

Carla Fernanda Franco Penteado

PAPEL DAS FIBRAS AFERENTES PRIMÁRIAS SENSÍVEIS
A CAPSAICINA NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA
AS VIAS AÉREAS E NA NEUTROPOIESE

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da Farmacêutica – Carla Fernanda Franco Penteado.

Campinas, 15 de dezembro de 2004.

Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Carla Fernanda Franco Penteado

**PAPEL DAS FIBRAS AFERENTES PRIMÁRIAS SENSÍVEIS A
CAPSAICINA NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA AS
VIAS AÉREAS E NA NEUTROPOIESE**

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2004

UNIDADE	8C
Nº UNIDADE	J/UNICAMP
	P387p
V	EX
TOMBO BC/	63489
PROC.	16-0-00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	05/05/05
Nº CPD	

Bib. id 349716

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

P387p Penteadó, Carla Fernanda Franco

 Papel das fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas e na neutropoiese. / Carla Fernanda Franco Penteadó. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

 Orientador : Edson Antunes

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

 1. Neuropeptídeos. 2. Citocinas. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dr. Edson Antunes

Membros:

Profa. Dr. Edson Antunes

Prof. Dra. Soraia Katia P Costa

Profa. Dr. Wothan Tavares de Lima

Prof. Dra. Nicola Conran Zorzetto

Profa. Dr. Francesco Langone

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

Data: 15/12/2004

200508982

Que **DEUS** não permita que eu perca o **ROMANTISMO**, mesmo eu sabendo que as rosas não falam. Que eu não perca o **OTIMISMO**, mesmo sabendo que o futuro que nos espera não é assim tão alegre. Que eu não perca a **VONTADE DE VIVER**, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa... Que eu não perca a vontade de **TER GRANDES AMIGOS**, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas... Que eu não perca a vontade de **AJUDAR AS PESSOAS**, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda. Que eu não perca o **EQUILÍBRIO**, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia. Que eu não perca a **VONTADE DE AMAR**, mesmo sabendo que a pessoa que eu mais amo, pode não sentir o mesmo sentimento por mim... Que eu não perca a **LUZ e o BRILHO NO OLHAR**, mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo escurecerão meus olhos... Que eu não perca a **GARRA**, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos. Que eu não perca a **RAZÃO**, mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas. Que eu não perca o **SENTIMENTO DE JUSTIÇA**, mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu. Que eu não perca o meu **FORTE ABRAÇO**, mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos... Que eu não perca a **BELEZA E A ALEGRIA DE VER**, mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma... Que eu não perca o **AMOR POR MINHA FAMÍLIA**, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exigiria esforços incríveis para manter a sua harmonia. Que eu não perca a vontade de **DOAR ESTE ENORME AMOR** que existe em meu coração, mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado. Que eu não perca a vontade de **SER GRANDE**, mesmo sabendo que o mundo é pequeno... E acima de tudo... Que eu jamais me esqueça que **DEUS** me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois....

"A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR!"

Dedico este trabalho

*A Deus pela graça de viver e
presença constate em todos os dias da minha vida..*

*Aos meus pais, Chico e Regina,
minhas irmãs Cherê e Juliana
pelo amor, incentivo e pelo apoio
em todos os momentos*

À minha vó Nica meu exemplo de vida.

*Aos meus tios, primos e meu cunhado
Luis pelo apoio e carinho.*

*A minha linda sobrinha e afilhada Anna Luisa
pela alegria que trouxe a nossa vidas.*

*Ao Mário Angelo, meu namorado,
pela imprescindível ajuda, carinho e compreensão*

AGRADECIMENTOS

A todos os amigos que me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho. De modo especial:

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pessoa que eu admiro por sua competência e dedicação, pela orientação e por me ensinar o caminho da pesquisa, proporcionando o meu crescimento científico e também pela amizade, compreensão e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo N Muscara e a Dra Simone Teixeira pelo trabalho em colaboração e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela colaboração, infinita disposição e amizade.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelo fornecimento dos materiais para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Carmem S.P. Lima, Mônica, Iramaia e Hélia do Hemocentro da UNICAMP pela assistência técnica e pela simpatia que me receberam no laboratório.

À Profa. Dra. Sandra Farsky pela oportunidade da realização de alguns experimentos em seu laboratório.

À Dra. Ivani pela co-orientação desde do mestrado, por quem eu tenho grande carinho e admiração.

Ao Enilton pela colaboração na realização dos experimentos e pelos momentos de companheirismo no decorrer destes anos.

Ao Humberto Miguel (aluno de doutorado do Departamento de Farmacologia da USP-SP) pelo auxílio nos experimentos de PCR.

Ao Sr. Miguel pela dedicação e carinho com os animais utilizados neste trabalho.

Ao Adilson e Marcos pela assistência técnica.

Ao Wanderlei, secretário da pós-graduação, pela eficiência e disposição em todos os momentos.

Aos amigos da Unicamp: Ágata, Alessandra, Alice, Aline, Angelina, Aninha, Camila, Cleber, Cristina, Cristiane, Fabíola, Elen, Fernanda Priviero, Fernanda e Marcelo Datti, Gislaine, Haroldo, Heloísa, Humberto, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Márcia, Rafael, Laura, Leige, Letícia, Lúcia, Luciane, Luis Otávio, Martinha, Marcio, Nicola, Pâmela, Paula Rúbia, Raquel, Renata Pereira, Sara, Sisi, Tatiane e Valéria.

Aos amigos da USP: Ana Alice, Ana Augusta, Bruno, Jamila, Paula e Rodrigo.

As minhas amigas Juliana Chaves, Fábiana e Fabiana.

Aos professores, funcionários do Depto de Farmacologia que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Aos animais utilizados neste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e à acessoria pelos comentários pertinentes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE MATERIAIS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxv
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxxix
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações gerais sobre inflamação neurogênica.....	34
1.2 Hematopoiese e neutrófilos.....	36
1.3 Mediadores solúveis da migração.....	43
1.4 Fibras aferentes primárias e neuropeptídeos	47
1.5 Controle neural das vias aéreas.....	49
OBJETIVOS.....	56
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Animais.....	58
2.2 Tratamento de animais neonatos com capsaicina.....	58
2.3 Modelo de reação inflamatória alérgica pulmonar.....	59
2.4 Contagem de células da medula óssea e do sangue.....	60
2.5 Obtenção de neutrófilos do sangue de rato.....	61
2.6 Quimiotaxia de neutrófilos periféricos <i>in vitro</i>	62
2.7 Adesão de neutrófilos periféricos <i>in vitro</i>	63
2.8 Tratamento crônico com o composto 48/80.....	64
2.9 Obtenção dos macrófagos alveolares.....	64
2.10 Determinação da concentração de nitrito, ânion superóxido e TNF- α no sobrenadante de macrófagos alveolares.....	65
2.11 Determinação da concentração do TNF- α , IL-6, IL-10, PGE ₂ e LTB ₄ no lavado broncoalveolar.....	66
2.12 Determinação da concentração da substância P no lavado broncoalveolar e na medula óssea.....	66
2.13 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR).....	67

2.14 Análise Estatística.....	72
3. RESULTADOS	
3.1 Determinação da eficácia do tratamento de ratos neonatos com capsaicina.....	74
3.2 População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA.....	75
3.3 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA.....	77
3.4 População de leucócitos totais e diferenciais no sangue periférico após desafio com OVA.....	80
3.5 Quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i> induzida pelo fMLP, substância P e PAF.....	82
3.6 Adesão <i>in vitro</i> de neutrófilos induzida pelo fMLP e PMA.....	84
3.7 Expressão da COX-2 e iNOS no tecido pulmonar.....	89
3.8 Expressão de CINC-1, CINC-2 e CINC-3 no tecido pulmonar.....	91
3.9 Níveis de TNF- α , IL-6, IL-10, PGE ₂ e LTB ₄ no LBA.....	93
3.10 Macrófagos alveolares isolados de ratos controles e tratados com capsaicina: liberação de ânion superóxido, nitrito e TNF- α	95
3.11 Participação dos mastócitos.....	97
3.12 Influência do pré-tratamento de ratos com capsaicina na hematopoiese e na expressão de receptores de taquicininas e PPT-I	
3.12.1 Níveis da substância P na medula óssea.....	99
3.12.2 População basal de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea e sangue periférico.....	101
3.12.3 Expressão de RNAm para PPT-I, receptor NK ₁ e receptor NK ₂	104
4. DISCUSSÃO	108
5. CONCLUSÕES	128
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Soro albumina bovina
C5a	5º fator do sistema complementto
CFU	Unidades formadoras de colônia
CFU-G	Unidades formadoras de colônia para granulócitos
CFU-GM	Unidades formadoras de colônia para granulócitos e monócitos
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
CINC	citocina indutora de quimioatração de neutrófilos
COX-2	Cicloxigenase induzível
CPS	Capsaicina
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
HTBA	Hexadtrimetil amônio bromida
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
ICAM-2	molécula de adesão intercelular-2
ICAM-3	molécula de adesão intercelular-2
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
IgG ₁	Imunoglobulina G ₁
IgG ₂	Imunoglobulina G ₂
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LBA	Lavado broncoalveolar
LFA-1	Antígeno-1 de função linfocitária
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
Mac-1	Antígeno-1 de macrófago
MEM	Eagle's minimum essencial medium
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago-1 α
NANC	Fibras não-adrenérgicas não colinérgicas
NGF	Fator de crescimento neuronal
NK-1	Receptor de neurocinina tipo 1
NK-2	Receptor de neurocinina tipo 2
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
O ₂ [•]	ânion superóxido
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada

PECAM-1	Molécula de adesão da célula endotelial e da plaqueta
PGE2	Prostaglandina E2
PMA	Miristato e acetato de forbol
PPT-I	Pre-pro-taquicinina I
PSGL-1	Glicoproteína ligante-1
ROS	espécies reativas do oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase-transcrição reversa
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TGF- β	Fator de crescimento tumoral- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	molécula de adesão da célula vascular-1
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VLA-4	Antígeno de ativação tardia tipo 4

LISTA DE MATERIAIS

Material	Procedência
Anticorpo anti-Mac-1 (ICRF 44)	Serotec (EUA)
Anticorpo monoclonal não-específico	Serotec (EUA)
Capsaicina	Sigma (St. Louis, EUA)
Composto 48/80	Sigma (St. Louis, EUA)
Chemo Tx	Neuroprobe (EUA)
Corante May-Grunwald-Giemsa	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ferrocitocromo C	Sigma (St. Louis, EUA)
Fibronectina	Sigma (St. Louis, EUA)
fMLP	Sigma (St. Louis, EUA)
Halotano	Cristália (Brasil)
Hidróxido de alumínio	Sanofi (Brasil)
HTBA	Sigma (St. Louis, EUA)
Kits ELISA para dosagem da IL-6, IL-10, PGE ₂ , LTB ₄ e substância P	R&D systems (EUA)
Kit para dosagem da TNF- α	BD Biosciences (Pharmigen, EUA)
Leishaman	Merck (Alemanha)
LPS	Sigma (St. Louis, EUA)
Materiais utilizados na técnica de RT-PCR	Invitrogen Life Technologies (EUA)
MAY-GRUNWALD	Merck (Alemanha)

MEM	Sigma (St. Louis, EUA)
Metanol	Merck (Alemanha)
o-dianisidina	Sigma (St. Louis, EUA)
Ovalbumina	Sigma (St. Louis, EUA)
PAF	Sigma (St. Louis, EUA)
Pentobarbital sódico	Cristália (Brasil)
PMA	Sigma (St. Louis, EUA)
Primers	Invitrogen Life Technologies (Brasil)
Reagente de Griess	Sigma (St. Louis, EUA)
RPMI	Sigma (St. Louis, EUA)
Sais básicos	Merck (Alemanha)
SOD	Sigma (St. Louis, EUA)
soro albumina bovina	Sigma (St. Louis, EUA)
Substância P	Sigma (St. Louis, EUA)
Zimosan	Sigma (St. Louis, EUA)
Trizol	GIBCO (BRL, EUA)
Brometo de etídio	GIBCO (BRL, EUA)
RNA guard	Amersham (Reino Unido)
Superscript II	GIBCO (BRL, EUA)
Anticorpo anti-VLA-4 (Hb2/1)	Serotec (EUA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da inervação das vias aéreas humanas

51

Figura 2 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e eosinófilos (Painel D) no LBA de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias), sensibilizados e desafiados com OVA.

76

Figura 3 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos imaturos (B) e neutrófilos maduros da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

78

Figura 4 – Número de eosinófilos (A) e células mononucleares (B) da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

79

Figura 5 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e eosinófilos (D) no sangue periférico de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

81

Figura 6 – Adesão espontânea de neutrófilos sanguíneos periféricos em placas recobertas com soro (A) ou fibronectina (B).

86

Figura 7 - Efeito dos anticorpos anti-VLA-4, anti-Mac-1 e do anti- IgG sobre a adesão de neutrófilos induzida pelo fMLP (A) ou PMA (B) em placas recobertas com soro de rato.

87

Figura 8 - Efeito dos anticorpos anti-VLA-4, anti-Mac-1 e do anti-IgG sobre a adesão de neutrófilos induzida pelo fMLP (A) ou PMA (B) em placas recobertas com fibronectina.

88

Figura 9 - Expressão da iNOS (A) e da COX-2 (B) no pulmão de animais controle (colunas vazias) e tratados com capsaicina (colunas cheias).

90

Figura 10 - Expressão da CINC-1 (A), CINC-2 (B) e CINC-3 (C) no pulmão de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

92

Figura 11 - Concentração de TNF- α (A), LTB₄ (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) no LBA de animais controles (colunas vazias) e tratados com capsaicina (colunas cheias).

94

Figura 12 - Efeito do tratamento com 48/80 no número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e dos níveis de TNF- α (D) no LBA.

98

Figura 13 - Concentração da substância P na medula óssea de animais controle e tratados com capsaicina.

100

Figura 14 - Efeito do tratamento com capsaicina no número de leucócitos totais, neutrófilos imaturos, neutrófilos maduros, eosinófilos e células mononucleares na medula óssea.

102

Figura 15 - Efeito do tratamento com capsaicina no número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no sangue periférico.

103

Figura 16 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK₁ e NK₂ (B) no cérebro de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

105

Figura 17 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK₁ e NK₂ (B) no pulmão de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

106

Figura 18 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK₁ e NK₂ (B) nas células da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias).

107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quimiotaxia *in vitro* induzida pelo fMLP (1×10^{-5} M), substância P (5×10^{-5} M) e PAF (1×10^{-7} M) em neutrófilos sangüíneos obtidos de animais controle ou tratados com capsaicina (CPS), não-sensibilizados e sensibilizados com OVA.

83

Tabela 2 - Produção de ânion superóxido (O_2^-), TNF- α e nitrito pelos macrófagos alveolares obtidos de animais do grupo controle e tratados com capsaicina.

96

RESUMO

O tratamento neonatal com capsaicina em ratos acarreta aumento da inflamação alérgica pulmonar, sugerindo um papel protetor para as fibras C nas vias aéreas (MEDEIROS et al, 2001). O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos responsáveis pelo aumento do influxo neutrofílico pulmonar em ratos desprovidos de neuropeptídeos pelo tratamento neonatal com capsaicina, sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) na fase adulta. Os animais receberam capsaicina (30 mg/Kg, s.c.) no segundo dia de vida, sendo os protocolos experimentais realizados nos animais na fase adulta dos mesmos (60-70 dias de vida). A sensibilização com OVA foi realizada pela injeção subcutânea de 200 µg de OVA adsorvida em 8 mg de Al (OH)₃. O desafio antigênico com OVA (1 mg) foi realizado 14 dias após a sensibilização. A contagem de células no LBA, sangue periférico e medula óssea foi realizada 6h após o desafio com OVA. Nos animais desafiados com OVA observamos um aumento no número de neutrófilos no LBA, sendo este aumento significativamente maior em animais pré-tratados com capsaicina. Em ambos os grupos, controle e capsaicina, observamos redução do número de neutrófilos no sangue periférico de ratos desafiados com OVA, sendo esta redução maior no grupo capsaicina. Na medula óssea, observamos aumento significativo das formas imaturas e maduras de neutrófilos em ratos desafiados com OVA, não foi observado diferenças estatísticas entre o grupo controle e capsaicina. Empregando o modelo de adesão *in vitro*, nossos resultados mostraram que os neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos tratados com capsaicina têm a mesma capacidade de aderir em resposta ao fMLP (0.1 µM) ou PMA (1 µM) em placas recobertas com soro ou fibronectina. Além disso, neutrófilos obtidos de animais controle ou pré-tratados com capsaicina são

capazes de migrar *in vitro* em resposta ao fMLP (10 μ M), PAF (0.1 μ M) e a substância P (50 μ M) de maneira semelhante. Observamos um aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e LTB₄ no LBA dos ratos desafiados com OVA e pré-tratados com capsaicina. Nos animais tratados com capsaicina observamos um aumento significativo na expressão do RNAm para CINC-3 e redução do RNAm para CINC-2 no pulmão após o desafio com OVA, quando comparado com o seu respectivo controle. Macrófagos alveolares obtidos de animais tratados com capsaicina foram capazes de gerar a mesma quantidade de ânion superóxido, nitrito e TNF- α (basal e estimulada) quando comparado com o grupo controle. O tratamento crônico dos ratos com o composto 48/80 preveniu o aumento do influxo de neutrófilos no grupo de animais tratados com capsaicina (desafiados com OVA) e restaurou os níveis de TNF- α aos valores encontrados no grupo controle. No conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento neonatal com capsaicina resulta em “up-regulação” dos mastócitos, que, uma vez ativados pela exposição ao antígeno, passam a liberar grandes quantidades de mediadores inflamatórios, principalmente do TNF- α e a CINC-3, amplificando desta forma aumento do influxo de neutrófilos nas vias aéreas destes animais. Paralelamente, observamos que ratos pré-tratados com capsaicina apresentam aumento no número basal de neutrófilos imaturos e maduros na medula óssea, quando comparado aos animais controle. Este aumento está associado à elevação da expressão da PPT-I e do receptor NK₁ na medula óssea, sugerindo que estas proteínas estão “upreguladas” em animais desprovidos de neuropeptídeos pelo tratamento neonatal com capsaicina.

ABSTRACT

This study was undertaken to clarify the mechanisms by which C-fiber degeneration at neonatal stages exacerbates the inflammatory responses of rat airways. Rats were treated with capsaicin at neonatal stages and immunized with ovalbumin (OVA) at adult ages. Challenge of capsaicin pretreated rats with OVA promoted a higher influx of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid compared with the vehicle group. No significant differences were found for the other cell types. The increased adhesion of fMLP (0.1 μ M) and PMA (1 μ M)-treated neutrophils to fibronectin-coated wells did not differ among vehicle- and capsaicin-pretreated rats. Additionally, fMLP (10 μ M), PAF-(0.1 μ M) and substance P (50 μ M) induced a significant neutrophil chemotaxis, but no differences were found among vehicle and capsaicin groups. Increased levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and LTB₄ in BAL fluid as well as higher expression of CINC-3 in lung homogenates were detected in the capsaicin group compared with vehicle group. In the capsaicin group, chronic treatment with compound 48/80 restored the TNF- α levels to control values and prevented the neutrophil influx in BAL fluid. The enhanced production of TNF- α , superoxide anion and nitrite by isolated alveolar macrophages in response to LPS (3 μ g/ml), PMA (10 nM) and/or zymosan (100 particles/cell) did not differ between vehicle- and capsaicin-pretreated rats. In conclusion, chronic neuropeptide depletion promoted by neonatal capsaicin treatment upregulates airways mast cells, which upon activation by antigen at adult ages, release large amounts of cytokines such as TNF- α and CINC-3 that accounts for the massive airways neutrophil infiltration. Parallel to this, we observed that capsaicin-

pretreated rats present higher numbers of both immature and mature neutrophils in bone marrow, compared with control rats. This was accompanied by higher expression of mRNA for PPT-I and tachykinin-NK1 receptor in bone marrow, suggesting that these proteins are up-regulated in rats chronically depleted of neuropeptides by neonatal capsaicin treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a inflamação neurogênica

A inflamação neurogênica é uma resposta local, decorrente da liberação de certos transmissores dos terminais periféricos de neurônios não-adrenérgico e não colinérgico (NANC), em resposta a estímulos químicos, térmicos ou mecânicos (GEPPETTI & HOLZER, 1996). Os principais transmissores liberados desses terminais nervosos são peptídeos como a substância P, neurocinina A (NKA), neurocinina (NKB) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros. Estes neuropeptídeos estão envolvidos em uma variedade de doenças inflamatórias e processos hiperalgésicos incluindo rinite (BLOM et al., 1997), neuralgia pós-herpes, urticárias (HERNANZ et al., 1989; MAGGI, 1995), psoríase (NAUKKRINEN et al., 1989), dermatites atópicas e de contato (COULSON e HOLDEN, 1990), neuropatia diabética dolorosa (LOW et al., 1995), síndrome dolorosa pós-mastectomia (DINI et al., 1993), crises de enxaqueca (FUSCO et al., 1994; MAGGI, 1995), artrite reumatóide (LEVINE et al., 1985) e asma (BARNES, 1991; RICCIARDOLO et al., 1999).

Dentre os peptídeos liberados das fibras NANC, a substância P é o mais estudado e, supostamente, o que mais contribui para o processo inflamatório neurogênico (ANSEL et al., 1997). Este neuropeptídeo induz infiltração de granulócitos em diferentes tecidos por mecanismos dependentes e independentes de mastócitos (YANO et al., 1989; IWAMOTO, 1992). A substância P também estimula a liberação de TNF- α , que regula a expressão de moléculas de adesão

na superfície do endotélio (ICAM-1 e VCAM-1) e nos leucócitos (SABAN et al., 1997). Estes efeitos se devem, em grande parte, à ligação da substância P ao receptor NK_1 , resultando em níveis aumentados de cálcio intracelular seguido pela resposta biológica (QUNILAN et al., 1999).

Através de modelos animais que mimetizam a fisiopatologia das doenças das vias aéreas humanas, tem sido sugerido que os neuropeptídeos, particularmente a substância P, desempenham papel importante no desencadeamento da asma brônquica (MANZINE et al, 1987; LUNDBERG et al., 1991, ALVING, et al, 1991). Entretanto, outros estudos mostram que as fibras NANC do tipo C exercem papel protetor nas vias aéreas, uma vez que o esgotamento dos neuropeptídeos pelo tratamento dos animais com capsaicina acarreta aumento marcante no influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, no lavado broncoalveolar em resposta a diferentes estímulos inflamatórios (LONG et al., 1996, STERNER-KOCK et al., 1996). Corroborando estes estudos, mais recentemente demonstrou-se que o tratamento de ratos neonatos com capsaicina ocasiona, na fase adulta, aumento do influxo de neutrófilos no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar em resposta ao desafio intratraqueal com ovalbumina (OVA), o qual é acompanhado por hiperreatividade brônquica (MEDEIROS et al., 2001, 2003). Este recrutamento de neutrófilos nos ratos pré-tratados com capsaicina é máximo em 6 h e independe dos níveis elevados de imunoglobulinas. No presente trabalho procuramos aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos responsáveis pelo aumento do influxo de neutrófilos nas vias aéreas de ratos tratados na fase neonatal com capsaicina.

1.2 Hematopoiese e Neutrófilos

A formação de todas as células sangüíneas é denominada hematopoiese. Essa denominação abrange todos os fenômenos relacionados à origem, multiplicação e maturação das células precursoras ao nível de medula óssea (BAITON, 2001; LORENZI e JAMRA, 2001). No homem, as primeiras células sangüíneas surgem no período embrionário, por volta da sétima ou oitava semana de vida. Deste período até o quarto mês, estas células ficam localizadas no saco vitelino, que é o chamado período embrionário da hematopoiese. Do quarto ao sexto mês da vida fetal, passam a ser formadas no baço e no fígado (período hepatoesplênico) e, a partir de então, na porção esponjosa dos ossos (período medular). Em um adulto sadio, a produção diária de neutrófilos está em torno de 6 bilhões de células por quilograma de peso por dia (LORENZI e JAMRA, 2001).

A hemopoiese medular constitui um mecanismo complexo no qual participam células indiferenciadas (*stem cells*), macromoléculas de composição química diversa que formam a matriz extracelular e fatores de maturação produzidos pelas células estromais, as quais são compostas por linfócitos, macrófagos e células endoteliais do parênquima medular (LORENZI e JAMRA, 2001).

A diferenciação das *stem cells* ocorre a partir das unidades formadoras de colônia (CFU), para granulócitos e monócitos (CFU-GM) e CFU para granulócitos (CFU-G), e da IL-3, dando origem ao neutrófilos (BARBIOR e GOLD, 2001). O primeiro precursor do neutrófilos reconhecido microscopicamente é o mieloblasto,

o qual se diferencia seqüencialmente em promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo na forma de bastão e neutrófilo segmentado (BAITON, 2001).

A formação dos neutrófilos na medula óssea é dividida em compartimentos mitóticos/proliferativos e compartimentos de armazenamento de células maduras. O compartimento mitótico contém o mieloblasto, promielócito e mielócito, os quais são capazes de se replicar e estão presentes em pequeno número. Os metamielócitos, bastonetes e segmentados constituem o compartimento de armazenamento, não sendo capazes de se replicar (BARBIOR e GOLD, 2001).

O mieloblasto é uma célula imatura que tem núcleo largo e oval, nucléolos grandes, cujo citoplasma contém pouco ou nenhum grânulo. O promielócito apresenta núcleo esférico, cromatina grosseira e nucléolos. Nesta fase, o promielócito contém grande quantidade de grânulos citoplasmáticos positivos para a peroxidase. É neste período que se formam os grânulos primários ou azurófilos. No estágio final do promielócito, a peroxidase abruptamente desaparece, cessando a produção de grânulos azurófilos. O estágio mielócito se inicia com a produção de grânulos específicos peroxidase negativo. Nesta fase, o núcleo celular é esférico (ou com reentrância), a cromatina é densa, e o citoplasma apresenta grande quantidade de grânulos (BAITON, 2001).

