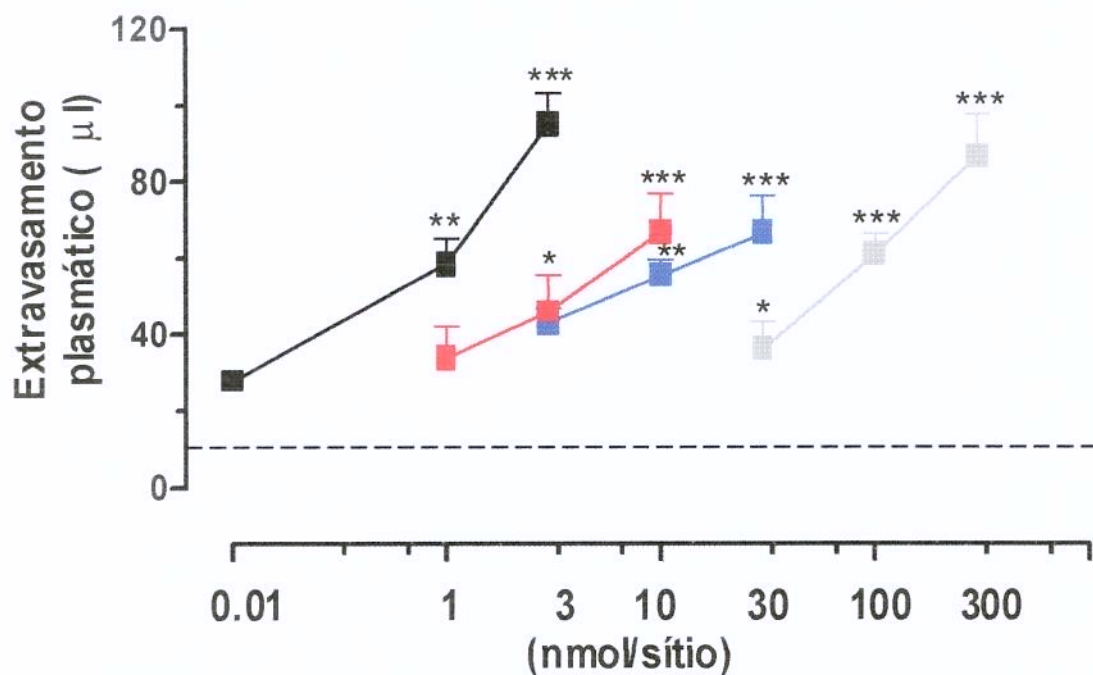


Figura 1. Extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina (■) e agonistas de receptores A_1 (ciclopentiladenosina; CPA; ■), A_2 (5'-etilcarboxamidoadenosina; NECA; ■) e A_3 (N^6 -[3-iodobenzil]- N -metil-5'-carboxiamidoadenosina; IB-MECA; ■) em pele dorsal de ratos. O tyrode está representado pela linha tracejada. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 5-6 animais. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ em relação ao Tyrode.

Tabela 1. Efeito da co-injeção de teofilina (5.7-57 nmol/sítio) no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina (300 nmol/sítio), CPA (agonista A₁; 3 nmol/sítio), NECA (agonista A₂; 1 nmol/sítio) e IB-MECA (agonista A₃; 1 nmol/sítio).

Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 3 animais.

<i>Extravasamento plasmático (μl/sítio)</i>				
Substâncias	Controle	Teofilina (nmol/sítio)		
		5.7	17	57
Adenosina	82 $\pm$ 0.6	88 $\pm$ 6.5	42 $\pm$ 6.3*	32 $\pm$ 5.3*
CPA	63 $\pm$ 3.3	88 $\pm$ 10.6	27 $\pm$ 13*	44 $\pm$ 4.0*
NECA	34 $\pm$ 2.7	36 $\pm$ 6.6	17 $\pm$ 2.5*	7.6 $\pm$ 0.4*
IB-MECA	32 $\pm$ 3.5	22 $\pm$ 2.9	27 $\pm$ 4.7	21 $\pm$ 2.3

*Indica $P < 0.05$ quando comparado ao seu respectivo valor de controle. CPA, N₆-ciclopentiladenosina; NECA, 5'-N-etilcarboxamidoadenosina; IB-MECA, N⁶-[3-iodobenzil]-N-metil-5'-carboxiamidoadenosina.

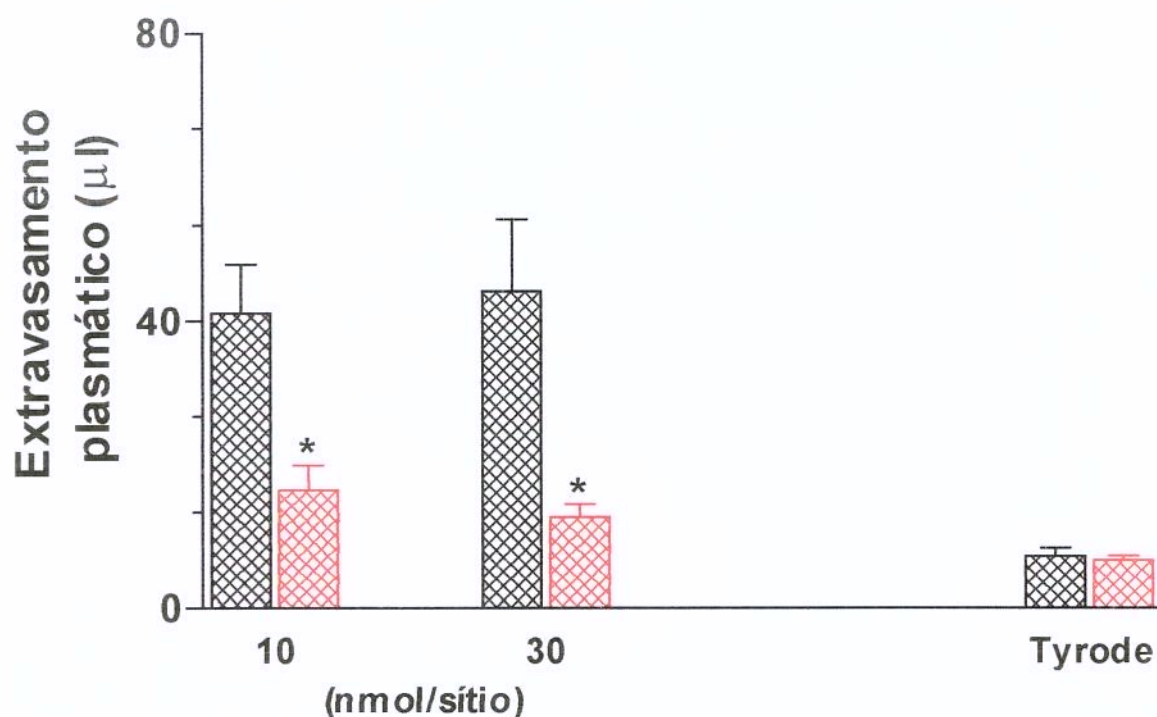


Figura 2. Efeito do antagonista de receptores A_1 de adenosina, DPCPX, no aumento de permeabilidade vascular induzido por CPA (agonista A_1). As barras pretas representam as respostas induzidas pelo CPA (10-30 nmol/sítio) e Tyrode isoladamente. As barras vermelhas representam o efeito do tratamento agudo com DPCPX (1 mg/kg; e.v.) no extravasamento plasmático induzido por CPA e Tyrode. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 5 animais cada grupo. * $P < 0.05$ em relação ao seu respectivo controle.

Tabela 2. Efeito do tratamento agudo com o antagonista de receptor A_1 , DPCPX (1 mg/kg; e.v.), no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina e agonistas de receptores A_2 (NECA) e A_3 (IB-MECA) em pele dorsal de ratos. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 5 animais cada grupo.

<i>Extravasamento plasmático (μl/sítio)</i>			
Substâncias	Controle	Tratado	n
Adenosina 30 nmol/sítio	25.5 $\pm$ 2.1	24.6 $\pm$ 2.6	5
Adenosina 100 nmol/sítio	31.1 $\pm$ 5.2	20.9 $\pm$ 2.1	5
Adenosina 300 nmol/sítio	25.9 $\pm$ 2.1	21.6 $\pm$ 3.8	5
NECA 0.1 nmol/sítio	23.0 $\pm$ 2.1	28.4 $\pm$ 3.6	5
NECA 0.3 nmol/sítio	30.3 $\pm$ 4.1	32.7 $\pm$ 4.6	5
NECA 1 nmol/sítio	44.2 $\pm$ 5.6	34.8 $\pm$ 5.3	5
IB-MECA 0.01 nmol/sítio	29.0 $\pm$ 8.4	38.6 $\pm$ 7.3	5
IB-MECA 0.1 nmol/sítio	39.1 $\pm$ 9.7	28.5 $\pm$ 6.6	5
IB-MECA 3 nmol/sítio	58.0 $\pm$ 2.0	40.0 $\pm$ 4.9	5

CPA, N₆-ciclopentiladenosina; NECA, 5'-N-etilcarboxamidoadenosina; IB-MECA, N⁶-[3-iodobenzil]-N-metil-5'-carboxiamidoadenosina; DPCPX, 1, 3-dipropil-8-ciclopentilxantina.

Tabela 3. Efeito da co-injeção de DMPX (antagonista seletivo de receptor A_2 ; 0.45-45 nmol/sítio) no extravasamento de proteína plasmática induzido pela adenosina (300 nmol/sítio), CPA (10 nmol/sítio, agonista A_1), NECA (3 nmol/sítio, agonista A_2) e IB-MECA (1 nmol/sítio, agonista A_3). Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 4 animais.

<i>Extravasamento plasmático (μl/sítio)</i>				
Substâncias	Controle	DMPX (nmol/sítio)		
		0.45	4.5	45
Adenosina	56 $\pm$ 10.9	49 $\pm$ 4.4	45 $\pm$ 5.8	51 $\pm$ 11.1
CPA	74 $\pm$ 8.2	65 $\pm$ 5.8	68 $\pm$ 7.2	68 $\pm$ 8.1
NECA	39 $\pm$ 4.0	31 $\pm$ 4.2	14 $\pm$ 1.5*	16 $\pm$ 3.2*
IB-MECA	60 $\pm$ 4.6	71 $\pm$ 7.9	49 $\pm$ 2.0	55 $\pm$ 5.2

*Indica $P < 0.001$ quando comparado ao seu respectivo valor de controle. CPA, N_6 -ciclopentiladenosina; NECA, 5'-N-etilcarboxamidoadenosina; IB-MECA, N^6 -[3-iodobenzil]-N-metil-5'-carboxiamidoadenosina; DMPX, 3, 7-dimetil-1-propargilxantina.

