

Alessandra Linardi

**PARTICIPAÇÃO DE FIBRAS SENSORIAIS NA
RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA
PELA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA
DO TIPO B EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Orientador: Dr. Edson Antunes

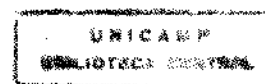
Departamento de Farmacologia

Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

Universidade Estadual de Campinas

Campinas

1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	EL
TEMPER	39,859
PRG	278/00
C	☐
D	☒
PREC	28,11,00
DATA	11/01/00
N.º CPD	

CM-00137815-3

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

L632p

Linardi, Alessandra

"Participação de fibras sensoriais na resposta edematogênica induzida pela enterotoxina estafilócica do tipo B em camundongos" / Alessandra Linardi. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Edson Antunes

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

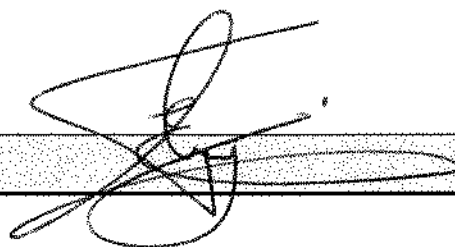
I. Inflamação. 2. Edema. 3. Bradicinina. 4. Toxinas. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

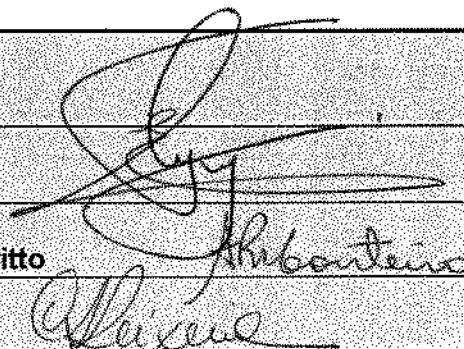
A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dr. Edson Antunes, is written over the horizontal line separating the supervisor's name from the members' list.

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antunes

2. Profa. Dra. Alba Regina Maria Souza Britto

3. Profa. Dra. Catarina Fátima Pereira

Two handwritten signatures in black ink are visible to the right of the members' list. The top signature is more complex and loops, while the bottom signature is more fluid and cursive. They correspond to the second and third members of the committee.

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

Data: 04/10/99

NOTA DO ORIENTADOR

O projeto de pesquisa que norteou esta tese foi idealizado e supervisionado nos dois primeiros anos pela Profa. Glaci Ribeiro da Silva, após o qual, a Profa., por motivos pessoais, desligou-se desta Universidade. Desde então, a mestrandia Alessandra Linardi passou para minha orientação direta, sendo esta mudança com anuência da Sub-Comissão de Pós-Graduação em Farmacologia (FCM/UNICAMP) e FAPESP. No período em que esteve sob minha orientação, tomei a liberdade de dar outro rumo ao projeto originalmente proposto, sendo justo dizer que o projeto foi recomeçado. Apesar disso, a idéia original prevaleceu, o projeto foi finalizado e a tese escrita. Dessa forma, tomo a liberdade de compartilhar com a Profa. Glaci tanto os méritos quanto as críticas dirigidas a este trabalho.

“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se eu insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que eu acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.”

(Gandhi)

*À todos aqueles que colaboraram de alguma
forma para a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela oportunidade, ensinamentos e especialmente pela paciência e incentivo. Através dele aprendi o verdadeiro valor da pesquisa.

À FAPESP e FAEP, pelo apoio financeiro.

À Soraia Katia Pereira Costa, pela valiosa colaboração para a realização deste trabalho.

À Carla Fernanda Franco Penteado e Ivani Aparecida de Souza, pela ajuda, amizade, companheirismo e alegria que me dedicaram em todos os momentos, inclusive os mais difíceis.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, bem como aos demais funcionários, de modo especial à Dora, Gislaine, Rita, Wanderlei e Elizeu pela ajuda e amizade.

Ao Miguel Borges da Silva, pelo cuidado com que trata os nossos animais.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo e educação que me dedicaram, desde os primeiros passos de minha vida.

Ao querido Edson Rabello de Abreu, pelo companheirismo, incentivo, cumplicidade e amor dedicados.

A Deus, que sempre iluminou os meus passos em todos os instantes da minha jornada.

Aos animais, sacrificados para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	i
LISTA DE DROGAS.....	xi
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mediadores neurogênicos envolvidos na inflamação cutânea.....	4
1.2. Substâncias que inibem ou estimulam as fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina (CSPA).....	6
1.3. Envolvimento do sistema endócrino na resposta inflamatória.....	11
1.4. Fisiopatologia e farmacologia das enterotoxinas.....	13
1.5. Objetivos.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. Animais.....	18
2.2. Enterotoxina estafilocócica do tipo B (SEB).....	18
2.3. Medida do edema de pata e da exsudação de azul de Evans.....	18
2.4. Indução do diabetes.....	19
2.5. Protocolos experimentais.....	19
2.6. Drogas.....	22
2.7. Análise estatística.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. Efeito do SR140333 e SR48968 sobre a resposta edematogênica da SEB.....	25
3.2. Efeito da co-injeção de CGRP e SEB.....	28
3.3. Efeito do HOE 140 sobre a resposta edematogênica da SEB.....	31
3.4. Efeito do SR140333 e HOE 140 sobre a resposta edematogênica da SEB.....	34
3.5. Efeito do SR140333 sobre a resposta edematogênica da bradicinina.....	36
3.6. Efeito da capsazepina sobre a resposta edematogênica da SEB.....	38
3.7. Efeito da mepiramima e metisergida sobre a resposta edematogênica da SEB.....	41
3.8. Efeito da insulina sobre a resposta edematogênica da SEB.....	45
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	56
6. SUMMARY.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig.1. Efeito dos antagonistas de receptores NK₁ (SR140333) e NK₂ (SR48968) sobre o edema induzido pelo agonista NK₁ (GR73632) ou SEB.

26

Fig.2. Efeito dos antagonistas de receptores NK₁ (SR140333) e NK₂ (SR48968) sobre a exsudação plasmática induzida pelo agonista NK₁ (GR73632) ou SEB.

27

Fig.3. Efeito da co-injeção de CGRP sobre o edema induzido pelo agonista de receptores NK₁ (GR73632) ou SEB.

29

Fig.4. Efeito da co-injeção de CGRP sobre a exsudação plasmática induzida pelo agonista de receptores NK₁ (GR73632) ou SEB.

30

Fig.5. Efeito do antagonista de receptores B₂ (HOE 140) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela bradicinina.

32

Fig.6. Efeito do antagonista de receptores B₂ (HOE 140) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB.

33

Fig.7. Efeito da administração simultânea dos antagonistas de receptores NK₁ (SR140333) e B₂ (HOE 140) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB.

35

Fig.8. Efeito do antagonista de receptores NK₁ (SR140333) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela bradicinina.

37

Fig.9. Efeito do antagonista de receptores vanilóides (capsazepina) sobre o edema induzido pela capsaicina.

39

Fig.10. Efeito do antagonista de receptores vanilóides (capsazepina) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB.

40

Fig.11. Efeito do antagonista de receptores H_1 (mepiramina) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela histamina.

42

Fig.12. Efeito do antagonista de receptores 5-HT (metisergida) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela serotonina.

43

Fig.13. Efeito dos antagonistas de receptores H_1 (mepiramina) e 5-HT (metisergida) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB.

44

Fig.14. Efeito do tratamento com insulina sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB.

46

Fig.15. Efeito do tratamento com insulina sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela capsaicina.

47

Tab.1. Efeito do tratamento com insulina sobre a glicemia de animais não diabéticos e diabéticos.

48

RESUMO

Neste trabalho, investigou-se a participação de fibras sensoriais no aumento de permeabilidade vascular e na formação de edema induzidos pela SEB (enterotoxina estafilocócica do tipo B) (25 µg/pata) em camundongos.

O tratamento dos animais com o SR140333 (antagonista de receptores NK₁; 120 nmoles/Kg, s.c. + 120 nmoles/Kg, i.v.) inibiu significativamente o edema e a exsudação (35 e 37%, respectivamente) induzidos pela SEB. Da mesma forma, o edema e a exsudação plasmática induzidos pelo GR73632 (agonista de receptores NK₁; 50 pmoles/pata) foram significativamente reduzidos pelo SR140333 (40 e 88%, respectivamente). Ao contrário, o tratamento endovenoso com SR48968 (antagonista de receptores NK₂; 1,7 µmoles/Kg) não alterou o edema e a exsudação causados pela SEB (ou GR73632) em relação aos seus respectivos controles.

O edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB não se alteraram, significativamente, pela co-injeção de CGRP (100 e 300 pmoles/pata). Por outro lado, o edema evocado pelo GR73632 (50 pmoles/pata) foi significativamente potencializado pelo CGRP em ambas as doses.

No grupo de animais tratados com o HOE 140 (antagonista de receptores B₂; 400 nmoles/Kg, i.v.) observou-se redução significativa do edema e da exsudação plasmática induzidos pela SEB (35 e 34%, respectivamente). Da mesma forma, o edema e a exsudação plasmática evocados pela bradicinina (3 nmoles/pata) foram significativamente reduzidos (69 e 94%, respectivamente) pelo tratamento com o HOE 140. O tratamento prévio dos animais com a mistura de antagonistas, SR140333 (120

nmoles/Kg; s.c. + 120 nmoles/Kg; i.v.) e HOE 140 (400 nmoles/Kg; i.v.), reduziu significativamente o edema e a exsudação evocados pela SEB. Entretanto, a inibição, embora significativa, não foi maior do que aquela observada pelo SR140333 ou HOE 140, administrados isoladamente. Além disso, o SR140333 reduziu significativamente o edema (62%) e a exsudação (49%) evocados pela bradicinina (3 nmoles/pata).

O edema e a exsudação plasmática causados pela SEB no grupo tratado com a capsazepina (antagonista de receptores vanilóides; 100 μ moles/Kg; s.c.) foi significativamente menor (53 e 45%, respectivamente), em relação ao grupo controle. A capsazepina (50 e 100 μ moles/Kg; s.c.) reduziu, em ambas as doses, o edema induzido pela capsaicina (5 μ g/pata), em relação ao grupo controle (50 e 67 %, respectivamente).

No grupo tratado com mepiramina (antagonista de receptores H_1 ; 10 mg/Kg, i.v.) ou metisergida (antagonista de receptores 5-HT; 10 mg/Kg, i.v.), observou-se que o edema evocado pela SEB foi reduzido significativamente, quando comparado aos respectivos grupos-controle (40 e 60%, respectivamente). A exsudação plasmática nos animais tratados com mepiramina e metisergida foi reduzida em 25 e 63%, respectivamente. O tratamento com mepiramina ou metisergida reduziu o edema e a exsudação induzidos tanto pela histamina (100 μ moles/pata), quanto pela serotonina (100 μ moles/pata), respectivamente.

Em animais diabéticos, observou-se que o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB estavam reduzidos, em relação aos animais não diabéticos (75 e 50%, respectivamente); o mesmo foi observado com o edema e com a exsudação plasmática evocados pela capsaicina (3,2 μ g/pata) (56 e 77%, respectivamente). O tratamento prévio dos animais com insulina

(20 UI/Kg; s.c.) corrigiu a hiperglicemia, mas não promoveu alterações significativas na resposta inflamatória induzida pela SEB ou capsaicina.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a SEB causa uma resposta inflamatória neurogênica complexa, que envolve geração local de cininas, ativação de receptores vanilóides e degranulação de mastócitos.

LISTA DE DROGAS

DROGA	PROCEDÊNCIA
Aloxano	Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, E.U.A.)
Azul de Evans	Sigma
Bradicinina	Sigma
Capsaicina	Sigma
Capsazepina	Research Biochem. Inc. (E.U.A.)
Etanol	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Éter etílico	Chemco (Campinas, Brasil)
Éter sulfúrico	Chemco
Formamida	Merck (Darmstadt, Alemanha)
CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina)	Sigma
GR73632	Cedido pela Dra. S.D. Brian, King's College (Londres, R.U.)
Histamina	Sigma
HOE 140	Hoechst A.G. (Frankfurt, Alemanha)
Insulina (Monotard MC*)	Novo Nordisk (Araucária, Brasil)

Mepiramina	Sterilin (Inglaterra, R.U.)
Metanol	Synth (Diadema, Brasil)
Metisergida	Sandoz S.A. (Bale, Suíça)
SEB (enterotoxina estafilocócica tipo B)	Sigma
Serotonina	Sigma
SR140333	Cedido pela Dra. S.D Brain, King's College (Londres, R.U.)
SR48968	Sanofi Recherche (Montpellier, França)
Tween 80	Sigma

1. Introdução

A inflamação neurogênica é definida como uma resposta local, decorrente da liberação de certos transmissores de terminais de fibras sensoriais, em resposta a estímulos químicos, térmicos ou mecânicos (IANGLEY, 1923; JANCÓS *et al.*, 1967; LEMBECK & HOLZER, 1979). Através de trabalhos pioneiros de BAYLISS (1901) e BRUCE (1913), demonstrou-se que terminações nervosas de determinados neurônios, quando estimuladas, causavam alterações vasculares periféricas. Propôs-se, na ocasião, que essas alterações eram resultantes de impulsos nervosos que se propagavam no sentido eferente (ativação retrógrada) do neurônio sensorial aferente primário. Com base nisto, introduziu-se o conceito de vasodilatação neurogênica, bem como a terminologia 'antidrômica' para designar tais efeitos.