O último estágio de maturação consiste de células que não se dividem e que podem ser diferenciadas através da morfologia do núcleo e da população de granulação mista (BARBIOR e GOLD, 2001). O metamielócito apresenta o núcleo em forma de rim, cromatina frouxa e ausência de nucléolos. O bastonete apresenta o núcleo em forma de ferradura, enquanto o neutrófilo segmentado apresenta o núcleo lobulado.

No rato, o precursor mielóide varia de tamanho, especialmente o metamielócito. O núcleo em forma de anel é evidente no estágio de metamielócito, antes de as células polimorfonucleares serem liberadas na circulação periférica. Além disso, os neutrófilos do rato apresentam granulação citoplasmática fina, quase sem cor, e o núcleo, roxo-azulado, apresenta-se mais freqüentemente na forma de anel (SANDERSON e PHILIPS, 1981).

Os neutrófilos deixam o compartimento de estoque da medula e entram no sangue, onde terão uma meia vida de 6 a 7 horas; portanto, são repostos em grande quantidade, no sentido de manter estável o número de células circulantes (BARBIOR e GOLD, 2001).

A migração dos neutrófilos dos vasos sangüíneos para o tecido inflamado é o principal evento do processo inflamatório. Esse processo de transmigração acontece em várias etapas, e é controlado por uma complexa cascata de interações de moléculas de adesão presentes no neutrófilo e nas células endoteliais com ligantes presentes na matriz extracelular (VESTEWEBER e BLANKS, 1999). Este processo se inicia com o deslocamento do neutrófilo da região central do vaso para se posicionar e rolar ao longo da superfície do endotélio. Esta etapa é mediada pelas selectinas, pela glicoproteína ligante-1 (PSGL-1) e por seus ligantes presentes na célula endotelial (WAGNER e ROTH, 2000).

O passo seguinte da migração celular é a adesão firme e transmigração dos neutrófilos, a qual é mediada pelas integrinas. Quando os neutrófilos rolam pelo endotélio devido às interações com as selectinas, certos agentes, como quimiocinas, estão aumentados levando à ativação das integrinas. A ativação

destas moléculas leva à interrupção do rolamento do neutrófilo a fim de estabilizar a adesão entre os neutrófilos e o endotélio (BROWN, 1997).

Selectinas

A nomenclatura dos três membros da família dessas moléculas de adesão foi designada por prefixos de acordo com o tipo de célula onde estas moléculas foram primeiramente identificadas: L-selectina está expressa em leucócitos, a E-selectina no endotélio ativado, e a P-selectina em plaquetas. Esta última também pode ser expressa em células endoteliais (PIGOTT e POWER, 1994; VESTEWEEBER e BLANKS, 1999).

Durante o processo inflamatório, quando os neutrófilos são ativados por substâncias quimiotáticas, estes expõem a L-selectina na sua superfície. A perda da L-selectina é um dos marcadores utilizados para distinguir neutrófilos não-ativados de ativados. Isto ocorre porque a metaloproteinase do neutrófilo cliva a selectina na junção do domínio exofacial com o domínio transmembrânico, liberando o domínio extracelular da L-selectina no plasma. Desta forma, os níveis circulantes desta selectina estão aumentados em vários processos inflamatórios associados à ativação de neutrófilos (BROWN, 1997).

A expressão da E e P-selectina aumenta rapidamente na membrana das células endoteliais após estimulação com vários mediadores inflamatórios como citocinas, histamina e trombina (VESTEWEEBER e BLANKS, 1999). Assim, na inflamação, a E- e/ou P-selectina presente no endotélio e a L-selectina presente nos neutrófilos atuam seqüencialmente iniciando o "tethering" do neutrófilos, um

processo que leva à marginação destas células, aumentando o contato com o endotélio (BROWN, 1997; VESTEWEEBER e BLANKS, 1999).

Integrinas

As integrinas são glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas encontradas nos neutrófilos e em outras células hematopoiéticas, e são responsáveis pela adesão célula-célula e pela adesão matriz celular-célula.

Essas moléculas apresentam duas subunidades denominadas α e β . Foram classificadas originalmente em 3 subfamílias: β_1 integrinas (ou VLA proteínas), β_2 integrinas (ou leucams) e β_3 integrinas (ou citoadesivas). Foram identificadas 16 subunidades α e 8 subunidades β , sendo que subunidades α individuais podem se associar a mais de uma subunidade β .

As integrinas se ligam a uma variedade de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, fibrinogênio, colágeno, laminina, e outros) e também com membros da superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 e VCAM-1) (PIGOTT e POWER, 1994; KAVANAUGH, 1997).

A ligação dos neutrófilos ao endotélio ativado é principalmente mediada por duas integrinas β_2 (ou CD18), que são o antígeno-1 de macrófago (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18) e o antígeno-1 de função linfocitária (LFA-1; $\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18).

O LFA-1 está presente predominantemente em linfócitos, mas os neutrófilos podem expressar constitutivamente pequena quantidade desta integrina (VAN DER VIEREN et al, 1999). Por outro lado, o Mac-1 revelou-se como a mais

importante integrina do grupo CD18 encontrada em respostas inflamatórias dependentes de neutrófilos. Esta integrina é armazenada em 3 compartimentos no neutrófilo: vesículas secretoras, grânulos específicos e grânulos de gelatinase. Pode ser rapidamente mobilizada para a superfície dos neutrófilos após exposição ao fMLP, LPS, entre outros agentes (BOREGAARD e COWLAND, 1997).

A β_1 integrina (VLA-4; $\alpha_4\beta_1$) é predominantemente encontrada em linfócitos, eosinófilos e monócitos, e participa das interações das células com o endotélio e a matriz celular. Alguns trabalhos têm demonstrado que neutrófilos humanos e de rato também podem expressar constitutivamente esta integrina (ISSEKUTZ et al., 1996; DAVENPECK et al., 1998; CONRAN et al., 2003).

Imunoglobulinas

As imunoglobulinas estão envolvidas na adesão célula-célula. A imunoglobulina ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) foi a primeira imunoglobulina identificada como marcadora da ativação de células B e como ligante para a integrina LFA-1 em células linfoblastóides B. Esta molécula apresenta pequena expressão constitutiva nos monócitos e nas células endoteliais, mas sua expressão é aumentada marcadamente durante processos inflamatórios. As integrinas Mac-1 e LFA-1 são seus ligantes (CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993; PIGOTT e POWER, 1994; MULLER e RADOLPH, 1999).

Duas outras ICAMs foram identificadas posteriormente: ICAM-2 e ICAM-3. A ICAM-2 é constitutivamente expressa nas células endoteliais e células T. A integrina LFA-1 tem maior afinidade para esta imunoglobulina do que pela ICAM-1,

enquanto que para a Mac-1 o inverso é verdadeiro. A ICAM-3 encontra-se expressa em todos os leucócitos, mas não nas células endoteliais.

A VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular-1) é outro membro da superfamília das imunoglobulinas envolvida nas interações leucócito-endotélio. O ligante para a VCAM-1 é a integrina VLA-4 (MULLER e RADOLPH, 1999).

A passagem dos neutrófilos entre as células endoteliais envolve outra molécula de adesão do tipo IgG, a PECAM-1 (molécula de adesão da célula endotelial e da plaqueta), que está expressa nas células endoteliais, plaquetas e neutrófilos. A PECAM-1 é uniformemente distribuída sobre a superfície dos neutrófilos circulantes, estando concentrada nas junções intercelulares das células endoteliais não-estimuladas. Nas células endoteliais, a PECAM-1 parece ser o ligante homofílico passivo para a PECAM-1 presente nos neutrófilos, esta ligação resulta na transdução de sinal no neutrófilo, ativação de integrinas e finalmente na transmigração celular (O'BRIEN et al., 2003).

1.3 Mediadores solúveis da migração

Os estímulos que induzem a migração dos neutrófilos são citocinas não quimiotáticas ou substâncias quimiotáticas, descritos a seguir.

a) Citocinas não quimiotáticas

O TNF- α e a IL-1 são citocinas capazes de induzir a produção de substâncias quimiotáticas e a expressão de proteínas de adesão nos neutrófilos e nas células endoteliais, mas não são quimiotáticas para os neutrófilos. Sob ação do TNF- α , os neutrófilos se ativam e expressam integrinas, levando-os a produzir mediadores lipídicos e liberar o conteúdo dos seus grânulos. Igualmente, as células endoteliais mobilizam selectinas e aumentam a expressão da ICAM-1 em resposta ao TNF- α . De maneira similar, a IL-1 promove a indução da expressão de selectinas e ICAM-1 nas células endoteliais, e ativa as integrinas nos neutrófilos (SCHLEIMER e RUTLEDGE, 1986).

b) Substâncias quimiotáticas

As substâncias quimiotáticas para os neutrófilos são produzidas por uma variedade de células, e incluem principalmente o C5a, quimiocinas, neuropeptídeos, fMLP, PAF e LTB₄.

O C5a circulante, formado a partir da quebra da proteína C5, é produzido durante a ativação da via clássica do complemento no sangue, e, uma vez formado, pode se ligar aos neutrófilos circulantes. Macrófagos tissulares e células epiteliais especializadas podem produzir C5a através da via alternativa do sistema complemento (KOHL e BITTER-SUERMAN, 1993). Com isso, o C5a extravascular promove migração dos neutrófilos dependente de gradiente (STRUNK et al., 1988). A ligação do C5a com o seu receptor nos neutrófilos pode levar à ativação das vias secretórias e oxidativas destas células.

As quimiocinas representam um grupo de aproximadamente 40 pequenas proteínas (6 a 15 kD). Estruturalmente, todas as quimiocinas possuem 4 resíduos de cisteína na sua porção amino terminal que formam pontes de dissulfeto. As quimiocinas são classificadas pela sequência de duas cisteínas NH₂ proximal: α ou CXC quimiocinas (cujos resíduos de cisteína são separados por um aminoácido); β ou CC quimiocinas (cujos resíduos de cisteína são adjacentes). De modo geral, os neutrófilos respondem às α -quimiocinas enquanto as células mononucleares respondem mais fortemente às β -quimiocinas (ROLLINS, 1997; NICKEL et al., 1999; WAGNER e ROTH, 2000). Dentre essas quimiocinas, a IL-8 é, provavelmente, a mais importante para a migração de neutrófilos na maioria das respostas inflamatórias observadas em humanos e coelhos. Os roedores não possuem um análogo da IL-8, mas possuem a “citocina indutora de quimioatração de neutrófilos” (CINC), que é semelhante às proteínas oncogênicas relacionadas ao crescimento. Duas CINC, CINC-1 (ou KC) e a CINC-3 (ou MIP-2) são fundamentais em respostas inflamatórias em ratos e camundongos. Além disso, a

CINC-3, quando incubada com sangue de rato, pode levar os neutrófilos a expressarem a L-selectina e aumentar a expressão de Mac-1 (FREVERT et al., 1995).

O peptídeo formilado bacteriano (fMLP) é resultante da quebra da porção NH₂-terminal de proteínas bacterianas (THELEN et al., 1993). Receptores para o fMLP estão expressos em neutrófilos não estimulados, mas a ativação destas células com fMLP (ou outros agentes) aumenta o número de receptores para este agente (BORREGAARD e COWLAND, 1997). Além da quimiotaxia, o fMLP exerce vários outros efeitos nos neutrófilos, tais como desgranulação, aumento do "burst" oxidativo e da adesão.

O LTB₄ é produzido em neutrófilos e outras células a partir do ácido araquidônico. Está presente na maioria dos focos inflamatórios, podendo também induzir aderência dos neutrófilos às células endoteliais. A aderência no endotélio é devida em parte à ação direta do LTB₄ nas células endoteliais (NOHGAWA et al., 1997). Dois receptores para o LTB₄ já foram clonados e identificados em diferentes espécies animais: o BLT₁ e BLT₂, sendo que o receptor BLT₂ o responsável pela resposta quimiotática (NICOSIA et al., 2001).

O PAF é um fosfoglicerídio acetilado derivado dos lipídeos da membrana celular e é produzido por células endoteliais, plaquetas, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. Através da ligação com o receptor PAFR presentes nos neutrófilos é capaz de promover quimiotaxia. Além disso, induz a expressão de moléculas de adesão no endotélio e nos leucócitos (MATHIAK et al, 1997). Acredita-se que, o PAF derivado da célula endotelial, auxilie a ligação aos receptores de PAF presentes no neutrófilo em rolamento (ZIMMERMAN et al., 1996).

A substância P, além de regular uma série de mecanismos envolvidos na migração do neutrófilo, induz a produção de citocinas e aumenta a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio, através da interação com os receptores clássicos para os neuropeptídeos NK₁ e NK₂ (SABAN et al., 1997; DELGADO et al., 2003; DIANZANI et al., 2003). É capaz também de induzir quimiotaxia de granulócitos *in vitro* (ROCH-ALVEILERR et al., 1986; CAROLAN e CASALE, 1993).

Portanto, a ligação destes agentes quimiotáticos aos receptores na superfície dos neutrófilos inicia uma série de eventos intracelulares que levam a migração, agregação, aderência, desgranulação e produção de ânion superóxido. Esses efeitos são dependentes da concentração do agente quimiotático, sendo que, em baixas concentrações, é capaz de levar à quimiotaxia, e em altas concentrações, à desgranulação (HARIBABU et al., 2000).

1.4 Fibras aferentes primárias e neuropeptídeos

As fibras aferentes primárias originam-se de gânglios da raiz dorsal e formam uma vasta rede de axônios perivasculares que inervam densamente todo o organismo. Estes compreendem os neurônios ganglionares da raiz dorsal e neurônios ganglionares trigeminais (SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Em geral, os neurônios aferentes são bastante sensíveis a vanilóides (substâncias que contêm o grupo vanilil em sua estrutura química), possuem o corpo celular de pequeno diâmetro ($< 50 \mu\text{m}$) e compreendem axônios não-mielinizados de baixa velocidade de condução (tipo C) e alguns mielinizados maiores (tipo A δ ; HOLZER, 1991).

A transmissão química dos neurônios autonômicos para os tecidos efetores periféricos foi durante muito tempo creditada unicamente à noradrenalina e acetilcolina. Esse conceito foi reavaliado a partir dos anos sessenta quando se demonstrou que a resposta inflamatória local, decorrente da condução de impulso nervoso antidrômico de terminações periféricas de alguns neurônios aferentes primários, não era dependente da liberação de noradrenalina e acetilcolina, mas sim da liberação de outros mediadores, principalmente neuropeptídeos (JANCSÓ et al., 1961; SZOLCSÁNYI et al., 1975). Desde então, essas fibras passaram a ser conhecidas como fibras não-adrenérgica, não-colinérgica (NANC).

A capsaicina, substância isolada da pimenta vermelha, atua sobre fibras NANC do tipo C e A δ , resultando na estimulação ou degeneração das mesmas (JANCSÓ et al., 1961, 1967; JANCSÓ e KIRALY, 1981), e por isso tem sido

amplamente utilizada como ferramenta farmacológica no estudo dos neurônios sensoriais.

A seletividade da capsaicina é demonstrada pela presença de um sítio específico de membrana, o receptor vaniloíde. A ativação do receptor vaniloíde leva à abertura do canal iônico; com influxo de sódio e cálcio, gerando depolarização e potencial de ação; isto determina a propagação do impulso para as ramificações periféricas e para o sistema nervoso central (REF). Resumidamente, as ações farmacológicas da capsaicina envolvem, primeiramente, a excitação dos neurônios sensoriais que é seguida pela dessensibilização dos mesmos, impossibilitando assim a condução de novos estímulos. Finalmente, dependendo da concentração, da via de administração e da idade dos animais, advêm as ações neurotóxicas da capsaicina (MAGGI et al., 1995; HOLZER, 1991). Acredita-se que suas ações neurotóxicas da capsaicina estejam relacionadas com a diminuição (ou inibição) do transporte intra-axonal do fator de crescimento neuronal (NGF) da periferia, onde é produzido, para o corpo celular. É sabido que o NGF é fundamental para a manutenção e sobrevivência dos neurônios ganglionares imaturos da raiz dorsal (WOOD, 1993). Tem sido proposto também, que o aumento do cálcio intracelular poderia alcançar níveis suficientemente altos nos neurônios sensoriais contribuindo para os efeitos neurotóxicos da capsaicina observados *in vivo* (CATERINA e JULIUS, 2001).

O tratamento neonatal de ratos com capsaicina promove a destruição de mais de 80% das fibras C, enquanto que o tratamento com essa substância em animais adultos não é tão severo, mas causa redução significativa nos níveis de neuropeptídeos (HOLZER, 1991).

Os neuropeptídeos mais estudados são as taquicininas (substância P, NKA e NKB) e o CGRP. As taquicininas são peptídeos produzidos a partir de dois genes distintos, denominados pré-pró-taquicinina A (PPT-A ou PPT-I) e pré-pró-taquicinina B (PPT-B ou PPT-II), que apresentam em comum a mesma sequência C-terminal em suas estruturas químicas, ou seja, Phe-X-Leu-Met-NH₂. Três tipos de receptores pós-juncionais, denominados NK₁, NK₂ e NK₃, já foram clonados e caracterizados (MAGGI, 1993). Os receptores NK₁ são ativados preferencialmente pela substância P, e os receptores NK₂ e NK₃ são ativados pela NKA e NKB, respectivamente. Os efeitos biológicos do CGRP são dependentes da ativação de receptores específicos denominados CGRP₁ e CGRP₂ (DENNIS et al., 1989).

1.5 Controle neural das vias aéreas

O trato respiratório é ricamente innervado por fibras autonômicas e sensorias, as quais regulam o tônus da musculatura lisa e a secreção de muco. O sistema nervoso parassimpático, é a via eferente dominante, responsável principalmente pelo controle do tônus da musculatura lisa. A acetilcolina liberada pelas terminações nervosas parassimpáticas induz broncoconstrição, no entanto, tem sido proposto que outros neurotransmissores não-colinérgicos tais como o óxido nítrico (NO) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) também podem ser liberados por fibras nervosas parassimpáticas exibindo uma ação broncodilatadora. As terminações nervosas simpáticas desempenham pequeno papel na regulação direta do tônus da musculatura das vias aéreas, porém grande população de receptores β -adrenérgicos são encontrados nesta musculatura, os

quais, após ativação, levam a broncodilatação (CANNING e FISCHER, 2001) (Figura 1).

O nervo vago supre a maioria das fibras sensoriais nas vias aéreas. As fibras sensoriais que inervam o trato respiratório têm seus corpos celulares localizados principalmente no gânglio jugular e no gânglio nodoso, e apresentam projeções periféricas para as vias aéreas e projeções centrais para a medula. Algumas inervações sensoriais se originam do gânglio da raiz dorsal, com fibras que acompanham os nervos simpáticos espinhais (BARNES, 1992) (Figura 1). A ativação inapropriada destas fibras sensoriais, como na asma brônquica, pode resultar em aumento na produção de muco, tosse e broncoconstrição. Do mesmo modo, a ativação dos nervos aferentes trigeminais, que inervam as vias aéreas inferiores, produz sintomas de rinite alérgica como secreção de muco, espirro e exsudação plasmática (BARNES, 2001).

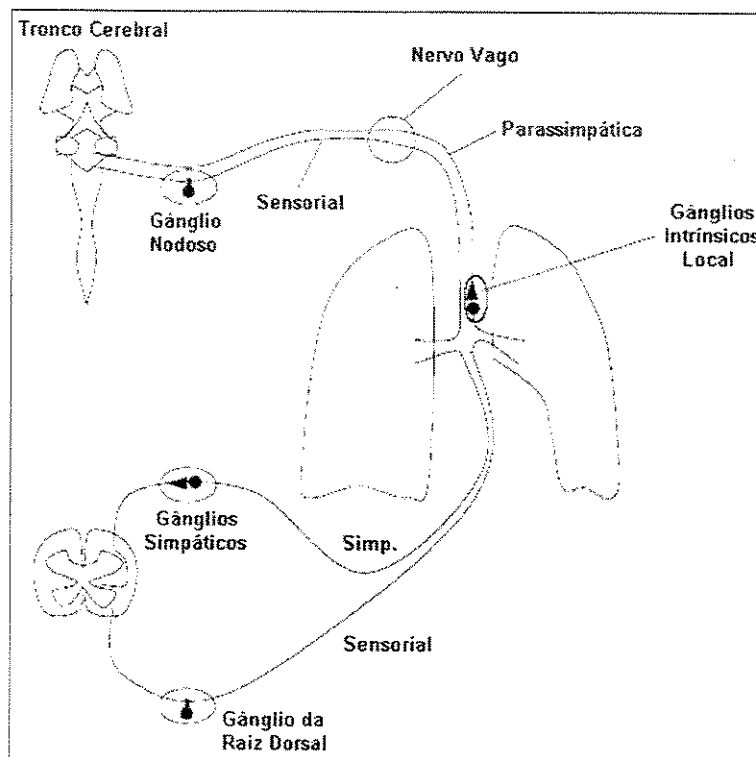


Figura 1- Representação esquemática da inervação das vias aéreas humanas (GRONEBERG et al., 2004).

As fibras aferentes das vias aéreas podem ser divididas em 3 classes (FOX et al., 1993; CARR e UNDEM, 2001): receptores de adaptação lenta (SARS), receptores de adaptação rápida (RARS) e fibras C.

Os SARS são mecanorreceptores de limiar baixo, e respondem às mudanças de tensão nas vias aéreas. Estão localizados principalmente no músculo liso das vias aéreas, apresentam axônio mielinizado e a condução é feita através de fibras A β (FOX, 1999). Os RARS, também conhecidos como “receptores irritantes”, são encontrados em todo o tecido respiratório; porém estão presentes em concentrações maiores nas vias aéreas superiores, especialmente na carina e

brônquio principal. Apresentam axônio mielinizado, e a condução é feita através de fibras A δ (MORTOLA et al., 1975, FOX et al, 1999). As fibras C que inervam o trato respiratório são divididas em pulmonares (localizadas nas paredes alveolares) e brônquicas (localizadas na mucosa). Nenhuma diferença estrutural entre os dois tipos de fibras C foi descrita até o momento.

A capsaicina estimula seletivamente as fibras C sem afetar as fibras A δ em cobaias (FOX et al, 1993). Através de experimentos *in vitro*, demonstrou-se que uma subpopulação de fibras A δ das vias aéreas de cobaias também são sensíveis a capsaicina (RICCIO et al., 1996). No entanto, concentrações significativamente maiores de capsaicina são necessárias para que ocorra a estimulação destas fibras.

As fibras C são sensíveis também a outros estímulos químicos como a bradicinina, histamina, prostanóides, adenosina, fumaça de cigarro e ozônio. No entanto, a ativação destas fibras por estas substâncias parece depender da espécie animal utilizada. Os prostanóides são capazes de ativá-las no cão e no gato, mas não em ratos e cobaias. A adenosina, por sua vez, ativa as fibras C em ratos, mas não em cães. Além disso, outras diferenças podem ser encontradas; por exemplo, a histamina e a serotonina são capazes de ativar as fibras C brônquicas, mas não as pulmonares (BELVISI, 2003).

A estimulação das fibras C resulta na liberação dos neuropeptídeos esta é a chamada função eferente dos neurônios sensoriais. Nas vias aéreas, a descamação epitelial, observada freqüentemente em sujeitos asmáticos, expõe os terminais nervosos aferentes, os quais podem sofrer estimulação por mediadores

inflamatórios, resultando na liberação dos neuropeptídeos (LAITINEN et al., 1985). Assim, o componente neurogênico da inflamação das vias aéreas e da hiperreatividade brônquica pode ser resultante da descamação epitelial e da hiperatividade dos nervos sensoriais os quais encontram-se mais expostos a certos mediadores, incluindo a bradicinina (BARNES, 2001).

De modo geral, os efeitos produzidos pelas taquicininas nas vias aéreas são pró-inflamatórios. A substância P e a NKA promovem broncoconstrição, vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas, edema brônquico e hipersecreção de muco (BARNES, 1986). A broncoconstrição induzida por estimulação elétrica, *in vivo* e *in vitro*, é bloqueada por antagonistas de receptores NK₁ e NK₂ (LUNDBERG et al., 1983, MAGGI et al., 1991; LOU et al., 1993).

Dessa forma, os estudos apontam os nervos sensoriais como elementos importantes nos processos inflamatórios das vias aéreas. No entanto, os dados da literatura são conflitantes, uma vez que, utilizando a capsaicina como ferramenta farmacológica para avaliar o papel das fibras sensoriais e dos neuropeptídeos, pode-se observar tanto redução quanto amplificação da inflamação pulmonar.

Utilizando um modelo de hipersensibilidade imediata em camundongos, demonstrou-se que o tratamento do animal adulto com capsaicina promove um aumento da exsudação e do número de leucócitos nas vias aéreas e na pele dos animais, mas previne a hiperreatividade da traquéia (BUCKLEY e NIJKAMNP, 1994a; 1994b). Esses autores sugeriram que a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação não estão necessariamente correlacionadas na reação de hipersensibilidade do tipo imediata.

Em coelhos imunizados com *Alternaria tenuis*, o tratamento de animais adultos com capsaicina atenuou significativamente a hiperreatividade das vias aéreas induzida pelo antígeno (RICCIO et al, 1993; HERD et al., 1995). De modo semelhante, o tratamento de cobaias adultas com capsaicina diminuiu a hiperreatividade, a exsudação plasmática e o influxo neutrofílico induzido por ozônio (KANEKO et al., 1994; KOTO et al., 1995). O mesmo perfil de resposta foi observado com cobaias submetidas a exposições crônicas de OVA, onde o tratamento com capsaicina resultou na diminuição da broncoconstrição e edema peribronquiolar (TIBÉRIO et al., 1997).