3.3. *Papel dos mastócitos nas respostas induzidas pela adenosina, CPA, NECA e IB-MECA in vivo e in vitro*

Conforme mostrado anteriormente, a injeção intradérmica de adenosina (30-300 nmol/sítio), CPA (3-30 nmol/sítio), NECA (0.1-3 nmol/sítio) e IB-MECA (0.1-3 nmol/sítio) causou um extravasamento plasmático significativo na pele dorsal de ratos. Contudo, quando os ratos foram pré-tratados (30 min) com ciproheptadina, um antagonista de receptores de histamina e serotonina, na dose de 1mg/kg (i.p.), o extravasamento evocado pela adenosina (Fig. 3), CPA (Fig. 4), NECA (Fig. 5) e IB-MECA (Fig. 6) foi marcadamente reduzido quando comparado aos seus respectivos controles. O tratamento com ciproheptadina foi efetivo visto que reduziu em 79% o edema evocado pela injeção intradérmica do composto 48/80 (500 ng/sítio), um conhecido agente capaz de desgranular mastócitos *in vivo* e *in vitro*.

Quando os ratos foram submetidos ao tratamento crônico com o composto 48/80 (5 mg/kg; s.c.; 3 dias antes), no sentido de produzirmos um esgotamento dos estoques de histamina e serotonina, o extravasamento plasmático evocado pelo CPA (0.1-10 nmol/sítio) e NECA (0.1-1 nmol/sítio) foi reduzido ($P < 0.01$) de maneira significativa quando comparado ao grupo de ratos controle (Fig. 7). O mesmo tratamento reduziu de forma marcante o extravasamento plasmático induzido pela injeção intradérmica do composto 48/80 (500 ng/sítio), usado para confirmar a eficácia do tratamento crônico (Fig. 7).

A incubação (20 min) dos mastócitos peritoneais isolados de ratos com adenosina (1-100 μ M), CPA (10-100 μ M), NECA (1-100 μ M) e IB-MECA (100 μ M) não promoveu

liberação significativa de histamina, quando comparado à liberação de histamina do composto 48/80 (10 µg/ml) e substância P (100 µg/ml, Tabela 4).

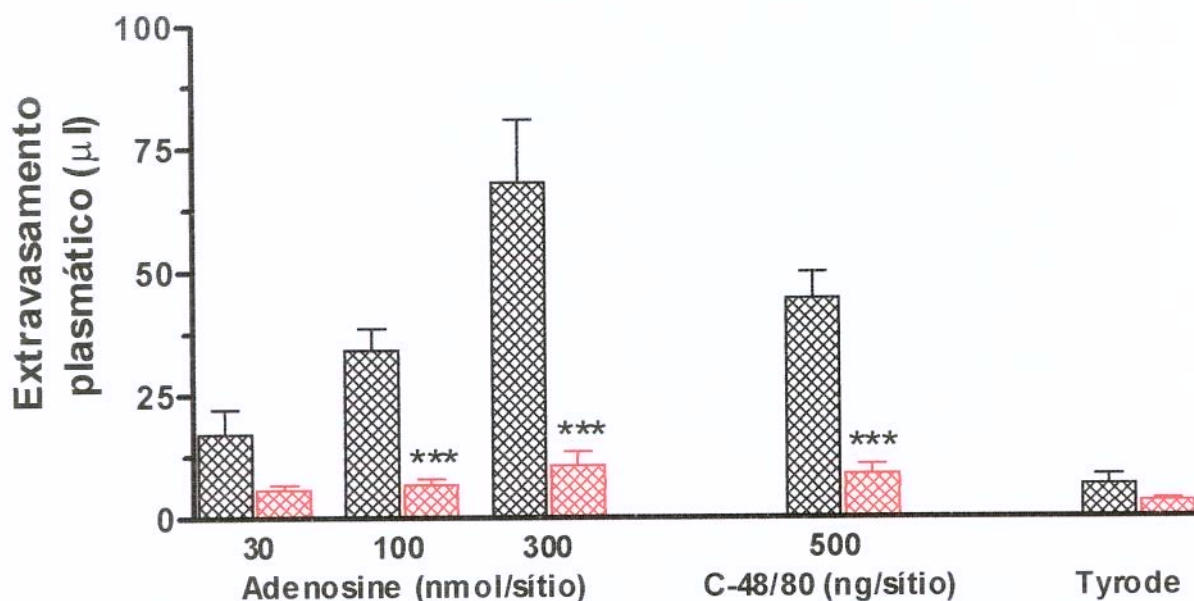


Figura 3. Efeito do tratamento com ciproheptadina, antagonista de receptores de histamina e 5-HT, no edema induzido pela adenosina. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido pela adenosina (30-300 nmol/sítio) nos animais controle e tratados com ciproheptadina (1 mg/kg; i.p.; 30 min. antes), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

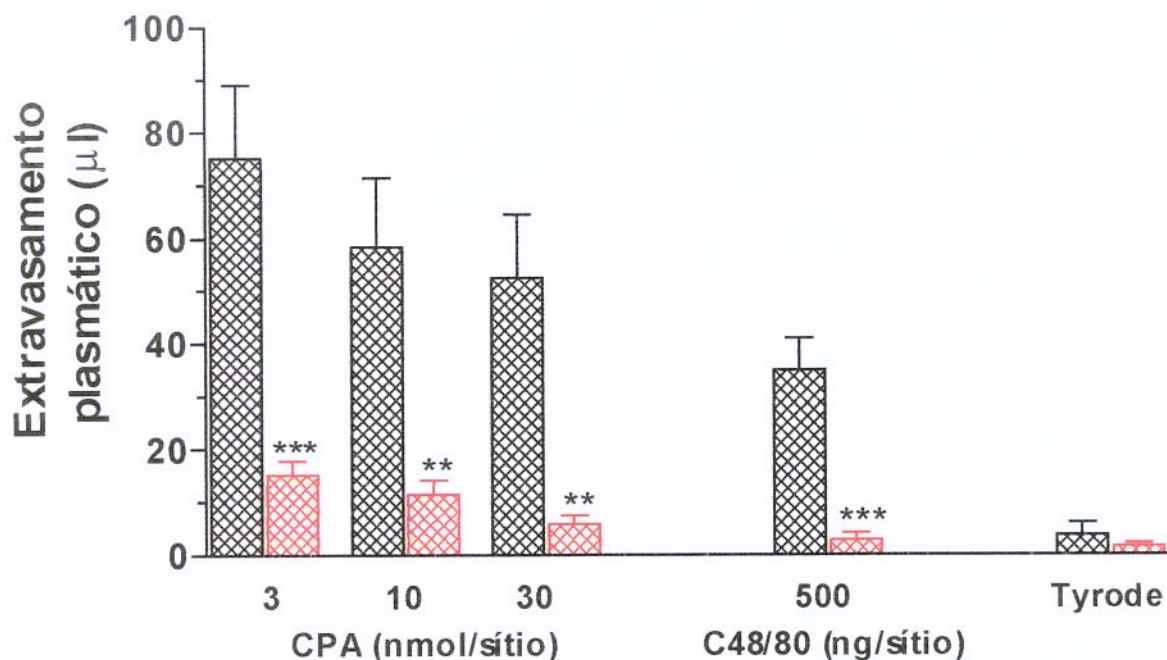


Figura 4. Efeito do tratamento com ciproheptadina, antagonista de receptores de histamina e 5-HT, no edema induzido por CPA (agonista A_1). As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido pelo CPA (3-30 nmol/sítio) nos animais controle e tratados com ciproheptadina (1 mg/kg; i.p.; 30 min. antes), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

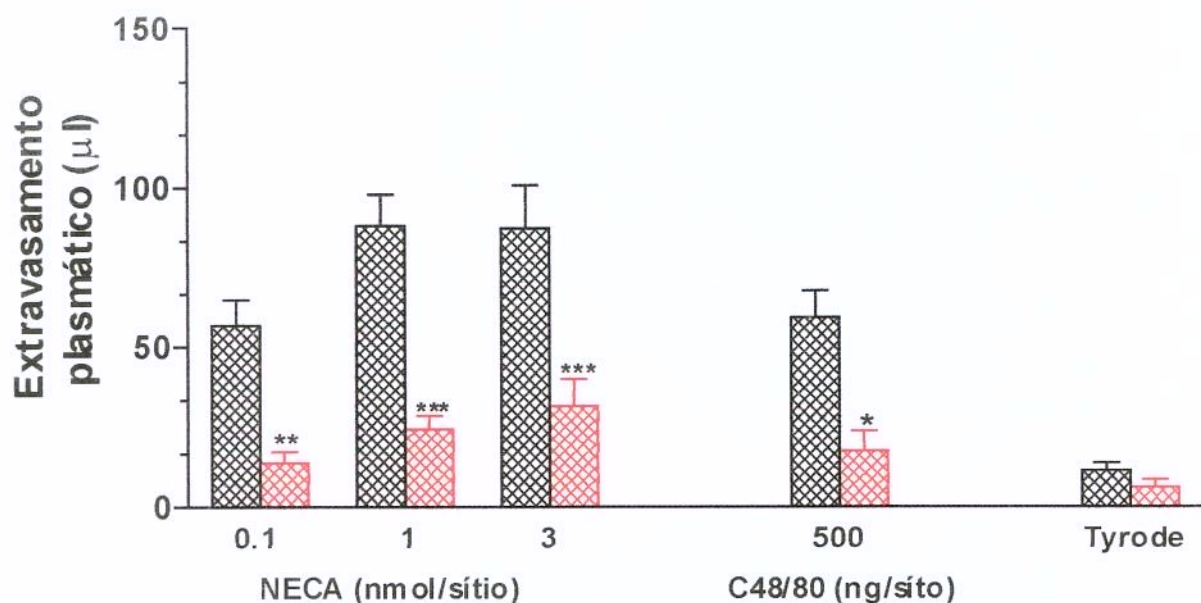


Figura 5. Efeito do tratamento com ciproheptadina, antagonista de receptores de histamina e 5-HT, no edema induzido por NECA. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido por NECA (0.1-3 nmol/sítio) nos animais controle e tratados com ciproheptadina (1 mg/kg; i.p.; 30 min. antes), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