A partir dos anos sessenta, estabeleceu-se que as alterações vasculares periféricas, promovidas pela estimulação de fibras sensoriais aferentes primárias, eram dependentes da liberação de certos mediadores (neuropeptídeos) e independentes da liberação de noradrenalina e acetilcolina (JANCÓS *et al.*, 1967; SZOLCSÁNYI *et al.*, 1975). Desde então, essas fibras passaram a ser conhecidas como fibras NANC (não-adrenérgica e não-colinérgica).

Atualmente, uma parte dos neurônios NANC é conhecida como neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina (CSPAN; capsaicin-sensitive primary afferent neurons), os quais foram assim classificados para designar uma classe de neurônios susceptíveis à ação excitatória ou inibitória da capsaicina sobre as fibras sensoriais desmielinizadas do tipo C e as mielinizadas do tipo A δ e A β (JANCÓS *et al.*, 1967; SZOLCSÁNYI, 1977; CERVERO & LAIRD, 1991; HOLZER, 1991; HANDWERKER & KOBAL, 1993).

Em geral, as fibras CSPA originam-se do gânglio da raiz dorsal ou gânglio

trigeminal. Os neurônios da raiz dorsal entram no sistema nervoso central, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, enquanto os neurônios do gânglio trigeminal fazem sinapses com neurônios de segunda ordem no núcleo espinhal do trato trigeminal (HAMMOND & YAKSH, 1983; BESSON & CHAOUCH, 1987). Geralmente, os neurônios CSPA transmitem a informação nociva (usualmente percebida como queimação ou dor) para o sistema nervoso central (função aferente), enquanto suas terminações são sítios de liberação de uma variedade de peptídeos (função eferente) (FOREMAN, 1987). As fibras CSPA estão amplamente distribuídas no organismo incluindo o tecido cutâneo, trato gastrointestinal e genitourinário, vias aéreas, coração e outros (MAGGI, 1995).

De modo geral, os transmissores liberados dos terminais CSPAN são peptídeos, representados principalmente pelas taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais desempenham diferentes papéis fisiopatológicos. As respostas inflamatórias mediadas pela liberação destes mediadores incluem vasodilatação, aumento da permeabilidade venular com conseqüente formação de edema e ativação de diversos tipos celulares incluindo leucócitos, fibroblastos (HOLZER *et al.*, 1995; HOLZER, 1998) e mastócitos (LEMBECK & HOLZER, 1979; GAMSE & SARIA, 1987; MAGGI, 1991; 1995)

Do ponto de vista fisiopatológico, os neuropeptídeos participam de vários processos inflamatórios como neuralgia pós-herpes, pruridos nodulares, urticárias (HERNANZ *et al.*, 1989; MAGGI, 1995), psoríase (NAUKKARINEN *et al.*, 1989), dermatites atópicas, dermatites de contato (COULSON & HOLDEN, 1990; MAGGI, 1995) e neuropatia diabética (HOLZER, 1988; MAGGI, 1995). A liberação local destes neuropeptídeos está

também relacionada a alterações hemodinâmicas e vasculares periféricas (BÜNKER *et al.*, 1993), cicatrização de feridas e manutenção da integridade da pele (SENEPATI *et al.*, 1986; MAGGI, 1995). Além disso, tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas, os neuropeptídeos sensoriais modulam, de forma eficiente, mecanismos relacionados a funções celulares imunológicas, incluindo proliferação e produção de citocinas (SCHOLZEN *et al.*, 1998).

1.1. Mediadores neurogênicos envolvidos na inflamação cutânea

1.1.1. Taquicininas

Os peptídeos substância P (SP), a neurocinina A (NKA) e a neurocinina B (NKB) são membros da família das taquicininas e possuem grande homologia química entre si (MAGGI, 1995). Tanto a SP quanto a NKA são os principais mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular. A SP, particularmente, é muito ativa em relação à capacidade de produzir extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema na pele de espécies variadas, incluindo a humana (BRAIN, 1996). Além disso, a SP apresenta um importante papel na transmissão da dor (GEPPETTI *et al.*, 1988). Este peptídeo atua sobre mastócitos, promovendo liberação de histamina e serotonina (HUGHES *et al.*, 1990). Acredita-se que o efeito estimulante da SP sobre os mastócitos não seja um fenômeno dependente de receptores, mas sim da interação direta das cargas catiônicas desse peptídeo com componentes aniônicos, presentes na membrana dos mastócitos (HOLZER, 1992).

Até o presente, descreveram-se três subtipos de receptores NK, acoplados a proteína G, denominados NK₁, NK₂ e NK₃ (PATAACCHINI & MAGGI, 1995; WHITTY *et al.*, 1995). Em geral, a SP possui maior afinidade pelo receptor NK₁, a NKA pelos receptores NK₁ e NK₂, e a NKB pelo receptor NK₃ (HOLZER, 1998). O subtipo NK₁ está amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico. No sistema nervoso central, este receptor regula as atividades relacionadas com comportamento, degeneração e manutenção neuronal, função respiratória e cardiovascular. No sistema nervoso periférico, esse receptor é largamente expresso nos tratos respiratório, gastrointestinal, geniturinário e em vários tipos de células imunológicas e inflamatórias. Recentemente, alguns trabalhos relatam a ação de compostos não peptídicos que atuam como antagonistas seletivos para as taquicininas. Dentre esses, demonstrou-se que o SR140333 é um potente antagonista de receptores NK₁, enquanto que o SR48968 antagoniza os receptores NK₂ (EMONDS-ALT *et al.*, 1992, 1993; DRAY *et al.*, 1994). Da mesma forma, agonistas seletivos de receptores NK₁, tais como o GR73632 foram desenvolvidos e estão sendo largamente utilizados na pesquisa experimental (ANDREWS *et al.*, 1989; ANDOH *et al.*, 1998). O emprego dessas substâncias tem sido de grande utilidade para o estudo do papel fisiopatológico dos receptores de taquicininas.

1.1.2. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

O CGRP foi um dos primeiros exemplos de neuropeptídeos descobertos por meio de técnicas de biologia molecular nos anos oitenta. Tanto no homem quanto no rato, duas formas moleculares desse peptídeo foram isoladas: CGRP- α ou CGRP-I (AMARA *et al.*, 1982, ROSENFELD *et al.*, 1983) e CGRP- β ou

CGRP-II (AMARA *et al.*, 1985; BREIMER, *et al.*, 1988), sendo as duas formas semelhantes em suas atividades biológicas. Considerado o principal mediador da vasodilatação neurogênica na pele (HOLZER, 1992), o CGRP exerce uma prolongada e potente ação vasodilatadora, via estimulação dos receptores CGRP-I ou CGRP-II (DENNIS *et al.*, 1989; 1990). Achados histoquímicos revelaram que o CGRP está presente em fibras nervosas aferentes que inervam os vasos sanguíneos do corpo inteiro, sendo que a quantidade destas fibras é maior em artérias do que em veias (HOLZER, 1992).

1.1.3. Outros mediadores neurogênicos

Além da SP e CGRP, outras substâncias biologicamente ativas foram identificadas nos terminais nervosos CSPA, incluindo o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP), o peptídeo pituitário ativador da adenil ciclase relacionado ao VIP (PACAP), a galanina, a secretoneurina, o fator liberador de corticotrofina, somatostatina, o óxido nítrico e os nucleotídeos purinérgicos (BRAIN, 1996; KHAKH & KENNEDY, 1998).

1.2. Substâncias que inibem ou estimulam as fibras sensoriais CSPA

1.2.1. Capsaicina

A capsaicina, substância purificada a partir do fruto da pimenta *Capsicum annuum*, tem a capacidade de estimular neurônios sensoriais, promovendo, conseqüentemente, liberação de quantidades significativas de neuropeptídeos (JANCSÒ *et al.*, 1980; HOLZER, 1988). Assim, a administração local de capsaicina na pele, em baixas doses, causa inflamação neurogênica, caracterizada por vasodilatação arteriolar e extravasamento

plasmático em vênulas pós-capilares. Em doses elevadas, a capsaicina provoca depleção dos estoques desses neuropeptídeos, podendo levar a total degeneração dos terminais nervosos (JANCSÓ *et al.*, 1967). Em vista disso, a capsaicina tem sido largamente empregada para estudar o envolvimento de fibras sensoriais em diferentes ações fisiopatológicas (HOLZER, 1991).

Os efeitos fisiopatológicos da capsaicina são mediados pelos chamados receptores vanilóides, assim denominados pela alta afinidade para grupos químicos do tipo vanilil (HOLZER, 1991). Estes receptores são comumente encontrados em terminais nervosos das fibras sensoriais (SZALLASI, 1994), embora estudos recentes relatam a existência dos mesmos em núcleos cerebrais (SASAMURA *et al.*, 1998), mastócitos (BIRÓ *et al.*, 1998a) e células da glia (BIRÓ *et al.*, 1998b). Além da capsaicina, outras substâncias que contêm o grupo vanilil, entre elas a resiniferatoxina (extraída da planta *Euphorbia resinifera*), são também capazes de ativar os receptores vanilóides (SZALLASI & BLUMBERG, 1990; SZALLASI *et al.*, 1999). Estes receptores dividem-se em duas classes, os do tipo C (ativados preferencialmente pela capsaicina) e receptores tipo R (ativados preferencialmente pela resiniferatoxina) (ÁCS *et al.*, 1997; BIRÓ *et al.*, 1997; SZALLASI, 1997). A resiniferatoxina é cerca de vinte vezes mais potente do que a capsaicina para ativar o receptor R. Um subtipo de receptor vanilóide (VR1) pertencente ao tipo C foi recentemente clonado (CATERINA *et al.*, 1997). Em pata de rato, demonstrou-se que a capsaicina altera a captação de oxigênio e causa vasoconstrição. Os autores atribuíram estes efeitos à ativação de receptores, por eles denominados, VN₁ e VN₂ (COLQUHOUN *et al.*, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 1996).

Dessa forma, através da ação de análogos da capsaicina sobre os receptores vanilóides tem sido possível determinar subclasses destes

receptores, os quais diferem entre si farmacológica e fisiologicamente (SZALLASI & BLUMBERG, 1996; SZALLASI, 1997; CATERINA *et al.*, 1997). Assim, é provável que mecanismos distintos, mediados por receptores vanilóides, possam ocorrer dentre as subclasses destes receptores (ÁCS *et al.*, 1997; BIRÓ *et al.*, 1998a).

A capsazepina, um análogo estrutural da capsaicina, bloqueia os receptores vanilóides e, inibe as ações antinociceptivas *in vivo* e *in vitro* induzidas tanto pela capsaicina (BEVAN *et al.*, 1991; DICKENSON *et al.*, 1991), quanto pela resiniferatoxina (ELLIS & UNDEM, 1994; ÁCS *et al.*, 1996). Entretanto, a capsazepina também bloqueia canais de cálcio voltagem dependentes (DOCHERTY *et al.*, 1997), assim como receptores nicotínicos (LIU & SIMON, 1997). Além disso, estudos recentes sugerem a presença de receptores vanilóides insensíveis à capsazepina em vias aéreas (AUBERSON & LUNDBERG, 1993) e pele de ratos (COSTA *et al.*, 1999). Portanto, a capsazepina já não pode ser classificada como antagonista seletivo de receptores vanilóides.

1.2.2. Cininas

As cininas, principalmente a bradicinina e a calidina, são peptídeos formados a partir de precursores plasmáticos ou teciduais, os cininogênios, através da ação de calicreínas plasmáticas ou teciduais (REGOLI & BARABÉ, 1980). As cininas evocam ações variadas como hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia e ativação da fosfolipase A₂, efeitos estes mediados por receptores B₁ ou B₂ (BHOOLA *et al.*, 1992). Somado a isso, a bradicinina é capaz de liberar neuropeptídeos dos neurônios CSPA e, assim, potencializar indiretamente suas próprias ações inflamatórias (MAGGI

& MELLI, 1988). Por intermédio da utilização de antagonistas seletivos para receptores B₂ como o HOE 140, foi possível demonstrar a presença desses receptores no sistema nervoso central e periférico (HALL, 1992; DRAY & PERKINS, 1993; SALEH *et al.*, 1997).

1.2.3. Histamina

A histamina é um importante agente inflamatório, capaz de mediar numerosas funções, incluindo extravasamento de proteínas plasmáticas, contração de músculo liso de brônquios e intestino, estimulação de neurônio sensorial (via receptores H₁) e vasodilatação (via ativação de receptores H₁ e H₂). O terceiro subtipo de receptor de histamina, denominado H₃, foi identificado em terminações nervosas central e periférica, o qual parece exercer efeitos inibitórios. Estudos experimentais mostraram que o agonista de receptores H₃, R- α -metil-histamina, inibe o extravasamento de proteínas plasmáticas (ICHINOSE & BARNES, 1990). Além disso, alguns pesquisadores sugerem uma inter-relação entre os neurônios sensoriais e os mastócitos (HUGHES *et al.*, 1990). Assim, é possível que a liberação basal de histamina dos mastócitos previna a estimulação de neurônios sensoriais via ativação dos receptores H₃, enquanto a liberação maciça de histamina que ocorre perante a degranulação de mastócitos atue sobre os receptores H₁ e H₂ localizados nas células alvo (BARNES *et al.*, 1990).