Diferente dos estudos citados acima, o tratamento de cobaias, no período neonatal, com capsaicina aumentou a reatividade brônquica após exposição dos animais à fumaça de cigarro (BURNS et al., 1992). O tratamento de ratos no período neonatal com capsaicina também exacerbou a hiperreatividade das vias aéreas e o infiltrado de neutrófilos no lavado broncoalveolar após exposição ao ozônio (JIMBA et al., 1995; TAKEBAYASHI et al., 1998). De modo semelhante, LONG et al. (1996) observaram que a instilação intratraqueal com LPS em ratos tratados com capsaicina na fase neonatal evoca um infiltrado neutrofílico no lavado broncoalveolar marcadamente maior do que em animais controle. Este tratamento produz também um aumento na severidade da inflamação broncopulmonar e no número de lesões necróticas no pulmão após exposição ao ozônio, sendo este efeito atribuído ao infiltrado neutrofílico nos ratos tratados e expostos ao ozônio (STERNER-KOCK et al., 1996). Corroborando estes estudos, mais recentemente demonstrou-se que ratos tratados na fase neonatal com capsaicina e desafiados com OVA na idade adulta apresentam aumento do influxo

de neutrófilos nas vias aéreas e hiperreatividade brônquica (MEDEIROS et al., 2001; 2003). Neste estudo, o tratamento neonatal com capsaicina não modificou os níveis séricos de IgE, IgG₁ e IgG₂ nos animais sensibilizados, indicando que os neurônios aferentes primários sensíveis a capsaicina modulam o influxo neutrofílico alérgico pulmonar por mecanismos independentes de Ig (MEDEIROS et al., 2001).

Em resumo, o tratamento de animais adultos com capsaicina reduz a resposta inflamatória, e taquicinininas, quando administradas exogenamente, exercem potente efeito inflamatório, especialmente nas vias aéreas. Por outro lado, a degeneração das fibras sensoriais no período neonatal e a redução drástica da produção de neuropeptídeos no animal adulto pode acarretar amplificação da inflamação pulmonar não-alérgica e alérgica.

Objetivos

Objetivos gerais

O objetivo principal deste projeto foi investigar os mecanismos que determinam aumento do influxo de neutrófilos no pulmão de ratos desprovidos de neuropeptídeos pelo tratamento neonatal com capsaicina, sensibilizados e desafiados com OVA na fase adulta.

Objetivos específicos

Em ratos tratados com capsaicina no período neonatal e que na idade adulta foram sensibilizados e desafiados com OVA, investigamos:

- O conteúdo celular (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) na medula óssea, sangue periférico e lavado broncoalveolar;
- A resposta quimiotática e a capacidade de adesão de neutrófilos periféricos *in vitro*;
- Os níveis de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) e de mediadores lipídicos (LTB₄ e PGE₂) no lavado broncoalveolar, assim como os níveis de ânion superóxido, nitrito e TNF- α em macrófagos alveolares *in vitro*;
- A expressão gênica da iNOS, COX-2, CINC-1, CINC-2 e CINC-3 no tecido pulmonar;
- O número de leucócitos e os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar de ratos tratados cronicamente com o composto 48/80;
- O número de neutrófilos (imaturos e maduros) e a expressão gênica da PPT-I e dos receptores NK₁ e NK₂ na medula óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos e fêmeas, pesando de 180 a 230 g. Os animais foram mantidos à 24°C, com um período de iluminação diária de 12 h, e com água e alimentação “ad libitum”.

2.2 Tratamento de animais neonatos com capsaicina

Casais de ratos adultos (fêmeas e machos), obtidos do Biotério Central da UNICAMP foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia. Esses casais foram mantidos em caixas isoladas, por um período de 10 dias, a fim de submetê-los à reprodução. Após esse período, os casais foram separados e as fêmeas prenhes colocadas em caixas individuais.

No segundo dia após o nascimento dos filhotes, os ratos neonatos receberam, pela via subcutânea, uma única dose de capsaicina (30 mg/kg) na região dorsal. Os animais controles receberam a injeção do veículo (1:1:8; Tween 80: etanol: NaCl 0,9%) no volume de 100 µl. Finalizado o tratamento, os animais foram mantidos aquecidos e sob observação por 1 hora, e então devolvidos às respectivas mães. Os animais foram amamentados até o 21º dia, e então separados das mães. Esses animais foram colocados em caixas coletivas, separados por sexo, e utilizados entre o 60º-70º dia de vida.

2.3 Modelo de reação inflamatória alérgica pulmonar

2.3.1 Sensibilização à ovalbumina (OVA) e desafio antigênico

Os animais pré-tratados com capsaicina e os animais controle (pré-tratados com veículo) foram sensibilizados através da injeção subcutânea no dorso (0.15 ml) de uma solução contendo 200 µg de OVA (grau III) adsorvida em 8 mg de hidróxido de alumínio, preparada em solução fisiológica. Os animais não sensibilizados receberam, em vez da OVA, igual volume de hidróxido de alumínio. Quatorze dias após a sensibilização, os animais receberam o desafio antigênico. Para isto, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) e submetidos a uma incisão no pescoço para a injeção intratraqueal de 0.4 ml solução fisiológica contendo OVA (2.5 mg/ml). As incisões foram suturadas imediatamente e os animais, após recuperados da anestesia, tiveram livre acesso à água e à comida. Ao fim deste procedimento, tivemos sempre 4 grupos experimentais; (1) Controle-Não sensibilizado; (2) Controle-Sensibilizado; (3) Capsaicina-Não sensibilizado e (4) Capsaicina-Sensibilizado. Utilizamos estes 4 grupos experimentais para a maioria dos protocolos experimentais descritos abaixo.

2.3.2 Lavado broncoalveolar

Os lavados broncoalveolares (LBA) foram realizados 6 h após o desafio antigênico com OVA. Os animais foram anestesiados com halotano, a cavidade

peritoneal exposta e a artéria abdominal transeccionada para exsanguinação. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de solução PBS à temperatura ambiente. O PBS foi injetado e cuidadosamente aspirado. O material recolhido foi centrifugado à 1000 g, por 10 minutos à 20°C e o botão celular ressuspenso em 2 ml PBS. Os leucócitos foram contados em contador automático de células (CELL-DYN, 1600, EUA). A análise diferencial dos leucócitos foi determinada em microscópio óptico (lente de imersão) pela contagem, de no mínimo, 200 células em esfregaço preparado em citocentrífuga e corado com May-Grunwald-Giemsa. Os dados foram expressos como número de células ($\times 10^6$) por LBA.

2.4 Contagem de células da medula óssea e do sangue

Os animais foram anestesiados com halotano e amostras do sangue periférico coletadas através da artéria abdominal em tubos contendo citrato de sódio 3,2%. Para determinação do número de células da medula, os animais foram sacrificados e o fêmur direito removido; em seguida, a medula óssea foi suavemente eluída com 2,5 ml de PBS contendo heparina (20 UI/ml). A contagem total dos leucócitos foi realizada como descrito acima. A contagem diferencial do sangue foi realizada em lâminas de esfregaço e a da medula em lâminas preparadas em citocentrífuga. A coloração, em ambos os casos, foi feita com corante de Leishman.

Os valores da contagem do sangue foram expressos como número de células ($\times 10^6$) por ml. Os dados da medula foram representados como número de células ($\times 10^6$) por fêmur. Foram consideradas formas imaturas do neutrófilo os mieloblastos, promielócitos e mielócitos; e maduras, os metamielócitos, bastonetes e segmentados.

2.5 Obtenção de neutrófilos do sangue de rato

Para cada experimento, coleta-se sangue de cinco ratos (controles ou tratados com capsaicina) através da artéria abdominal, na presença de citrato de sódio (3,2 %). O sangue foi então submetido à sedimentação com Dextran à 6%, seguido por um sistema gradiente Ficoll-Hypaque (1,077 g/L), de acordo com BHALLA et al (1993). O sobrenadante obtido após a sedimentação foi centrifugado à 470 g, ressuspensão em Eagle's minimum essential medium (MEM, pH 7.2) e colocado sobre o Ficoll após o qual foi centrifugado à 400 g por 30 minutos para a separação dos granulócitos e das células mononucleares. Foi realizada a lise hipotônica das células vermelhas e, em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em MEM contendo 0,1% de OVA. A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas em May-Grüwalds. Através desta técnica obtivemos população homogênea (> 85%). A viabilidade, determinada pelo método de exclusão com o corante Azul de Trypan (0,1%), foi superior a 90%.

2.6 Quimiotaxia de neutrófilos periféricos in vitro

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 96 poços (RICHARDS e MCCULLOUGH, 1984). Aliquotas de 25 µl da suspensão de neutrófilos ($8,0 \times 10^6$ células/ml) foram colocadas no compartimento superior da câmara e 29 µl dos estímulos quimiotáticos (fMLP, PAF ou substância P) colocados no compartimento inferior. Os dois compartimentos foram separados com filtro de policarbonato com poro de 5 µm (Chemo Tx ®). A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se os agentes quimiotáticos pelo mesmo volume de MEM. Após incubação por 2 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, os filtros foram removidos, as placas centrifugadas por 5 min a 1250 g e o conteúdo dos poços ressuspensos e transferidos para outra placa, que foi então congelada por uma noite e destinada à dosagem do conteúdo de mieloperoxidase (MPO) (BRADLEY et al., 1982).

As placas foram descongeladas e mantidas em banho de gelo. A seguir, cada poço recebeu 0.5% (w/v) de hexadeciltrimetil amônio bromida (HTBA) em 50 mM de tampão fosfato potássio, pH 6.0.

O conteúdo dos poços foi ressuspensão, e 10 µl de cada amostra foram transferidos para outra placa adicionou-se 200 µl da solução de o-dianisidina (0.167 mg/ml o-dianisidina dihidrocloride, 0.0005% peróxido de hidrogênio em 50 mM de tampão fosfato, pH 6.0) imediatamente antes da leitura da mudança da absorbância em 460 nm, por 5 minutos, em leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A curva padrão foi construída com os neutrófilos obtidos de

cada grupo experimental (controle e capsaicina), sendo que, 2×10^6 neutrófilos/ml foi usado para a obtenção do maior ponto da curva. A quantidade de células migradas foi calculada comparando-se as absorbâncias desconhecidas com a curva padrão. Em cada experimento, os ensaios foram sempre realizados em triplicata.

2.7 Adesão de neutrófilos periféricos *in vitro*

Placas com 96 poços foram incubadas com 60 μ l de fibronectina humana (20 μ g/ml em PBS) ou soro de rato a 10% em PBS e mantidas por uma noite a 4°C. Os poços foram lavados duas vezes com PBS antes de serem incubados com BSA 0.1% (w/v) por 60 minutos a 37°C. A seguir, estes poços foram lavados novamente com PBS antes de as placas serem colocadas para secar em estufa.

Alíquotas de 50 μ l de neutrófilos foram incubados na presença do fMLP ou PMA por 30 minutos à 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, as células não aderidas foram removidas e descartadas, e as células aderidas foram lavadas com PBS. Em outro protocolo experimental, os neutrófilos isolados do sangue foram incubados com os anticorpos HP2/1 (anti-VLA-4, 20 μ g/ml), ICRF44 (anti-Mac-1, 1:12) ou com o monoclonal não específico (IgG; controle, 20 μ g/ml).

A placa então foi congelada por uma noite e, posteriormente, destinada à dosagem do conteúdo de MPO (BRADLEY et al., 1982), conforme a técnica descrita no item acima. A aderência foi calculada comparando-se as absorbâncias desconhecidas com a curva padrão.

2.8 Tratamento crônico com o composto 48/80

Os animais foram pré-tratados com o composto 48/80, por via intraperitoneal, durante 4 dias consecutivos, duas vezes ao dia, da seguinte forma: 0.6 mg/Kg no primeiro dia, 1 mg/Kg no segundo e terceiro dia e 2 mg/Kg no quarto dia (Di Rosa et al, 1971, modificada). Os animais do grupo controle receberam pela mesma via, salina 0.9%. No quinto dia, todos os animais, previamente sensibilizados, foram desafiados com OVA. Após 6 h, os animais foram sacrificados e o LBA realizado, conforme descrito acima.

2.9 Obtenção dos macrófagos alveolares

Os animais controle e pré-tratados com capsaicina, não sensibilizados ou sensibilizados com OVA, foram anestesiados com halotano. A cavidade peritoneal foi exposta e a artéria abdominal transeccionada para exsanguinação. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de salina 0,9% contendo heparina. A salina foi injetada e cuidadosamente aspirada. O material recolhido foi centrifugado à 470 g, por 10 minutos à 20°C e o resíduo celular ressuspenso em 2 ml de RPMI. A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas em May-Grüwalds. Através desta técnica obtivemos população homogênea de macrófagos (> 90%). Os macrófagos (2×10^6 células/ml/por poço) foram transferidos para uma placa de cultura e mantidos por 2 horas para aderência em estufa à 37°C e 5%

CO₂. Após este período, as placas foram lavadas com salina 0.9%, e os macrófagos incubados com LPS (3 µg/ml) ou OVA (10 µg/ml) por 6 horas. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -70°C para dosagem de nitrito e TNF-α.

2.10 Determinação da concentração de nitrito, ânion superóxido e TNF-α no sobrenadante de macrófagos alveolares

A concentração de nitrito foi determinada através do método de Griess. Nas amostras de sobrenadante dos macrófagos (100 µl) foi adicionado 100 µl do reagente de Griess. Após 15 minutos, foi realizada a leitura das absorbâncias (540 nm). O cálculo foi feito comparando-se as absorbâncias das amostras desconhecidas com a curva padrão (nitrito de sódio).

Para determinação da concentração de ânion superóxido, amostras de 2×10^6 células/ml de macrófagos obtidos de animais previamente sensibilizados, em Hanks (pH 7.4), foram incubadas na presença de ferricitocromo c (80 µM) e estimuladas com PMA (10 nM; ativador de proteína quinase C), zimosan (100 partículas/célula; estímulo particulado de fagocitose) ou OVA (10 µg/ml). Algumas amostras foram tratadas com superóxido dismutase (120 U/ml), pois esta enzima inibe a formação de ferrocitocromo c, atuando como controle negativo dos experimentos. Após 120 minutos à 37°C, as absorbâncias (550 nm) foram registradas e convertidas para nmols de ânion superóxido gerados, considerando

para o ferrocitocromo c um coeficiente de extinção molar de $29500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CONDINO-NETO et al., 1993).

A concentração do TNF- α foi determinada utilizando kit comercial ELISA (BD Biosciences, Pharmingen, EUA).

2.11 Determinação da concentração do TNF- α , IL-6, IL-10, PGE₂ e LTB₄ no lavado broncoalveolar.

Os animais foram sacrificados 6 h após a injeção intratraqueal de OVA e as amostras de LBA (10 ml) foram coletadas em PBS contendo heparina e foi acrescentado um coquetel de inibidores de proteases contendo AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatin A e E-64. O material foi congelado com nitrogênio líquido e armazenado em freezer à - 80° C. Para o ensaio, foram utilizados kits comerciais para dosagens de IL-6, IL-10, PGE₂, LTB₄ (R&D Systems, EUA) e TNF- α (BD Biosciences, Pharmingen, EUA).

2.12 Determinação da concentração da substância P no lavado broncoalveolar e na medula óssea

Os animais foram sacrificados e as amostras de LBA e de sobrenadante da medula óssea foram coletadas em PBS contendo heparina e foi acrescentado um coquetel de inibidores de proteases. O material foi congelado com nitrogênio

líquido e armazenado em freezer à - 80° C. Para o ensaio, utilizou-se “kit comercial” para dosagens de substância P de rato (R&D Systems, EUA).

2.13 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR)

Os animais do grupo controle e capsaicina foram sacrificados e o fêmur removido; em seguida, a medula óssea foi suavemente eluída com 2,5 ml de PBS contendo heparina (20 UI/ml). O pulmão e o cérebro foram removidos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -70°C até o processamento das amostras. A presença de RNAm para as diferentes isoformas das CINCs (CINC-1, CINC-2 e CINC-3), iNOS e COX-2 no tecido pulmonar, assim como de PPT-I, receptor NK₁ e receptor NK₂ na medula óssea foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), como descrito abaixo.

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído usando-se o reagente Trizol (5 ml/g de amostra, GIBCO BRL, EUA). As amostras foram homogeneizadas em Trizol, e após 5 min, foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (1:24). Após agitação vigorosa para a extração dos lipídios, os tubos foram deixados 10 min em repouso e centrifugados à 2000 g (45 min à 4°C). A fase aquosa (sobrenadante) foi separada (600 µl) e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (13.000 g, 10

min à 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e o pellet de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 75%. Após centrifugação (13000 g, 6 min à 4°C), os sobrenadantes foram desprezados, e os tubos foram invertidos e apoiados sobre papel de filtro para eliminar restos de etanol.

Posteriormente, o RNA foi dissolvido com 50 µl de água tratada com DEPC. Alíquotas desta solução foram diluídas 1:1000, as absorbâncias medidas a 260 nm e as concentrações de RNA total foram calculadas considerando-se a relação: 1 AU = 40 µg/ml. A integridade do RNA isolado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (0.8 % em TAE contendo 0.5 µg/ml de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA) e as bandas reveladas sob luz ultravioleta.

Transcrição do cDNA

Vinte e três µl de H₂O (tratada com DEPC), 5 µl de oligo dT (GIBCO BRL, EUA) e 15 µg de RNA (amostra) foram cuidadosamente misturados. A mistura foi aquecida à 70°C durante 10 min e deixada posteriormente à temperatura ambiente durante 10 min. Na seguinte ordem foram adicionados 10 µl de tampão de reação (5X first strand buffer), 2.5 µl de dNTP (10 mM, Amersham, Inglaterra), 5 µl de DTT (0.1 M) e 1 µl de inibidor de RNases (RNA guard, Amersham, Inglaterra). A mistura foi aquecida à 42°C durante 2 min. Posteriormente, adicionou-se 1 µl da enzima RT (transcriptase reversa – Superscript II, GIBCO BRL, EUA) e novamente aquecida à 42°C por 1 h.

As amostras foram aquecidas à 70°C durante 15 min, e à 37°C por 2 min. Adicionou-se 1 µl de RNase H (com a finalidade de se eliminar a RNase do híbrido) e aqueceu-se à 37°C por 30 min. As amostras foram mantidas a -20°C até serem submetidas ao PCR.

PCR

Os *primers* foram diluídos a uma concentração de 500 pmoles/µl (solução estoque) em H₂O Milli-Q autoclavada. As seqüências dos *primers* utilizados são mostradas no quadro a seguir:

Primer	Seqüências (5' → 3')
CINC-1 (298 bp)	TGGAGAAAGAAGATAGATTGC TTCTTCCCGCTCAACACCTTC
CINC-2 (309 bp)	CACTGAAGAGTTACGATGTCA TGAGGCTCCATAAATGAAAGA
CINC-3 (300 bp)	CCTGGAAAGGAAGAACATGGG ACCTCCCAACTACATAAGTAA
iNOS (651 bp)	ACA ACA GGA ACC TAC CAG CTC A GAT GTT GTA GCG CTG TGT GTC A
COX-2 (1158 bp)	AGA CAG ATC ATA AGC GAG GAC C CAC TTG CAT TGA TGG TGG CTG T
PPT-I (130 bp)	TTT GCA GAG GAA ATC GG TGT CTT CCT CAG TTG GTG TC
NK₁ (380 bp)	CAT CAA CCC AGA TCT CTA CC GCT GGA GCT TTC TGT CAT GGA
NK2 (491 bp)	CAT CAC TGT GGA CGA GGG G TGT CTT CCT CAG TTG GTG TC
β-actina (300 bp)	TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT
GAPDH (400 bp)	GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 μ l que contém 5 μ l de cDNA (amostra), 5 μ l de tampão para PCR (10X), 1,5 μ l de $MgCl_2$ (1,5 mM), 1 μ l de dNTPs (0.2 mM), 1-5 μ l dos primers, 0.5 μ l do primer de GAPDH 5'/ β -actina 5', 0.5 μ l do primer de GAPDH 3'/ β -actina 5' (3 μ M), q.s.p. 50 μ l de H_2O para PCR e 0.5 μ l de Taq polimerase (2 U).

Foram 23 ciclos de desnaturação (95°C/1 min), anelamento (56°C/2 min) e extensão (72°C/3min) para os *primers* da CINC-1 e CINC-2, e 30 ciclos para os *primers* da CINC-3. Para os *primers* da COX-2 foram 33 ciclos de desnaturação (95°C/1 min), anelamento (56°C/2 min) e extensão (72°C/1min). Para os *primers* da iNOS foram 30 ciclos de desnaturação (94° C/ 1 min), anelamento (65° C/45 s) e extensão (72° C/1.5 min). Foram 35 ciclos de desnaturação (95°C/30s min), anelamento (56°C/30 s) e extensão (72°C/30 s) para os *primers* da PPT-I, NK₁ e NK₂.

Separação dos produtos de PCR

Alíquotas dos produtos da reação de PCR (aproximadamente 20 μ l), previamente normalizadas para darem quantidades equivalentes do controle de GAPDH em todas as amostras, foram submetidas a um gel de agarose 1,5% contendo 0.5 μ g/ml de brometo de etídio. Os géis foram visualizados sob luz UV e as imagens foram capturadas usando um aparelho Chemilmager (Alpha Scientific). A intensidade das bandas marcada com brometo de etídio foi

determinada usando-se um software desse mesmo aparelho específico para determinar o nível da expressão relativa de cada uma das isoformas.

2.14 Análise Estatística

Os dados estão expressos como médias $\pm$ EPM. As diferenças entre as médias foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelos testes pelo teste de Bonferroni ou Student-Neuman-Keuls, de acordo com programa estatístico INSTAT (Versão 3.0; EUA). Quando apropriado, realizou-se também o teste *t* de Student não-pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Determinação da eficácia do tratamento de ratos neonatos com capsaicina

Após 60 dias do tratamento dos neonatos com capsaicina, a maioria dos animais apresentou lesões generalizadas na pele, principalmente ao redor da região oral, incluindo focinho e boca, e perda de pêlos em certas áreas do corpo. Alguns não apresentaram erupções na face, porém, apresentaram ulcerações no abdômen.

A eficácia do método utilizado foi avaliada quantificando-se a substância P no LBA dos animais adultos. Observamos que a quantidade de substância P nos animais pré-tratados com capsaicina é significativamente menor ($p < 0,05$) do que aquela encontrada nos animais do grupo controle ($2,3 \pm 0,5$ e $9,3 \pm 1,2$ pg/ml, respectivamente, $n=6$).

3.2. População de leucócitos totais e diferenciais no LBA após desafio pulmonar com OVA

Os dados dos leucócitos totais do LBA estão apresentados na figura 2A. Nesta figura, representamos um aumento significativo no número de leucócitos totais nos animais que foram sensibilizados e desafiados com OVA, tanto no grupo controle quanto no grupo capsaicina, quando comparados com seus respectivos grupos não-sensibilizados. No entanto, este aumento foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais do grupo capsaicina em relação ao grupo controle. Entre os grupos de animais não sensibilizados, não notamos diferenças significantes.

Na figura 2B podemos observar que o número de neutrófilos no LBA dos animais sensibilizados e desafiados com OVA aumentou significativamente em relação ao grupo de animais não sensibilizados. Porém, uma quantidade significativamente maior destas células foi encontrada no grupo de animais pré-tratados com capsaicina. Entre os grupos de animais não-sensibilizados, não encontramos diferenças significantes.

O número de células mononucleares no LBA não foi diferente nos quatros grupos investigados (Figura 2C).

Em relação aos eosinófilos, observamos que a quantidade destas células no LBA em 6h é muito pequena, como esperado. Porém, notamos um aumento significativo no grupo capsaicina (sensibilizado/desafiado) quando comparado com o controle (Figura 2D).

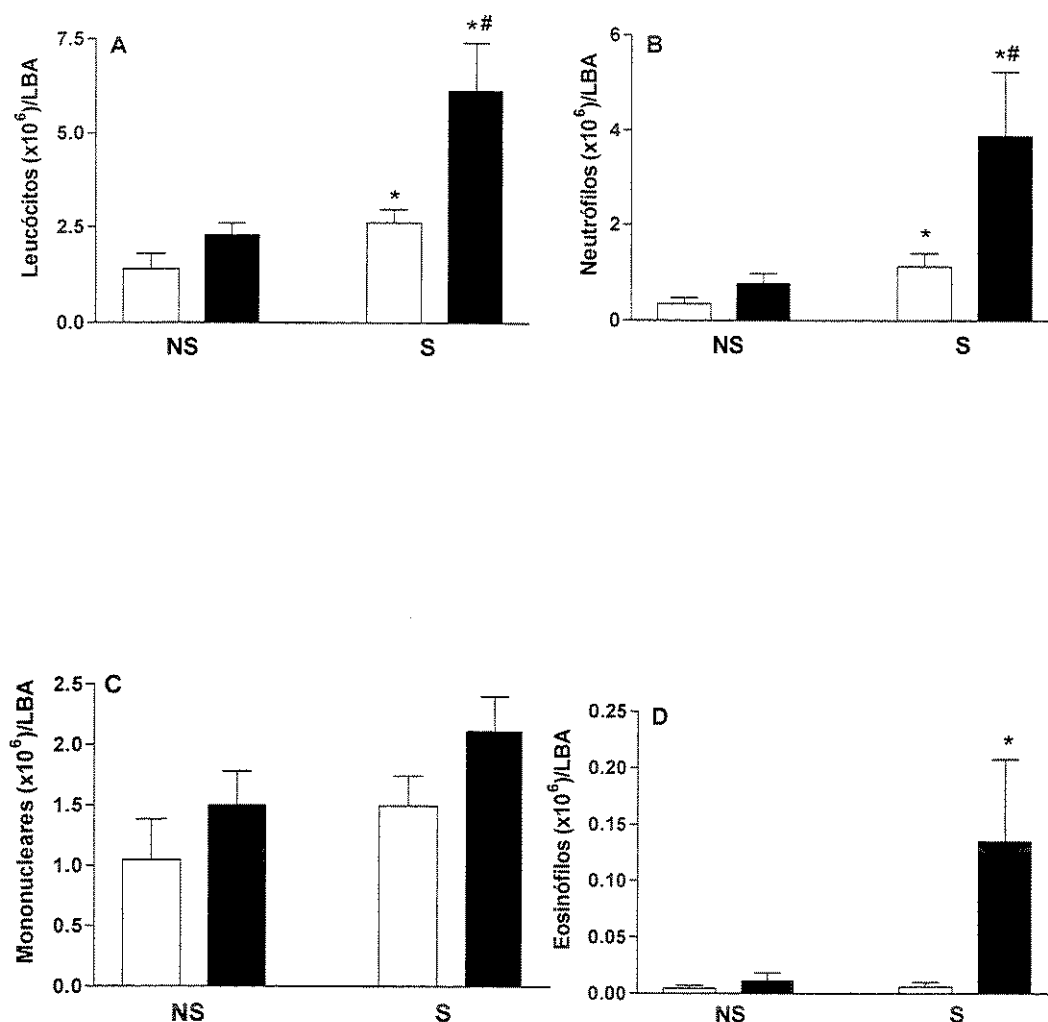


Figura 2 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e eosinófilos (Painel D) no LBA de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias), sensibilizados e desafiados com OVA. O número de leucócitos foi avaliado 6 horas após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao NS; # $P < 0,05$ comparado com o grupo controle S.