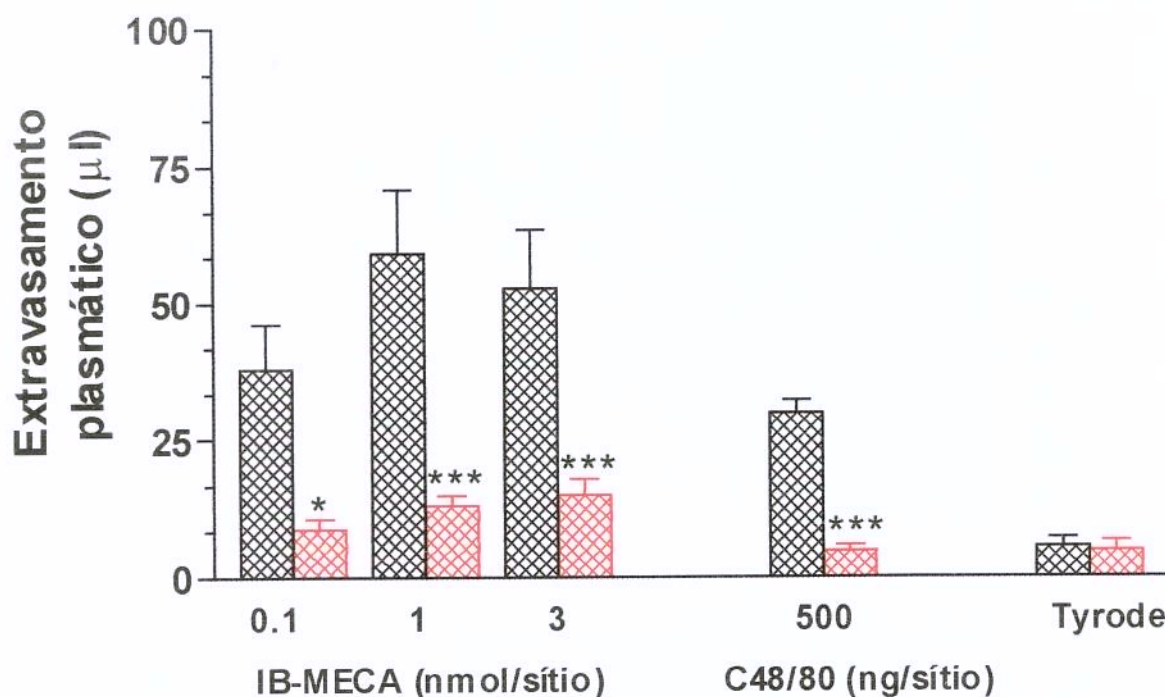


Figura 6. Efeito do tratamento com ciproheptadina, antagonista de receptores de histamina e 5-HT, no edema induzido por IB-MECA. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido por IB-MECA (0.1-3 nmol/sítio) nos animais controle e tratados com ciproheptadina (1 mg/kg; i.p.; 30 min. antes), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

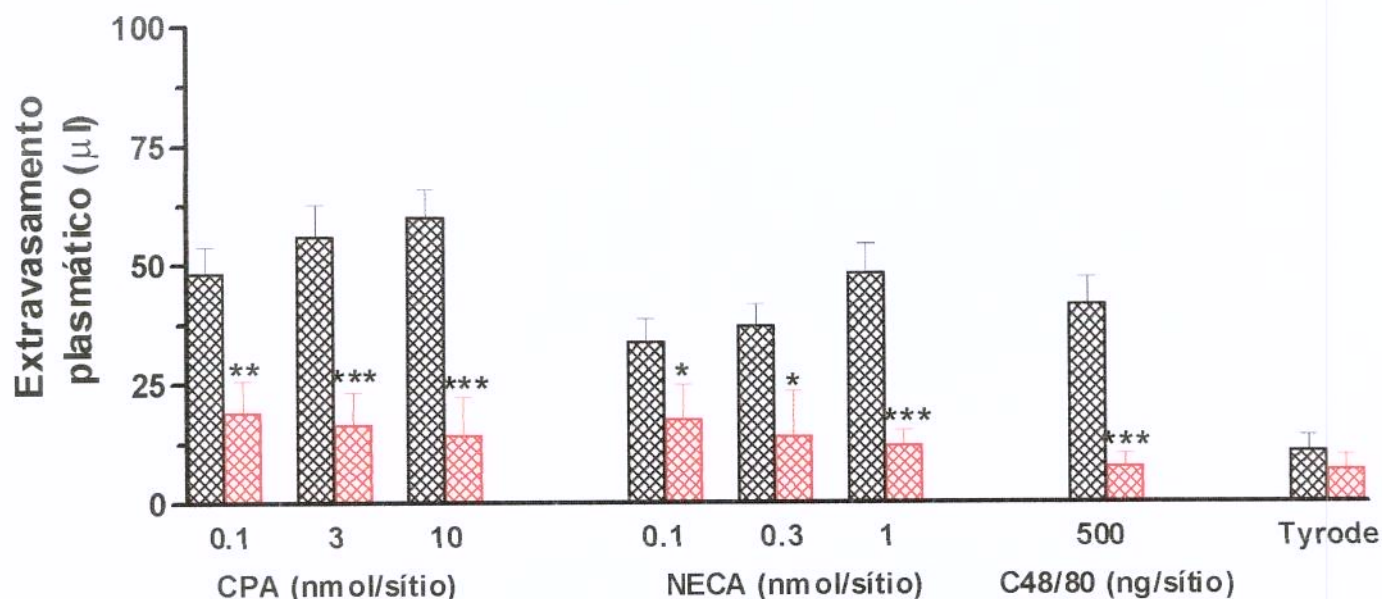


Figura 7. Efeito do tratamento crônico com o composto 48/80 no edema induzido pelo CPA e NECA. As barras pretas representam o extravasamento plasmático induzido pelo CPA (0.1-10 nmol/sítio), NECA (0.1-1 nmol/sítio) e pelo composto 48/80 (500 ng/sítio) nos animais controle (salina 0.1 ml; s.c.). As barras vermelhas representam o edema induzido pelos mesmos agonistas em ratos tratados com o composto 48/80 (5mg/kg; i.p.; três dias antes). Os resultados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 5 animais cada grupo. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

Tabela 4. Efeito da incubação de mastócitos peritoneais isolados de ratos com adenosina, CPA, NECA, IB-MECA, composto 48/80 e substância P. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M.

Substâncias	Dose	<i>Liberção de histamina (%)</i>
C-48/80	10 μ g/ml	80.6 $\pm$ 6.03 (n= 6)
Substância P	100 μ g/ml	37.8 $\pm$ 0.23 (n= 3)
Adenosina	1 μ M	0.00 $\pm$ 0.0 (n= 4)
	10 μ M	0.79 $\pm$ 0.0 (n= 4)
	100 μ M	3.8 $\pm$ 0.04 (n= 6)
CPA	10 μ M	0.00 $\pm$ 0.0 (n= 3)
	30 μ M	0.00 $\pm$ 0.0 (n= 3)
	100 μ M	1.7 $\pm$ 0.24 (n= 5)
NECA	1 μ M	0.00 $\pm$ 0.0 (n= 3)
	10 μ M	0.00 $\pm$ 0.0 (n= 3)
	100 μ M	2.7 $\pm$ 0.46 (n= 5)
IB-MECA	100 μ M	0.5 $\pm$ 0.00 (n= 3)

3.4. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina

As figuras 8, 9 e 10 ilustram o efeito da administração i.d. de adenosina e seus análogos na pele dorsal de ratos pré-tratados com capsaicina, quando neonatos.

No grupo de animais controle tratados com o veículo (1:1:8; Tween 80:etanol:salina; 0.1 ml, s.c.), a injeção i.d. de adenosina (30-300 nmol/sítio), CPA (0.1-10 nmol/sítio), NECA (0.1-3 nmol/sítio) e IB-MECA (0.01-1 nmol/sítio) induziram extravasamento plasmático significativo em relação ao Tyrode. No grupo de animais tratados com capsaicina (50 mg/kg; s.c.) no período neonatal, o extravasamento plasmático evocado pela adenosina, CPA e NECA, foi parcialmente ($P < 0.05$) reduzido, sendo esta redução visualizada somente nas doses mais elevadas de adenosina (100 e 300 nmol/sítio), CPA (3 e 10 nmol/sítio) e NECA (3 nmol/sítio). Contudo, o extravasamento plasmático induzido pelo IB-MECA não foi modificado pelo tratamento neonatal com capsaicina (Fig. 10). A resposta induzida pelo Tyrode não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle e tratado com capsaicina.

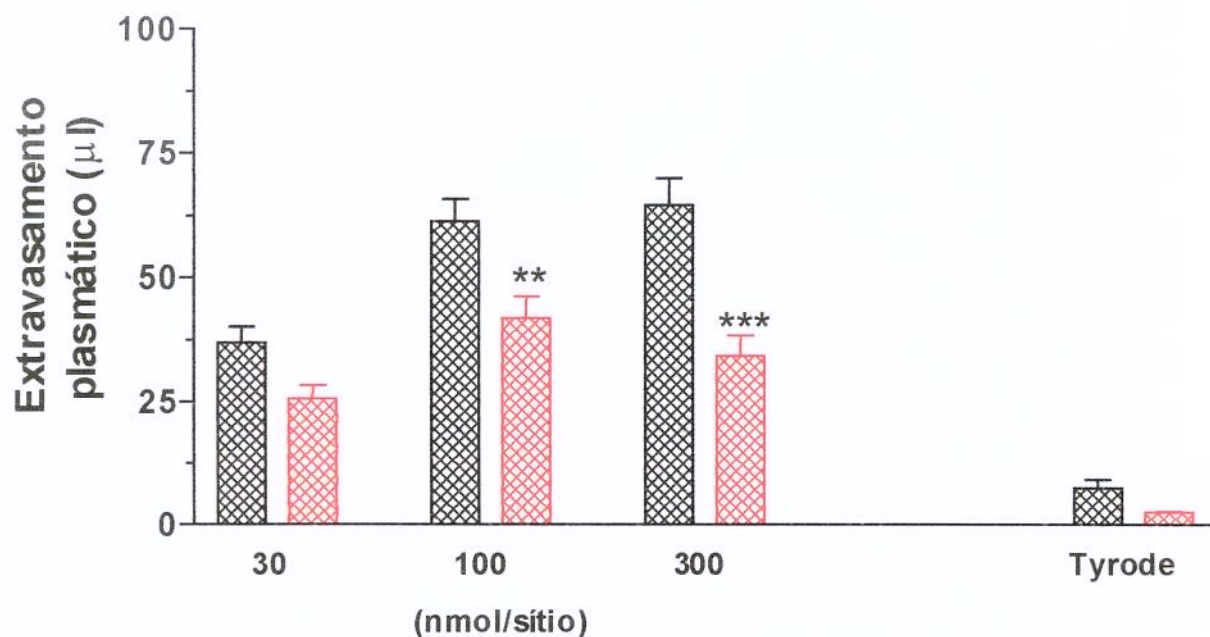


Figura 8. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por adenosina em pele dorsal de ratos. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido por adenosina (30-300 nmol/sítio) nos animais controle e tratados com capsaicina (50 mg/kg; s.c.), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