1.2.4. Serotonina

A serotonina, contida principalmente em mastócitos, é um dos principais mediadores da inflamação em roedores,. No sistema nervoso central, a serotonina pode causar ações inibitórias ao ativar receptores do tipo 5-HT₁

(PEROUTKA & SNYDER, 1979; HOYER, 1994) ou excitatórias em receptores do tipo 5-HT₂ (GADDUM & PICARELLI, 1956; PEROUTKA & SNYDER, 1979; HOYER, 1994). No sistema nervoso periférico, a serotonina possui ações do tipo excitatória através da ativação de receptores 5-HT₃, presentes em neurônios aferentes sensoriais, causando dor (GADDUM & PICARELLI, 1956; RICHARDSON *et al.*, 1985; HAMON *et al.*, 1989; HOYER, 1994). Na microcirculação, a serotonina induz vasodilatação arteriolar, via receptores 5-HT₁, e nas vênulas promove contração das células endoteliais, causando aumento da permeabilidade vascular, provavelmente através da ação em receptores do tipo 5-HT₂ (HOLLENBERG, 1988). A classificação dos tipos de receptores envolvidos nas ações inflamatórias da serotonina ainda não está totalmente definida.

1.2.5. Metabólitos do ácido araquidônico (AA)

Vários trabalhos demonstram as diferentes ações excitatórias de metabólitos do AA, principalmente as prostaglandinas, sobre terminações nervosas sensoriais (HOLZER, 1992; 1998). Um dos mecanismos propostos para explicar o efeito analgésico de agentes anti-inflamatórios não esteroidais é a remoção da influência excitatória das prostaglandinas sobre os neurônios aferentes primários (FERREIRA, 1981).

1.2.6. Opióides

As encefalinas são consideradas potentes inibidores endógenos de neuropeptídeos liberados de neurônios sensoriais (BARNES *et al.*, 1990). Estudos experimentais demonstraram que a morfina e análogos sintéticos da encefalina inibem o extravasamento de proteína plasmática induzida pela

estimulação de nervos safenos em patas de rato (BARTHÓ & SZOLCSÁNYI, 1981; BARBER, 1993). Em diversos modelos experimentais tais como íris de coelho (UEDA *et al.*, 1983; 1985), bronquíolos de cobaia (BARTHÓ *et al.*, 1987; MARTLING & LUNDBERG, 1988), átrio isolado de cobaia (GIULIANI *et al.*, 1990) e vias aéreas de cobaias (BELVISI *et al.*, 1989; RECHTMAN *et al.*, 1990), o extravasamento de proteínas plasmáticas e a bronconstrição via fibras NANC foi reduzida pela utilização de agonistas de receptores opióides. Assim, não é surpreendente observar que as terminações nervosas periféricas de neurônios aferentes sensoriais possuam receptores opióides inibitórios.

1.2.7. Vermelho de rutênio

O vermelho de rutênio é um corante inorgânico, relatado, na literatura no final dos anos oitenta, como um antagonista de capsaicina (CHAHN, 1989; MAGGI, 1991). O mecanismo pelo qual o vermelho de rutênio bloqueia receptores vanilóides é desconhecido, mas postula-se que existam dois sítios para o corante, um sítio de ligação, reversível, o qual inibe substâncias vanilóides, e um segundo sítio, irreversível, envolvendo dessensibilização (CHAHN, 1989). Além disso, o vermelho de rutênio parece inibir um subtipo de receptor vanilóide denominado VN₂ (GRIFFITHS *et al.*, 1996).

1.3. Envolvimento do sistema endócrino na resposta inflamatória

A participação do sistema endócrino no desenvolvimento da resposta inflamatória tem sido amplamente demonstrada (MORAES & GARCIA-LEME, 1982; FORTES *et al.*, 1984; GARCIA-LEME *et al.*, 1992).

Estudos experimentais revelaram que animais diabéticos apresentam uma

resposta inflamatória reduzida frente a estímulos químicos e físicos, a qual pode ser revertida pelo tratamento dos animais com insulina (GARCIA LEME *et al.*, 1973; 1974). Estudos utilizando microscopia eletrônica revelaram que microvasos de animais diabéticos, submetidos à administração de histamina ou serotonina, exibem redução da permeabilidade vascular e, quando pré-tratados com insulina, apresentam uma permeabilidade vascular normal ou aumentada. Este fato sugere que a integridade da resposta microvascular depende, em parte, da disponibilidade de insulina (LLORACH, *et al.*, 1976). Visto que, os receptores para a insulina estão presentes na superfície luminal das células endoteliais vasculares, sugere-se que esse hormônio module certas funções destas células (BAR *et al.*, 1978; PILLION *et al.*, 1982). Além disso, é sugerido que a redução de processos inflamatórios (inclusive os de natureza neurogênica) em animais diabéticos, não está relacionada com a depleção de mediadores inflamatórios como a SP, já que o conteúdo deste peptídeo em nervos sensoriais mostra-se inalterado em tais animais. Isto propõe que o diabetes acarreta redução da atividade desses mediadores em nível vascular (GARCIA-LEME *et al.*, 1974; GAMSE & JANCSON, 1985).

Entretanto, estudos mais recentes relatam que ratos diabéticos apresentam redução da resposta neurogênica, mediante estímulos elétricos, e que esta redução pode ser revertida pelo tratamento crônico (mas não agudo) dos animais com insulina (BENNETT *et al.*, 1998). No entanto, ainda segundo estes autores, as respostas inflamatórias evocadas pela SP e CGRP exógenos não se apresentam reduzidas em animais diabéticos, sugerindo que a redução da resposta neurogênica à SP e CGRP não está relacionada à modulação dos receptores desses neuropeptídeos, mas sim à liberação prejudicada dos mesmos decorrente da neuropatia periférica.

1.4. Fisiopatologia e farmacologia das enterotoxinas

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são neurotoxinas produzidas por algumas cepas do *Staphylococcus aureus*. Essas toxinas induzem alterações fisiopatológicas em humanos e animais de experimentação, as quais podem levar à incapacitação, choque e morte (BERGDOLL, 1983; BOBAK & GUERRANT, 1992; LECLAIRE *et al.*, 1995).

As SE (25.000 - 30.000 daltons) são proteínas semelhantes entre si, estáveis em meio ácido e em temperatura elevada. Classificam-se imunologicamente, em cinco tipos diferentes designados alfabeticamente de A a E (BERGDOLL, 1983; IANDOLO, 1989). Destes, a SE do tipo B (SEB) foi a primeira obtida de forma altamente pura e em grande quantidade. Tanto sua seqüência de aminoácidos quanto sua massa molecular (28.366 daltons) já são conhecidos (BERGDOLL, 1979).

De modo geral, as enterotoxinas funcionam também como 'superantígenos' (BOBAK & GUERRANT, 1992), sendo que parte das ações destas toxinas deve-se ao seu intenso efeito imunomodulador (FLEISCHER *et al.*, 1989; MARRACK & KAPPLER, 1990), o qual pode resultar em ativação das células T, síntese e liberação de citocinas e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (PERLSTEIN *et al.*, 1993; SHURIM *et al.*, 1997). Em relação à SEB, particularmente, observou-se marcante liberação de IL-2 e TNF- α de células T (GONZALO *et al.*, 1993; FLORQUIM *et al.*, 1994). Acredita-se que na resposta inflamatória induzida pela SEB, a IL-2 esteja envolvida diretamente com a ativação hipofisária, e o TNF- α com a ativação adreno-hipofisária. Estudos clínicos relatam que a aplicação tópica de SEB na pele humana produz reação inflamatória provavelmente pela liberação de citocinas (STRANGE *et al.*, 1996).

Recentemente, estudos revelaram semelhanças entre os mediadores químicos responsáveis pelo edema de pata e a migração de neutrófilos peritoneais induzidos pela SEB (ou SEA) em camundongos (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996; 1997). A injeção intraplantar de SEB em camundongos produz edema inflamatório bifásico e de longa duração. A fase primária (inicial) do edema dura cerca de 24 horas, sendo seguida por uma fase secundária (ou tardia) que se inicia após 24 horas e continua até as 72 horas, caracterizada como edema crônico (DESOUZA *et al.*, 1996). Nesse estudo, verificou-se que mediadores químicos tais como PAF (fator de agregação plaquetária), histamina e metabólitos do ácido araquidônico contribuem para esta atividade edematogênica. Em relação aos metabólitos do ácido araquidônico existe uma diferença marcante entre as duas fases do edema, ou seja, enquanto os produtos da lipoxigenase estão envolvidos na fase aguda, os da cicloxigenase parecem estar envolvidos na fase crônica.

Em relação à migração de neutrófilos, na cavidade peritoneal de camundongos, induzida pela SEB, DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA (1996) demonstraram que esta resposta é de longa duração, dependente de macrófagos residentes e inibida pela dexametasona. A migração de neutrófilos foi também reduzida pelo tratamento prévio dos animais com antagonista de PAF (BN52021) e inibidor de lipoxigenase (BWA4C). Ao contrário, tanto a indometacina (inibidor de cicloxigenase) quanto a difenidramina (antagonista H_1) mostraram-se ineficazes em reduzir o influxo de neutrófilos induzido pela SEB. Além disso, estes autores observaram que o edema de pata, bem como a migração de neutrófilos peritoneais induzidos pela SEB, são inibidos pelo pré-tratamento dos animais com capsaicina, sugerindo que a SEB produz inflamação dependente de mecanismos neurogênicos. Outros dados da

literatura relatam que a SEB, quando injetada subcutâneamente em camundongos, induz uma resposta inflamatória mediada por degranulação de mastócitos e liberação de serotonina (SUBRAMANIAN & BRAY, 1987; CHOI *et al.*, 1989; KOMISAR *et al.*, 1992; SALOGA *et al.*, 1996).

Segundo KOMISAR *et al.* (1992), a liberação de serotonina induzida pela SEB, em mastócitos de ratos *in vitro*, é aumentada pela co-administração de bradicinina. Por outro lado, em macacos tratados com capsaicina há uma redução da resposta inflamatória cutânea induzida pela SEB, mas não daquela induzida pelo composto 48/80 (degranulador de mastócitos) ou histamina (GOTTFRIED *et al.*, 1989). Esses dados sugerem que a SEB atua indiretamente em mastócitos cutâneos, via estimulação de neurônios sensoriais.

Considerando-se o exposto acima, investigamos a participação de neuropeptídeos sensoriais bem como a participação de mastócitos sobre o edema e exsudação plasmática induzidos pela SEB.

1.5. Objetivos

Os objetivos desse projeto foram investigar:

- a) O papel das fibras CSPA sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB;
- b) A participação dos mastócitos nas ações inflamatórias, induzidas pela SEB *in vivo*;
- c) O papel das cininas na resposta edematogênica induzida pela SEB;

d) O aumento de permeabilidade vascular e a formação de edema induzidos pela SEB em animais diabéticos.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Utilizaram-se camundongos Swiss, machos, provenientes do Biotério Central da Unicamp, com peso entre 25 e 30 g. Esses animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Farmacologia 24 h antes dos experimentos sendo mantidos a 24 °C, com um período de iluminação diária de 12 h e com livre acesso à água e à comida.

2.2. SEB

A SEB foi dissolvida em salina 0,9% estéril e estocada em alíquotas a -20 °C, para se evitar ciclos de descongelamento.

2.3. Medida do edema de pata e da exsudação de azul de evans

O edema de pata foi medido pelo método de LEVY (1969) e a exsudação plasmática pelo método de azul de Evans (GAMSE *et al.*, 1980). Estes efeitos foram analisados 2 h após a injeção do estímulo lesivo. Após anestesia com éter, injetou-se na região intraplantar da pata esquerda posterior (PE) 50 µl do estímulo lesivo, enquanto a pata direita posterior (PD) recebeu o mesmo volume do veículo. Trinta minutos antes de serem sacrificados, os animais receberam, por via intravenosa, 25 mg/kg de uma solução de azul de Evans no volume de 0,01 ml por grama de peso do animal. A seguir, os animais foram sacrificados em éter sulfúrico e suas patas seccionadas na articulação tarsocrural. Em seguida, as patas foram pesadas em balança analítica. O edema foi avaliado pela variação de peso (em mg) da PE em relação à PD. Para extração do azul de Evans, após a medida do edema, as patas foram picadas e colocadas em tubos de ensaio contendo 3 ml de formamida. Estes tubos foram mantidos em banho-maria a 57 °C por 24 h. A quantidade de azul de Evans

extraída foi determinada por espectrofotometria a 619 nm. Avaliou-se a exsudação pela variação da quantidade de azul de Evans extravasada ($\mu\text{g/g}$ de tecido) da PE em relação à PD. Os valores determinados foram comparados com uma curva padrão, a qual foi obtida acrescentando-se quantidades conhecidas do corante, em diferentes tubos contendo formamida.