3.3 População de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea após desafio com OVA

A figura 3 mostra que o número de leucócitos totais, neutrófilos imaturos e neutrófilos maduros nos animais não-sensibilizados está aumentado no grupo de animais tratados com capsaicina quando comparamos com o seu respectivo grupo controle. O desafio intratraqueal com OVA não alterou o número total de leucócitos na medula óssea nos animais do grupo controle e do grupo capsaicina, em relação aos respectivos animais não-sensibilizados. No entanto, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de neutrófilos imaturos nos animais sensibilizados em relação aos respectivos animais não-sensibilizados. Este aumento foi semelhante para os grupos controle e capsaicina (Figura 3B).

Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de eosinófilos (Figura 4A) e células mononucleares (Figura 4B).

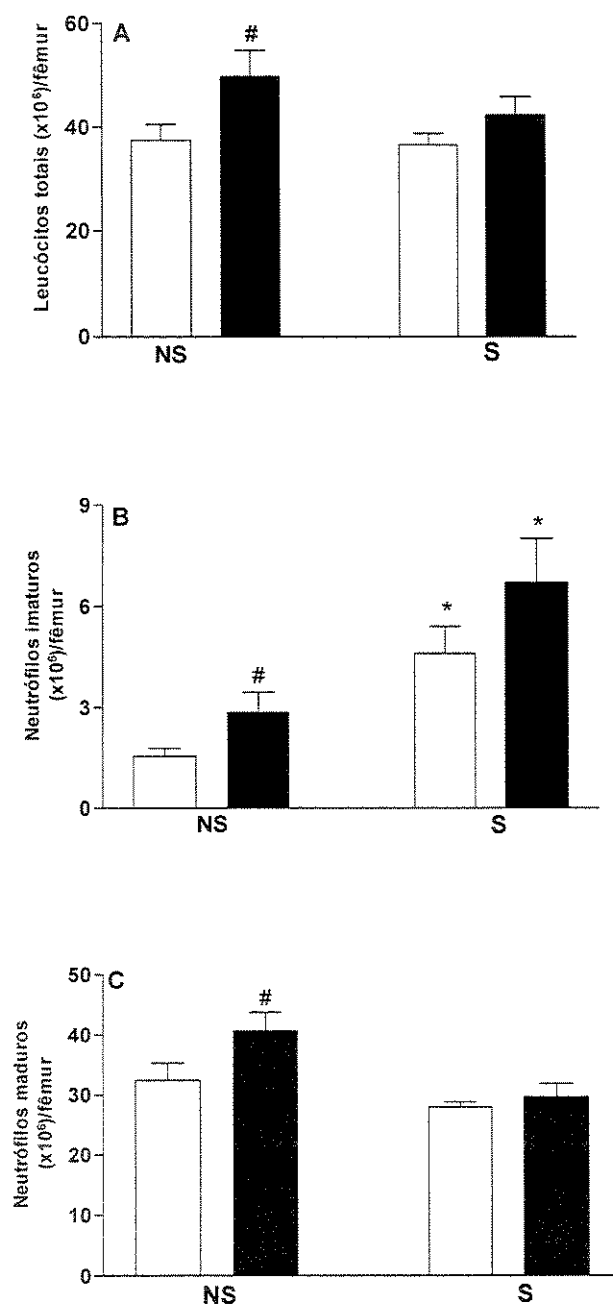


Figura 3 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos imaturos (B) e neutrófilos maduros da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). O número de leucócitos foi avaliado 6 horas após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao NS; [#] $P < 0,05$ comparado com o grupo controle NS.

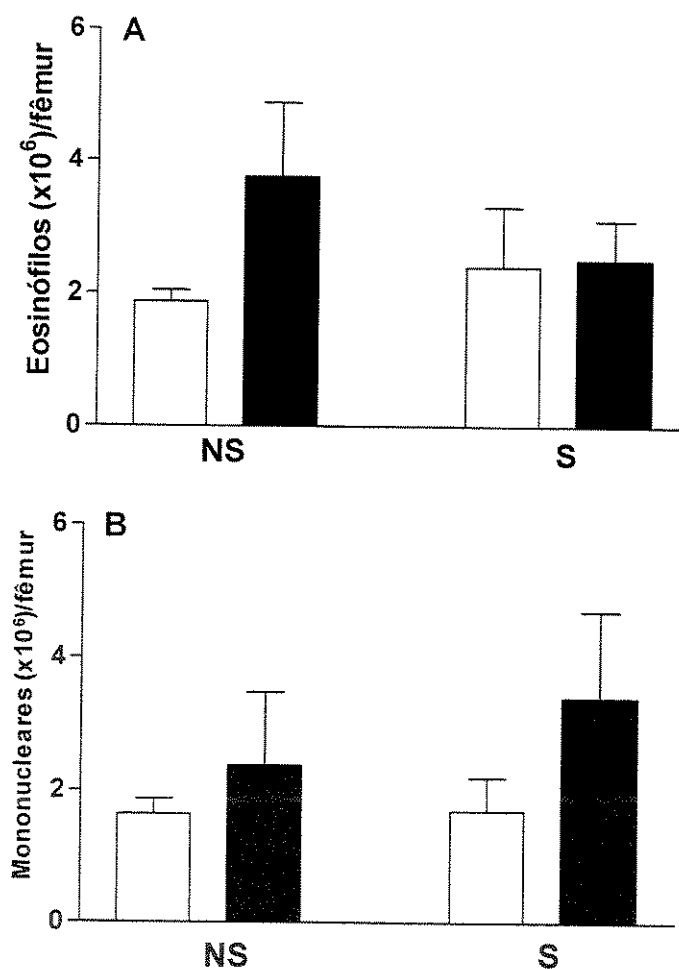


Figura 4 – Número de eosinófilos (A) e células mononucleares (B) da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). O número de leucócitos foi avaliado 6 horas após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais.

3.4 População de leucócitos totais e diferenciais no sangue periférico após desafio com OVA

O número de leucócitos totais no sangue de ratos sensibilizados diminuiu significativamente em relação aos respectivos animais não-sensibilizados (Figura 5A). Entretanto, no grupo de ratos pré-tratados com capsaicina, a redução foi significativamente maior do que a do grupo controle.

O número de neutrófilos reduziu significativamente ($p < 0,05$) no grupo de animais tratados com capsaicina e desafiados com OVA, quando comparado com o seu respectivo grupo não-sensibilizado ou com o grupo controle sensibilizado (Figura 5B).

Observamos também diminuição significativa no número de células mononucleares no grupo de animais sensibilizados (controle e capsaicina) em relação aos animais não-sensibilizados; porém, esta redução é maior no sangue periférico dos animais tratados com capsaicina (Figura 5C).

O número de eosinófilos não foi alterado de modo significativo nos grupos investigados (Figura 5D).

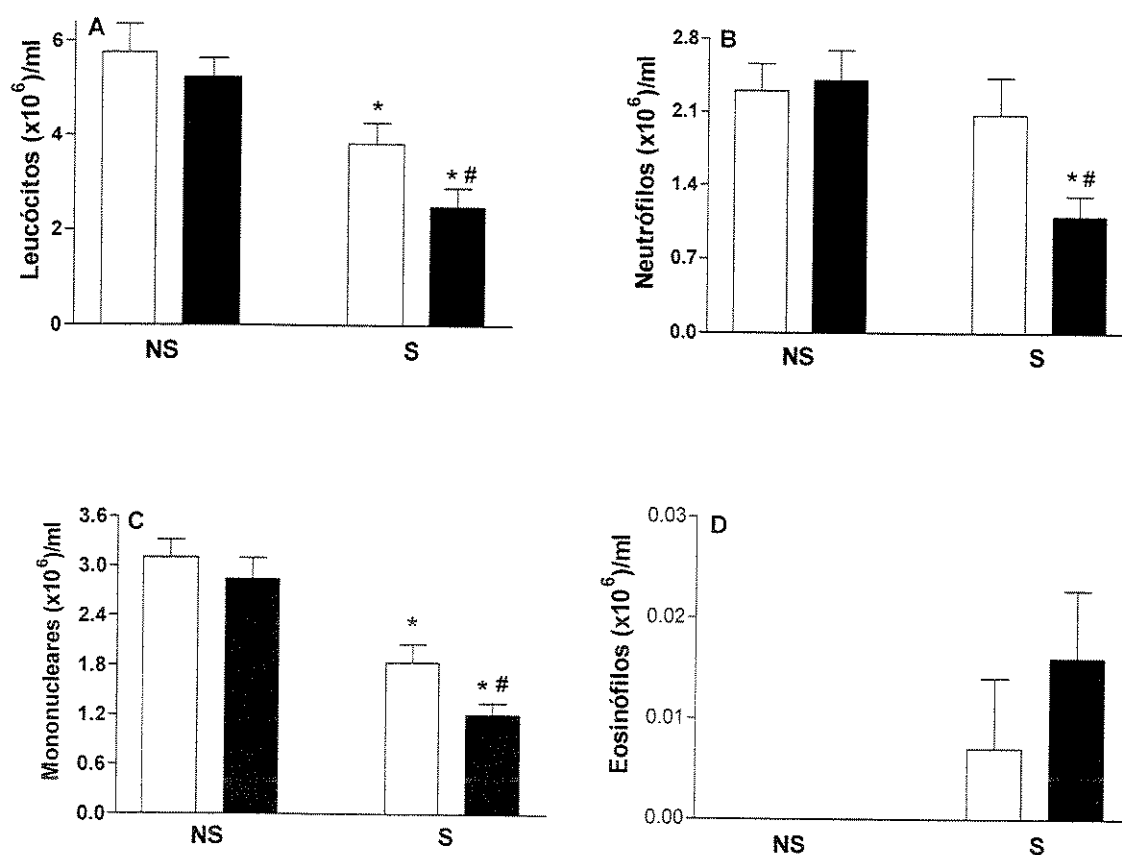


Figura 5 – Número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e eosinófilos (D) no sangue periférico de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). O número de leucócitos foi avaliado 6 horas após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais. # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle S; * $P < 0,05$ comparado com os respectivos grupos NS.

3.5 Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* induzida pelo fMLP, substância P e PAF

Procuramos investigar se neutrófilos periféricos isolados de ratos tratados com capsaicina encontram-se pré-ativados, produzindo resposta maior frente a diferentes estímulos quimiotáticos.

Fizemos inicialmente, curvas concentração-resposta ao fMLP (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M), PAF (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M) e substância P ($1,25 \times 10^{-5}$ - 5×10^{-5} M) em neutrófilos de ratos *naïve*. A partir destes experimentos, selecionamos as concentrações de 1×10^{-5} M de fMLP, 1×10^{-7} M de PAF e 5×10^{-5} M de substância P, por produzirem respostas quimiotáticas sub-máximas.

A tabela 1 mostra que a resposta quimiotática dos neutrófilos induzidas pelo fMLP e PAF não diferiu estatisticamente nos quatros grupos estudados. De modo similar, a quimiotaxia induzida pela substância P não diferiu entre os grupos controle e capsaicina.

Tabela 1 – Quimiotaxia *in vitro* induzida pelo fMLP (1×10^{-5} M), substância P (5×10^{-5} M) e PAF (1×10^{-7} M) em neutrófilos sangüíneos obtidos de animais controle ou tratados com capsaicina (CPS), não-sensibilizados e sensibilizados com OVA.

	Neutrófilos ($\times 10^5/\text{ml}$)			
	Não-sensibilizado		OVA-sensibilizado	
	Controle	CPS	Controle	CPS
MEM	$4,2 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$
fMLP	$13,1 \pm 2,7^*$	$13,9 \pm 1,0^*$	$9,9 \pm 1,2^*$	$11,6 \pm 1,6^*$
PAF	$18,6 \pm 1,8^*$	$17,5 \pm 4,3^*$	$11,3 \pm 1,9^*$	$12,3 \pm 4,1^*$
Substância P	$17,5 \pm 1,2^*$	$18,9 \pm 1,1^*$	ND	ND

Os neutrófilos foram incubados com cada agente quimiotático por 2 h (37 °C, 5% CO₂). Cada experimento foi realizado com “pool” de sangue de 5 ratos e cada ponto feito em triplicata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=5).

*P<0,05, quando comparada à migração espontânea (MEM).

3.6 Adesão *in vitro* de neutrófilos induzida pelo fMLP e PMA

Inicialmente, estudamos a adesão espontânea dos neutrófilos em placas recobertas com fibronectina ou soro. Verificamos que a adesão espontânea não diferiu de modo significativo entre os grupos controle e capsaicina (Figura 6). O tratamento dos neutrófilos com os anticorpos anti-VLA-4 ou anti-Mac-1 inibiu significativamente ($P < 0,05$) a adesão espontânea dessas células à fibronectina ou soro. Por outro lado, o anticorpo monoclonal não-específico (IgG) não apresentou efeito significativo sobre a adesão espontânea (Figura 6).

A incubação dos neutrófilos com fMLP (1×10^{-7} M) ou PMA (1×10^{-6} M) promoveu aumento significativo da adesão, tanto em placas revestidas com soro (Figura 7), como em placas revestidas com fibronectina (Figura 8). Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos controle e capsaicina.

O aumento da adesão dos neutrófilos (grupo controle ou capsaicina) ao soro ou fibronectina, observado após incubação destas células com fMLP (1×10^{-7} M) foi revertido quando as células foram co-incubadas com os anticorpos anti-VLA-4 ou anti-Mac-1 (Figura 7A e 8A).

Resposta similar foi obtida quando utilizamos o PMA (1×10^{-6} M) para induzir a adesão. Como mostrado no painel B das figuras 7 e 8, a co-incubação dos neutrófilos com os anticorpos anti-Mac-1 ou anti-VLA-4, na presença do PMA, foi capaz de reverter o aumento da adesão dessas células ao soro ou fibronectina.

O tratamento dessas células com o anticorpo controle (anticorpo monoclonal não específico) não modificou a adesão induzida pelo fMLP ou pelo

PMA (Figuras 7 e 8). No conjunto, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos controle e capsaicina.

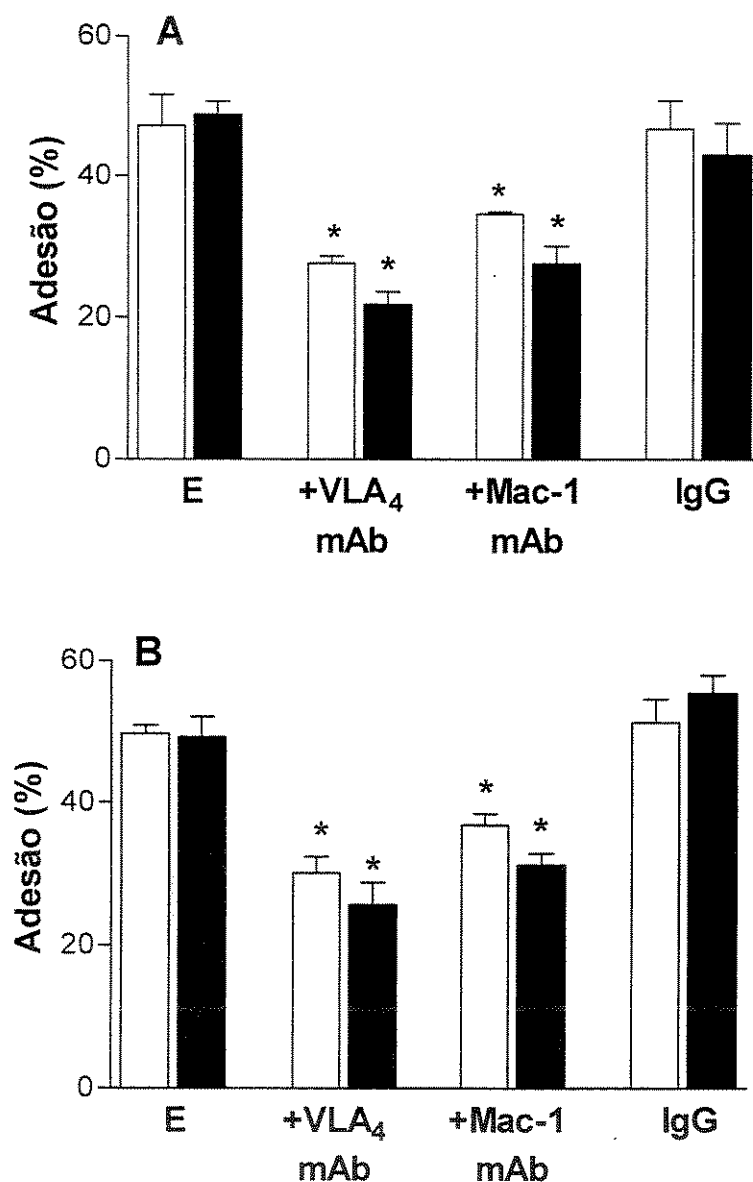


Figura 6 - Adesão espontânea de neutrófilos sanguíneos periféricos em placas recobertas com soro (A) ou fibronectina (B). Animais controles e pré-tratados com capsaicina estão representados pelas colunas vazias e cheias, respectivamente. A adesão foi determinada 30 minutos após a incubação com os anticorpos VLA-4 (20 μ g/ml), Mac-1 (1:12) e IgG (20 μ g/ml). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM da % de células aderidas (n=5). *P<0,05, quando comparada à células não tratadas com anticorpos (E).

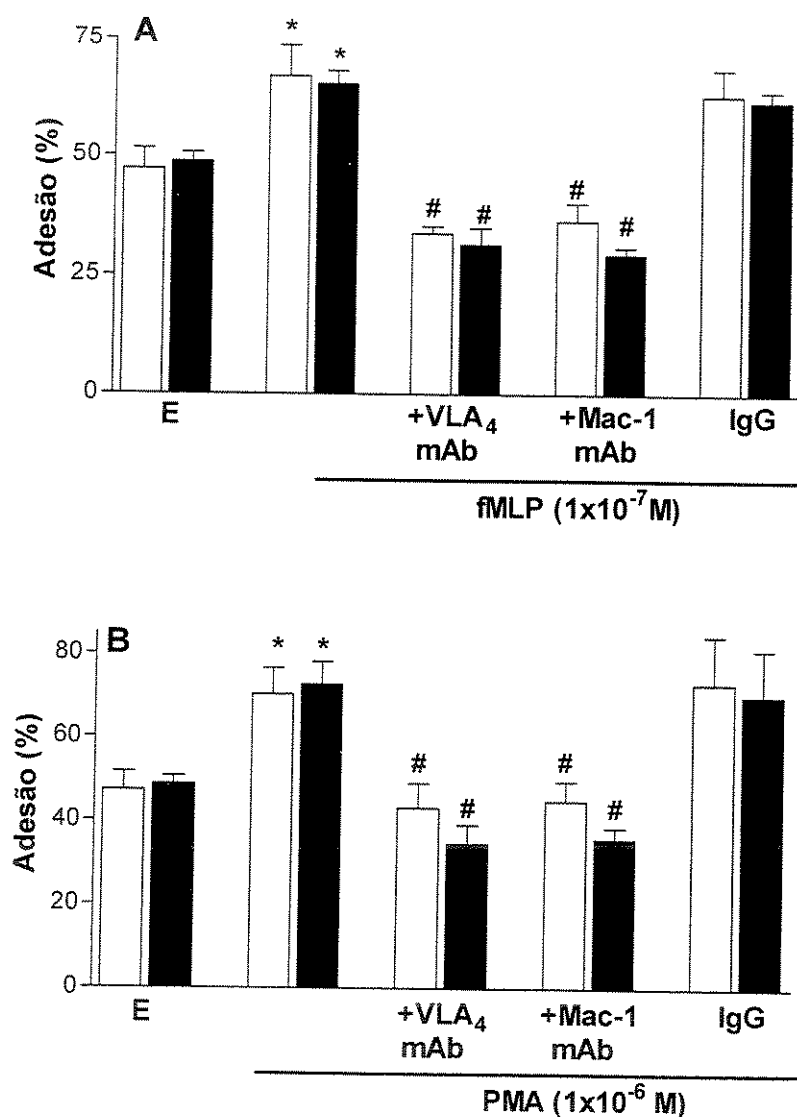


Figura 7 - Efeito dos anticorpos anti-VLA-4, anti-Mac-1 e IgG sobre a adesão de neutrófilos induzida pelo fMLP (A) ou PMA (B) em placas recobertas com soro de rato. Animais controles e tratados com capsaicina estão representados pelas colunas vazias e cheias, respectivamente. A adesão foi determinada 30 minutos após a incubação com fMLP (1×10^{-7} M) ou PMA (1×10^{-6} M) na presença dos anticorpos anti-VLA-4 (20 μ g/ml), anti-Mac-1 (1:12) ou anti-IgG (20 μ g/ml). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM da % de células aderidas (n=5). *P<0,05, quando comparada à adesão espontânea (E); #P<0,05 quando comparado à adesão induzida pelo fMLP ou PMA.

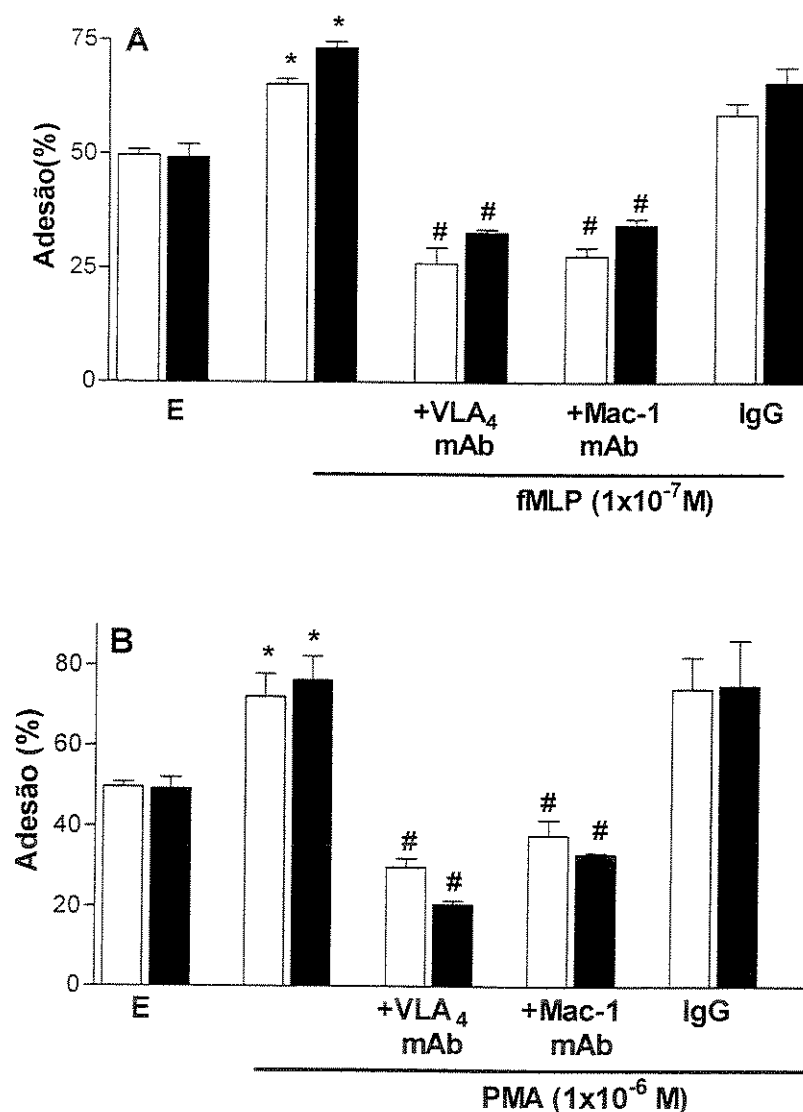


Figura 8 - Efeito dos anticorpos anti-VLA-4, anti-Mac-1 e IgG sobre a adesão de neutrófilos induzida pelo fMLP (A) ou PMA (B) em placas recobertas com fibronectina. Animais controles e tratados com capsaicina estão representados pelas colunas vazias e cheias, respectivamente. A adesão foi determinada 30 minutos após a incubação com fMLP (1×10^{-7} M) ou PMA (1×10^{-6} M) na presença dos anticorpos anti-VLA-4 (20 μ g/ml), anti-Mac-1 (1:12) ou anti-IgG (20 μ g/ml). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM da % de células aderidas (n=5). *P<0,05, quando comparada à adesão espontânea (E); #P<0,05 quando comparado à adesão induzida pelo fMLP ou PMA.

3.7 Expressão da COX-2 e iNOS no tecido pulmonar

A expressão do RNAm para COX-2 e iNOS foi realizada em pulmões de animais não sensibilizados e sensibilizados com OVA, após 6 h do desafio intratraqueal com este antígeno. Pulmões de ratos injetados endovenosamente com LPS (0,3 mg/kg) foram utilizados como controle positivo.

Os dados, ilustrados na figura 9, mostram que a expressão do RNAm para COX-2 e iNOS foi detectada nos pulmões dos animais controle e tratados com capsaicina. Porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre ambos os grupos. No grupo de ratos tratados com LPS, notamos aumento marcante ($p < 0,05$) da expressão de RNAm para COX-2 e iNOS, como esperado.