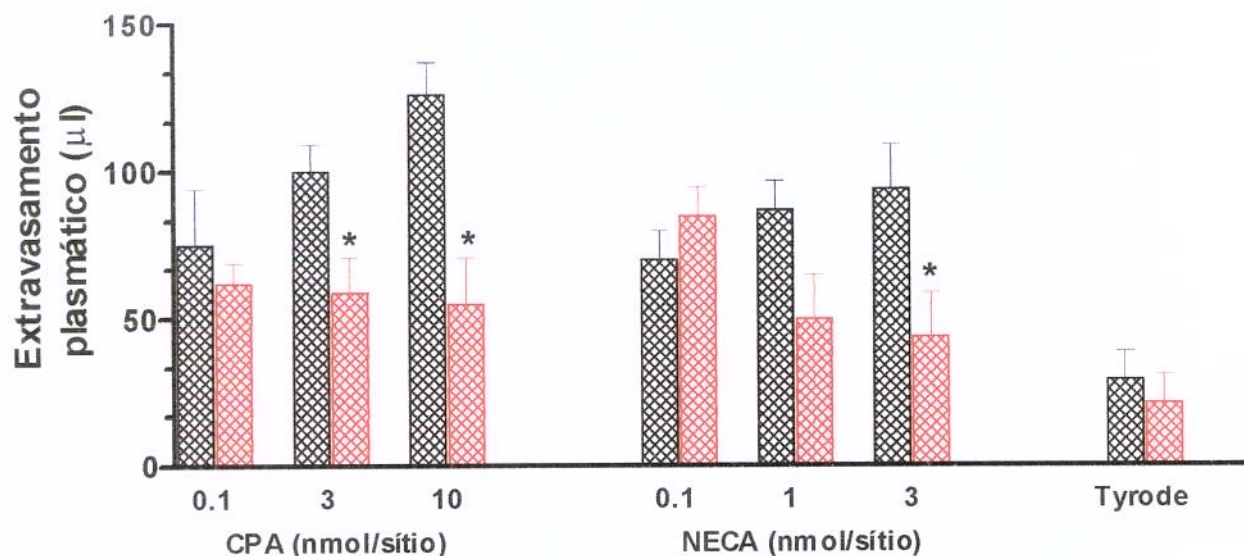


Figura 9. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por CPA e NECA em pele dorsal de ratos. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido por CPA e NECA nos animais controle e tratados com capsaicina (50 mg/kg; s.c.), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. * $P < 0.05$ comparado com o seu respectivo controle.

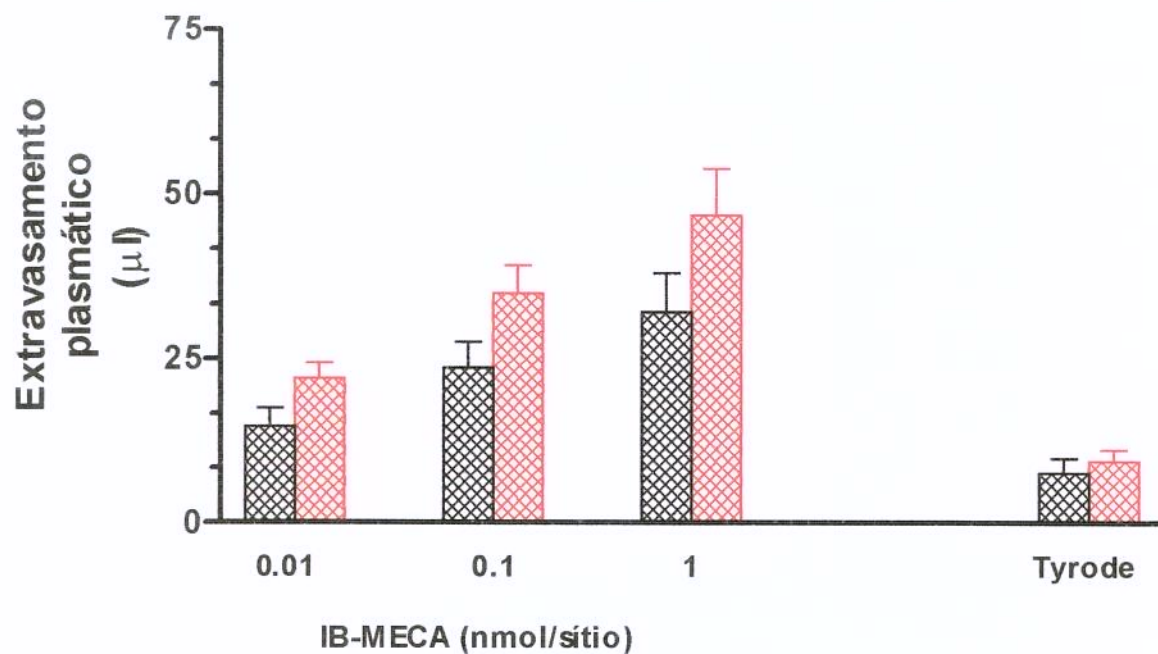


Figura 10. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a resposta induzida por IB-MECA em pele dorsal de ratos. As barras pretas e vermelhas representam a formação de edema induzido por IB-MECA nos animais controle e tratados com capsaicina (50 mg/kg; s.c.), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo.

3.5. Efeito de antagonistas de receptores NK_1 e NK_2 de taquicininas

A injeção i.d. do agonista de receptores NK_1 de taquicininina, GR73632 (30 pmol/sítio) e da substância P (100 pmol/sítio) causou extravasamento plasmático significativo, o qual foi marcadamente ($P < 0.001$) reduzido pela co-injeção com 1 nmol/sítio de SR 140333, antagonista seletivo de receptores NK_1 (Figs. 11, 12, 13 e 14).

Quando co-injetado com adenosina (100 nmol/sítio; Fig. 11), CPA (10-100 nmol/sítio; Fig. 12), NECA (0.1-1 nmol/sítio; Fig. 13) ou IB-MECA (0.01-1 nmol/sítio; Fig. 14), o SR 140333 (1 nmol/sítio) causou redução parcial do extravasamento plasmático evocado por tais substâncias. A inibição significativa foi evidenciada, principalmente, nas doses mais elevadas desses compostos.

O tratamento endovenoso dos ratos com o antagonista de receptores NK_2 de taquicininina, SR 48968 (0.3 μ mol/kg, e.v.), não interferiu na respostas evocadas pelo GR73632 (30 pmol/sítio; 43 ± 4.6 e 39 ± 3.6 μ l/sítio para controle e tratado, respectivamente) e substância P (100 pmol/sítio; 36 ± 5.3 e 38 ± 5.9 μ l/sítio para controle e tratado, respectivamente). Da mesma forma, este antagonista não modificou as respostas induzidas pela adenosina, CPA e NECA quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

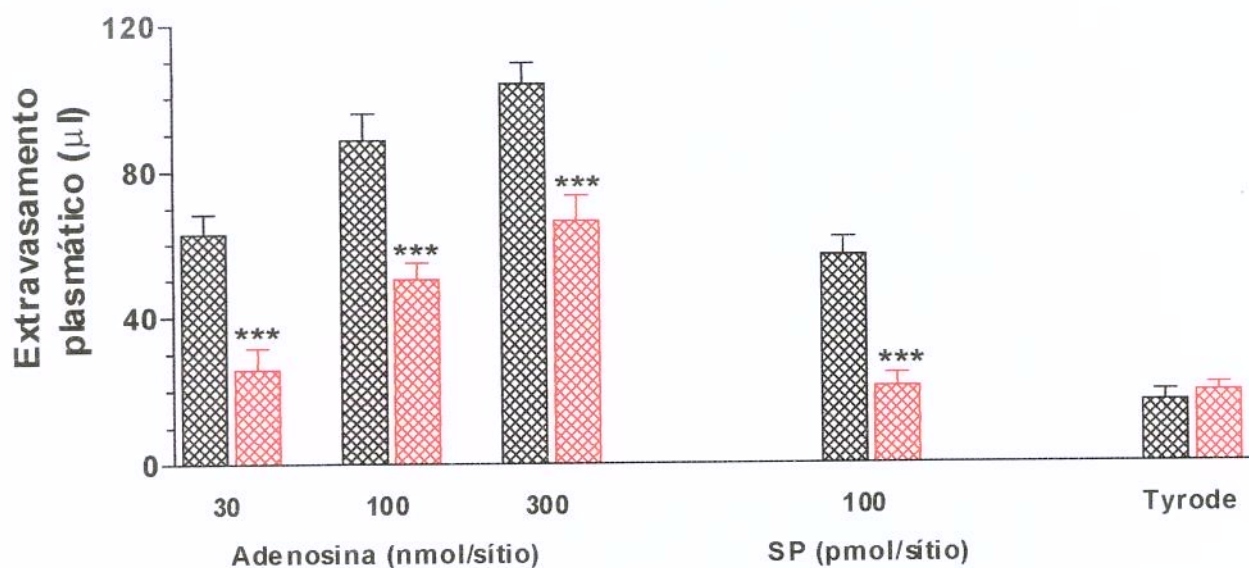


Figura 11. Efeito do SR 140333, antagonista de receptores NK_1 , no aumento de permeabilidade vascular induzido pela adenosina. As barras pretas representam as respostas induzidas pela adenosina, substância P (SP) e Tyrode isoladamente. O efeito da co-injeção do SR 140333 (1 nmol/sítio) com a adenosina, SP e Tyrode estão representados pelas barras vermelhas, respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