2.4. Indução do diabetes

Induziu-se o diabetes de acordo com método previamente descrito (PTAK *et al.*, 1975). Os animais foram mantidos em jejum durante 24 h; em seguida, o aloxano foi injetado intravenosamente (70 mg/Kg; 0,1 ml/10 g). Paralelamente, um outro grupo de animais recebeu salina 0,9%, nas mesmas condições (animais não diabéticos). No quinto dia, após a injeção de aloxano, a glicemia (medida através do monitor Advantage*) e o hematócrito (medido através de microcentrifuga) foram determinados nos animais mantidos em jejum noturno de 12 h (PTAK *et al.*, 1975). Consideraram-se diabéticos os animais com valores de glicemia entre 250 a 650 mg/dl e hematócrito entre 40 a 55%.

2.5. Protocolos experimentais

Os animais foram divididos em grupos de 5 a 8 camundongos cada, para receber um dos tratamentos descritos a seguir:

2.5.1. Efeito do SR140333 (antagonista de receptores NK_1) e SR48968 (antagonista de receptores NK_2)

Os animais receberam SR140333 (240 nmoles/kg; 0,05 ml/10 g), sendo 120 nmoles/kg por via subcutânea (s.c.) e 120 nmoles/kg por via intravenosa (i.v.) (PINTER *et al.*, 1999), 10 min antes da injeção intraplantar de SEB (25

µg/pata) (DESOUZA *et al.*, 1996). O SR48968 (1,7 µmoles/kg; i.v.; 0,05 ml/10 g) (INOUE *et al.*, 1997) foi administrado 10 min antes da SEB (25 µg/pata). Para confirmar a eficiência do tratamento com os antagonistas, avaliou-se, nas mesmas condições acima, o edema de pata e a exsudação plasmática induzidos pelo agonista de receptores NK₁ (GR73632; 50 pmoles/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após a injeção intraplantar de SEB ou GR73632.

2.5.2. Efeito do HOE 140 (antagonista de receptores B₂)

Os animais receberam HOE 140 (400 nmoles/kg; i.v.; 0,05 ml/10 g), 10 min antes da injeção intraplantar de SEB (25 µg/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após o estímulo. Para confirmar a eficiência do pré-tratamento, estimou-se, nas mesmas condições acima, o edema de pata e a exsudação plasmática induzidos pela injeção intraplantar de bradicinina (3 nmoles/pata) (TRATSK, *et al.*, 1997).

2.5.3. Efeito do SR140333 e HOE 140, administrados simultaneamente

Os animais receberam concomitantemente o SR140333 (120 nmoles/kg, s.c. e 120 nmoles/kg, i.v.) e HOE 140 (400 nmoles/kg, i.v.) 10 min antes da injeção intraplantar de SEB (25 µg/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após o estímulo.

2.5.4. Efeito do CGRP

Administrou-se o CGRP concomitantemente à injeção intraplantar de SEB (25 µg/pata) ou GR73632 (50 pmoles/pata) nas doses de 100 e 300

pmoles/pata. A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após a injeção intraplantar de SEB ou GR73632.

2.5.5. Efeito da capsazepina (antagonista de receptores vanilóides)

Os animais receberam capsazepina (50 ou 100 μ moles/kg; s.c.; 0,05 ml/10 g) de acordo com a metodologia descrita por PERKINS & CAMPBELL (1992), 60 min antes da injeção intraplantar de capsaicina (5 μ g/pata) (SZIKSZAY *et al.*, 1998). Os animais não tratados (controles) receberam o mesmo volume do veículo por via subcutanea. A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após o estímulo. Na mesmas condições acima, outro grupo de animais recebeu capsazepina (100 μ moles/kg; s.c.), sessenta minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata).

2.5.6. Efeito da mepiramina (antagonista de receptores H₁)

Os animais receberam mepiramina (10 mg/kg; i.v.; 0,05 ml/10 g) 10 min antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após o estímulo. Para confirmar a eficiência do pré-tratamento determinou-se, nas mesma condições acima, o edema de pata e exsudação plasmática induzidos pela injeção intraplantar de histamina (100 μ g/pata) (SAMPAIO *et al.*, 1995).

2.5.7. Efeito da metisergida (antagonista de receptores 5-HT)

Os animais receberam metisergida (10 mg/kg; i.v.; 0,05 ml/10 g) 10 min antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 h após o estímulo. Para confirmar a eficiência do pré-tratamento

determinou-se, nas mesmas condições acima, o edema de pata e exsudação plasmática induzidos pela injeção intraplantar de serotonina (100 µg/pata) (SAMPAIO *et al.*, 1995).

2.5.8. Efeito da insulina em animais não diabéticos e diabéticos

A insulina nas doses de 5, 10 ou 20 UI/kg (OTTLECHZ *et al.*, 1976) foi administrada por via subcutânea (região do pescoço; 0,1 ml/10 g), 30 min antes da injeção intraplantar com SEB (25 µg/pata). Nas mesmas condições, um outro grupo de animais foi tratado com insulina e utilizado para determinação da glicemia, nos tempos indicados para a avaliação do estímulo inflamatório. Um grupo de animais recebeu, ainda, insulina (20 UI/kg), nas mesmas condições acima, 2 h antes da injeção intraplantar de capsaicina (3,2 µg/pata) (PIOVEZAN *et al.*, 1998). O edema e exsudação plasmática foram avaliados 2 h após o estímulo com SEB e 30 min após o estímulo com capsaicina.

2.6. Drogas

O aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina;5,6-dioxiuracil), bradicinina, CGRP, histamina (2-[4-Imidazolil]etilamina), insulina, metisergida, mepiramina e serotonina (5-hidroxitriptamina) foram diluídos em salina 0,9%. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida) foi diluída em etanol: tween 80: salina 0,9% (10:10:80, v/v). A capsazepina (2-[2-(4-clorfenil)etilamino-tiocarbonil]-7,8-dihidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1H-2-benzazepina) foi diluída em metanol: salina 0,9% (60:40, v/v). O GR73632 (8Ava[L-Pro⁹,N-MeLeu¹⁰], SR140333 ((S)-1-{2-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-iso-propoxifenilacetil) piperidina-3-il]etil}-4-fenil-1-azoniabicyclo[2.2.2]octona, clorida), SR48968 ((S) N-metil-N[4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidino)-2-(3,4,-ciclorofenil)butil]benzamida) e o HOE

140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) foram diluídos em salina 0,9%, e armazenados a - 20 °C sob forma de alíquotas.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM. Analisaram-se as diferenças entre as médias pelo teste t-Student não pareado, ou ANOVA seguida de teste de Bonferroni. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significantes.

3. Resultados

3.1. Efeito dos antagonistas de receptores NK₁ (SR140333) e NK₂ (SR48968) sobre o edema e a exsudação induzidos pela SEB

A figura 1A mostra que a injeção intraplantar do GR73632 (agonista NK₁; 50 pmoles/pata) promoveu uma resposta edematogênica significativa. O tratamento prévio dos animais com o SR140333 (120 nmoles/kg, s.c. + 120 nmoles/kg, i.v.; 10 min antes) reduziu significativamente em 40% essa resposta edematogênica. Da mesma forma, a injeção intraplantar da SEB (25 µg/pata) induziu edema na pata dos camundongos controles, que foi significativamente reduzido (35%) no grupo de animais tratados com o SR140333 (Fig. 1B). Ao contrário, o tratamento endovenoso com o antagonista de receptores NK₂ (SR48968; 1,7 µmoles/kg; 10 min antes) não alterou o edema causado pela SEB ou GR73632, em relação aos seus respectivos controles (Fig. 1A, B).

A figura 2A, B representa a exsudação plasmática induzida pela injeção intraplantar do GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 µg/pata). No grupo tratado com o SR140333, nas mesmas condições descritas acima, observou-se que a exsudação evocada tanto pelo GR73632 quanto pela SEB foram reduzidas significativamente (88 e 37%, respectivamente), quando comparadas aos seus respectivos grupos-controle. O mesmo não se observou com os animais tratados com o SR48968.

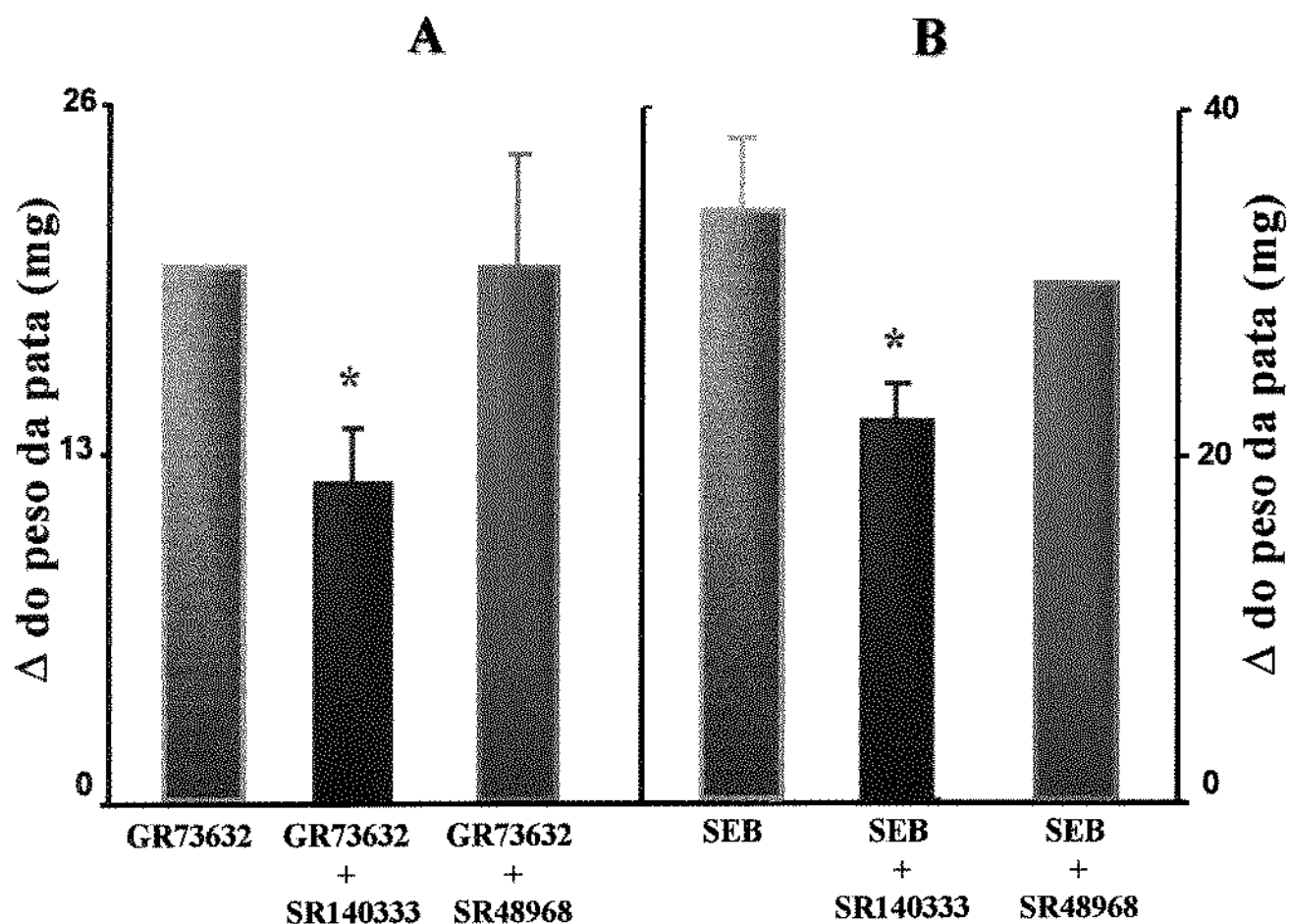


Fig. 1. Efeito dos antagonistas de receptores NK_1 (SR140333) e NK_2 (SR48968) sobre o edema induzido pelo agonista NK_1 (GR73632) (A) ou SEB (B). O SR140333 (120 nmoles/kg i.v. + 120 nmoles/kg s.c.) e o SR48968 (1,7 μ moles/kg, i.v.) foram administrados 10 minutos antes da injeção intraplantar de GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 μ g/pata). O edema foi medido 2 horas após o estímulo lesivo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos não tratados com os antagonistas (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