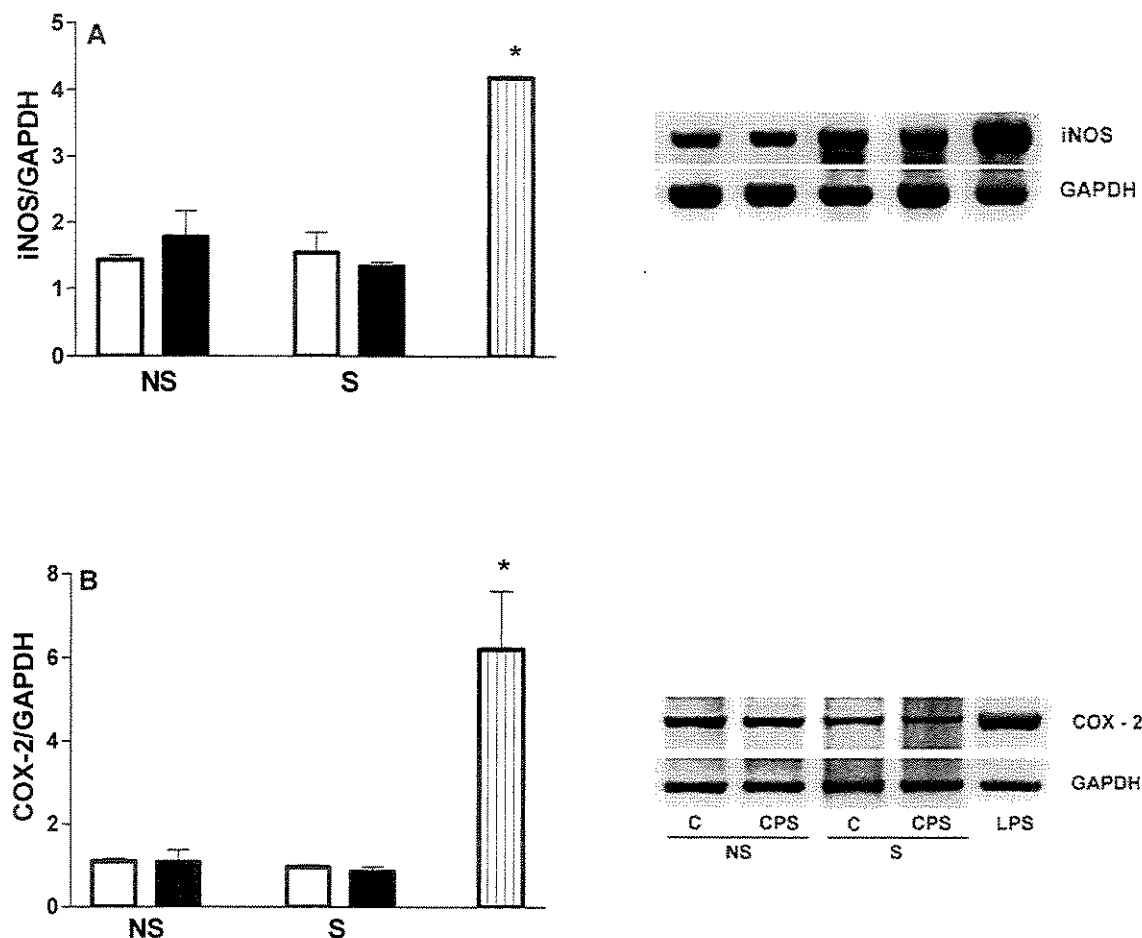


Figura 9 - Expressão da iNOS (A) e da COX-2 (B) no pulmão de animais controle (colunas vazias) e tratados com capsaicina (colunas cheias). O pulmão foi coletado 6 h após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados com OVA (S). O LPS (0,3 mg/kg), utilizado como controle positivo para iNOS e COX-2, foi administrado pela via endovenosa 6 h antes da retirada do pulmão. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com os grupos controle e capsaicina. O painel à direita mostra o RT-PCR representativo para iNOS (A) e COX-2 (B).

3.8 Expressão da CINC-1, CINC-2 e CINC-3 no tecido pulmonar

A expressão do RNAm para a CINC-1, CINC-2 e CINC-3 foi detectada nos pulmões dos animais controle e tratados com capsaicina, não-sensibilizados e sensibilizados com OVA (Figura 10).

Para a CINC-1, não observamos diferença significativa entre os grupos controle e capsaicina, embora exista tendência clara de redução no grupo capsaicina-sensibilizados. Para a CINC-2, encontramos redução significativa ($P < 0,05$) na expressão desta quimiocina no tecido pulmonar dos animais tratados com capsaicina e sensibilizado. Por outro lado, a expressão da CINC-3 no pulmão dos animais tratados com capsaicina e sensibilizados aumentou significativamente em relação ao grupo controle. Entre os grupos de animais não-sensibilizados, não encontramos diferenças significativas para nenhuma das CINC.

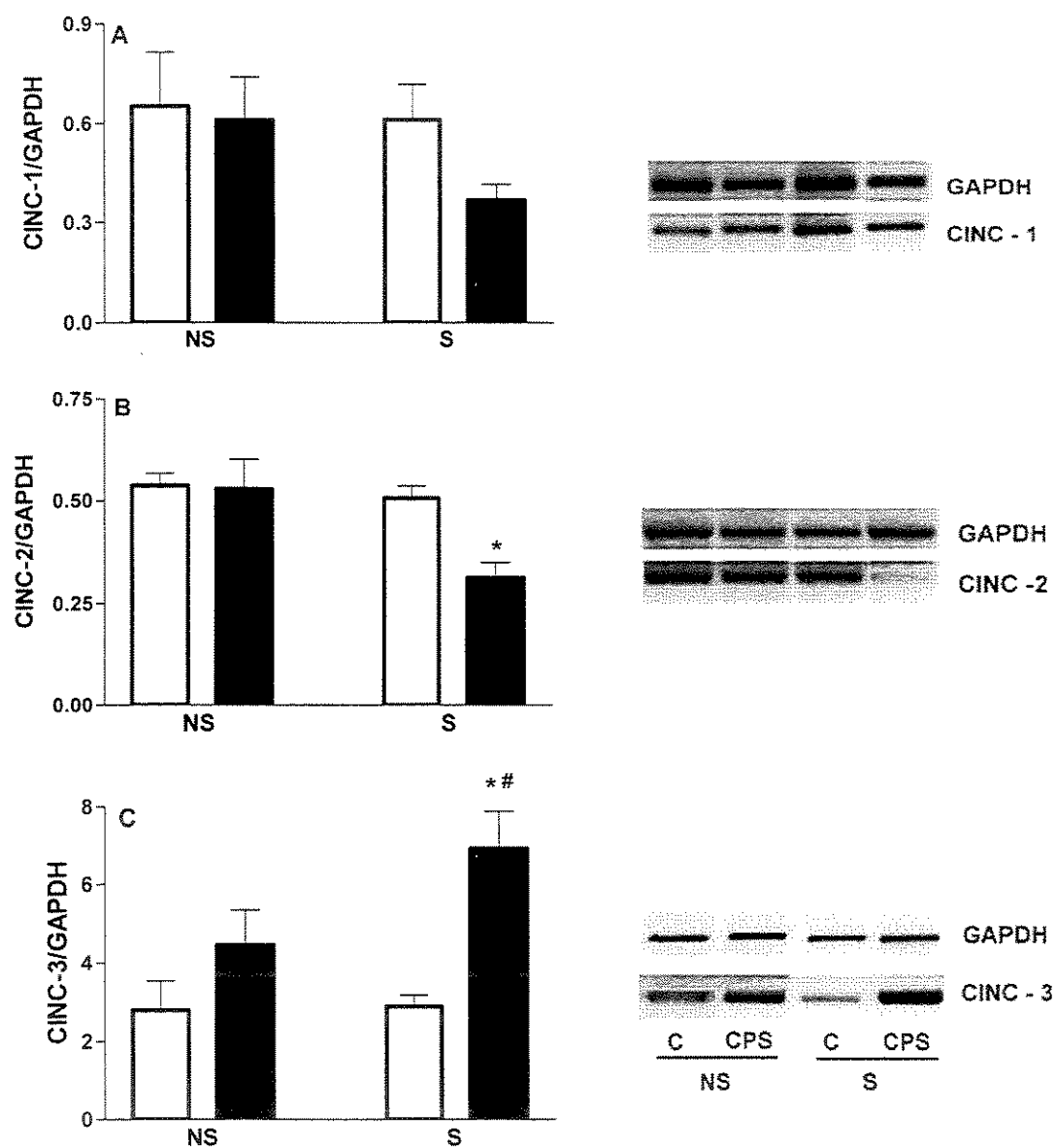


Figura 10 - Expressão da CINC-1 (A), CINC-2 (B) e CINC-3 (C) no pulmão de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). O pulmão foi coletado 6 h após a injeção intratraqueal de OVA em animais não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 4 animais. # $p < 0,05$ comparado com o grupo NS; * $p < 0,05$ comparado com o controle. O painel à direita ilustra o RT-PCR representativo para CINC-1(A), CINC-2 (B) e CINC-3 (C).

3.9 Níveis de TNF- α , IL-6, IL-10, PGE₂ e LTB₄ no LBA

Quantificamos as concentrações de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10) e de produtos do metabolismo do ácido araquidônico (PGE₂ e LTB₄) no LBA de ratos controle e pré-tratados com capsaicina, 6 h após a administração intratraqueal de OVA.

Nossos dados revelaram um aumento nos níveis de TNF- α no grupo de animais sensibilizados e desafiados com OVA em relação aos animais não-sensibilizados. No entanto, nos animais tratados com capsaicina, observamos quantidade significativamente maior ($P < 0,05$) desta citocina em relação ao grupo controle (Figura 11A).

Encontramos também aumento significativo nos níveis de IL-6 (Figura 11C) e de IL-10 (Figura 11D) no LBA no grupo tratado com capsaicina, sensibilizados e desafiados com OVA, em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferenças entre os animais não-sensibilizados de ambos os grupos.

Aumento significativo nos níveis do LTB₄ foi também observado no grupo de animais tratados com capsaicina, sensibilizados e desafiados com OVA, quando comparamos com o grupo controle (Figura 11B).

Nos grupos controle e capsaicina, respectivamente, não encontramos diferenças significativas nas concentrações de PGE₂ no LBA dos animais não-sensibilizados ($405,4 \pm 108,6$ e $397,5 \pm 54,3$ ng/LBA) e sensibilizados com ovalbumina ($503,8 \pm 90,2$ e $666 \pm 177,8$ ng/LBA), respectivamente.

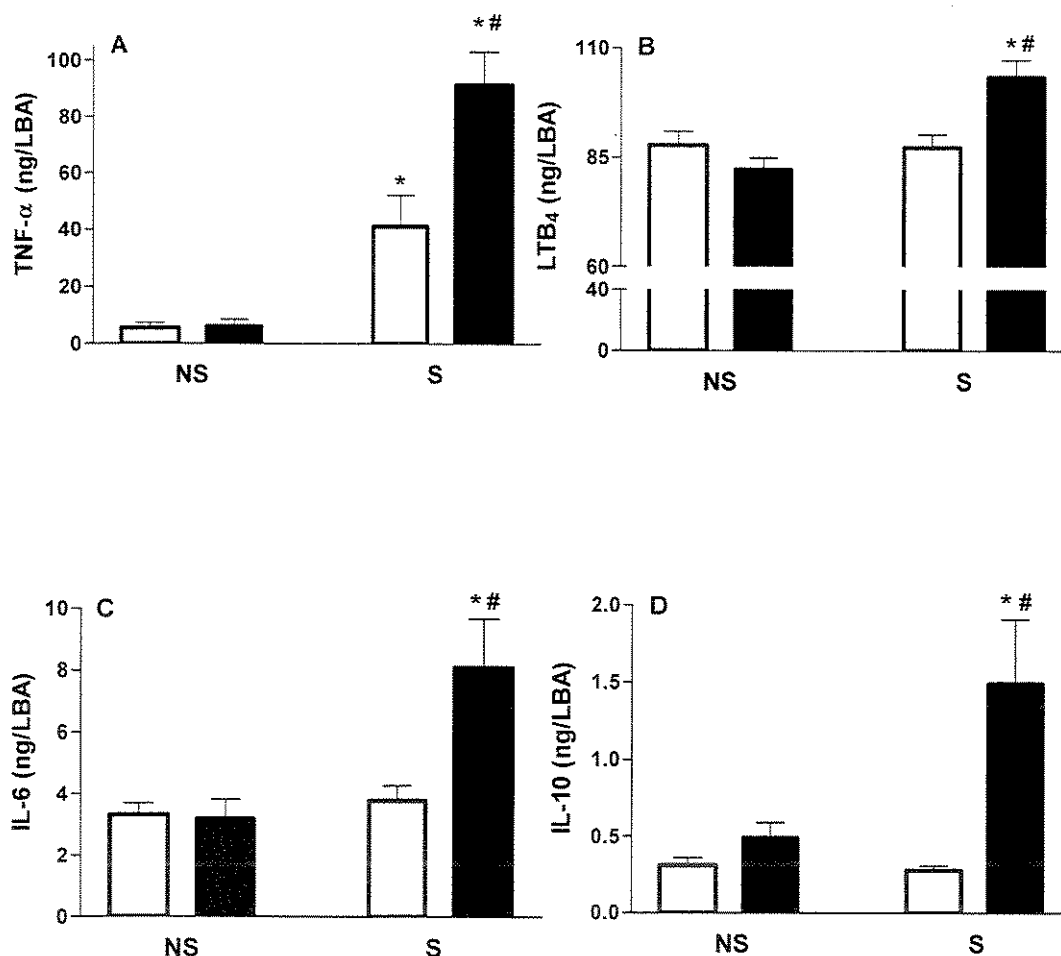


Figura 11 - Concentração de $TNF-\alpha$ (A), LTB_4 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) no LBA de animais controles (colunas vazias) e tratados com capsaicina (colunas cheias). Os níveis destas substâncias foram determinados em amostras de LBA 6 h após a administração intratraqueal de OVA, em animais não-sensibilizados (NS) e sensibilizados (S). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 6 animais. * $p < 0,05$ comparado com os grupos NS; # $p < 0,05$ comparado com o respectivo controle.

3.10 Macrófagos alveolares isolados de ratos controles e tratados com capsaicina: Liberação de ânion superóxido, nitrito e TNF- α

A incubação dos macrófagos alveolares com PMA (10 nM) ou zimosan (100 partículas/células) aumentou significativamente ($P < 0,05$) a produção de ânion superóxido (O_2^-), em ambos os grupos controle e capsaicina (Tabela 2). Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos.

Avaliamos também a capacidade destas células em produzir nitrito e TNF- α . Verificamos que a produção basal, para ambos os mediadores, não é diferente entre os grupos analisados. Quando incubamos estas células com LPS (3 μ g/ml, 6h) observamos um aumento significativo na produção de nitrito e de TNF- α (Tabela 2). Porém, não encontramos diferenças significativas entre os grupos controle e capsaicina.

A incubação dos macrófagos alveolares com OVA (10 μ g/ml) não elevou os níveis basais de ânion superóxido, nitrito e TNF- α (Tabela 2).

Tabela 2 – Produção de ânion superóxido (O_2^-), TNF- α e nitrito pelos macrófagos alveolares obtidos de animais do grupo controle e tratados com capsaicina. Os macrófagos foram estimulados *in vitro* por 2 h com PMA (10 nM), zimosan (100 partículas/célula) ou OVA (10 μ g/ml) para a determinação da produção de O_2^- . Para determinação dos níveis de nitrito e TNF- α , os macrófagos foram estimulados com LPS (3 μ g/ml, 6 h) ou OVA (10 μ g/ml, 6 h).

		Controle	Capsaicina
O_2^- (nmol /10 ⁶ cels)	Basal	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
	PMA	7,0 $\pm$ 1,1*	7,5 $\pm$ 0,7*
	Zimosan	2,1 $\pm$ 0,3*	3,0 $\pm$ 0,4*
	OVA	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3
TNF- α (ng/ml)	Basal	3,4 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,6
	LPS	4,4 $\pm$ 0,2*	4,5 $\pm$ 0,3*
	OVA	2,9 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,6
Nitrito (μ M)	Basal	6,6 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 1,8
	LPS	21,5 $\pm$ 1,6*	19,6 $\pm$ 0,6*
	OVA	4,7 $\pm$ 2,3	6,8 $\pm$ 2,2

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM de 6 animais. *p<0,05 comparado com os níveis basais.

3.11 Participação dos mastócitos

Os dados ilustrados na figura 12 mostram o efeito do tratamento crônico dos ratos com 48/80 sobre o número de leucócitos e os níveis de TNF- α no LBA após desafio intratraqueal com OVA (6 h), em animais previamente sensibilizados com este antígeno.

Nossos resultados mostraram que o número de leucócitos totais (Figura 12A) e de neutrófilos (Figura 12B) no LBA dos ratos tratados com capsaicina encontra-se aumentado em relação ao grupo controle, como esperado; entretanto, o tratamento com o composto 48/80 preveniu este aumento, igualando-os aos valores dos animais do grupo controle.

Não houve diferenças significativas no número de células mononucleares nos grupos controle e capsaicina, não-tratados e tratados com o composto 48/80 (Figura 12C).

De modo similar, a concentração TNF- α no LBA foi maior no grupo tratado com capsaicina, como anteriormente mostrado. O tratamento crônico destes animais com o composto 48/80 preveniu o aumento dos níveis de TNF- α , igualando-o aos valores dos animais do grupo controle (Figura 12).

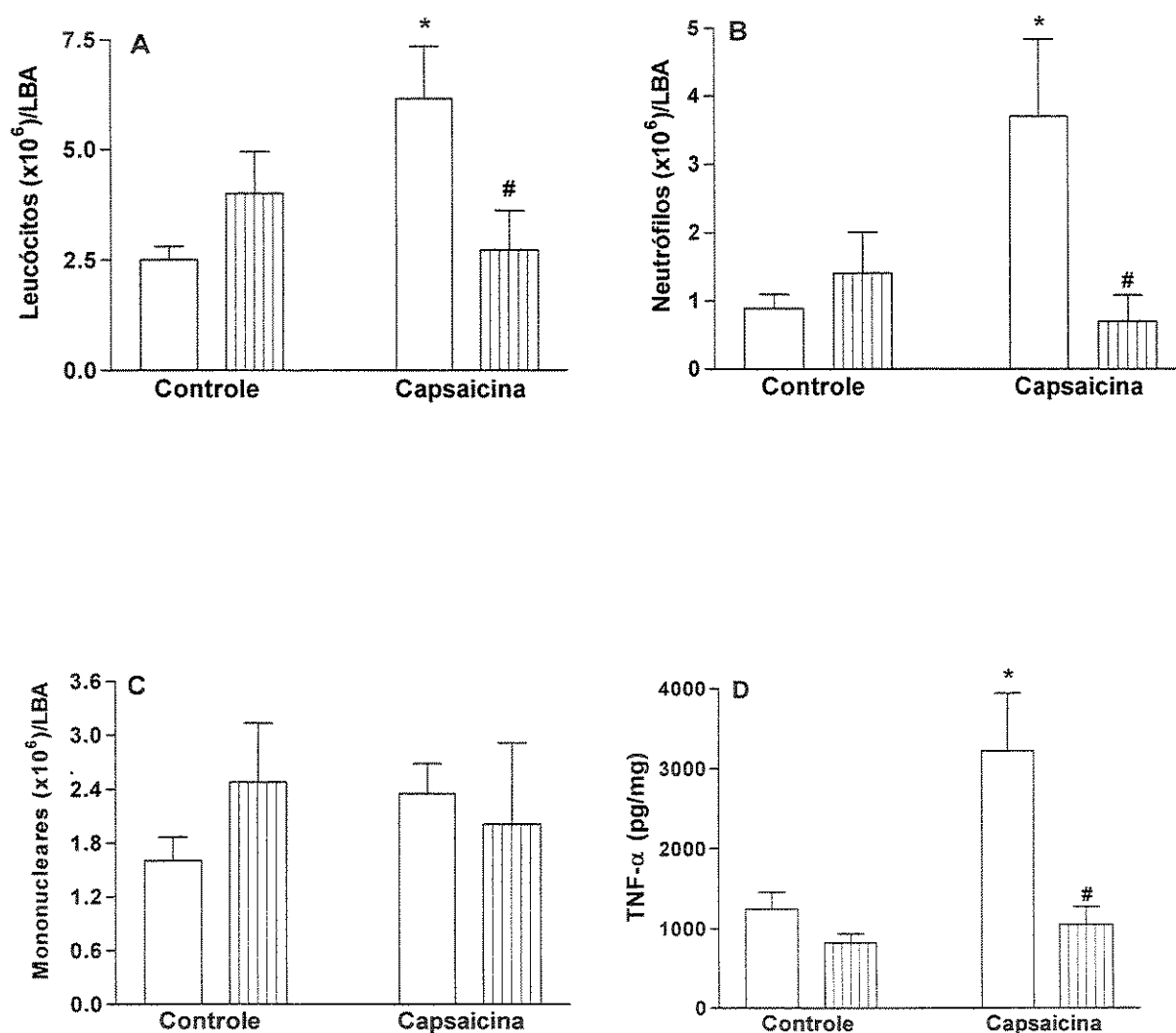


Figura 12 - Efeito do tratamento com 48/80 no número de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), células mononucleares (C) e dos níveis de TNF- α (D) no LBA. Esses parâmetros foram avaliados 6 horas após a injeção intratraqueal de OVA. As colunas hachuradas representam animais que receberam o composto 48/80 ao passo que as colunas vazias representam os animais tratados com salina (veículo do composto 48/80). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com a salina do grupo capsaicina.

3.12 Influência do pré-tratamento de ratos com capsaicina na hematopoiese, e na expressão de receptores de taquicininas e PPT-I

3.12.1 Níveis de substância P na medula óssea

Os níveis de substância P foram avaliados na medula óssea de animais controle ou tratados com capsaicina. A Figura 13 mostra uma redução significativa nos níveis desta substância no grupo tratado com capsaicina quando comparado com o grupo controle.

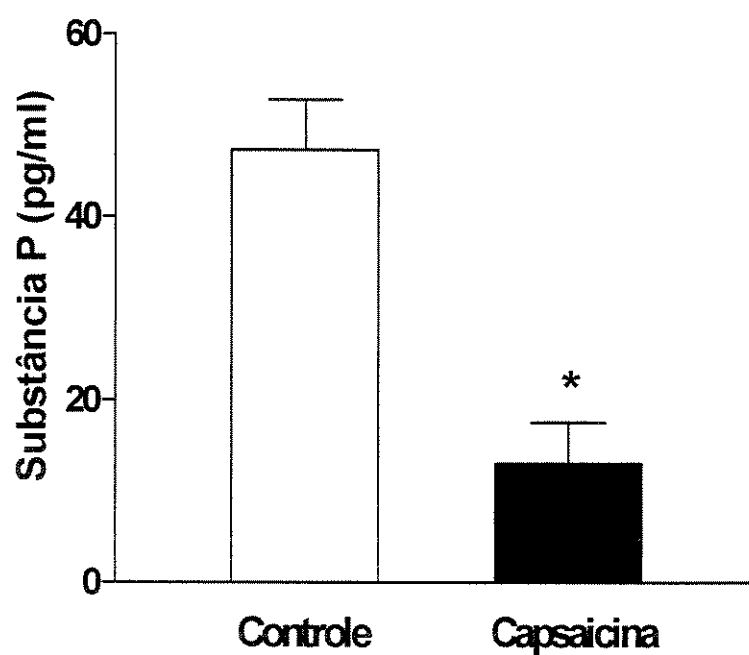


Figura 13 - Concentração da substância P na medula óssea de animais controle e tratados com capsaicina. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

3.12.2 População basal de leucócitos totais e diferenciais na medula óssea e sangue periférico

A figura 14 representa que o número de leucócitos totais e de neutrófilos imaturos e maduros na medula óssea de ratos não-sensibilizados do grupo capsaicina é significativamente maior que o respectivo grupo controle. Dessa forma, para investigarmos o papel dos neuropeptídeos na neutropoiese, passamos a empregar apenas animais controles e tratados com capsaicina, sem passarem pela imunização com OVA.

A figura 14 mostra que os animais tratados com capsaicina no período neonatal apresentam, quando adultos, um número significativamente maior (aproximadamente 27%) de leucócitos totais na medula óssea quando comparado com os animais controle. Em relação à contagem diferencial destas células, observamos um aumento de 174 % das formas imaturas e 42% das formas maduras do neutrófilo no grupo capsaicina ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi vista em relação aos eosinófilos e células mononucleares (Figura 14).

Em relação à contagem total e diferencial no sangue destes animais, não observamos diferenças significantes entre ambos os grupos (Figura 15).

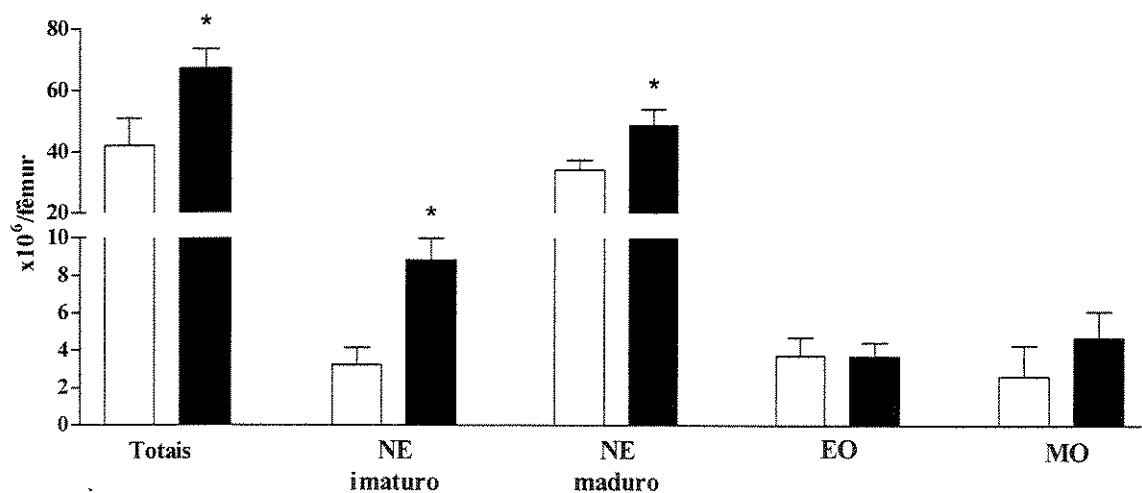


Figura 14 - Efeito do tratamento com capsaicina no número de leucócitos totais, neutrófilos imaturos, neutrófilos maduros, eosinófilos e células mononucleares na medula óssea. O grupo controle está representado pelas colunas vazias e o grupo capsaicina pelas colunas cheias. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. NE (neutrófilos), EO (eosinófilos), MO (mononucleares).