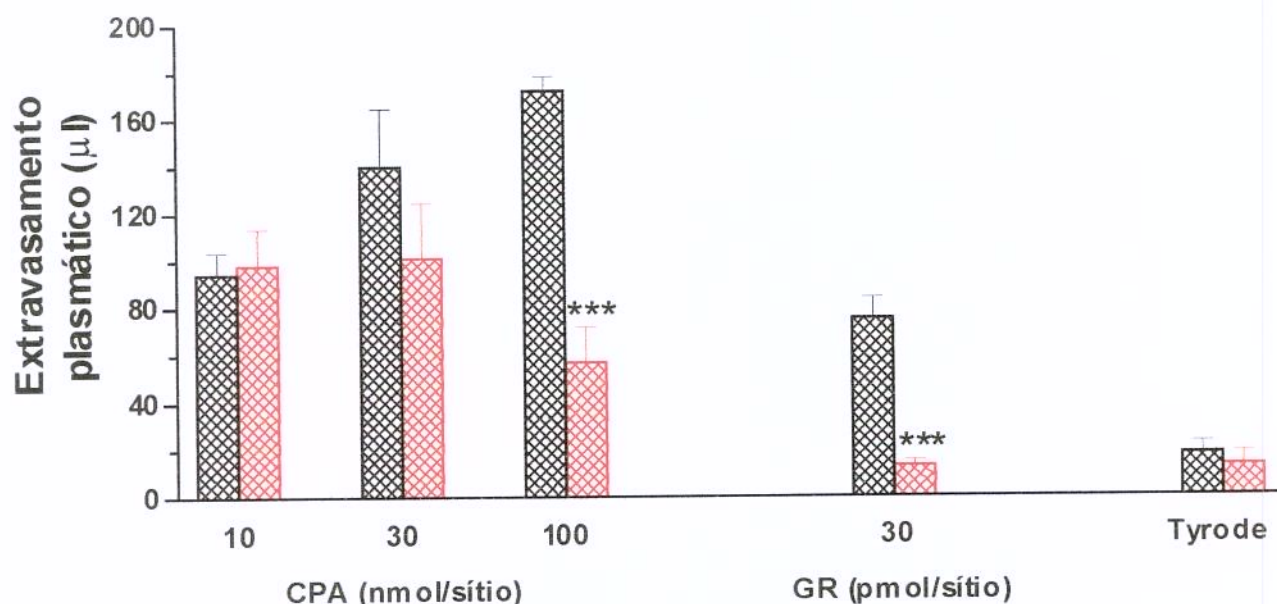


Figura 12. Efeito do SR 140333, antagonista de receptores NK_1 , no aumento de permeabilidade vascular induzido pelo CPA. As barras pretas representam as respostas induzidas pelo CPA, GR73632 e Tyrode isoladamente. O efeito da co-injeção do SR 140333 (1 nmol/sítio) com CPA, GR73632 e Tyrode estão representados pelas barras vermelhas, respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

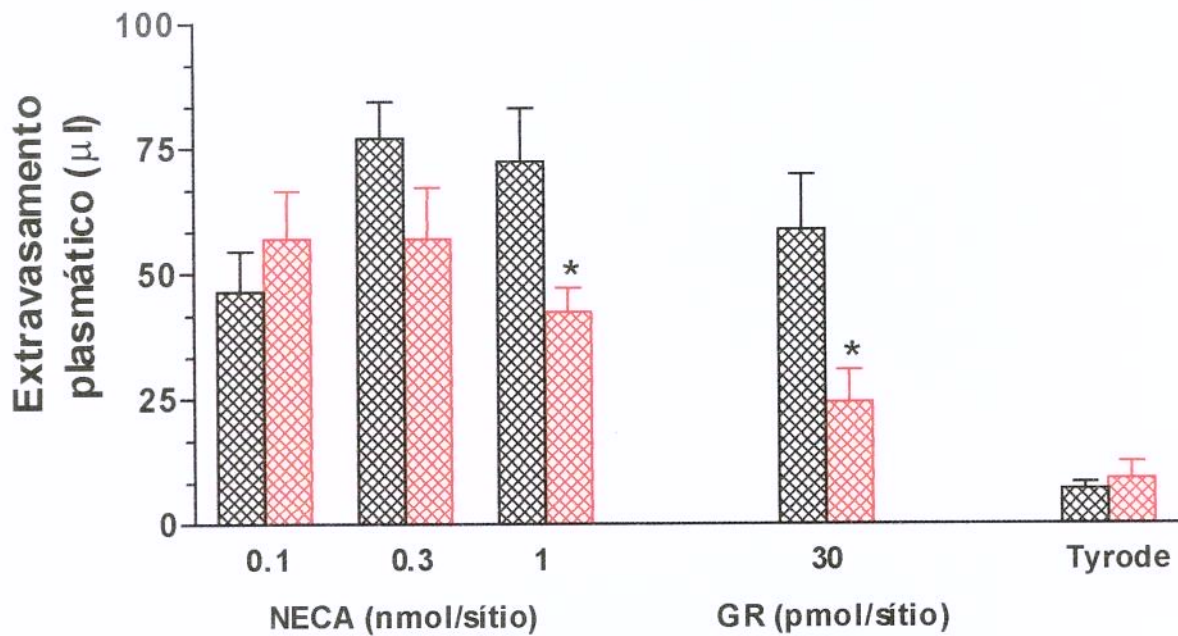


Figura 13. Efeito do SR 140333, antagonista de receptores NK_1 , no aumento de permeabilidade vascular induzido por NECA. As barras pretas e vermelhas representam as respostas induzidas por NECA, GR73632 e Tyrode na ausência e presença de SR140333 (1 nmol/sítio), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. * $P < 0.05$ comparado com o seu respectivo controle.

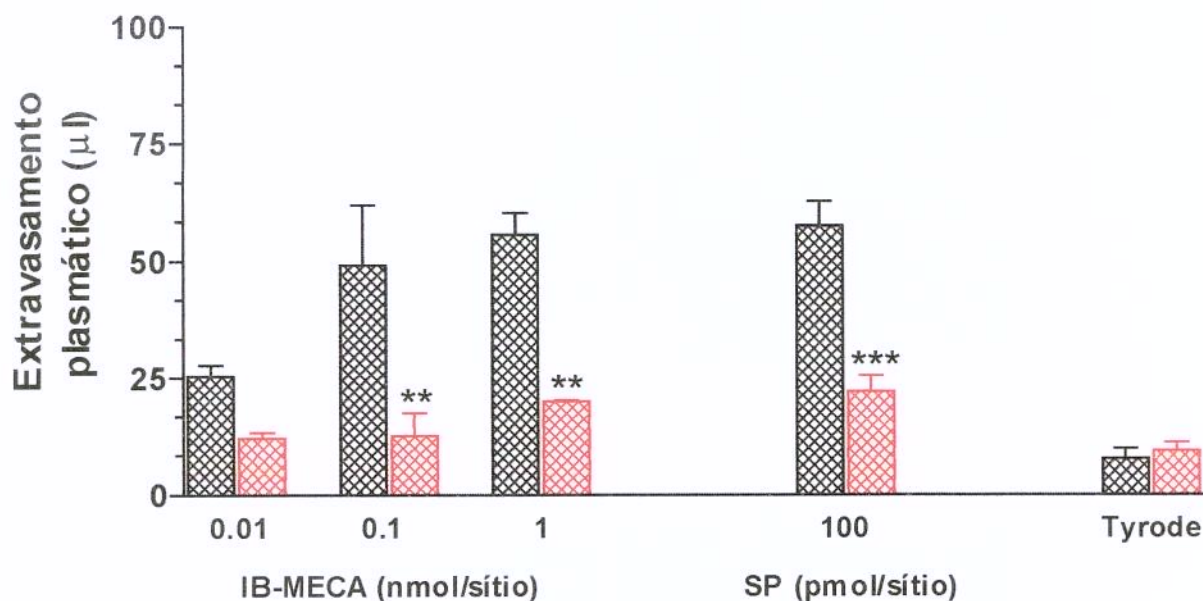


Figura 14. Efeito do SR 140333, antagonista de receptores NK_1 , no aumento de permeabilidade vascular induzido por IB-MECA. As barras pretas e vermelhas representam as respostas induzidas por IB-MECA, SP e Tyrode na ausência e presença de SR140333 (1 nmol/sítio), respectivamente. Os valores estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado com o seu respectivo controle.

Tabela 5. Efeito do tratamento com o antagonista de receptor NK₂ de taquicininina, SR 48968 (0.3 μ mol/kg; e.v.), no edema induzido pela adenosina e agonista de receptores A₁ (CPA) e A₂ (NECA). Os valores estão representados como a média $\pm$ E.P.M. para 3-4 animais cada grupo.

<i>Extravasamento plasmático (μl/sítio)</i>			
Substâncias	Controle	Tratado	n
Adenosina 30 nmol/sítio	34.2 $\pm$ 4.8	29.9 $\pm$ 7.0	3
Adenosina 100 nmol/sítio	41.8 $\pm$ 3.2	42.0 $\pm$ 6.6	3
Adenosina 300 nmol/sítio	58.5 $\pm$ 10.4	43.9 $\pm$ 4.9	3
CPA 3 nmol/sítio	53.0 $\pm$ 11.0	43.8 $\pm$ 9.7	4
CPA 10 nmol/sítio	43.0 $\pm$ 3.0	37.8 $\pm$ 2.9	4
CPA 30 nmol/sítio	48.0 $\pm$ 1.0	45.0 $\pm$ 2.6	4
NECA 0.1 nmol/sítio	38.0 $\pm$ 4.0	42.7 $\pm$ 6.7	3
NECA 1 nmol/sítio	37.0 $\pm$ 3.4	54.7 $\pm$ 11.0	3
NECA 3 nmol/sítio	52.0 $\pm$ 8.9	53.5 $\pm$ 15.0	3

DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a adenosina e agonistas seletivos de receptores A_1 (CPA), A_2 (NECA) e A_3 (IB-MECA) causam aumento significativo e dose-dependente na permeabilidade vascular em pele dorsal de ratos. Contudo, essas substâncias, quando comparadas entre si, apresentaram diferenças de potências em relação à capacidade de produzir extravasamento de proteínas plasmáticas. O agonista de receptor A_3 (IB-MECA) mostrou-se o mais potente, seguido pelos agonistas A_2 (NECA), A_1 (CPA) e adenosina.

O aumento de permeabilidade venular observado com a adenosina, CPA e NECA em pele de ratos parece, de fato, envolver ativação de receptores purinérgicos visto que a teofilina, antagonista não seletivo de receptores de adenosina, mostrou-se capaz de inibir significativamente o extravasamento de proteína plasmática evocado pelos mesmos. Isto foi corroborado pelo uso do DPCPX (antagonista seletivo de receptores A_1) e DMPX (antagonista seletivo de receptores A_2). O tratamento agudo com o DPCPX reduziu de maneira dose-dependente o extravasamento de proteína plasmática evocado pelo CPA, não modificando a resposta induzida pela adenosina, NECA e IB-MECA. O mesmo foi observado para o DMPX, que inibiu significativamente o edema induzido pelo NECA, não modificando as respostas induzidas pela adenosina, CPA e IB-MECA. Isto sugere, mais uma vez, que os receptores A_1 e A_2 estão envolvidos diretamente na resposta inflamatória mediada por esses nucleotídeos. Em relação ao agonista A_3 , IB-MECA, é curioso que o extravasamento de proteína plasmática não tenha sido inibido pela teofilina. Apesar disto não nos ser ainda claro, essa ausência de resposta pode estar relacionada à diferenças na afinidade da teofilina por entre as espécies animais. Tem sido sugerido que tal diferença de afinidade e o baixo grau de homologia entre receptores de ratos e de humanos possa refletir a existência de dois subtipos de receptores A_3 (JACOBSON, 1998). Embora antagonistas seletivos para o receptor A_3 não sejam ainda disponíveis, estudos

anteriores têm sugerido que o extravasamento plasmático induzido por IB-MECA envolve ativação de receptores A_3 em mastócitos de ratos (REEVES *e col.*, 1997) e camundongos (TILLEY *e col.*, 2000).