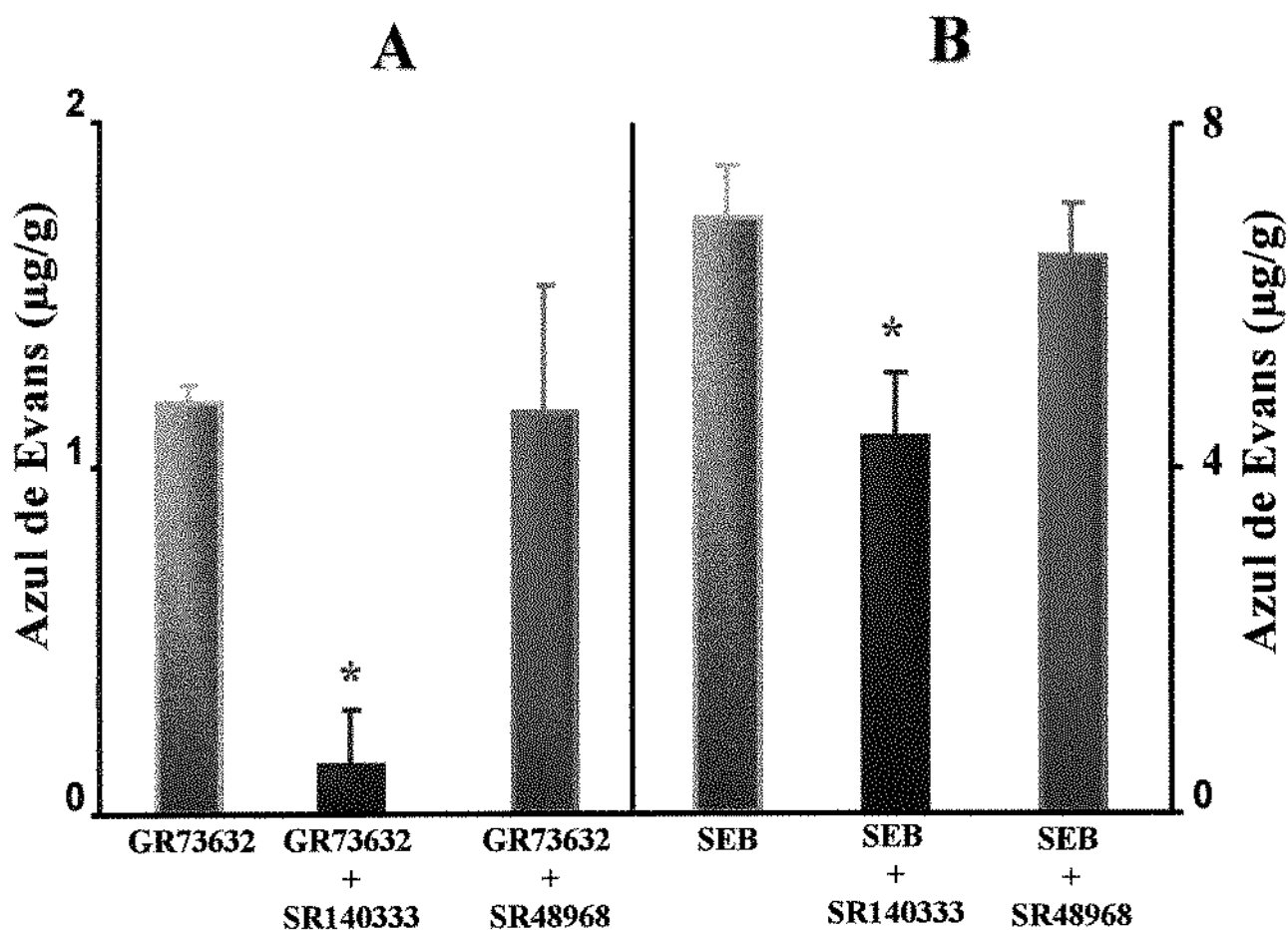


Fig. 2. Efeito dos antagonistas de receptores NK_1 (SR140333) e NK_2 (SR48968) sobre a exsudação plasmática induzida pelo agonista NK_1 (GR73632) (A) ou SEB (B). O SR140333 (120 nmoles/kg i.v. + 120 nmoles/kg, s.c.) e o SR48968 (1,7 µmoles/kg, i.v.) foram administrados 10 minutos antes da injeção intraplantar de GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 µg/pata). A exsudação foi medida 2 horas após o estímulo lesivo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos não tratados com os antagonistas (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

3.2. Efeito da co-injeção de CGRP sobre o edema e exsudação induzidos pela SEB

A figura 3A mostra que o edema evocado pelo GR73632 (50 pmoles/pata) foi significativamente potencializado pela co-injeção do CGRP, nas doses de 100 pmoles/pata (75%) e 300 pmoles/pata (75%). A figura 3B ilustra que o edema induzido pela SEB (25 µg/pata) não foi alterado significativamente pela co-injeção de CGRP em ambas as doses. Quando administrado isoladamente o CGRP (100 e 300 pmoles/pata) não causou edema significativo ($4,0 \pm 2,5$ mg e $8,00 \pm 2,0$ mg; respectivamente).

A figura 4A, B representa a exsudação plasmática induzida pela injeção intraplantar do GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 µg/pata). Em ambos os estímulos, a co-injeção de CGRP, nas doses de 100 ou 300 pmoles/pata, não causou alterações significantes na exsudação plasmática. O CGRP, administrado isoladamente, não induziu extravasamento plasmático.

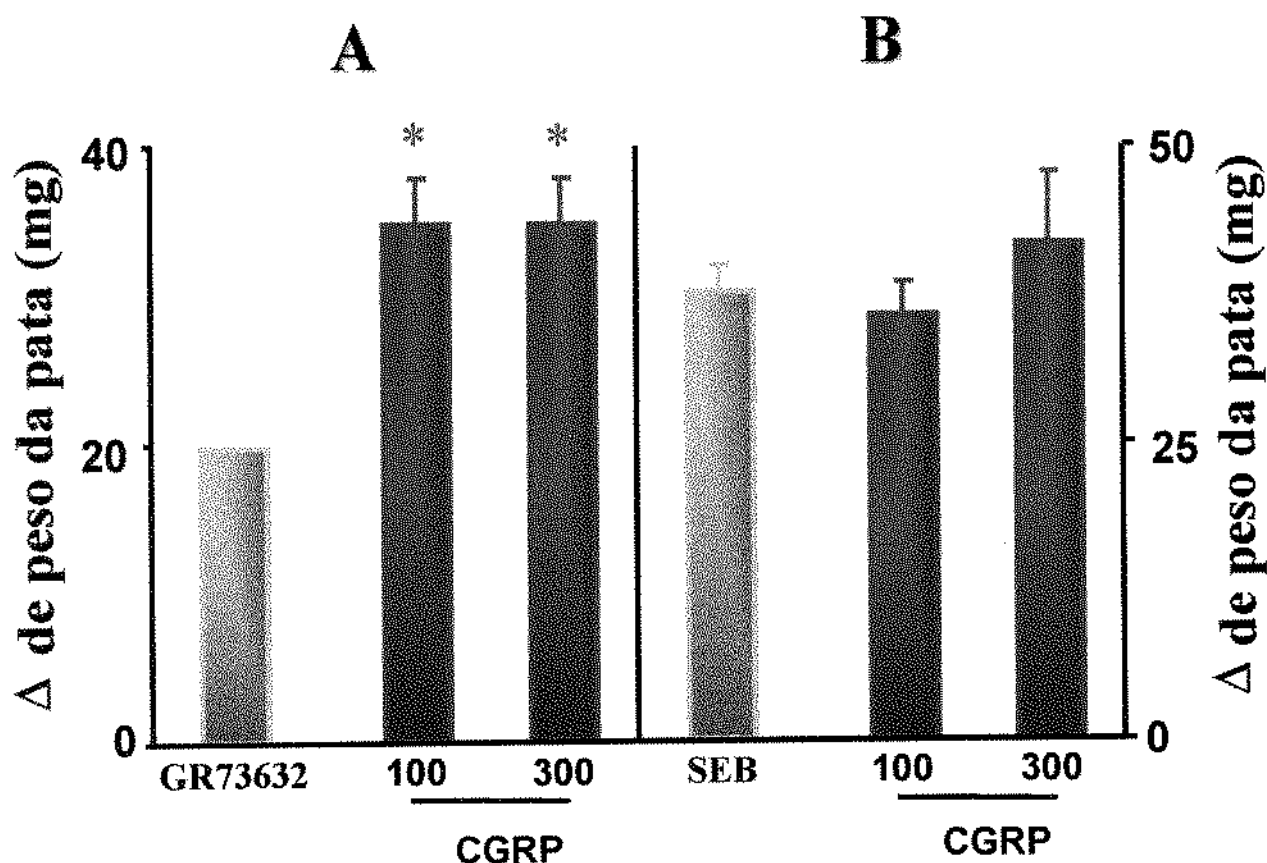


Fig. 3. Efeito da co-injeção de CGRP sobre o edema induzido pelo agonista de receptores NK_1 (GR73632) (A) ou SEB (B). O CGRP (100 ou 300 pmoles/pata) foi administrado concomitantemente com GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após os estímulos lesivos. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos não tratados com o CGRP (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

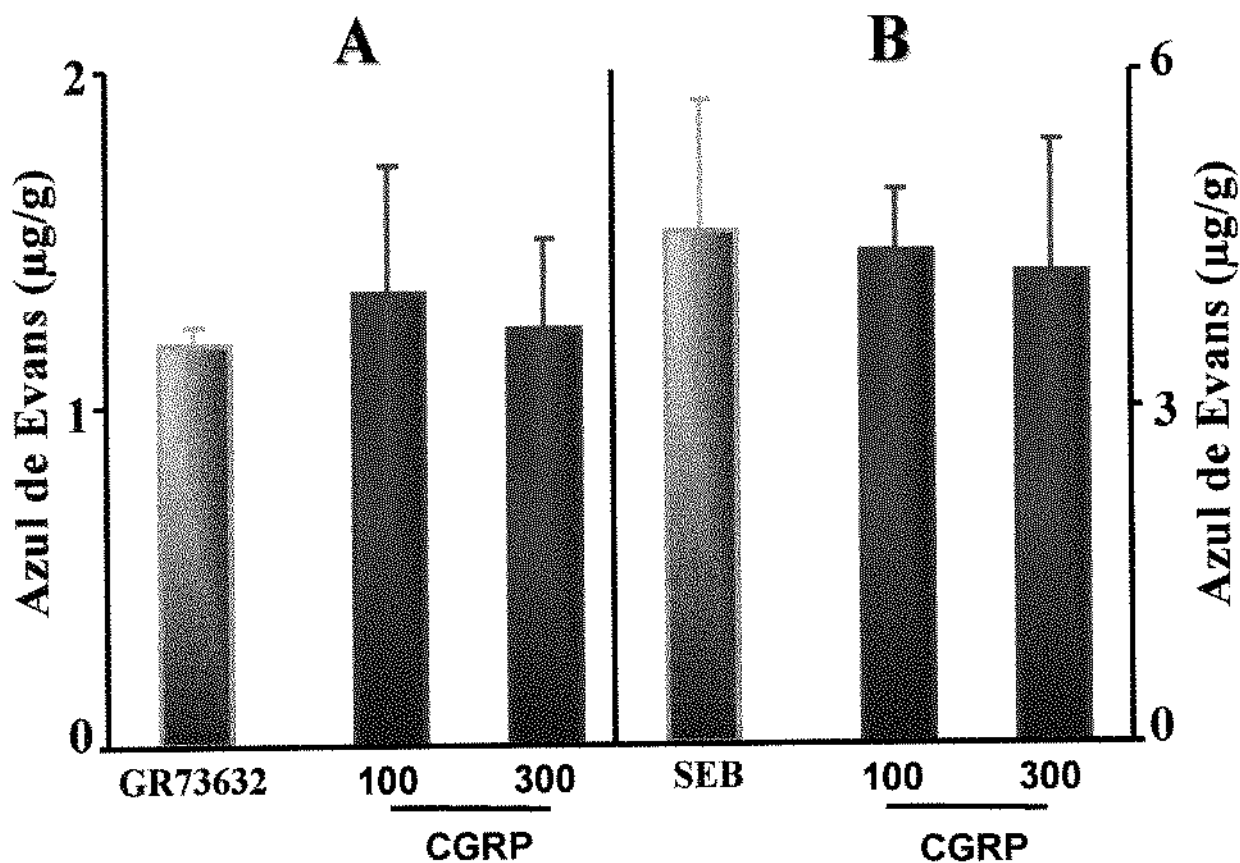


Fig. 4. Efeito da co-injeção de CGRP sobre a exsudação plasmática induzida pelo GR73632 (A) ou SEB (B). O CGRP (100 ou 300 pmoles/pata) foi administrado concomitantemente com GR73632 (50 pmoles/pata) ou SEB (25 µg/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após os estímulos lesivos. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais.

3.3. Efeito do HOE 140 (antagonista de receptor B₂) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB

As figuras 5A e 6A ilustram o edema de pata, induzido pela injeção intraplantar da bradicinina (3 nmoles/pata) ou SEB (25 µg/pata), no grupo de animais controles e tratados com o HOE 140 (400 nmoles/kg; 10 minutos antes). No grupo de animais tratados, observou-se redução significativa do edema induzido pela bradicinina (69%), bem como daquela induzida pela SEB (35%), em relação aos seus respectivos controles.

Em relação à exsudação plasmática, notamos que aquela induzida pela bradicinina (3 nmoles/pata) foi praticamente abolida (94%; Fig. 5B) pelo tratamento com o HOE 140, enquanto que a da SEB (25 µg/pata) foi parcialmente reduzida (34%; Fig. 6B) em relação aos respectivos grupos-controle.