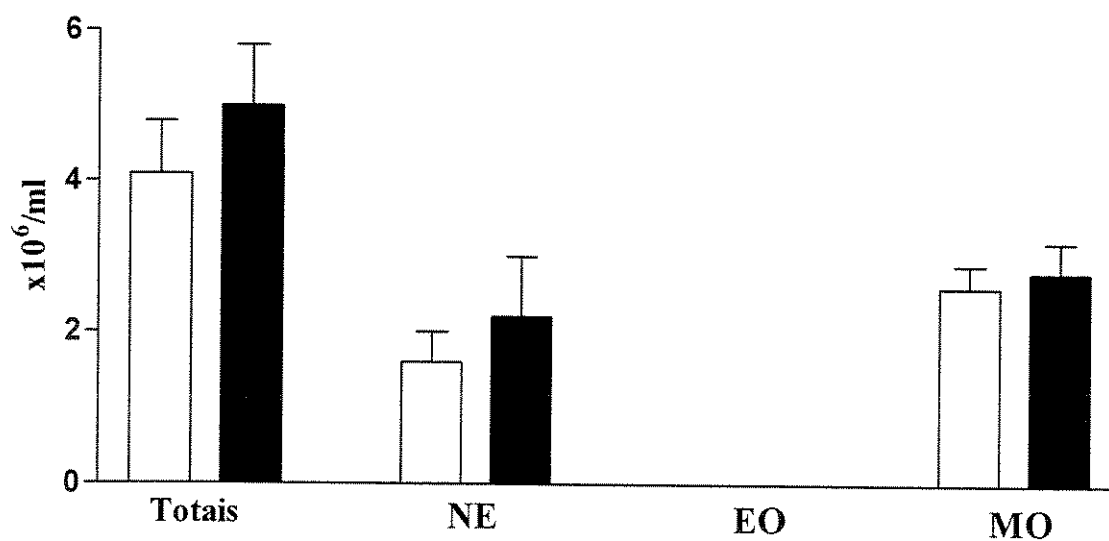


Figura 15 - Efeito do tratamento com capsaicina no número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares no sangue periférico. O grupo controle está representado pelas colunas vazias e o grupo capsaicina pelas colunas cheias. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5-6 animais. NE (neutrófilos), EO (eosinófilos), MO (mononucleares).

3.12.3 Expressão de RNAm para PPT-I, receptor NK₁ e receptor NK₂

Para a padronização da técnica, investigamos, inicialmente, a expressão de RNAm para PPT-I, NK₁ e NK₂ nos pulmões e cérebros de animais controle ou tratados com capsaicina.

Como mostrado na figura 16, no cérebro, não encontramos diferenças significativas na expressão gênica da PPT-I (Painel A) e dos receptores NK₁ e NK₂ (Painel B) dos animais dos grupos controle e capsaicina.

Resultado semelhante foi encontrado nas amostras de pulmão onde a expressão do RNAm para a PPT-I no grupo capsaicina não é significativamente diferente do grupo controle (Figura 17A). Em relação à expressão do RNAm para o receptor NK₂ no pulmão, nenhuma diferença foi encontrada. Além disso, não encontramos expressão constitutiva do RNAm para NK₁ no pulmão em nenhum dos grupos investigados (Figura 17B).

Quando analisamos as amostras provenientes da medula óssea, verificamos que há um aumento significativo da expressão do RNAm para a PPT-I no grupo capsaicina comparado ao grupo controle (Figura 18A). Em relação à expressão do RNAm para o receptor NK₂, nenhuma diferença foi encontrada. Porém, a expressão do RNAm para o receptor NK₁ está presente apenas nos animais tratados com capsaicina (Figura 18B).

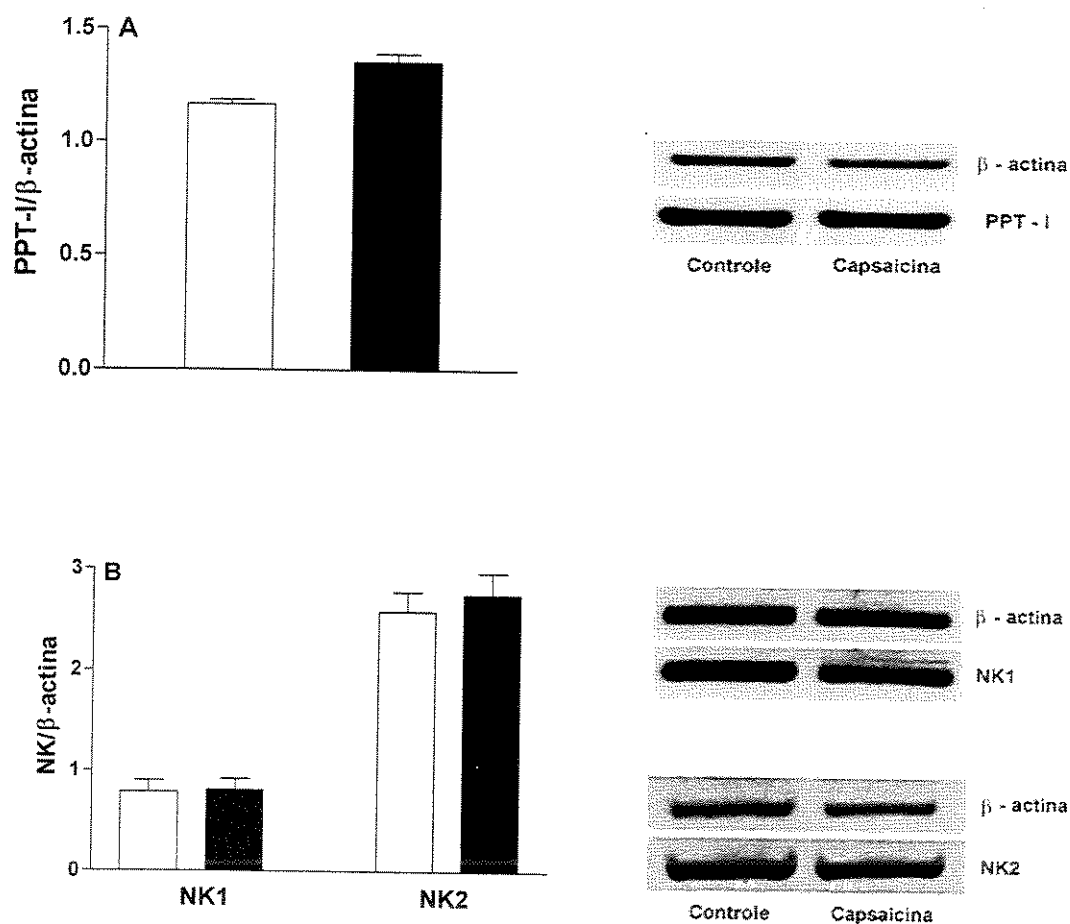


Figura 16 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK_1 e NK_2 (B) no cérebro de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 4 animais. O painel à direita ilustra o RT-PCR representativo para PPT-I (A), NK_1 (B) e NK_2 (C).

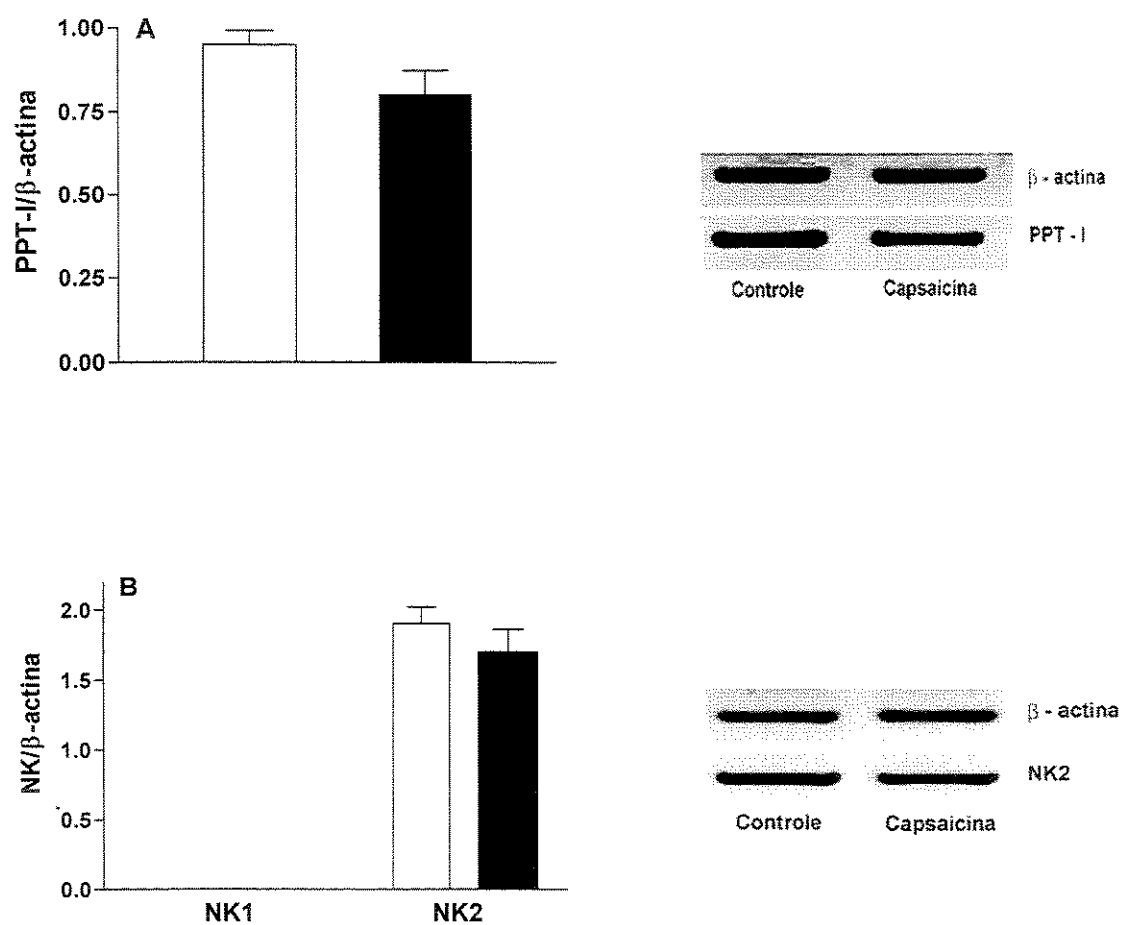


Figura 17 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK_1 e NK_2 (B) no pulmão de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 4 animais. O painel à direita ilustra o RT-PCR representativo para PPT-I (A) e NK_2 (B).

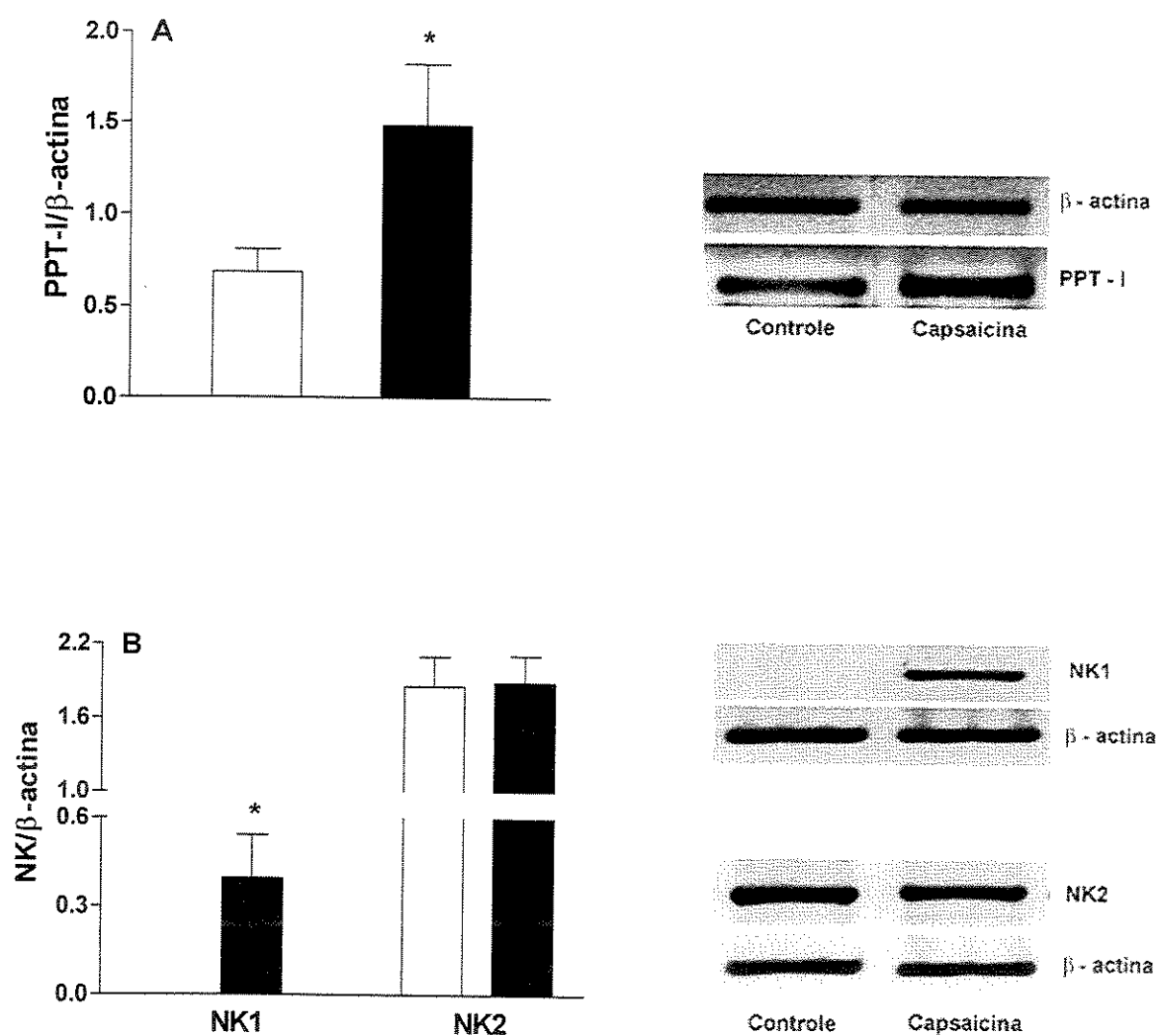


Figura 18 - Expressão da PPT-I (A) e dos receptores NK_1 e NK_2 (B) nas células da medula óssea de animais controle (colunas vazias) ou tratados com capsaicina (colunas cheias). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ comparado com grupo controle. O painel à direita ilustra o RT-PCR representativo para PPT-I (A), NK_1 (B) e NK_2 (C).

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o desafio pulmonar com OVA em animais previamente sensibilizados acarreta maior influxo de neutrófilos para as vias aéreas em ratos tratados com capsaicina no período neonatal, o qual é acompanhado por aumento na liberação de mediadores inflamatórios no LBA (TNF- α , IL-6, IL-10 e LTB₄) e na expressão de CINC-3 no tecido pulmonar.

Nos grupos controle e capsaicina, o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas nos animais desafiados com OVA, foi acompanhado de queda significativa do número destas células no sangue periférico e aumento de suas formas imaturas na medula óssea. A neutropenia no grupo capsaicina foi maior, provavelmente como consequência do maior infiltrado neutrofílico nas vias aéreas. Por outro lado, o aumento de formas imaturas de neutrófilos na medula óssea, após o desafio com OVA, foi de magnitude semelhante para os grupos controle e capsaicina, não esquecendo de mencionar que a população basal destas células (observada nos animais não-sensibilizados e animais *naïve*) é maior no grupo capsaicina em relação ao controle. É sabido que vários estímulos, direta ou indiretamente, são capazes de induzir proliferação e desenvolvimento dos progenitores de neutrófilos na medula óssea (BABIOR e GOLD, 2001). Embora não tenhamos avaliado a produção de GM-CSF, pode-se sugerir que o pré-tratamento com capsaicina acarreta maior produção desta glicoproteína levando a aumento da neutropoiese.

A degeneração das fibras sensoriais no período neonatal e a redução drástica da produção de neuropeptídeos no animal adulto, através do tratamento

com capsaicina, resultam em uma maior resposta inflamatória pulmonar e aumento da reatividade brônquica (LONG et al., 1996; STERNER-KOCK et al., 1996; MEDEIROS et al., 2001; 2003). Entretanto, os mecanismos envolvidos na amplificação da resposta inflamatória pulmonar pelo tratamento neonatal com capsaicina são poucos compreendidos.

Está bem estabelecido que neutrófilos pré-ativados (*primed*) no sangue periférico podem amplificar a resposta inflamatória em diversos tecidos (CONDLIFFE et al., 1996; 1998; VAN EEDEN et al., 1999). Neste contexto, avaliamos se os neutrófilos circulantes dos ratos tratados com capsaicina no período neonatal encontram-se pré-ativados na circulação de modo a explicar o recrutamento maior destas células nos pulmões de ratos expostos ao desafio com OVA.

Primeiramente, investigamos a capacidade de adesão dos neutrófilos em placas recobertas com fibronectina ou soro. Nossos dados mostraram que neutrófilos estimulados com fMLP ou PMA foram capazes de aderir tanto às placas revestidas com fibronectina como às aquelas revestidas com soro, sendo a adesão semelhante em ambas as condições. Os ligantes presentes no soro nos quais os neutrófilos aderem não são ainda inteiramente conhecidos, mas alguns trabalhos sugerem que a fibronectina (glicoproteína encontrada tanto no plasma como na matriz extracelular) é a principal proteína responsável por essa adesão (FRIESER et al., 1996).

A adesão do neutrófilo ao endotélio é mediada pelas integrinas da família β_2 presentes nos neutrófilos (LFA-1 e Mac-1) e pela superfamília da imunoglobulina (ICAM-1 e ICAM-2) no endotélio. O passo seguinte, a migração transendotelial,

também envolve a participação das integrinas β_2 que se ligam à matriz extracelular (BURNS et al., 2001). Assim, são as β_2 integrinas as principais responsáveis pela infiltração dos neutrófilos em tecidos como a pele, pulmão e outros (NOURSHARGH et al., 1989; ISSEKUTZ e ISSEKUTZ, 1992; DOERSCHUK et al., 1990). No entanto, alguns estudos têm descrito que os neutrófilos podem infiltrar os pulmões e a cavidade peritoneal por mecanismos independentes de β_2 integrinas (WINN e HARLAN, 1993; ISSEKUTZ e ISSEKUTZ, 1993). De fato, neutrófilos humanos estimulados com fMLP, PAF e IL-8 podem expressar a β_1 integrina (KUBES et al, 1995), e a adesão destas células à placas recobertas com fibronectina é dependente tanto de Mac-1, como de VLA-4 (CONRAN et al., 2003). Além disso, neutrófilos de rato expressam constitutivamente o VLA-4 (ISSEKUTZ et al., 1996).

O anticorpo contra Mac-1 foi capaz de inibir tanto a adesão espontânea dos neutrófilos, bem como a adesão induzida pelo fMLP e PMA. Esta inibição foi observada tanto nas placas revestidas com soro, como naquelas revestidas com fibronectina, confirmando a participação desta integrina no processo de adesão do neutrófilo. Além disso, nossos dados mostraram que a adesão dos neutrófilos à fibronectina (ou ao soro), induzida pelo fMLP ou PMA, foi prevenida pelo anticorpo contra $\alpha_4\beta_1$ integrina (VLA-4), sugerindo novamente o envolvimento desta integrina na adesão do neutrófilo. A adesão espontânea dessas células também foi reduzida por este anticorpo, parecendo confirmar os dados de literatura sobre a expressão constitutiva dessa integrina nos neutrófilos do rato (ISSEKUTZ et al., 1996). Entretanto, não nos é claro, porque o anticorpo anti-Mac-1 produz o mesmo

grau de inibição da adesão (espontânea e estimulada) que o anticorpo anti-VLA-4. A possibilidade de um efeito inespecífico é descartada porque o anticorpo anti-IgG (controle) não inibiu a adesão dos neutrófilos em nenhuma das condições experimentais.

No conjunto, é importante ressaltarmos que não observamos diferenças significativas entre os neutrófilos obtidos dos animais tratados com capsaicina e do grupo controle quanto à capacidade de aderir em placas revestidas com soro ou fibronectina. Isto parece excluir a possibilidade que o aumento do influxo de neutrófilos no pulmão dos ratos tratados com capsaicina seja devido à expressão aumentada destas moléculas de adesão na parede do neutrófilo circulante.

A literatura mostra que os neutrófilos pré-ativados na circulação são mais eficazes em migrar para os tecidos (CONDLIFFE et al., 1996; 1998; VAN EEDEN et al., 1999). Dessa forma, investigamos a resposta quimiotática dos neutrófilos induzida pelo fMLP, PAF e substância P. Nossos resultados mostraram que neutrófilos obtidos de animais pré-tratados com capsaicina são capazes de migrar em resposta a esses agentes na mesma magnitude que os neutrófilos obtidos dos animais controle.

No conjunto, os ensaios de adesão e de quimiotaxia *in vitro* mostram que o aumento de resposta inflamatória pulmonar em animais tratados com capsaicina não está ligado a alterações na mobilização e adesão dos neutrófilos. Isto sugere que os neutrófilos de animais tratados com capsaicina não se encontram ativados (*primed*) na circulação sanguínea.

As quimiocinas da família das CXC estão envolvidas principalmente em processos inflamatórios onde o neutrófilo é o propagador do dano tecidual

(TESSIER et al., 1997). A quimiocina mais estudada é a IL-8 sendo o primeiro estímulo para a migração de neutrófilos na maioria das respostas inflamatórias em humanos e coelhos (HARADA et al, 1996). Os roedores não possuem um análogo da IL-8, mas possuem a “citocina indutora de quimioatração de neutrófilos” (CINC), que é semelhante às proteínas oncogênicas relacionadas ao crescimento. As CINC-1, CINC-2 e CINC-3 são potentes fatores quimiotáticos para neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, sendo responsáveis pelo influxo destas células em modelos de inflamação pulmonar (TAKANO et al., 1999). Estudos *in vitro* mostram que macrófagos alveolares, células epiteliais e endoteliais, quando estimuladas com LPS, IL-1 e TNF- α , são capazes de produzir CINC-1 (ou KC) e a CINC-3 (ou MIP-2) (LUKASZEWICZ et al., 1996; SHANLEY et al., 1997; O’LEARY et al., 1997). Além disso, a CINC-1 e CINC-2 parecem desempenhar papel importante na infiltração de neutrófilos durante a inflamação alérgica em ratos (NAKAGAWA et al., 1998).

Dessa forma, investigamos se o aumento do influxo de neutrófilos no LBA dos animais tratados com capsaicina e desafiados com OVA era devido à expressão aumentada das CINC no pulmão destes animais. Nossos dados mostraram que a expressão da CINC-3 está significativamente aumentada no pulmão dos animais tratados com capsaicina no período neonatal que foram desafiados com OVA na fase adulta, sugerindo que esta quimiocina participa ativamente do influxo neutrofílico pulmonar nos ratos tratados com capsaicina. Além disso, uma redução significativa da expressão da CINC-2 foi observada nos animais tratados com capsaicina. Embora a redução da expressão desta quimiocina não nos seja clara, pode-se sugerir que o aumento da CINC-3

“downregula” a CINC-2. Estudo prévio mostrou que a quimiotaxia e a mobilização de cálcio induzida pela CINC-2 é bloqueada pela incubação dos neutrófilos com CINC-3; no entanto, a CINC-2 não tem a capacidade de afetar a resposta da CINC-3 (SHIBATA et al., 2000).

O TNF- α é capaz de ativar leucócitos, aumentar a aderência de neutrófilos e monócitos à matriz celular, estimular a proliferação de fibroblastos e a produção de algumas citocinas inflamatórias (THOMMESEN et al., 1998). O TNF- α tem sido responsabilizado por alguns eventos da inflamação pulmonar como hiperreatividade brônquica e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para as vias aéreas (KIPS et al., 1992; YATES et al., 1993). Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de TNF- α nos animais desafiados com OVA, tanto do grupo controle, como do grupo capsaicina. Porém, um aumento significativamente maior foi observado no LBA dos ratos do grupo capsaicina, sugerindo que esta citocina está implicada na exacerbação da inflamação alérgica pulmonar (número de neutrófilos aumentado). Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por LONG et al. (1996), onde a instilação intratraqueal com LPS em ratos pré-tratados com capsaicina evoca um infiltrado neutrofílico marcadamente maior do que em animais controle, sendo isto acompanhado por níveis aumentados de TNF- α no LBA.

Os leucotrienos são liberados por células inflamatórias presentes (ou recrutadas) nas vias aéreas em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo alérgico. Concentrações elevadas de LTB₄ têm sido encontradas em várias condições inflamatórias pulmonares como bronquite crônica, asma e síndrome do

desconforto respiratório agudo (SDRA) (CROOKS e STOCKLEY, 1998; NICOSIA et al., 2001). Nossos dados mostraram que a concentração de LTB₄ encontra-se aumentada no LBA animais tratados com capsaicina no período neonatal e desafiados com OVA na fase adulta, confirmando que este mediador tem importante papel em aumentar a adesão e quimiotaxia dos neutrófilos no endotélio durante a inflamação pulmonar. Além disso, estudo prévio mostrou que, em modelo de inflamação imune em camundongos, o TNF- α induz migração de neutrófilos *in vivo* por um mecanismo dependente da liberação do LTB₄ (CANETTI et al, 2001). Isto parece sugerir que o aumento dos níveis de LTB₄ no LBA dos animais tratados com capsaicina é consequência da maior produção de TNF- α nestes animais.