Estabelecido que o aumento de permeabilidade vascular induzido pela adenosina, CPA, NECA e IB-MECA em pele de ratos é dependente da estimulação direta de receptores purinérgicos seletivos, nos propusemos a investigar se essa resposta era resultante de uma ação direta em mastócitos. Trabalhos anteriores mostraram que grande parte das ações inflamatórias da adenosina envolve ativação destas células com conseqüente liberação de histamina e 5-HT de seus estoques intracelulares (CHURCH, HUGHES, VARDEY, 1986; LINDEN, 1994; REEVES *e col.*, 1997). Para verificar, utilizamos o tratamento crônico com o composto 48/80, substância de natureza polibásica, sabidamente capaz de desgranular mastócitos *in vivo* e *in vitro*. Quando administrado cronicamente, o composto 48/80 esgota os estoques mastocitários de histamina e 5-HT (DI ROSA, GIROUD, WILLOUGHBY, 1971). Este tratamento promoveu redução significativa na resposta exsudativa à injeção intradérmica do próprio composto 48/80, comprovando a eficácia do método utilizado. Além disso, esse mesmo tratamento praticamente aboliu o extravasamento de proteína plasmática induzido pelos agonistas de receptores A_1 e A_2 . A participação dos mastócitos nas respostas mediadas pela adenosina e seus análogos em pele de ratos foi ainda avaliada através do uso de antagonista de receptores de histamina e 5-HT, a ciproheptadina. Os resultados revelaram que o extravasamento plasmático induzido pela adenosina e seus análogos foi significativamente inibido por este antagonista, sugerindo que o edema resultante da ação desses agentes envolve ativação local de mastócitos.

Trabalhos recentemente publicados demonstraram que o edema de pata induzido pelo CPA é bloqueado por antagonistas de receptores de histamina e de 5-HT (SAWYNOK, REID & LIU,

1999) assim como por tratamentos com capsaicina e composto 48/80, mas não pela 6-hidroxdopamina (SAWYNOK, REID & LIU, 2000). Isto indica o envolvimento de fibras aferentes sensoriais e mastócitos, mas não de terminais nervosos simpáticos. Estes autores acreditam que o CPA ativa os terminais nervosos aferentes sensoriais induzindo a liberação de substância P, que é capaz de ativar mastócitos e liberar histamina e 5-HT de seus estoques (SAWYNOK, REID & LIU, 2000).

Ambos, histamina e 5-HT, originados de mastócitos, produzem edema quando administrados localmente, sendo este resultante de uma ação preferencial em vênulas pós-capilares. Como mastócitos de ratos não possuem receptores A_1 (RAMKUMAR *e col.*, 1993), a ativação dessas células pelo CPA poderia ocorrer indiretamente através de um mecanismo neurogênico, uma vez que mastócitos estão localizados próximos (ou em contato direto) com as terminações nervosas sensoriais periféricas (MARSHALL & WASERMAN, 1995), e a estimulação das fibras sensoriais poderia levar a desgranulação dos mesmos (DIMITRIADOU *e col.*, 1991). Adicionalmente, a própria histamina é capaz de ativar os terminais sensoriais amplificando a resposta inflamatória (SUFKA, SCHOMBURG & GIORDANO, 1991; AMMAN, *e col.*, 1995).

Visto que o aumento de permeabilidade vascular induzido pela adenosina e análogos em pele de ratos é dependente da ativação de mastócitos, passamos a investigar a capacidade desses agentes em liberar histamina de mastócitos peritoneais isolados de ratos. Contudo, nos deparamos com um aparente contraste em relação aos resultados *in vivo* que é a incapacidade da adenosina e análogos em induzir liberação de histamina e 5-HT de mastócitos isolados. Isto sugere que os efeitos observados *in vivo* são decorrentes da estimulação indireta de mastócitos ou que fatores presentes no meio extracelular são necessários para a ação das purinas nestas células. Os

resultados *in vitro* são consistentes com estudos prévios que mostram que a adenosina e análogos não liberam histamina *per se*, mas potencializam a liberação estimulada com antígenos e composto 48/80 (REEVES *e col.*, 1997; DEXTER *e col.*, 1999). Sugere-se que a adenosina possua dois efeitos opostos na liberação de histamina de fragmentos de pulmão humano: potencialização da liberação, por um efeito em receptores intracelulares, e inibição da liberação, por um efeito em receptores extracelulares, provavelmente em receptores A₂ (OTT *e col.*, 1992), sendo esta diferença, provavelmente, dependente da concentração do agonista (NISHIBORI *e col.*, 1983). Estes últimos autores demonstraram que em doses baixas (10^{-9} a 10^{-8} M), a adenosina causa inibição da liberação de mediadores de mastócitos, e em doses acima de 10^{-6} M o efeito é potencializado, indicando que a adenosina pode atuar tanto em sítio intracelulares como em receptores de superfície nos mastócitos (LOHSE *e col.*, 1987).

Postula-se que a interação de substâncias liberadas de mastócitos (histamina e 5-HT) com outros mediadores inflamatórios, tais como a substância P, é um passo intermediário no desencadeamento de processos inflamatórios neurogênicos (HOLZER, 1992). Além disso, sugere-se que a histamina e 5-HT possuem seus próprios receptores localizados em terminais nervosos sensoriais (HOLZER, 1998). Sabe-se ainda que o aumento de permeabilidade vascular evocado pela substância P é mediado por dois mecanismos distintos: estimulação direta dos receptores NK₁, localizados nas células endoteliais de vênulas pós-capilares, e ativação de mastócitos (BRAIN & WILLIAMS, 1989). Estudos recentes revelaram que receptores NK₁ estão expressos em mastócitos de ratos (OGAWA *e col.*, 1999) e camundongos (KRUMINS & BROOMFIELD, 1992), sugerindo que a substância P desgranula mastócitos via ativação direta desses receptores. Partindo-se desse conhecimento, decidimos investigar a atividade edematogênica dos agonistas purinérgicos em animais co-injetados com o antagonista de

receptores NK_1 de taquicininas, SR140333. Assim, quando a adenosina, bem como seus análogos, foram co-injetados com o SR140333, o extravasamento plasmático evocado pelos mesmos foi significativamente inibido; porém, tal inibição foi observada somente nas doses mais elevadas da adenosina e análogos. Tais resultados mostram, em primeiro lugar, que o extravasamento plasmático induzido pela purinas é parcialmente dependente da estimulação de receptores NK_1 de taquicininas e, portanto, possui um componente neurogênico. A ausência de efeitos do antagonista de receptores NK_2 de taquicininas, SR48968, sobre o extravasamento plasmático induzido pela adenosina e seus análogos demonstra que os receptores NK_2 não estão envolvidos nessas respostas. Isto é esperado visto que receptores NK_1 (e não NK_2) é que tem sido de fato implicados nas ações pró-inflamatórias da substância P (QUARTARA & MAGGI, 1998).

A capsaicina é bastante empregada como instrumento de pesquisa na investigação de processos inflamatórios neurogênicos (HOLZER, 1991). Isto deve-se ao fato da capsaicina possuir a capacidade de estimular ou degenerar sub-tipos de neurônios sensoriais levando à liberação (ou depleção) dos neuropeptídeos tais como a substância P e CGRP (JANCSÓ, KIRALY, JANCSÓ-GABOR, 1977). Quando administrada a ratos no período neonatal, a capsaicina degenera os neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal causando lesão do terminal sensorial e depleção crônica dos neuropeptídeos. Assim, o tratamento de ratos com capsaicina no período neonatal causou redução significativa no extravasamento plasmático induzido por doses elevadas de adenosina, CPA e NECA, mas não por IB-MECA. Isto parece sugerir que somente em concentrações altas de CPA, NECA e adenosina são capazes de ativar os terminais nervosos sensoriais. Com relação ao IB-MECA, os resultados sugerem que o mesmo não ative diretamente os terminais nervosos sensoriais. É possível que o efeito deste agonista envolva, de alguma forma, ativação de mastócitos cutâneos; sabe-se que mastócitos de ratos

possuem ambos os receptores A_3 e A_{2B} , cuja ativação leva à liberação de histamina e 5-HT e outros mediadores (RAMKUMAR *et al.*, 1993).

Em resumo, nossos resultados fornecem evidências diretas que os receptores A_1 , A_2 e A_3 medeiam o aumento de permeabilidade microvascular em pele dorsal de ratos, com subsequente formação de edema. Nossos dados sugerem que a adenosina e análogos possuem mecanismos distintos: estimulação dos terminais nervosos sensoriais via receptores A_1 e A_2 , resultando na liberação de substância P; e estimulação de mastócitos via receptores A_3 . Até o presente estudo, entretanto, não temos evidências que comprovem que o componente neurogênico seja decorrente da ação da histamina/5-HT em terminais nervosos sensoriais.

CONCLUSÃO

1. A injeção intradérmica de adenosina, agonistas de receptores A_1 (CPA), A_2 (NECA) e A_3 (IB-MECA) causa aumento de permeabilidade vascular e subsequente extravasamento de proteínas plasmáticas na pele dorsal de ratos *in vivo*;
2. A adenosina, CPA, NECA e IB-MECA não promovem liberação de histamina dos grânulos de mastócitos peritoneais isolados de ratos;
3. O extravasamento de proteína plasmática na pele de ratos induzido pela adenosina e análogos é decorrente da ativação de mastócitos, através de receptores seletivos de adenosina, bem como da ativação de terminais nervosos sensoriais, resultando na liberação de substância P.