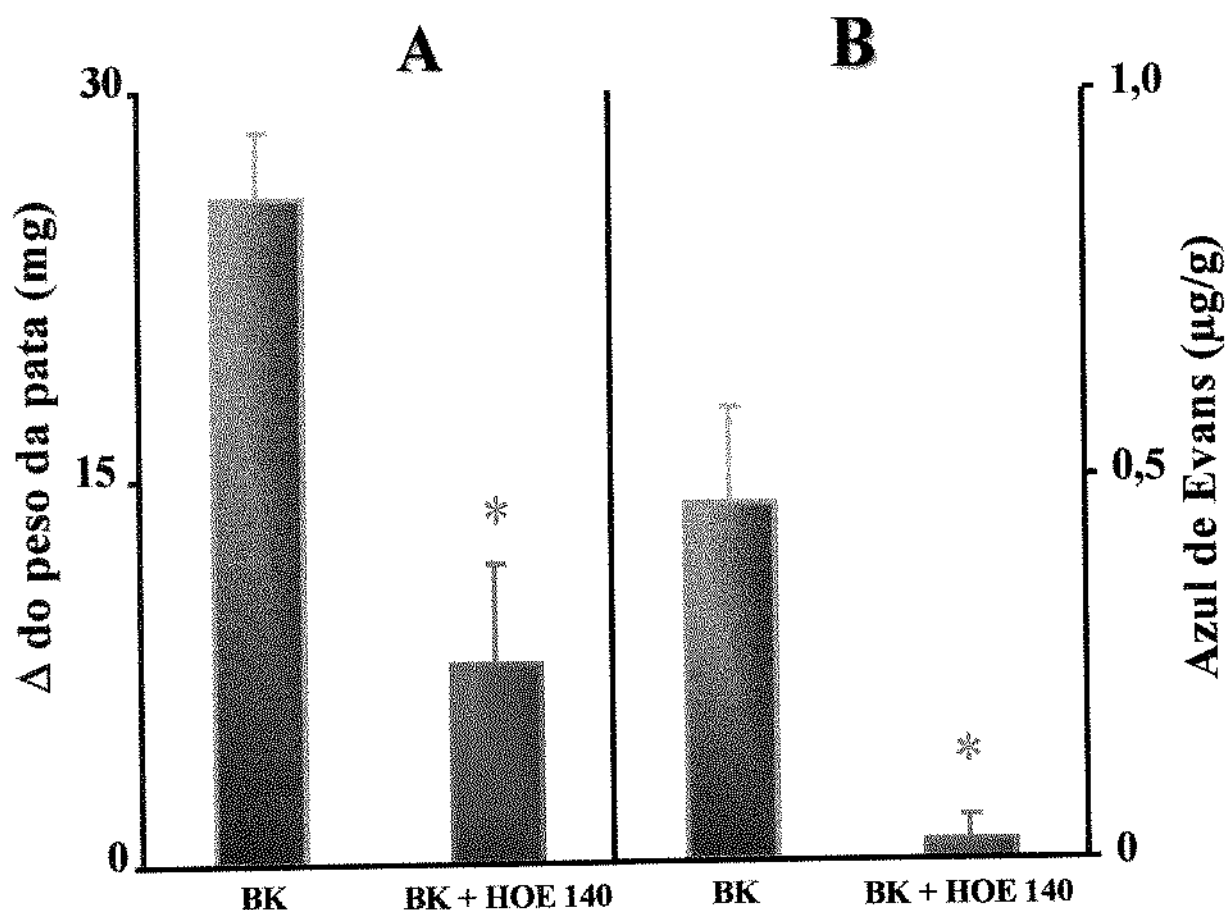


Fig. 5. Efeito do antagonista de receptores B₂ (HOE 140) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela bradicinina. O HOE 140 (400 nmoles/kg, i.v.) foi administrado 10 minutos antes da injeção intraplantar de bradicinina (BK; 3 nmoles/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo não tratado com HOE 140 (teste t-Student não pareado).

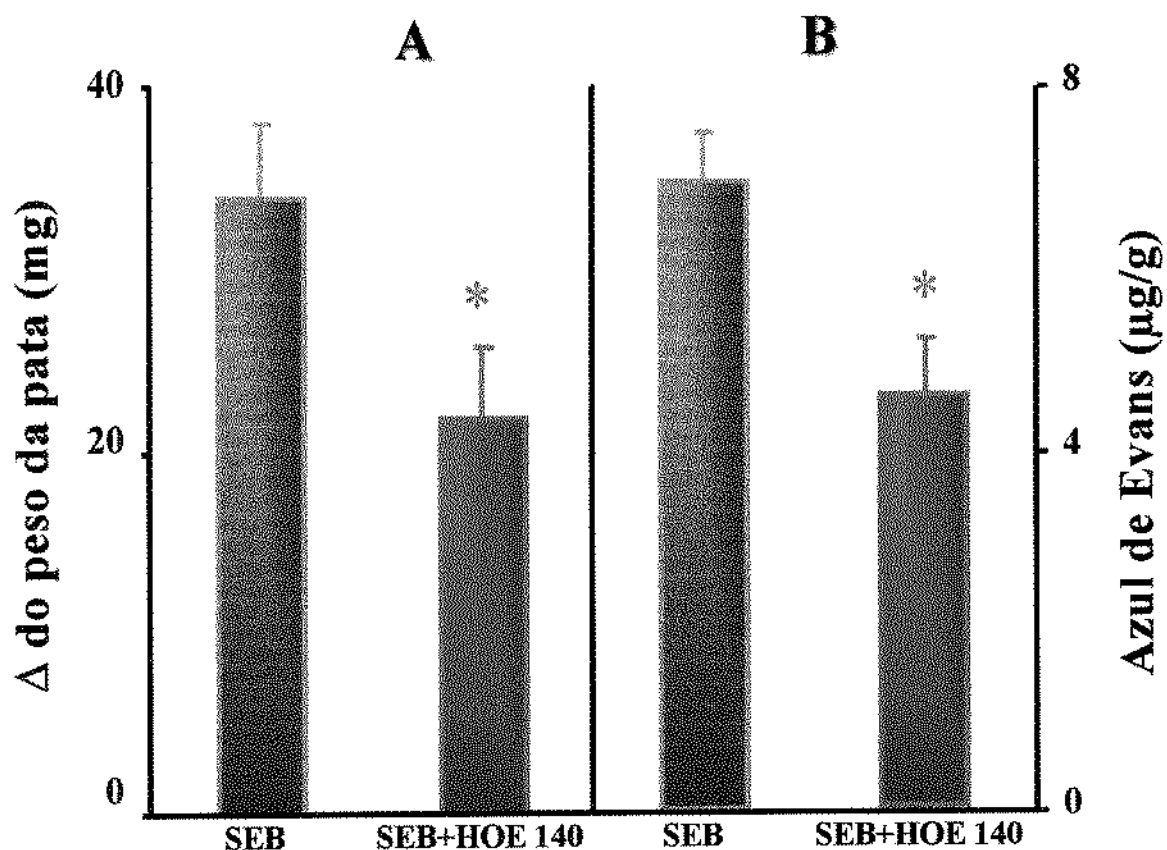


Fig. 6. Efeito do antagonista de receptores B_2 (HOE 140) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela SEB. O HOE 140 (400 nmoles/kg, i.v.) foi administrado 10 minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com HOE 140 (teste t-Student não pareado).

3.4. Efeito da co-injeção do SR140333 e HOE 140 sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB

O tratamento prévio dos animais com a mistura de antagonistas, SR140333 (120 nmoles/kg, s.c. + 120 nmoles/Kg, i.v.) e HOE 140 (400 nmoles/Kg, i.v.), reduziu significativamente o edema (49%) e a exsudação (31%) evocados pela administração intraplantar da SEB (25 µg/pata) (Fig. 7A, B). Entretanto, a redução, embora significativa, não foi maior do que aquela observada pelo SR140333 ou HOE 140, administrados isoladamente (veja Figs. 1B e 2B; 6A, B, respectivamente).

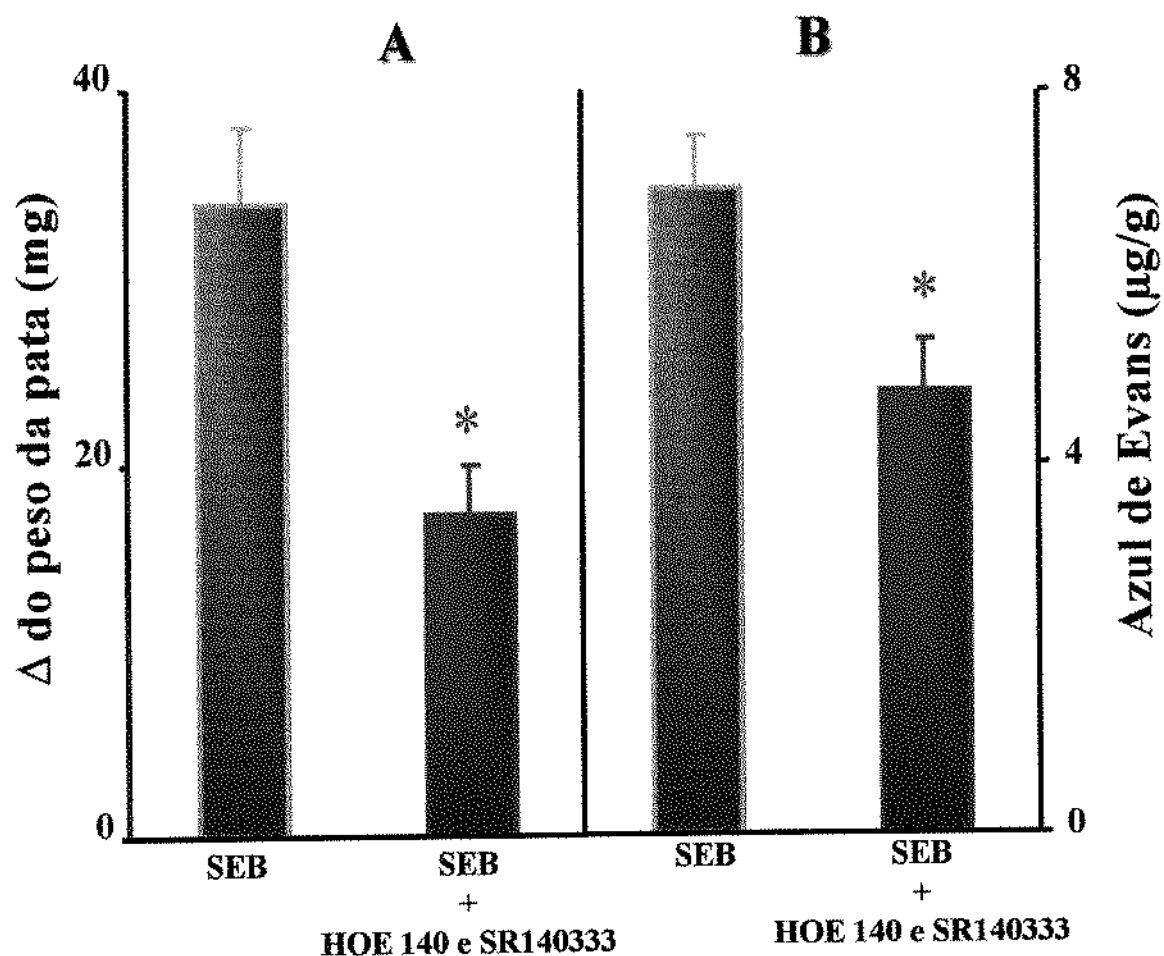


Fig. 7. Efeito da administração simultânea dos antagonistas de receptores NK_1 (SR140333) e B_2 (HOE 140) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela SEB. O SR140333 (120 nmoles/kg i.v. + 120 nmoles/kg, s.c.) e o HOE 140 (400 nmoles/kg, i.v.) foram administrados 10 minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 $\mu\text{g/pata}$). A resposta inflamatória foi medida 2 horas após o estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com os antagonistas (teste t-Student não pareado).

3.5. Efeito do SR140333 sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela bradicinina

O tratamento prévio dos animais com o antagonista SR140333 (120 nmoles/kg, s.c. + 120 nmoles/kg, i.v.), reduziu significativamente o edema (62%) e a exsudação (49%) evocados pela administração intraplantar da bradicinina (3 nmoles/pata) (Fig. 8A, B).