Além do TNF- α , tem sido bem documentado que a produção da IL-6 aumenta durante a inflamação pulmonar (DENNIS, 1992; CHEN et al, 1993; CHUNG, 2001; HO et al., 2004). A IL-6 é frequentemente usada como marcador da ativação sistêmica de citocinas pro-inflamatórias (BARTON, 1997). Esta citocina exerce efeitos importantes no sistema imune, incluindo crescimento das células plasmáticas, diferenciação das células B, indução de proteínas da fase aguda e indução de hematopoiese. No pulmão, níveis elevados de IL-6 estão correlacionados clinicamente com fibrose pulmonar, pneumonites e asma. No pulmão, as primeiras células que produzem IL-6 em resposta à estimulação direta com IL-1 e TNF- α são os fibroblastos e os macrófagos alveolares (LUKACS e WARD, 1996). Nossos resultados mostraram que as concentrações de IL-6 estão aumentadas no LBA dos animais tratados com capsaicina e desafiados com OVA,

sugerindo que esta citocina, juntamente com o TNF- α , tem papel importante na exacerbação do influxo neutrofílico observado nestes animais.

As citocinas antiinflamatórias são uma série de moléculas imunoreguladoras que controlam as respostas das citocinas inflamatórias. A IL-10 é a mais importante citocina antiinflamatória na resposta imune. Essa citocina inibe a produção do TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e MIP por monócitos e macrófagos (CLARKE et al., 1998). Estudos têm mostrado que a função da IL-10 *in vivo* é a de regular a resposta inflamatória pulmonar (SHANLEY et al., 1995; MULLIGAN et al., 1997, GUDMUNDSSON et al., 1998; SHANLEY et al., 2000). Esses estudos mostraram que esta citocina está “up-regulada” durante a inflamação pulmonar, e que o bloqueio da mesma com anticorpo, aumenta a produção de TNF- α e o recrutamento de neutrófilos, exacerbando os danos pulmonares (SHANLEY et al, 1996). Nossos resultados mostraram aumento significativo na concentração de IL-10 no LBA dos ratos tratados com capsaicina e desafiados com OVA, sugerindo que seja consequência do aumento nos níveis de TNF- α observado nesses animais.

O óxido nítrico (NO) tem sido descrito como um importante mediador de doenças alérgicas, e aumento nos níveis de NO no ar exalado tem sido detectado em pacientes asmáticos ou com rinite alérgica (FISCHER et al., 2002). De fato, há evidências que a expressão protéica e do RNAm da iNOS está aumentada nas vias aéreas de indivíduos asmáticos, particularmente em macrófagos e células epiteliais (HAMID et al., 1993; SALEH et al., 1998). Entretanto, nossos resultados mostraram que a expressão da iNOS não está alterada em nenhum dos grupos

investigados, descartando que o NO participa do recrutamento de neutrófilos nos animais pré-tratados com capsaicina e desafiados com OVA.

Nas respostas inflamatórias causadas por LPS ou citocinas, a COX-2 é expressa, passando a gerar grandes quantidades de PGE₂, que, por sua vez, medeia vários eventos da fase aguda da resposta inflamatória como aumento de fluxo sanguíneo e de permeabilidade vascular (DEWITT *et al.*, 1993; NÜSING e BARSING, 1999; MITCHELL e WARNER, 1999). Nossos dados mostraram que a expressão do RNAm para COX-2 não foi alterada nos pulmões de ratos tratados com capsaicina e desafiados com OVA, em relação ao grupo controle. Observamos também que a quantidade de PGE₂ no LBA, 6 h após o desafio com OVA, não se alterou significativamente em todos os grupos investigados. Estes dados parecem excluir que a PGE₂, derivada de uma COX-2, esteja envolvida na exacerbação do influxo de neutrófilos em ratos tratados com capsaicina. DEVLIN *et al.* (1996) mostraram que os níveis PGE₂ aumentam significativamente na primeira hora após a exposição ao ozônio, diminuindo após este período. Portanto, é provável que a concentração de PGE₂ aumente somente nas primeiras horas após o desafio com OVA, contribuindo para os eventos vasculares que favorecem a mobilização de neutrófilos para o local inflamado.

O macrófago é a principal célula diferenciada do sistema fagocítico mononuclear. Essas células originam-se da medula óssea a partir do precursor comum, a linhagem granulocítica (DAVIES, 1994). Após deixarem a medula, os monócitos permanecem na circulação sanguínea por 70 horas até migrarem para diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos. Estes permanecem residentes por alguns meses, sendo considerados células terminais,

desprovidos de capacidade de proliferação (GORDON, 1986). Os macrófagos residentes podem sofrer estimulação por agentes inflamatórios e/ou imunológicos e adquirirem características próprias, tanto morfológicas quanto funcionais, tais como a fagocitose e a capacidade microbicida, além do processamento e apresentação de antígenos.

Macrófagos pulmonares, comumente chamados de macrófagos alveolares, são as células mais abundantes do tecido pulmonar, estando presentes nos alvéolos e nos espaços distais. Estas células representam a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos ou imunológicos (SCHAUBLE et al., 1993). Além disso, muitas evidências sugerem que estas células participam na produção e manutenção da inflamação das vias aéreas em doenças alérgicas como a asma brônquica (FULEER, 1989).

As citocinas secretadas pelos macrófagos, em resposta aos patógenos, são um grupo de moléculas estruturalmente diversas, e incluem a IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e IL-8. Uma vez que a concentração de TNF- α , IL-6 e IL-10 está elevada no LBA de animais tratados com capsaicina e desafiados com OVA, pensamos, inicialmente, nos macrófagos como as principais células pulmonares implicadas no aumento da inflamação pulmonar nestes animais.

Além dos medidores citados acima, os macrófagos alveolares podem liberar espécies reativas do oxigênio (ROS) (MOORE et al, 1992). As ROS parecem desempenhar um papel importante em várias patologias das vias aéreas como SARA, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma (HENRICKS e NIJKAMP, 2001). A primeira ROS produzida no sítio inflamatório é o ânion

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é formado a partir da redução do oxigênio molecular por transferência de um elétron. Em nosso trabalho, quantificamos a produção do ânion superóxido em macrófagos alveolares purificados do LBA de animais tratados com capsaicina e controle, previamente sensibilizados com OVA. Nossos resultados mostraram que os macrófagos alveolares obtidos dos animais tratados com capsaicina são capazes de gerar quantidades similares de ânion superóxido em comparação com o grupo controle (produção basal e produção estimulada). Isto sugere que o tratamento com capsaicina não interfere na produção de ânion superóxido por macrófagos alveolares, ou seja, este mecanismo parece não contribuir para a exacerbação do influxo neutrofílico pulmonar dos ratos pré-tratados com capsaicina.

Ainda com o objetivo de explorar a participação dos macrófagos alveolares na resposta inflamatória pulmonar dos animais tratados com capsaicina, quantificamos os níveis de nitrito e de $TNF-\alpha$ em resposta ao LPS. Nossos dados mostraram que tanto a quantidade basal quanto a estimulada (LPS) de nitrito e de $TNF-\alpha$ foi semelhante entre o grupo controle e capsaicina, parecendo excluir que os macrófagos alveolares participam do aumento do influxo de neutrófilos observado nos animais tratados com capsaicina. Isto corrobora nossos resultados mostrando que a expressão da iNOS e da COX-2 no pulmão desses animais não está alterada, uma vez que, macrófagos alveolares são conhecidos como as principais células produtoras de NO e metabólitos do ácido araquidônico em doenças pulmonares (HAMID et al., 2003).

Além do macrófago, outra célula pulmonar capaz de liberar citocinas pró-inflamatórias é o mastócito. Nas vias aéreas, os mastócitos estão localizados próximos aos vasos sanguíneos, epitélio, músculo liso brônquico e nervos. Existe também uma relação morfológica e funcional entre os mastócitos e as fibras sensoriais sensíveis a capsaicina na mucosa das vias aéreas (ALVING et al., 1991). Os mastócitos têm papel importante na resposta inata e imune, respondendo a antígenos via receptor ligado à IgE. Além de liberar histamina, serotonina e eicosanóides, estas células sintetizam e secretam citocinas (IL-6 e IL-10) e quimiocinas (IL-8), as quais, acredita-se, contribuem para reações alérgicas imediatas e recrutamento de células inflamatórias (METCALFE et al., 1997; WILLIAMS e GALLI, 2000). Na resposta imune inata, os mastócitos são capazes de liberar TNF- α e este, por sua vez, induz o recrutamento de neutrófilos (MALAVIYA et al., 1996). O TNF- α liberado pelos mastócitos é derivado de dois “pools” distintos: o pré-formado (que é responsável pela grande quantidade de TNF- α liberado durante os 10 primeiros minutos após a estimulação) e o neo-sintetizado (que é liberado posteriormente com o objetivo de manter os níveis desta citocina) (OLEJNIK e BRZEZINSKA-BLASZCZYK, 1998). Assim, os mastócitos pulmonares podem ser considerados células-alvo, envolvidas na liberação de mediadores responsáveis pelo influxo de neutrófilos nos ratos tratados com capsaicina.

Com o objetivo de investigar se os mastócitos participam do processo inflamatório pulmonar observado nos ratos tratados com capsaicina, utilizamos a estratégia de tratar os animais cronicamente com o composto 48/80. Este

composto, quando administrado cronicamente, esgota os estoques de histamina e serotonina nos mastócitos presentes no tecido conjuntivo (DI ROSA et al., 1971). Além disso, os mastócitos do tecido conectivo e de mucosa são capazes de liberar $\text{TNF-}\alpha$ *in vitro* em resposta ao desafio com OVA (TREZENA et al., 2003) e ao composto 48/80 (GIBBS et al., 2001). Nossos resultados mostraram que o tratamento com o composto 48/80 reduziu o número de leucócitos totais e de neutrófilos, assim como de $\text{TNF-}\alpha$ no LBA de ratos tratados com capsaicina (sensibilizados e desafiados com OVA), igualando os valores aos do grupo controle.

Em resumo, esses achados sugerem que o tratamento de ratos neonatos com capsaicina e o esgotamento crônico de neuropeptídeos induz “up-regulação” dos mastócitos pulmonares. O desafio com OVA na fase adulta destes ratos induziria grande liberação de $\text{TNF-}\alpha$ (e possivelmente IL-8), contribuindo para o maciço infiltrado neutrofílico nas vias aéreas. Duas hipóteses podem ser cogitadas para explicar estes dados. A primeira diz respeito à deficiência crônica de substância P nas vias aéreas. É sabido que a substância P ativa diretamente uma proteína G, sensível a pertussis toxina, em mastócitos, levando à liberação de $\text{TNF-}\alpha$ através da via das MAP-quinases (AZZOLINA et al., 2003). Desta forma, podemos sugerir que certos estímulos (por exemplo, alérgenos) rotineiramente presentes nas vias aéreas, são capazes de ativar as fibras C induzindo liberação de substância P, que, por sua vez, estimula mastócitos pulmonares, levando-os a liberar $\text{TNF-}\alpha$. Conseqüentemente, a perda permanente das fibras C (pelo tratamento dos neonatos com capsaicina) levaria à “up-regulação” dos mastócitos

pulmonares residentes devido à supressão de estimulação pela substância P. A segunda possibilidade para explicar nossos resultados diz respeito à deficiência crônica de somatostatina nas vias aéreas. Estudos recentes mostram que este neuropeptídeo, liberado dos terminais sensoriais, é capaz de reduzir a atividade dos mastócitos e de inibir a inflamação crônica (SAAVEDRA e VERGARA, 2003; HELYES et al., 2004). Assim, o feedback negativo normalmente exercido pela somatostatina nos mastócitos seria perdido nos animais tratados com capsaicina; isso tornaria os mastócitos mais susceptíveis à exposição com alérgenos, como a OVA. Entretanto, estudos adicionais, quantificando-se as concentrações de citocinas (TNF- α , CINC_s, e outros), em mastócitos pulmonares isolados são necessários pra se compreender os mecanismos pelos quais o esgotamento crônico de neuropeptídeos leva à “up-regulação” destas células.

Hematopoiese e neuropeptídeos

A inervação de órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e secundários (baço e intestino) por fibras simpáticas e peptidérgicas formam o chamado eixo neuroimune hematopoiético (CALVO e FORTEZA-VILA, 1969; FELTEN et al., 1991, 1992; WEIHE et al., 1991).

Na medula óssea, a distribuição anatômica precisa dessas fibras nervosas peptidérgicas ainda não está bem estabelecida. No entanto, estudo de microscopia eletrônica mostrou uma proximidade dos terminais nervosos com as células reticulares e fibroblastóides, sugerindo que as terminações nervosas estão em contato direto com o estroma da medula óssea (YAMAZAKI et al., 1990).

O controle neural da hematopoiese parece se iniciar muito cedo na vida fetal. O desenvolvimento temporal da inervação da medula óssea correlaciona-se com o início da atividade hematopoiética no rato em desenvolvimento (CALVO e FORTEZA-VILA, 1969; MILLER e McCUSKEY, 1973).

Com o objetivo de investigar o papel dos neuropeptídeos na maturação celular na medula óssea, quantificamos o número total e diferencial de leucócitos, os níveis de substância P, e a expressão da PPT-I, do receptor NK₁ e do receptor NK₂ na medula óssea de animais controle e tratados no período neonatal com capsaicina.

Nossos resultados mostraram que os níveis de substância P na medula óssea de animais tratados com capsaicina estão marcadamente reduzidos, atestando novamente a eficácia do tratamento. Embora na medula óssea a substância P possa ser produzida por fontes não-neuronais (RAMESKAR e

GASCON, 1997), nossos resultados indicam que a maior concentração deste neuropeptídeo deve estar presente nos terminais das fibras NANC sensíveis a capsaicina.

Quanto ao conteúdo celular na medula óssea, nossos resultados mostraram que animais *naive* tratados com capsaicina no período neonatal apresentam um número de leucócitos totais na medula óssea significativamente maior do que animais controle, sendo este aumento relacionado à população de formas imaturas e maduras de neutrófilos. Isto sugere que os neuropeptídeos modulam a neutropoiese. De fato, sabe-se da existência de receptores taquicininérgicos na medula óssea, presentes tanto em células não-neuronais como em fibras imunoreativas para substância P (RAMESKAR et al., 1997).

A substância P e a NKA são derivadas do gene da PPT-I, que é passível de indução por citocinas e fatores neurotróficos em células neurais ou não-neurais. Na medula óssea, as fibras nervosas e o estroma são fontes potenciais dos produtos do gene da PPT-I. A substância P e a NKA interagem com os três receptores, NK₁, NK₂ e NK₃, embora a substância P e a NKA se ligam preferencialmente ao NK₁ e NK₂, respectivamente (RAMESKAR et al., 1997). A estimulação do NK₁ causa um potente aumento da hematopoiese que pode ser "down-regulada" pelo NK₂ (RAMESHWAR e GASCÓN, 1997).

A substância P induz a produção de citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF) nas células imunes e hematopoiéticas, e no estroma medular (RAMESHWAR et al., 1993a, 1993b; RAMESHWAR e GASCÓN 1994, 1995; WAGNER et al., 1987; LOTZ et al., 1988), citocinas estas importantes para

hemocitopoiese. Estudo *in vitro* mostrou que a substância P, em concentrações fisiológicas, estimula progenitores da série de granulócitos-monócitos e dos eritroblastos (RAMESHWAR et al., 1993). Sítios de ligação para substância P estão também presentes em células B e T, macrófagos, progenitores hematopoiéticos e células endoteliais.

Por outro lado, a NKA parece induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias e hematopoiéticas negativas no estroma medular (RAMESHWAR et al., 1994). O efeito inibitório exercido pela NKA na CFU-GM está relacionado à indução de dois fatores de crescimento hematopoiéticos negativos, MIP-1 α e TGF- β (RAMESHWAR e GASCÓN, 1996).

Portanto, para tentarmos elucidar o papel dos neuropeptídeos na neutropoiese em animais tratados com capsaicina, decidimos verificar a expressão do precursor da substância P e da NKA (PPT-I), bem como dos seus respectivos receptores (NK₁ e NK₂) nas células da medula óssea.

Nossos resultados mostraram que na medula óssea dos animais tratados com capsaicina no período neonatal ocorre maior expressão de RNAm para PPT-I, quando comparado com o grupo controle, sugerindo que possa estar ocorrendo um maior produção das taquicininas (substância P e NKA). Com o propósito de investigar qual o receptor taquicininérgico é responsável pelo aumento da neutropoiese, determinamos a expressão do RNAm para os receptores NK₁ e NK₂. Não encontramos diferenças na expressão do RNAm do receptor NK₂. Porém, a expressão gênica do receptor NK₁ está presente apenas nas células dos animais tratados com capsaicina. Esses resultados sugerem que a ativação deste receptor

possa então ser o responsável pelo aumento no número de neutrófilos imaturos na medula óssea desses animais.

A depleção do conteúdo de neuropeptídeos tem sido relacionada com a perda da função imune (NILSSON et al., 1991). Na medula óssea, as terminações nervosas nas células estromais perivasculares parecem estar implicadas no controle da produção de células sangüíneas e da liberação destas para a circulação sangüínea periférica, como também na retenção de células progenitoras na medula óssea (AFAN et al., 1997). Trabalho recente mostrou que os neuropeptídeos presentes na medula óssea são vitais para a hematopoiese dos leucócitos. Neste estudo, o tratamento de camundongos adultos com capsaicina aumentou número de leucócitos na medula óssea 6h após tratamento. No entanto, a quantidade de neutrófilos está reduzida nas colônias obtidas dos animais tratados com capsacina, sugerindo que ausência do neuropeptídeo é capaz de reter os leucócitos na medula óssea e impedir a diferenciação celular principalmente dos neutrófilos (BROOME e MIYAN, 2000). Neste trabalho a capsaicina foi administrada no camundongo adulto, e não no rato neonato como é o nosso modelo. O tratamento do animal adulto apenas depleta o conteúdo de neuropeptídeos, enquanto o tratamento neonatal, além de depletar, degenera a fibra; isso poderia explicar a discrepância entre nossos resultados e os dos grupos citados acima.

Em conclusão, nossos dados sugerem que os neuropeptídeos modulam a neutropoiese, e que o receptor NK_1 poderia ser o responsável pelo aumento da formas imaturas da linhagem neutrofilica observada nos animais tratados com capsaicina.

5. Conclusões

1. O desafio intrapulmonar com OVA em ratos promove aumento do influxo de neutrófilos nas vias aéreas, sendo este aumento maior em animais pré-tratados com capsaicina em relação aos animais controle;

2. A resposta quimiotática e de adesão *in vitro* de neutrófilos circulantes ativados não é diferente entre os grupos controle e capsaicina;

3. O aumento do influxo de neutrófilos nos ratos tratados com capsaicina é acompanhado por aumento nos níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e LTB₄ no LBA e da expressão da CINC-3 no tecido pulmonar. Não observou alterações na expressão de iNOS e COX-2 em ambos os grupos experimentais;

4. Os macrófagos alveolares obtidos de animais controle e capsaicina são capazes de gerar a mesma quantidade de ânion superóxido, nitrito e TNF- α em resposta a estímulos apropriados;

5. O tratamento crônico dos ratos com o composto 48/80 previne o aumento do influxo neutrofílico no grupo de animais tratados com capsaicina (desafiados com OVA) e restaura os níveis de TNF- α aos valores encontrados no grupo controle;

6. O tratamento neonatal com capsaicina aumenta significativamente o conteúdo de neutrófilos imaturos e maduros na medula óssea, sendo este aumento acompanhado por elevação da expressão de PPT-I e do receptor NK1;

7. A destruição do terminal nervoso sensorial pela capsaicina no período neonatal do rato e o conseqüente esgotamento de neuropeptídeos induz “up-regulação” de mastócitos pulmonares, levando-os a liberar quantidades exageradas de citocinas e do LTB₄ em resposta à exposição ao antígeno;

8. Neuropeptídeos liberados de fibras C sensíveis à capsaicina modulam a neutropoiese, provavelmente através da interação com o receptor NK₁.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências Bibliográficas

- AFAN, A.M.; BROOME, C.S.; NICHOLLS, S.E.; WHETTON, A.D.; MIYAN, J.A. Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. **Br J Haematol**, 98: 569-577, 1997.
- ALVING, K.; MATRAN, R.; LUNDBERG, J.M. The possible role of prostaglandin D2 in the long-lasting airways vasodilation induced by allergen in the sensitized pig. **Acta Physiol Scand**, 143: 93-103, 1991.
- ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A.; SONG, I.S.; QUINLAN, K.L.; OLERUD, J.E.; CAUGHMAN, S.W.; BUNNETT, N.W. Interactions of the skin and nervous system. **J Invest Dermatol Symp Proc**, 2: 23, 1997.
- AZZOLINA, A.; BONGIOVANNI, A.; LAMPIASI, N. Substance P induces TNF- α and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. **Biochim Biophys Acta**, 1643(1-3):75-83, 2003.
- BABIOR, B.M.; GOLDE, D.W. Production, distribution, and fate of neutrophils. In: **Haemathology**. Willians, Baeutler, Lichtman, Collier, Kipps, Seligshon (ed.), pp.753-759, Mac-Graw Hill, 2001.
- BAITON, D.F. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. In: **Haemathology**. Willians, Baeutler, Lichtman, Collier, Kipps, Seligshon (ed.), pp.729-743, Mac-Graw Hill, 2001.
- BARNES, P.J. Neural control of human airways in health and disease. **Am. Rev. Resp. Dis**, 134: 1289-1314, 1986.

BARNES, P.J. Sensory nerves, neuropeptides, and asthma. **Ann. NY Acad. Sci.** 629: 359-370, 1991.

BARNES, P.J. Modulation of neurotransmission in airways. **Physiol Rev**, 72:699-729, 1992.

BARNES, P.J. Neurogenic inflammation in the airways. **Respir Physiol**, 125:145-154, 2001.

BARTON, B.E. IL-6: insights into novel biological activities. **Clin Immunol Immunopathol**, 85:16-20, 1997.

BELVISI, M.G. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. **Pulm Pharmacol Ther**, 16:1-7, 2003.

BHALLA, D.K.; RASMUSSEN, R.E.; DANIELS, D.S. Adhesion and motility of polymorphonuclear leukocytes isolated from the blood of rats exposed to ozone: Potential biomarkers of toxicity. **Toxicol Applied Pharmacol**, 123: 177-186, 1993.

BLOM, H.M.; VAN RIJSWIJK, J.B.; GARRELD, I.M.; MULDER, P.G.; TIMMERMANS, T.; VAN WIJK, R. Intranasal capsaicin is efficacious in non-allergic, non-infectious perennial rhinitis. A placebo-controlled study. **Clin. Exp. Allergy**, 27: 796-801, 1997.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, 89: 3503-3521, 1997.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, 78: 206-209, 1982.

BROOME, C.S.; MIYAN, J.A. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production. A key axis for neuroimmunomodulation. **Ann. NY Acad. Science**, 917: 424-434, 2000.

BROWN, E. Neutrophil adhesion and therapy of inflammation. **Seminars in Hematology**, 4: 319-326, 1997.

BUCKLEY, T.L.; NIJKAMP, F.P. Airways hyperreactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Modulation by capsaicin-sensitive nerves. **Am J Respir Crit Care Med**, 149:400-7, 1994a.

BUCKLEY, T.L.; NIJKAMP, F.P. Mucosal exudation associated with a pulmonary delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Role for the tachykinins. **J Immunol**, 153:4169-78, 1994b.

BURNS, A.R.; JAMES, A.L.; GREENE, S.G.; SCHELLENBERG, R.R.; HOGG, J.C. Effect of airways sensory fiber network degeneration on airways permeability and responsiveness. **Exp Lung Res**, 18: 287-298, 1992.

BURNS, J.A.; ISSEKUTZ, T.B.; YAGITA, H.; ISSEKUTZ, A.C. The β_2 , α_4 , α_5 integrins and selectins mediate chemotactic factor and endotoxin-enhanced neutrophil sequestration in the lung. **Am J Pathol**, 158: 1809-1819, 2001a.

- BURNS, J.A.; ISSEKUTZ, T.B.; YAGITA, H.; ISSEKUTZ, A.C. The $\alpha 4\beta 1$ (very late antigen (VLA)-4, CD49/CD29) and $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate $\beta 2$ (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. **J Immunol**, 166: 4644-4649, 2001b.
- CALVO, W.; FORTEZA-VILA, J. On the development of bone marrow innervation in new born rats as studied with silver impregnation and electron microscopy. **Am J Anatomy**, 126: 355-372, 1969.
- CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor- α and leukotriene B_4 mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, 134: 1619-1628, 2001.
- CANNING, B.J.; FISCHER, A. Neural regulation of airway smooth muscle tone. **Respir Physiol**, 125(1-2):113-127, 2001.
- CAROLAN, E.J.; CASALE, T.B. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. **J Allergy Clin Immunol**, 92(4): 589-598, 1993.
- CARR, M.J.; UNDEM, B.J. Inflammation-induced plasticity of the afferente innervation of the airways. **Env Health Persp**, 109: 567-71, 2001.
- CATERINA, M.J.; JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Ann Rev Neurosci**, 24: 487-517, 2001.
- CHUNG, K.F.; BARNES, P.J. Cytokines in asthma. **Thorax**, 54: 825-857, 1999.
- CLARKE, C.J.; HALES, A.; HUNT, A.; FOXWELL, B.M. IL-10-mediated suppression of TNF- α production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. **Eur J Immunol**, 28: 1719-26, 1998.

CONDINO-NETO, A.; MUSCARÁ, M.N.; GRUMACH, A.S.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; DENUCCI, G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. **Br J Clin Pharmacol**, 35: 485-490, 1993.

CONDLIFFE, A.M.; CHILVERS, E.R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. **Immunology**, 89(1):105-111, 1996.

CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. **Biochem Pharmacol**, 66(1): 43-50, 2003.

COULSON, I.H ; HOLDEN, C.A. Cutaneous reaction to substance P and histamine in atopic dermatitis. **Br J Dermatol**, 122: 343-349, 1990.

CROOKS, S.W; STOCKLEY, R.A. Leukotriene B₄. **Int J Biochem Cell Biol**, 30:173-178, 1998.

CROSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheum**, 136(2): 147, 1993.

DAVENPECK, K.L.; STERBIMSKY, S.A.; BOCHNER, B.S. Rat neutrophils express α 4 and β 1 integrins and bind to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). **Blood**, 91: 2341-2346, 1998.

DAVIES, P. Macrophages In: **Textbook of immunopharmacology**. DALE, M. ; FOREMAN, J.C., (eds), pp. 64-74, Blackwell Scientific Publ, Oxford, 1994.