SUMMARY

The contribution of sensory neurons and mast cells to the oedema evoked by adenosine A_1 (N_6 -cyclopentyladenosine, CPA, 3-30 nmol/site), A_2 (5'-ethylcarboxamidoadenosine, NECA, 1-10 nmol/site) and A_3 receptor agonists (N_6 -[3-iodobenzyl]- N -methyl-5'-carboxiamidoadenosine, IB-MECA, 0.01-3 nmol/site) was investigated in the rat skin microvasculature, by the accumulation of intravenously-injected (i.v.) ^{125}I -albumin. Intradermal (i.d.) injection of adenosine and analogues induced increased microvascular permeability in a dose-dependent manner (IB-MECA>NECA>CPA>adenosine). The non-selective adenosine receptor antagonist theophylline (5.7-57 nmol/site) markedly inhibited adenosine, CPA or NECA but not IB-MECA-induced plasma extravasation. The A_1 receptor antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX, 0.1-1.0 mg/kg, i.v.) significantly reduced CPA-induced plasma extravasation whereas responses to adenosine, NECA or IB-MECA were unchanged. The A_2 receptor antagonist 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX, 0.45-45 nmol/site) significantly reduced NECA-induced plasma extravasation without affecting responses to adenosine, CPA and IB-MECA. The tachykinin NK_1 (SR140333), but not the NK_2 (SR48968), receptor antagonist significantly inhibited the plasma extravasation evoked by higher doses of adenosine (100 nmol/site), CPA (100 nmol/site), NECA (1 nmol/site) or IB-MECA (0.1-1 nmol/site). In rats treated with capsaicin to destroy sensory neurons, the response to higher doses of adenosine, CPA and NECA, but not IB-MECA, was significantly inhibited. Effects of adenosine and analogues were largely inhibited by histamine and 5-hydroxytryptamine (5-HT) antagonists and by compound 48/80 pretreatment. However neither adenosine (1-100 μM) nor its analogues (CPA 10-100 μM , NECA 1-100 μM and IB-MECA 100 nmol/ml) induced degranulation of rat peritoneal

mast cells *in vitro*. In conclusion, our results provide further evidence that adenosine A₁ and A₂, but not A₃, receptor agonists may function as cutaneous neurogenic pro-inflammatory mediators.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, A., AND CELLEK, S. Regulation of the cardiovascular system by non-adrenergic and non-cholinergic nerves. **Cur. Opinon. Neph. Hypert.**, **6**: 74-79, 1997.
- AHLUWALIA, A., MAGGI, C.A., SANTICIOLI, P., LECCI, A., GIULIANI, S. Characterisation of the capsaicin-sensitive component cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. **Br. J. Pharmacol.**, **111**: 1017-1022, 1994.
- ALI, H.; CUNHA-MELO, J.R.; SAUL, W.F.; BEAVEN, M.A. Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signals for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. Evidence for a novel adenosine receptor. **J. Biol. Chem.**, **265**: 745-53, 1990.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Med. Clin. North Am.**, **81**: 1-28, 1997.
- AMARA, S.G., ARRIZA, J.L., LEFF, S.E., SWANSON, L.W., EVANS, R.M., ROSENFELD, M.G. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. **Science**, **229**: 1094-1097, 1985.
- AMMAN, R., SCHULIGOI, R., LANZ, I. & DONNERER, J. Histamine-induced oedema in the rat paw-effect of capsaicin denervation and CGRP receptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, **279**: 227-231, 1995.
- BALUK, P. Neurogenic inflammation in skin and airways. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, **2**: 76-81, 1997.
- BAYLIS, W.M. The origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb, and on the nature of these fibres. **J. Physiol.**, **26**: 173-209, 1901.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, **86**: 855-860, 1985.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. Interaction between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema and blood flow in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 77-82, 1989.

- BRAIN, S.D. AND CAMBRIDGE, H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. **Gen. Pharmacol.**, **27**: 607-611, 1996.
- BRAIN, S.D. Sensory neuropeptides in the skin. In: Neurogenic inflammation. Eds. GEPPETTI, P. & HOLZER, P. **Boca Raton, FL, CRC Press**, 1996. p. 229-244.
- BRUCE, A.N. Vasodilator axon reflex. **Q.J. Physiol.**, **6**: 339-354, 1913.
- BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In cell Membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach Ed by **R.W.Straub and L.Bolis**, pp 107-118, 1978.
- CAMPOS, B.G.A., FERREIRA, R.R. & GOMES, J.C. The potentiation of the histamine release induced by adenosine in mast cells from guinea pig lung and heart: sharp dependence on the time of preincubation. **Pharmacol. Res.**, **41**: 291-297, 2000.
- CARRUTHERS, A.M. & FOZARD, J.R. Effect of pertussis toxin treatment on the putative adenosine A3 receptor-mediated hypotensive response in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **250**: 185-8, 1993.
- CHIN, J.H. Adenosine receptor in brain: neuromodulation and role in epilepsy. **Ann. Neurol.**, **26**: 695-698, 1989.
- CHURCH, M.K. & HUGHES, P.J. Adenosine potentiates immunological histamine release from rat mast cells by a novel cyclic AMP-independent cell-surface action. **Br. J. Pharmacol.**, **85**: 3-5, 1985.
- CHURCH, M.K., HUGHES, P. J., VARDEY, C. J. Studies on the receptor mediating cyclic AMP-independent enhancement by adenosine Ig-E-dependent mediator release from mast cells. **Neuroscience**, **44**: 97-112, 1986.
- COULSON, I.H. & HOLDEN, C.A. Cutaneous reaction to substance P and histamine in atopic dermatitis. **Br. J. Dermatol.**, **122**: 343-349, 1990.
- CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **J. Appl. Physiol.**, **76**: 5-13, 1994.
- CRONSTEIN, B.N., KUBERSKY, S.M., HIRSCHHORN, R., WEISSMAN, G. Engagement of adenosine receptor inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂) release by activation human neutrophils. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **42**: 76-85, 1987.

- CUSHLEY, M.J., TATTERSFIELD, A.E., HOLGATE, S.T. Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **129**: 380-384, 1984.
- DELAHUNTY, T.M.; CRONIN, M.J.; LINDEN J. Regulation of GH3-cell function via adenosine A1 receptors. Inhibition of prolactin release, cyclic AMP production and inositol phosphate generation. **Biochem. J.**, **255**: 69-77, 1988
- DEXTER, E.J., BUTCHERS, P.R., REEVES, J.J., SHEEHAN, M.J. & PEARCE, F.L. The effect of adenosine and its analogues on histamine release from mast cells. **Inflamm. Res.**, **48**: S7-8, 1999.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, **104**: 15-29, 1971.
- DIMITRIADOU, V., BUZZI, M.G., MOSKOWITZ, M.A. & THEOHARIDAE, T.C. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. **Neuroscience**, **44**: 97-112, 1991.
- DOAK, G. J., SAWYNOK, J. Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **15**: 281, 311-318, 1995.
- 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**: 420-423, 2000.
- DOWD, E., MCQUEEN, D.S., CHESSEL, I.P., HUMPHREY, A. Adenosine A1 receptor-mediated excitation of nociceptive afferents innervating the normal and arthritic rat knee joint. **Br. J. Pharmacol.**, **125**: 1267-1271, 1998.
- DRURY, A.W. SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenosine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.**, **68**: 213-237, 1929.
- DUNWIDDIE, T.V. FREDHOLM, B.B. Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **249**: 31-37, 1989.
- FEOKTISTOV, I AND BIAGGIONI, I. Adenosine A2b receptors. **Pharmacol. Rev.**, **49**: 381-402, 1997.

- FOZARD, J.R., PFANNKUCHE, H.J., SCHUURMAN, H.J. Mast cell degranulation following adenosine A3 receptor activation in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **298**: 293-297, 1996.
- FREDHOLM, B.B., ABBRACCHIO, M.P., BURMSTOCK, G., HARDEN, T.K., SCHWABE, K.A., WILLIAMS, M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, **18**: 79-82, 1997.
- FREDHOLM, B.B., ARSLAN, G., KULL, B., KONTNY, E., AVENNIGSSON, P. Adenosine P1 receptor signaling. **Drug Dev. Res.**, **39**: 262-268, 1996.
- GAMSE, R. & SARIA, A. Antidromic vasodilatation in the hindpaw measured by laser doppler flowmetry: pharmacological modulation. **J. Auton. Nerv. System.**, **19**: 105-111, 1987.
- GARRET, C., CARRUETE, A., FARDIN, V., MOUSSAIOU, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C., LAUDON, P.M. Pharmacological properties of a potent and selective non-peptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **88**: 10208-10212, 1991.
- GASPAROVIC, I., HADZOVIC, S., STERN, P. Contribution to the theory that substance P has a transmitter role in sensitive pathway. **Med. Exp.**, **10**: 303-306, 1964.
- GEPPETTI, P., FRILLI, S., RENZI, D., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A. Distribution of CGRP-like immunoreactivity in various rat tissues: correlation with substance P and other tachykinins and sensitive to capsaicin. **Regul. Pep.**, **23**: 289-298, 1988.
- GERWINS, P. & FREDHOLM, B.B. Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **89**: 7330-4, 1992.
- 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**: 691-696, 1992.
- HERNANZ, A., MUELAS, G., BORBUJO, J. Plasma neuropeptide pattern in acute idiopathic urticaria. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **90**: 198-200, 1989.