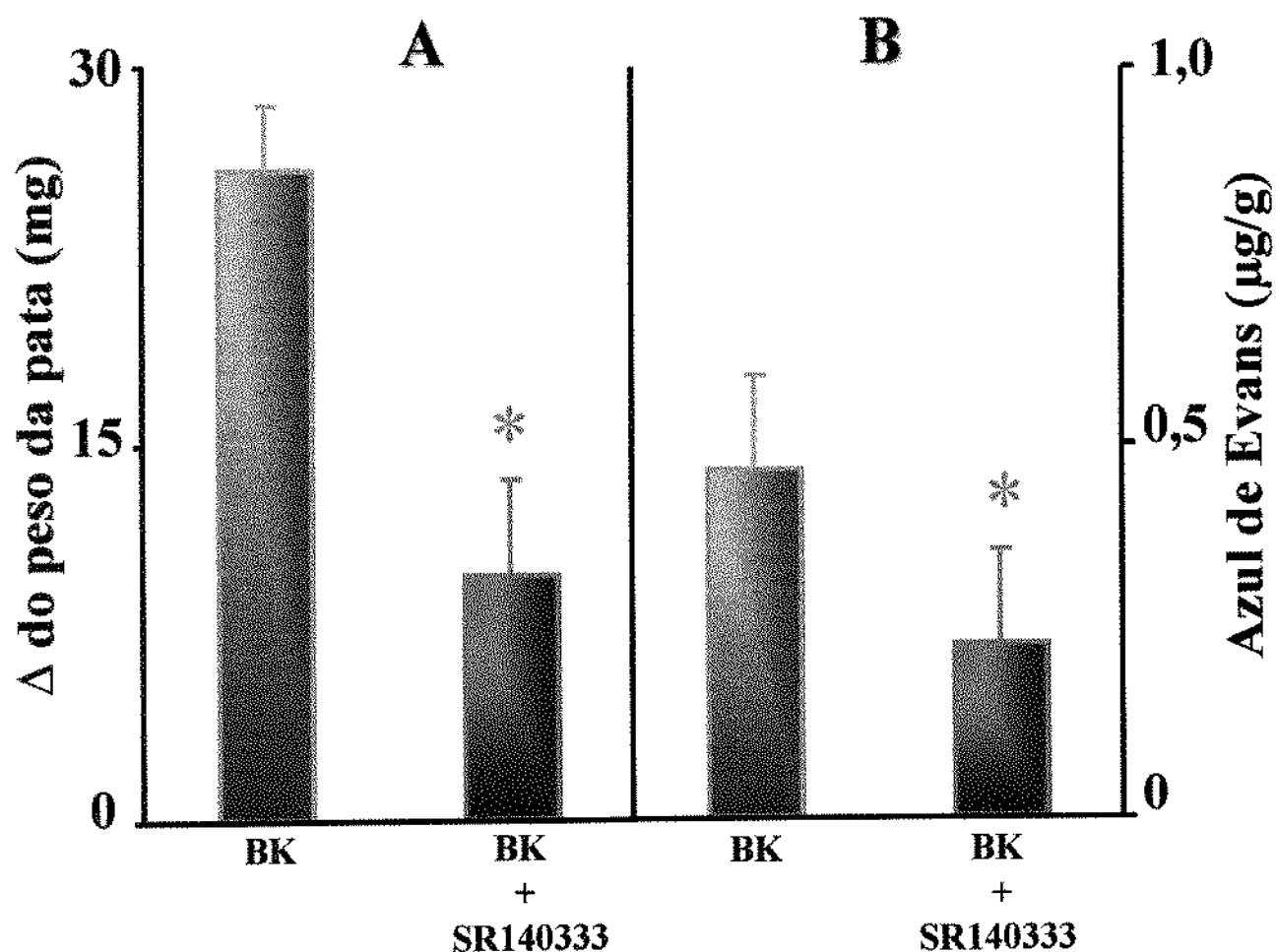


Fig. 8. Efeito do antagonista de receptores NK₁ (SR140333) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela bradicinina. O HOE 140 (400 nmoles/kg, i.v.) foi administrado 10 minutos antes da injeção intraplantar de bradicinina (BK; 3 nmoles/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo não tratado com HOE 140 (teste t-Student não pareado).

3.6. Efeito da capsazepina (antagonista de receptores vanilóides) sobre o edema e a exsudação induzidos pela SEB

A figura 9 ilustra o edema induzido pela capsaicina (5 µg/pata) na presença e ausência da capsazepina. A capsazepina (50 ou 100 µmoles/kg; s.c.; 60 min antes) reduziu significativamente o edema (50 e 67%, respectivamente) induzido pela capsaicina, em relação ao grupo-controle.

De forma semelhante, o edema causado pela SEB no grupo tratado com a capsazepina (100 µmoles/kg, s.c.; 60 min antes) foi significantemente menor (53%) em relação ao grupo controle (Fig. 10A). Nesses mesmos animais, a exsudação plasmática induzida pela SEB (25 µg/pata), foi reduzida, igualmente, (45%) em relação ao grupo-controle (Fig. 10B).

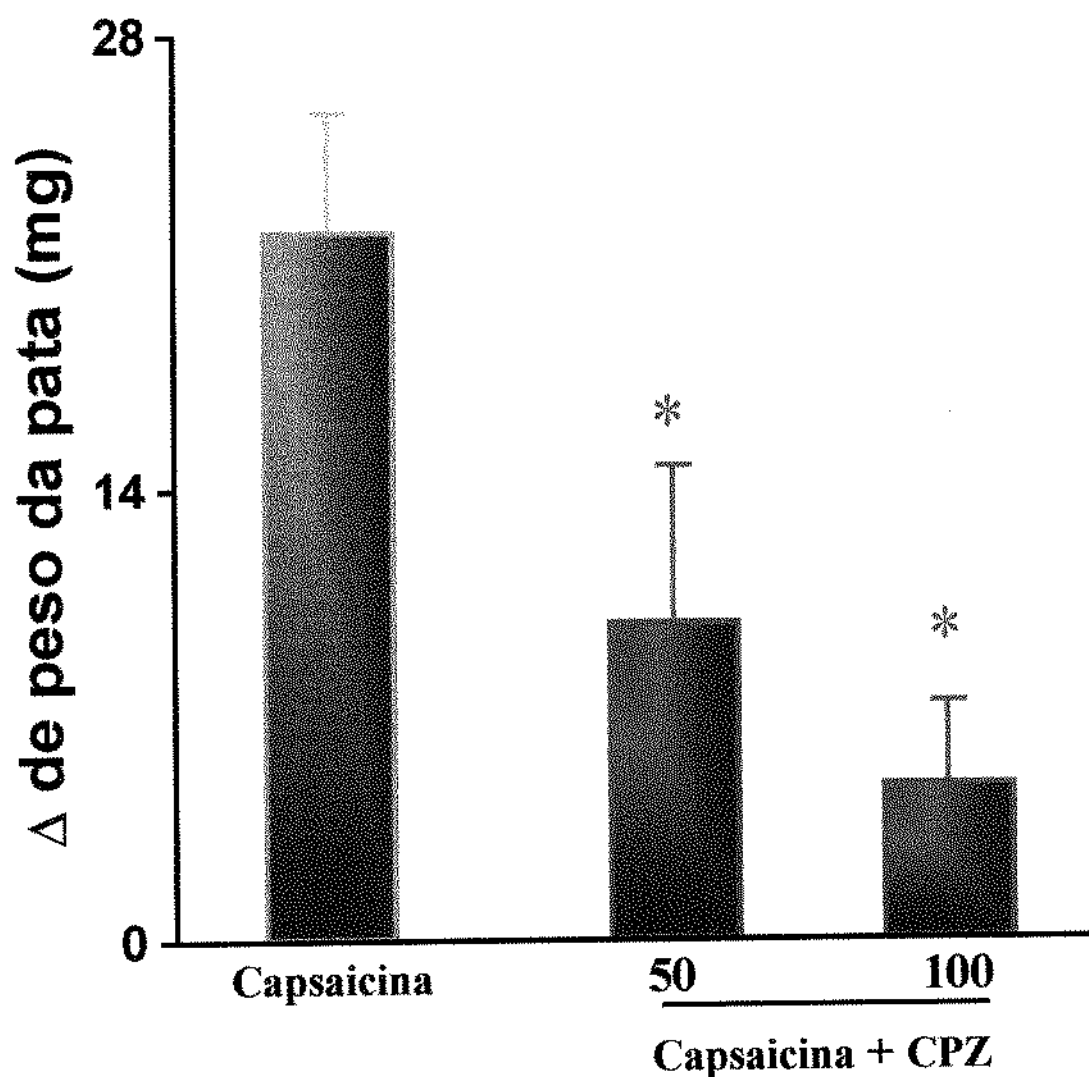


Fig. 9. Efeito da capsazepina (antagonista de receptores vanilóides) sobre o edema induzido pela capsaicina. A capsazepina (CPZ), nas doses indicadas acima (μ moles/kg, s.c.), foi administrada 60 minutos antes da injeção intraplantar de capsaicina (5 μ g/pata). O edema foi medido 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com capsazepina (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

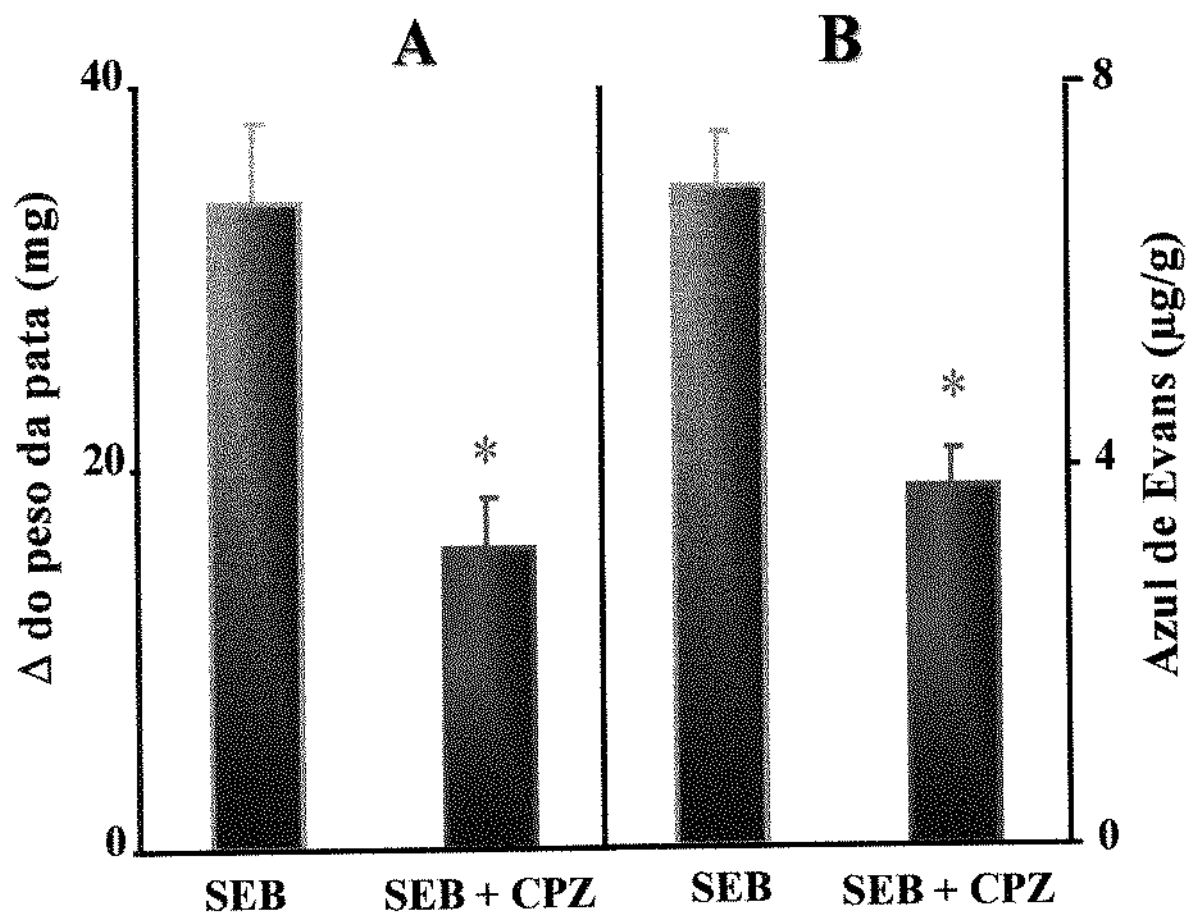


Fig. 10. Efeito da capsazepina sobre o edema (A) e a exsudação (B) induzidos pela SEB. A capsazepina (CPZ; 100 μ moles/kg, s.c.) foi administrada 60 minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi medida 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com capsazepina (teste t-Student não pareado).

3.7. Efeito dos antagonistas de receptores H_1 (mepiramina) e 5-HT (metisergida) sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB

A figura 11 mostra que a injeção intraplantar de histamina (100 μ g/pata) promoveu uma resposta edematogênica significativa. O tratamento prévio dos animais com mepiramina (10 mg/kg, i.v.; 10 min antes) reduziu significativamente o edema (30%; painel A) e a exsudação (84%; painel B) induzidos pela histamina. Da mesma forma, a injeção intraplantar de serotonina (100 μ g/pata) induziu edema (Fig. 12A) e a exsudação plasmática (Fig. 12B) na pata dos camundongos controles. Quando os animais foram tratados com metisergida (10 mg/kg, i.v.; 10 min antes) o edema foi reduzido em 25%, enquanto que a exsudação plasmática foi significativamente reduzida em 80%, em relação aos animais do grupo-controle.