DELGADO, A.V.; MCMANUS, A.T.; CHAMBERS, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. **Neuropeptides**, 37(6):355-61, 2003.

DEVLIN, R.B., McDONNELL, W.F. BECKER, S., MADDEN, M.C., McGEE, M.P. PEREZ, R., HATCH, G., HOUSE, D.E., KOREN, H.S. Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lung of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, 138 (1): 176-185, 1996.

DENNIS, T.; FOURNIER, A.; ST PIERRE, S.; QUIRION, R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. **J Pharmacol Exp Ther**, 251:718-725, 1989.

DEWITT, D.L.; MEADE, E.A.; SMITH, W.L. – PGH synthase isoenzyme selectivity the potencial for safer nonsteroidal antinflammatory drugs. **Am J Med**, 95: 405-445, 1993.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats by different sites by carrageenin and turpentine. **J Pathol**. 104: 15-29, 1971.

DIANZANI, C.; COLLINO, M.; LOMBARDI, G.; GARBARINO, G.; FANTOZZI, R. Substance P increases neutrophil adhesion to human umbilical vein endothelial cells. **Br J Pharmacol**, 139(6):1103-1110, 2003.

DINI, D.; BERTELLI, G.; GOZZA, A.; FORNO, G.G. Treatment of the post-mastectomy pain syndrome with topical capsaicin. **Pain**, 54: 223-226, 1993.

DOERSCHUK, C.M.; WINN, R.K.; COXSON, H.O.; HARLAN, J.M. CD-18-dependent and independent mechanism of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation in rabbits. **J Immunol**, 144: 2327-2333, 1990.

FELTEN, D.L.; COHEN, N.; ADER, R.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; ROZMAN, T.L. Neurochemical links between the nervous and immune systems. In: **Psychoneuroimmunology**. ADER, R.; Felten, D.L.; Cohen, N. (eds), pp. 3-25, Academic Press, New York, 1991.

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L.; LORTON, D. Noradrenergic and peptidergic innervation of secondary lymphoid organs: role in experimental rheumatoid arthritis. **Eur J Clin Invest**, 22: 37-41, 1992.

FISCHER, A.; FOLKERTS, G.; GEPPETTI, P.; GRONEBERG, D.A. Mediators of asthma: nitric oxide. **Pulm Pharmacol Ther**, 15:73-81, 2002.

FOX, A.J.; BARNES, P.J.; URBAN L.; DRAY, A. An in vitro study of the properties of single vagal afferents innervating guinea-pig airways. **J Physiol**, 469:21-35, 1993.

FOX, A. J. A comparative discussion of A δ and C fibers in different tissues. In: **Pain and Neurogenic inflammation**. Brain, S.D.; Moore, P.K. (eds), pp. 1-22, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1999.

FREVERT, C.W.; HUANG, S.; DANAEI, H.; PAULAUSKIS, J.D.; KOBZIK, L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in

neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. **J Immunol**, 154: 335-344, 1995.

FRIESER, M.; HALLMANN, R.; JOHANSSON, S.; VESTWEBER, D.; GOODMAN, S.L.; SOROKIN, L. Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves $\beta 1$ integrins. **Eur J Immunol**, 26: 3127-3136, 1996.

FULLER, R.W. The role of the alveolar macrophages in asthma. **Respir Med**, 83: 177-178, 1989.

FUSCO, B.M.; FIORE, G.; GALLO, F.; MARTELLETTI, P.; GIACOVAZZO, M.

Capsaicin-sensitive sensory neurons in cluster headache: pathophysiological

aspects and therapeutic indication. **Headache**, 34(3):132-137, 1994.

GEPPETTI, P.; HOLZER, P. In: **Neurogenic inflammation**. Boca Raton, FL CRC Press, 1996.

GIBBS, B.F.; WIERECKY, J.; WELKER, P.; HENZ, B.M.; WOLFF, H.H.; GRABBE, J. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF- α and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. **Exp Dermatol**, 10(5): 312-320, 2001.

GORDON, S. Biology of the macrophage. **J Cell Sci Suppl**, 4: 267-286, 1986.

GUDMUNDSSON, G.; BOSCH, A.; DAVIDSON, B.L.; BERG, D.J.; HUNNINGHAKE, G.W. Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 19(5):812-818, 1998.

HAMID, Q.; TULIC', M.K.; LIU, M.C.; MOQBEL, R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. **J Allergy Clin Immunol**, 111:S5-S17, 2003.

- HARADA, A.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. **Mol Med Today**, 2(11): 482-489, 1996.
- HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; VERGHESE, M.W.; BARR, A.J.; ZHELEV, D.V.; SNYDERMAN, R. Function and regulation of chemoattractant receptors. **Immunol Res**, 22(2-3):271-279, 2000.
- HELYES, Z.; SZABO, A.; NEMETH, J.; JAKAB, B.; PINTER, E.; BANVOLGYI, A.; KERESKAI, L.; KERI, G.; SZOLCSANYI, J. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. **Arthritis Rheum**, 50(5):1677-85, 2004.
- HENRICKS, P.A; NIJKAMP, J. Reactive oxygen species as mediators in asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, 14: 409-421, 2001.
- HERD, C.M.; GOZZARD, N.; PAGE, C.P. Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. **Eur J Pharmacol**, 282:111-119, 1995.
- HERNANZ, A.; MUELAS, G.; BORBUJO, J. Plasma neuropeptide pattern in acute idiopathic urticaria. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 90: 198-200, 1989.
- HOLZER, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev**, 43: 143-200, 1991.

ISSEKUTZ, A.C.; ISSEKUTZ, T.B. The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leukocytes to inflammatory reactions in the rat. **Immunology**, 76: 655-661, 1992.

ISSEKUTZ, A.C.; ISSEKUTZ, T.B. A major portion of polymorphonuclear leukocytes and T lymphocyte migration to arthritic joints in the rat is via LFA-1/Mac-1-independent mechanisms. **Clin Immunol Immunopathol**, 67: 257-263, 1993.

ISSEKUTZ, T.B.; MIYASAKA, M.; ISSEKUTZ, A.C. Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation. **J Exp Med**, 183: 2175-2184, 1996.

IWAMOTO, I.; TOMOE, S.; TOMIOKA, H.; YOSHIDA, S. Substance P-induced granulocyte infiltration in mouse skin: the mast cell-dependent granulocyte infiltration by the N-terminal peptide is enhanced by the activation of vascular endothelial cells by the C-terminal peptide. **Clin Exp Immunol**, 87(2):203-207, 1992.

JANCSÓ, G.; JANCSÓ-GARBOR, A.; SZOLCSÁNTI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br J Pharmacol Chemother**, 31: 138-151, 1967.

JANCSÓ, G.; JANCSÓ-GARBOR, A.; TAKÁTS, I. Pain and inflammation induced by nicotine, acetylcholine and structurally related compounds and their prevention by desensitisation agents. **Acta Physiol Hung** 14: 113-131, 1961.

- JANCSO, G.; KIRALY, E. Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. **Brain Res**, 210:83-89, 1981.
- JIMBA, M.; SKORNIK, W.A.; KILLINGSWORTH, C.R.; LONG, N.C.; BRAIN, J.D.; SHORE, S.A. Role of C fibers in physiological responses to ozone in rats. **J Appl Physiol**, 78:1757-63, 1995.
- JOHNSTON, B.; CHEE, A.; ISSEKUTZ, T.B.; UGAROVA, T.; FOX-ROBICHAUD, A.; HICKEY, N.J.; KUBES, P. $\alpha 4$ integrin-dependent leukocyte recruitment does not require VCAM-1 in a chronic model of inflammation. **J Immunol**, 164: 3337-3344, 2000.
- KANEKO, T.; IKEDA, H.; FU, L.; NISHIYAMA, H.; MATSUOKA, M.; YAMAKAWA, H.O.; OKUBO, T. Capsaicin reduces ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med**, 150: 724-728, 1994.
- KAVANAUGH, A. Overview of cell adhesion molecules and their antagonism, In: **Adhesion Molecules in Allergic Disease**. Bochner, B.S. (ed), pp1, Marcel Dekker, New York, NY, 1997.
- KIPS, J.C.; TAVERNIER, J.; PAUWELS, R.A. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. **Am Rev Respir Dis**, 145(2 Pt 1):332-336, 1992.
- KOHL, J.; BITTER-SUERMAN, D. Anaphylotoxins. In: **Complement in health and diseases**. Whaley, K.; Loos, M.; Weiler, J.M. (eds), pp. 299-324, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1993.

KOTO, H.; AIZAWA, H.; TAKATA, S.; INOUE, H.; HARA, N. An important role of tachykinins in ozone-induced airway hyperresponsiveness. **Am J Respir Crit Care Med**, 151:1763-1769, 1995.

KUBES, P.; NIU, X.F.; SMITH, C.W.; KEHRLI, M.E.; REINHARDT, P.H.; WOODMAN, R.C. A novel β 1-adhesion pathway on neutrophils: A mechanism evoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. **FASEB J**, 9: 1103-1111, 1995.

LAITINEN, L.A.; HEINO M.; LAITINEN A.; KAVA T.; HAAHTELA T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **Am Rev Respir Dis**, 131:599-606, 1985.

LEVINE, J.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BASBAUM, A.I. The contribution of neurogenic inflammation to experimental arthritis. **J Immunol**, 135: 158-160, 1985.

LONG, N.C.; FREVERT, C.W.; SHORE, S.A. Role of C-fibres in the inflammatory response to intratracheal lipopolysaccharide (LPS). **Am J Physiol**, 271: L-425-431, 1996.

LORENZI, T.F. ; JAMRA, M. Sistema Hemopoiético. In: **Semiologia Médica**. PORTO, C.C. (ed.), pp. 961-968, Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 2001.

LOTZ, M.; VAUGHAN, J.H.; CARSON, D.A.. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. **Science**, 241: 1218-1221, 1988.

LOU, Y.P.; LEE, L.Y.; SATOH M. H.; LUNDBERG, J.M. Postjunctional inhibitory effect of the NK2 receptor antagonist, SR 48968, on sensory NANC bronchoconstriction in the guinea-pig. **Br J Pharmacol**, 109:765-73, 1993.

- LOW, P.A.; OPFER-GEHRKING, T.; DYCK, P.J.; LITCHY, W.J. Double blind, placebo-controlled study of the application of capsaicin cream in chronic distal painful polyneuropathy. **Pain**, 62: 163-168, 1995.
- LUKACS, N.W.; WARD, P.A. Inflammatory mediators, cytokines, and adhesion molecules in pulmonary inflammatory inflammation and injury. **Advances in Immunol**, 62: 257-304, 1996.
- LUKASZEWICZ, G.C.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Induction of cytokine-induced chemoattractant (CINC) mRNA in the lung of septic rats. **J Trauma**, 41: 222-230, 1996.
- LUNDBERG, J.M.; ALVING, K.; KARLSSON, J.A.; MATRAN, R.; NILSSON, G. Sensory neuropeptide involvement in animal models of airway irritation and of allergic-evoked asthma. **Am Rev Respir Dis**, 143: 1429-1431, 1991.
- LUNDBERG, J.M.; SARIA, A.; BRODIN, E.; ROSELL, S.; FOLKERS, K. A substance P antagonist inhibits vagally induced increase in vascular permeability and bronchial smooth muscle contraction in the guinea pig. **Proc Natl Acad Sci USA**, 80:1120-1124, 1983.
- MAGGI, C.A. Tachykinin receptors and airway pathophysiology. **Eur Respir J**, 6:735-742, 1993.
- MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (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.

MALAVIYA, R.; IKEDA, T.; ROSS, E.; ABRAHAM, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. **Nature**, 381: 77-80, 1996.

MANZINI, S.; MAGGI, C.A.; GEPPETTI, P.; BACCIARELLI, C. Capsaicin desensitization protects from antigen-induced bronchospasm in conscious guinea-pig. **Eur J Pharmacol**, 138: 307-308, 1987.

MATHIAK, G.; SZEWCZYK, D.; ABDULLAH, F.; OVADIA, P.; RABINOVICI, R. Platelet-activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. **Shock**, 7:391-404, 1997.

MEDEIROS, M.V.; DE LUCA, I.M.S.; BRICOLA, A.A.O.; ZANESCO, A.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Enhanced airways responsiveness in rats depleted of sensory neuropeptides by neonatal capsaicin treatment. **Neuroc Let**, 341: 103-106, 2003.

MEDEIROS, M.V.; MACEDO-SOARES, M.F.; DE LUCA, I.M.S.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Contribution of C-fibres to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in rat. **Eur J Pharmacol**, 421: 133-140, 2001.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiol Rev**, 77(4): 1033-79, 1997.

MILLER, M.L.; McCUSKEY, R.S. Innervation of bone marrow in the rabbit. **Scand J Haemato**, 10: 17, 1973.

- MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br J Pharmacol**, 128(6):1121-32, 1999.
- MIYAN, A.M.; NICHOLLS, A.S.; WHETTON, A.D.; BROOME, C.S. Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine hematopoietic system. **Exp Hematol**, 24: 495, 1996.
- MOORE, S.A.; STRIETER, R.M.; ROLFE, M.W.; STANDIFORD, T.J.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L. Expression and regulation of human alveolar macrophage-derived interleukin-1 receptor antagonist. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 6: 569-75, 1992.
- MORTOLA, J.; SANT'AMBROGIO, G.; CLEMENT, M.G. Localization of irritant receptors in the airways of the dog. **Respir Physiol**, 24:107-114, 1975.
- MULLER, W.A.; RADOLPH, G.J. Migration of leukocyte across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J Leukoc Biol**, 66: 698-704, 1999.
- MULLIGAN, M.S.; WARNER, R.L.; FOREBACK, J.L.; SHANLEY, T.P.; WARD, P.A. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. **J Immunol**, 159(7):3483-3489, 1997.
- NAKAGAWA, H.; ANDO, Y.; TAKANO, K.; SUNADA, Y. Differential production of chemokines and their role in neutrophil infiltration in rat allergic inflammation. **Int Arch Allergy Immunol**, 115: 137-143, 1998.

NAUKKRINEN, A.; NICKOLOFF, B.J.; FARBER, E.M. Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. **J Invest Dermatol**, 92: 126-129, 1989.

NICKEL, R.; BECK, L.A.; STELLATO, C.; SCHLEIMER, R.P. Chemokines and allergic diseases. **J.Allergy Clin Immunol**, 104: 723-742, 1999.

NICOSIA, S.; CAPRA, V.; ROVATI, G.E. Leukotrienes as mediators of asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, 14:3-19, 2001.

NILSSON, G.; ALVING, K.; AHLSTEDT, S. Effects on immune responses in rats after neuromanipulation with capsaicin. **Int J Immunopharmacol**, 13: 21-26, 1991.

NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE, K.; HARAKAWA, N; TAKANO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **J Leuk Biol**, 62: 203-209, 1997.

NOURSHARGH, S.; RAMPART, M.; HELLEWELL, P.G.; JOSE, P.J.; HARLAN, J.M.; EDWARDS, A.J.; WILLIAMA, T.J. Accumulation of ¹¹¹In-neutrophils in rabbit skin in allergic and non-allergic inflammatory reactions in vivo. Inhibition by neutrophil pretreatment in vivo with monoclonal antibody recognizing the CD18 antigen. **J Immunol**, 142: 3193-3198, 1989.

NÜSING, R.M.; BARSING, J. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. **Br J Pharmacol**, 127: 919-926, 1999.

O'BRIEN, C.D.; LIM, P; SUN, J.; ALBEDA, S.M. PECAM-1-dependent neutrophil transmigration is independent of monolayer PECAM-1 signaling or localization. **BLOOD**, 101: 2816-2825, 2003.

O'LEARY, E.C.; ZUCKERMAN, S.H. Glucocorticoid-mediated inhibition of neutrophil emigration in an endotoxin-induced rat pulmonary inflammation model occurs without an effect on airways MIP-2 levels. **Am J Cell Mol Biol**, 16: 267-274, 1997.

OLEJNIK, A.K., BRZEZINSKA-BLASZCZYK, E. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) modulates rat mast cell reactivity. **Immunol Lett**, 64(2-3):167-171, 1998.

PIGOTT, R.; POWER, C. In: **The adhesion molecule**. Facts Book. Academic Press London, 1994.

QUINLAN, K.L.; SONG, I.S. ; NAIK, S.M.; LETRAN, E.L.; OLERUD, J.E; BUNNETT, N.W ; ARMSTRONG, C.A.; CAUGHMAN, S.W.; ANSEL, J.C. VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P. **J Immunol**, 162: 165-1661, 1999.

RAMESHWAR, P.; GANEA, D.; GASCÓN, P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. **Blood**, 81: 391-398, 1993a.

RAMESHWAR, P.; GASCÓN, P; GANEA, D. Stimulation of interleukin 2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. **J Immunol**, 151: 2484-2496, 1993b.

RAMESHWAR, P.; GANEA, D; GASCÓN, P. Induction of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by substance P in bone marrow cells in partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. **J Immunol**, 152: 4044-4054, 1994.

RAMESHWAR, P; GASCÓN, P. Regulation of substance P (SP)-like receptors in CD34+ cells by cytokines and neurotrophic factors. **FASEB J**, 1432: 248, 1994.

RAMESHWAR, P.; GASCÓN, P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma. Potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. **Blood**, 86: 482-490, 1995.

RAMESHWAR, P.; GASCÓN, P. Neural regulation of hematopoieses by the tachykinins. Implications for a fine tuned hematopoietic regulation. In: **Molecular Biology of Hematopoiesis**. Abraham, N.G.; Asano, S.; Brittinger, G. and Shadduck, R. (eds), pp 463-470, Plenum Press, NY, 1996.

RAMESHWAR, P.; GASCÓN, P. Hematopoietic modulation by the tachykinins. **Acta Haematol**, 98: 59-64, 1997.

RAMESHWAR, P.; PODDAR, A.; GASCON, P. Hematopoietic regulation mediated by interactions among the neurokinins and cytokines. **Leuk Lymphoma**, 28(1-2):1-10, 1997.

REINHARDT, P.H.; ELLIOT, J.F.; KUBES, P. Neutrophils can adhere via $\alpha 4\beta 1$ -integrin under flow conditions. **Blood**, 89: 3837, 1997.

- RICCIARDOLO, F.M.L.; RADO, V.; FABBRI, L.M.; STERK, P.J.; DI MARIA, G.U.; GEPPETTI, P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, 159(2): 557-562, 1999.
- RICCIO, M.M.; MANZINI, S.; PAGE, C.P. The effect of neonatal capsaicin on the development of bronchial hyperresponsiveness in allergic rabbits. **Eur J Pharmacol**, 232(1):89-97, 1993.
- RICCIO, M.M.; MYERS, A.C.; UNDEM, B.J. Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway. **J Physiol**, 491:499-509, 1996.
- RICHARDS, K.L.; MCCULLOUGH, J.M. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunol Commun**, 13: 49-62, 1984.
- ROCH-ARVEILLER, M.; REGOLI, D.; CHANAUD, B.; LENOIR, M.; MUNTANER, O.; STRALZKO, S.; GIROUD, J.P. Tachykinins: effects on motility and metabolism of rat polymorphonuclear leucocytes. **Pharmacology**, 33(5): 266-273, 1986.
- ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, 90: 909-928, 1997.
- SAAVEDRA, Y.; VERGARA, P. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. **Regul Pept**, 111(1-3):67-75, 2003.
- SABAN, M.R.; SABAN, R.; BJORLING, D.; HAAK-FRENDSCHO, M. Involvement of leukotrienes, TNF- α , and the LFA-1/ICAM-1 interaction in substance P-induced granulocyte infiltration. **J Leukoc Biol**, 61: 445-451, 1997.

SALEH, D.; ERNST, P.; LIM, S.; BARNES, P.J.; GIAID, A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. **FASEB J**, 12 (11):929-937, 1998.

SANDERSON, J.H. e PHILLIPS, C.E. Rats. In: **An atlas of laboratory animal haematology**. Sanderson, J.H.; Phillips, C.E. (eds), pp. 38-87, Clarendon Press. Oxford, 1981.

SCHAUBLE, T.L.; BOOM, W.H; FINEGAN, C.K.; RICH, E.A. Characterization of suppressor function of human alveolar macrophages for T lymphocyte responses to phytohemagglutinin: cellular selectivity, reversibility, and early events in T cell activation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 8(1): 89-97, 1993.

SCHLEIMER, R.P.; RUTLEDGE, B.K. Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. **J Immunol**, 136(2):649-54, 1986.

SHANLEY, T.P.; PETERS, J.L.; JONES, M.L.; CHENSUE, S.W.; KUNKEL, S.L.; WARD, P.A. Regulatory effects of endogenous interleukin-1 receptor antagonist protein in immunoglobulin G immune complex-induced lung injury. **J Clin Invest**, 15;97(4):963-70, 1996.

SHANLEY, T.P.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H.P.; JONES, M.L.; WARD, P.A. Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. **J Immunol**, 154(7):3454-3460, 1995.

SHANLEY, T.P.; SCHMAL, H.; WARNER, R.L.; SCHMID, E.; FRIEDL, J.P.; WARD, P.A. Requirement for CXC-chemokines (macrophage inflammatory

protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. **J Immunol**, 158: 3439-3448, 1997.

SHANLEY, T.P.; VASI, N.; DENENBERG, A. Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. **Cytokine**, 12(7):1054-1064, 2000.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). **Cytokine**, 12(9):1368-73, 2000.

STERNER-KOCK, A.; VESELY, K.R.; STOVALL, M.Y.; SCHELEGLE, E.S.; GREEN, J.F.; HYDE, D.M. Neonatal capsaicin treatment increases the severity of ozone-induced lung injury. **Am J Respir Care Med**, 153: 436-443, 1996.

STRUNK, R.C.; EIDLEN, D.M.; MASON, R.J. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. **J Clin Invest**, 81: 1419-1426, 1988.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, 51(2):159-212, 1999.

SZOLCSÁNYI, J.; JANCOS-GABOR, A.; JOO, F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. **Naunyn Schmied Arch Pharmacol**, 287(2): 157-69, 1975.

TAKEBAYASHI, T.; ABRAHAM, J.; MURTHY, G.G.; LILLY, C.; RODGER, I.; SHORE, S.A. Role of tachykinins in airway responses to ozone in rats. **J Appl Physiol**, 85(2):442-50, 1998.

TANAKO, K.; AL-MOKDAD, M.; SHIBATA, F.; TSUCHIYA, H.; NAKAGAWA, H. Rat macrophage inflammatory protein-1 α , a CC chemokine, acts as a neutrophil chemoattractant in vitro and in vivo. **Inflammation**, 23: 411-424, 1999.

TESSIER, P.A.; NACCACHE, P.H.; CLARK-LEWIS, I.; GLADUE, R.P.; NEOTE, K.S.; MCCOLL, S.R. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF- α . **J. Immunol**, 159(7): 3595-602, 1997.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiol Rev**, 73(4):797-821, 1993.

THOMMESEN, L.; SJURSEN, W.; GASVIK, K.; HANSSEN, W.; BREKKE, O.L.; SKATTEBOL, L.; HOLMEIDE, A.K.; ESPEVI, T.; JOHANSEN, B.; LAEGREID, A. Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. **J Immunol**, 161(7):3421-30, 1998.

TIBÉRIO, I.F.L.C.; TURCO, G.M.G.; LEICK-MALDONADO, E.A.; SAKAE, R.S.; PAIVA, P.S.O.; WARTH, M.P.T.N.; LAPA E SILVA, J.R.; SALDIVA, P.H.N., MARTINS, M.A. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. **Am J Respir Crit Care Med**, 155: 1739-1747, 1997.

TREZENA, A.G.; DA SILVA, Z.L.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DAMAZO, A.S.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; OLIANI, S.M.; DE LIMA, W.T. Differential regulation of the release of tumor necrosis factor- α and of eicosanoids by mast cells in rat airways after antigen challenge. **Mediators Inflamm**, 12(4): 237-46, 2003.

- VAN DER VIEREN, M.; CROWE, D.T.; HOEKSTRA, D.; VAZEUX, R.; HOFFMAN, P.A.; GRAYSON, M.H.; BOCHNER, B.S.; GALLATIN, W.M.; STAUNTON, D.E. The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1. **J Immunol**, 163(4):1984-90, 1999.
- VAN EEDEN, S.F.; KLUT, M.E.; WALKER, B.A.; HOGG, J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **J Immunol Methods**, 232(1-2):23-43, 1999
- VESTWEBER, D. e BLANKS, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol Rev**, 79(1): 181-213, 1999.
- WAGNER, F.; FINK, R.; HART, R.; DANCYGIER, H. Substance P enhances interferon- γ production by human peripheral blood mononuclear cells. **Regul Pept**, 19: 355, 1987.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanism, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, 52: 349-374, 2000.
- WEIHE, E.; NOHR, D.; MICHEL, S.; MULLER, S.; ZENTEL, H.J.; FINK, T.; KREKEL, J. Molecular anatomy of the neuro-immune connection. **Int. J. Neuroscience**, 59: 1-23, 1991.
- WILLIAMS, C.M.; GALLI, S.J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. **J Exp Med**, 7; 192(3): 455-62, 2000.
- WINN, R.K.; HARLAN, J.M. CD18-independent neutrophil and mononuclear leukocyte emigration into the peritoneum of rabbits. **J Clin Invest**, 92: 1168-1173, 1993.

WOOD, J.N. **Capsaicin in the study of pain**. Academic Press, San Diego , C.A., 1993.

YAMAZAKI, K.; ALLEN, T.D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the 'neuroreticular complex'. **Am J Anatomy**, 187: 261-276, 1990.

YANO, H.; WERSHIL, B.K.; ARIZONO, N.; GALLI, S.J. Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. **J Clin Invest**, 84(4): 1276-1286, 1989.

YATES, D.H.; BARNES, P.J.; THOMAS, P.S. Tumor necrosis factor α alerts human bronchial reactivity and induces inflammatory cell influx. **Am Rev Respir Dis** 147: A1001, 1993.

ZIMMERMAN, G.A; ELSTAD, M.R.; LORANT, D.E; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.N.; TOPHAM, M.K.; WEYRICH, A.S.; WHATLEY, R.E. Platelet-activating factor (PAF) signaling and adhesion in cell-cell interactions. **Adv Exp Med Biol**, 416: 269-304, 1996.