- HILL, S.J. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacol. Rev.**, **42**: 45-83, 1990.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurones. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 143-198, 1991.
- HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen. Pharmac.**, **30**: 5-11, 1998.
- HOLZER, P. Peptides sensory neurons in the control of vascular function: mechanisms and significance in the cutaneous and vascular splanchnic beds. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **121**: 52-145, 1992.
- HONG, J.L., CY, HO, KWONG, K., LY, LEE. Activation of pulmonary C fibers by adenosine in anaesthetised rats: role of adenosine A1 receptors. **J. Physiol.**, **508**: 109-118, 1998.
- HUGHES, S.R. & BRAIN, S.D. Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of CGRP peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. **Br. J. Pharmacol.**, **111**: 425-430, 1994.
- JACOBSON, K.A. Adenosine A3 receptors: novel ligands and paradoxical effects. **Trends Pharmacol. Sci.**, **19**: 184-191, 1998.
- JANCSO, G.; KIRALY, E.; JANSKO-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, **270**: 741, 1977.
- JANCSÓ, N., JANCSÓ-GABOR, A. & SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by treatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol. Chemotr.**, **31**: 138-151, 1967.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. **Ed. Guanabara**, 6^a ed., 1985.
- 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.
- KAMIKAWA, Y. AND SHIMO, Y. Adenosine selectively inhibits noncholinergic transmission in guinea pig bronchi. **J. Appl. Physiol.**, **66**: 2084-2090, 1991.
- KHAKH, B.S. AND KENNEDY, C. Adenosine and ATP: progress in their receptors' structures and functions. **TIPPS**, **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.
- KOWALSKI, M.L., KOWALSKI-SLIWINSKA, M., KALINER, M.A. Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. II additional evidence indicating that mast cells are not involved in neurogenic inflammation. **The American Assoc. of Immun.**, **145**: 1214-1221, 1990.
- KRUMINS, S.A. & BROOMFIELD, C.A. Evidence of NK1 and NK2 tachykinin receptors and their involvement in histamine release in a murine mast cell line. **Neuropeptides**, **21**: 65-72, 1992.
- LEANDER, S., HAKANSON, R., ROSELL, S., FOLKERS, K., SUNDLER, F. TORNQVIST, K. A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by noncholinergic nonadrenergic nerve stimulation. **Nature**, **294**: 467-469, 1981.
- LEMBECK, F. & HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, **310**: 175-183, 1979.
- LESH, M.E.; FERIN, M.A.; WEIGHT, C.D.; SCHRIER, D.J. The effects of (R)-N-(1-methyl-2-phenylethyl)adenosine (L-PIA), a standard A1-selective adenosine agonist on rat acute models of inflammation and neutrophil function. **Agents Actions**, **34**: 25-27, 1991.
- LINDEN, J. Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 298-306, 1994.
- LOHSE, M.J., MAURER, K., GENSHEIMER, H.P. & SCHWABE, U. Dual actions of adenosine on rat peritoneal mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **335**: 555-560, 1987.
- LÜNDBERG, 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**: 114-135, 1996.

- MAGGI, C.A. & SCHWARTZ, T.W. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. **Trends Pharmacol. Sci.**, **18**: 351-355, 1997.
- MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptides (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog. Neurobiol.**, **45**: 1-98, 1995.
- MAGGI, C.A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. **J. Auton. Pharmac.**, **11**: 173-208, 1991.
- MARQUARDT, D.L., PARKER, C.W. & SULLIVAN, T.J. Potentiation of mast cell mediator release by adenosine. **J. Immun.**, **113**: 741-748, 1978.
- MARQUARDT, D.L. AND WALKER, L.L. Inhibition of protein kinase A fails to alter mast cell adenosine responsiveness. **Agents actions**, **43**: 7-12, 1994.
- MARSHALL, J.S. & WASERMAN, S. Mast cells and nerves – potential interactions in the context of chronic disease. **Clin. Exp. Allergy**, **25**: 102-110, 1995.
- MARTIN, P.L. Relative agonist potencies of C2-substituted analogues of adenosine: evidence of adenosine A2b receptors in the guinea pig aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, **216**: 235-242, 1992.
- MORIMOTO, H., YAMASHITA, M., IMAZUMI, K., MATSUDA, A., OCHI, T., SEKI, N., MIZUHARA, H., FUJII, T., SENOH, H. Effects of adenosine A2 receptor agonists on the excitation of capsaicin-sensitive afferent in airway tissues. **Eur. J. Pharmacol.**, **240**: 121-126, 1993.
- MUNSHI, R.; PANG, I.H.; STERNWEIS, P.C.; LINDEN, J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. **J. Biol. Chem.**, **266**: 22285-22289, 1991.
- NAUKKARINEN, A., NICKLOFF, B.J., FARBER, E.M. Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. **J. Invest. Dermatol.**, **92**: 126-129, 1989.
- NISHIBORI, M.; SHIMAMURA, K.; YOKOYAMA, H.; TSUTSUMI, K.; SAEKI, K. Differential effects of adenosine on histamine secretion induced by antigen and chemical stimuli. **Arch. Int. Pharmacol. Ther.**, **265**: 17-28, 1983.

- NISHIMURA, S., MOHRI, M., OKADA, Y., MORI, M. Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. **Brain Res.**, **525**: 165-169, 1990.
- NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. Neuroanatomia: Estrutura e Função do Sistema Nervoso Humano. **Ed. Premier**, 5ª ed., 1999.
- OGAWA, K.; NABE, T.; YAMAMURA, H.; KOHNO, S. Nanomolar concentrations of neuropeptides induce histamine release from peritoneal mast cells of a substrain of Wistar rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **374**: 285-91, 1999.
- ONGINI, E. AND FREDHOLM, B.B. Pharmacology of adenosine A2a receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, **17**: 364-372, 1996.
- OTT, I.; LOHSE, M.J.; KLOTZ, K.N.; VOGT-MOYKOPF, I.; SCHWABE, U. Effects of adenosine on histamine release from human lung fragments. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **98**: 50-56, 1992.
- PATON, D.M. Structure activity relations for presynaptic inhibition of noradrenergic and cholinergic transmission by adenosine: evidence for action on A1 receptors. **J. Auton. Pharmacol.**, **1**: 287-290, 1981.
- PEACHELL, P.T., LICHTENSTEIN, L.M. & SCHLEIMER, R.P. Inhibition by adenosine of histamine on leukotriene release from basophils. **Biochem. Pharmacol.**, **38**: 1717-1725, 1989.
- PEAKMAN, M.C. AND HILL, S.J. Adenosine A1-receptor mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in type-2 but not type-1 rat astrocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, **306**: 281-289, 1996.
- PEAKMAN, M.C. AND HILL, S.J. Adenosine A2b-receptor mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. **Br. J. Pharmacol.**, **111**: 191-198, 1994.
- PUFFINGER, N.K., HANSEN, K.R., RESTA, R., LAURENT, A.B., KNUDESEN, T.B., MADARA, J.L., THOMPSON, L.F. Production and characterization of multiple antigenic peptide antibodies to the adenosine A2b receptor. **Mol. Pharmacol.**, **47**: 1126-1132, 1995.
- QUARTARA, L., MAGGI, C.A. The tachykinin NK1 receptor. Part II : distribution and pathophysiological roles. **Neuropeptides**, **32**: 1-49, 1998.

- RAMKUMAR, V., STILES, G.L., BEAVEN, M.A. & ALI, H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. **J. Biol. Chem.**, **268**: 16887-16890, 1993.
- REEVES, J.J., JONES, C.A., SHEEHAN, M.J., VARDEY, C.J. & WHELAN, C.J. Adenosine A₃ receptors promote degranulation of mast cells both in vitro and in vivo. **Inflammation Research**, **46**: 180-184, 1997.
- 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.
- SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, **31**: 381-389, 1997.
- SARIA, A., MARTLING, C.R., YAN, Z., THEODORSSON-NORHEIM E., GAMSE, R., LUNDBERG, J.M. Release of multiple tackykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, jhistamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulatio. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **137**: 1330-1335, 1988.
- SAWYNOK, J. & REID, A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhance nociception in the formalin test via activation of a purinergic P₂X receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, **330**: 115-121, 1997.
- SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, **317**: 1-11, 1998.
- SAWYNOK, J., REID, A. & LIU, X.J. Acute paw oedema induced by local application of adenosine A₁, A₂ and A₃ receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, **386**: 253-261, 1999.
- SAWYNOK, J., REID, A. & LIU, X.J. Involvement of mast cells, sensory afferent and sympathetic mechanisms in paw oedema induced by adenosine A₁ and A_{2B/3} receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, **395**: 47-50, 2000.
- SCHIFFMANN, S.N.; LIBERT, F.; VASSART, G.; VANDERHAEGHEN, J.J. Distribution of adenosine A₂ receptor mRNA in the human brain. **Neurosci. Lett.**, **130**: 177-81, 1991.

- SEBASTIÃO, A.M. AND RIBEIRO, J.A. Adenosine A2 receptor mediated excitatory actions on the nervous system. **Prog. Neurobiol.**, **48**: 167-189, 1996.
- SHEPHEARD, R.K., LINDEN, J., DULING, B.R. Adenosine-induced vasoconstriction in vivo: role of the mast cell and A3 adenosine receptor. **Circ. Res.**, **78**: 627-634, 1996.
- SIMONE, D.A., NGEOW, J.Y.F., WHITEHOUSE, J., BECERRA-CABRAL, L., PUTTERMAN, G.J., LAMOTTE, R.H. The magnitude and duration of itch produced by intracutaneous injections of histamine. **Somatosens. Res.**, **5**: 81-92, 1987.
- SIQUEIRA Jr, J.F.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. **MEDSI, Editora Médica e Científica Ltda**, 2000.
- STRICKER, S. Untersuchungen über die gefabwurzeln des ischiadicus. **Sitzungsber Kaiserl. Akad. Wiss (Wein)** **3**: 173-185, 1876.
- SUFKA, K.J., SCHOMBURG, F.M. & GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **41**: 53-56, 1991.
- SZOLCSÁNYI, 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.
- TILLEY, S.L., WAGONER, V.A., SALVATORE, C.A., JACOBSON, M.A. & KOLLER, B.H. Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. **J. Clin. Invest.**, **105**: 361-367, 2000.
- TOWLER, P.K. & BRAIN, S.D. Activity of tachykinin NK₁ and bradykinin B₂ receptor antagonists, and an opioid ligand at different stimulation parameters in neurogenic inflammation in the rat. **Neurosci. Lett.**, **257**: 5-8, 1998.
- TRUSSELL, L.O. & JACKSON, M.B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **82**: 4857-61, 1985.
- VAN CALKER, D., MUELLER, M., HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptor the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **J. Neurochem.**, **33**: 999-1005, 1979.
- VON EULER, U.S., GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissues extracts. **J. Physiol.**, **72**: 577-583, 1931.

- WALDAY, P. AND AAS, P. Prejunctional stimulation of cholinergic nerves in rat airway smooth muscle by an adenosine analogue. **Pulm. Pharmacol.**, **4**: 114-119, 1991.
- WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. Cosmetología de Harry. **Ediciones Díaz de Santos**, SA, 1990.
- XU, X.J.; DALSGAARD, C.J.; MAGGI, C.A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. NK-1, but not NK-2, tachykinin receptors mediate plasma extravasation induced by antidromic C-fiber stimulation in rat hindpaw: demonstrated with the NK-1 antagonist CP-96,345 and the NK-2 antagonist Men 10207. **Neurosci. Lett.**, **139**: 249-52, 1992.
- YAKSH, T.L., HUA, X.Y., KALCHEVA, I., NOZAKI-TAGUCHI, N., MARSALA, M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **96**: 7680-7686, 1999.
- YOUNG, P.A. & YOUNG, P.H. Bases da Neuroanatomia Clínica. **Ed. Guanabara**, 1998.
- ZHOU, Q.Y.; LI, C.; OLAH, M.E.; JOHNSON, R.A.; STILES, G.L.; CIVELLI, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **89**: 7432-6, 1992.