A figura 13 representa o edema (painel A) e a exsudação plasmática (painel B) induzidos pela injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). No grupo tratado com mepiramina, nas mesmas condições descritas acima, observou-se que o edema foi significativamente reduzido (40%) enquanto a exsudação foi reduzida em 25%, quando comparado aos seus respectivos grupos-controle. Nos animais tratados com metisergida, nas mesmas condições descritas acima, tanto o edema quanto a exsudação plasmática mostraram-se reduzidos significativamente (60% e 63%, respectivamente), em relação ao grupo controle.

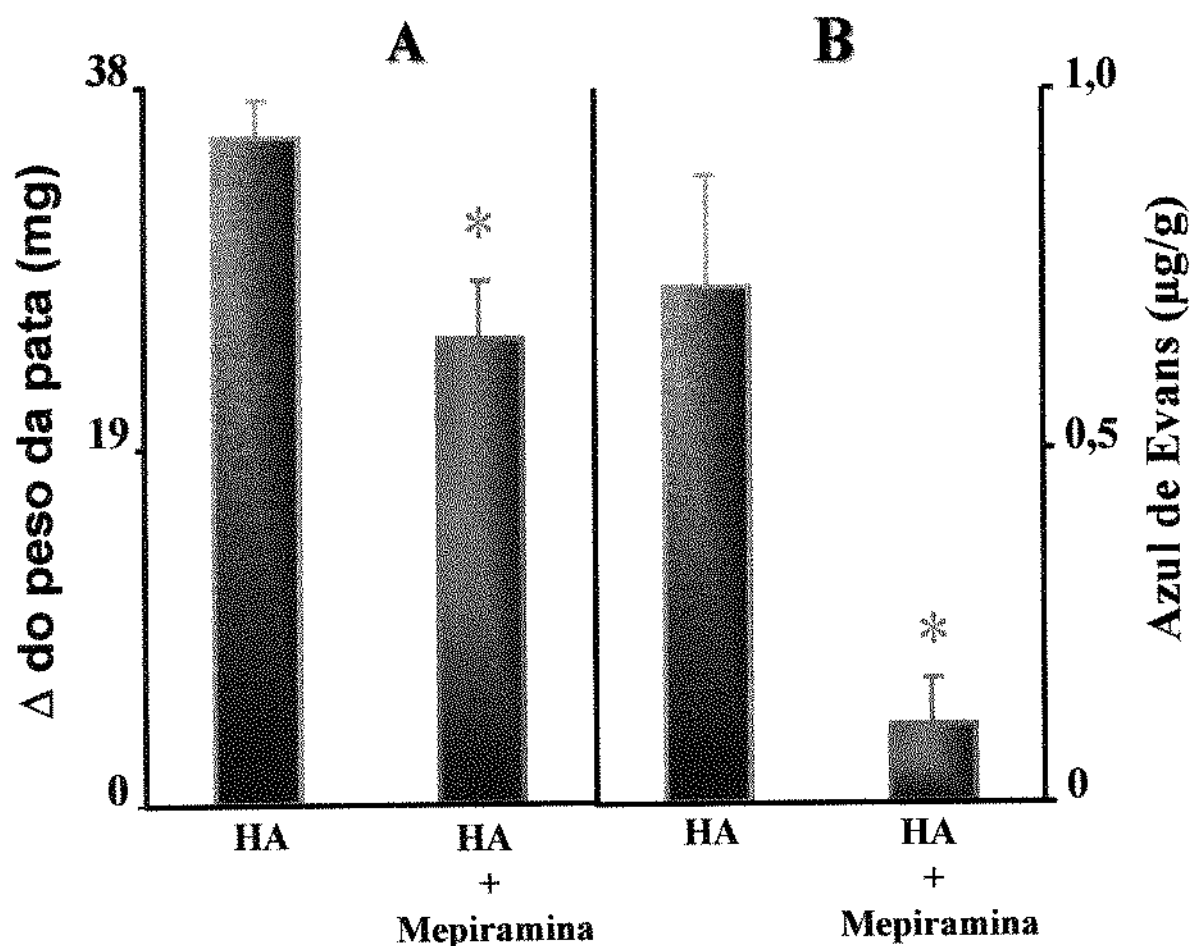


Fig. 11. Efeito do antagonista de receptores H_1 (mepiramina) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela histamina. A mepiramina (10 mg/kg, i.v.) foi administrada 10 minutos antes da injeção intraplantar de histamina (HA; 100 $\mu\text{g/pata}$). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com mepiramina (teste t-Student não pareado).

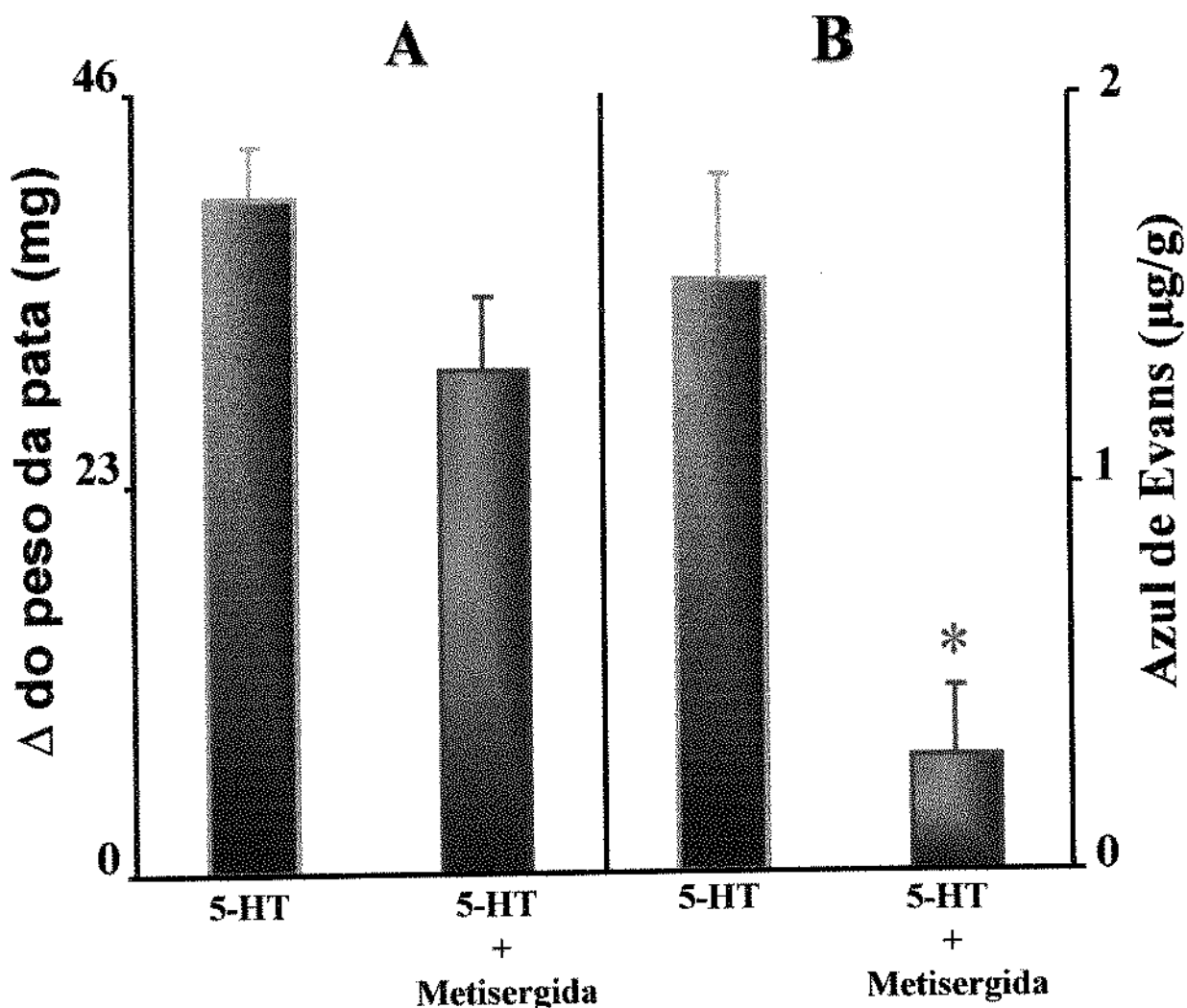


Fig. 12. Efeito do antagonista de receptores 5-HT (metisergida) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela serotonina. A metisergida (10 mg/kg, i.v.) foi administrada 10 minutos antes da injeção intraplantar de serotonina (5-HT; 100 μ g/pata). A resposta inflamatória foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras expressam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com metisergida (teste t-Student não pareado).

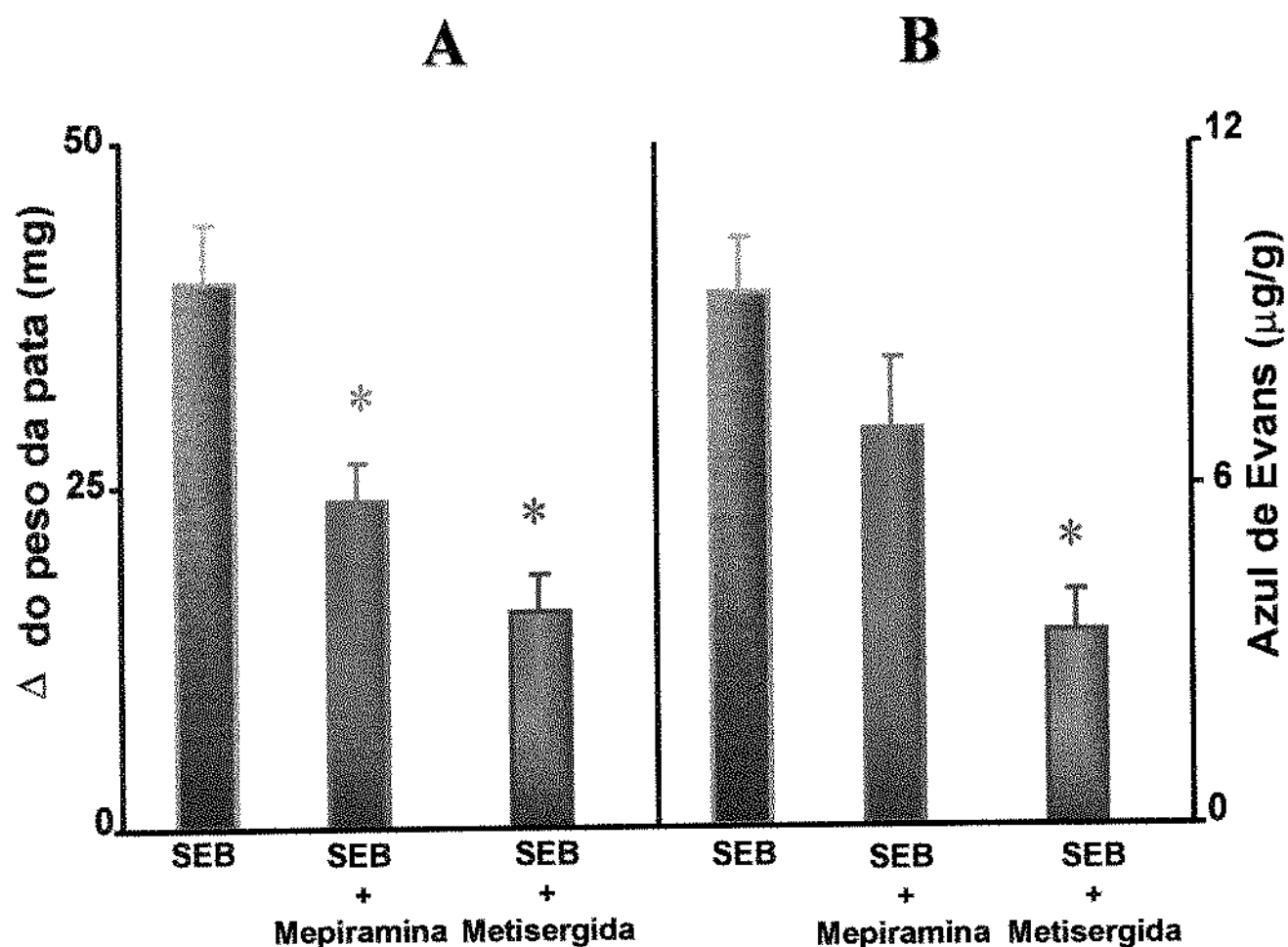


Fig. 13. Efeito dos antagonistas de receptores H_1 (mepiramina) e 5-HT (metisergida) sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela SEB. A mepiramina (10 mg/kg, i.v.) e metisergida (10 mg/kg, i.v.) foram administradas 10 minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória foi medida 2 horas após o estímulo lesivo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos não tratados com os antagonistas (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

3.8. Efeito do tratamento com insulina sobre o edema e a exsudação plasmática induzidos pela SEB em animais diabéticos

A figura 14A, B mostra o edema e a exsudação avaliados, após a injeção intraplantar de SEB (25 µg/pata) em animais não diabéticos e diabéticos. Observou-se que nos animais diabéticos, tanto o edema quanto a exsudação, foram significativamente reduzidos (75 e 50%, respectivamente), em relação aos animais não diabéticos (Fig. 14A, B). Em ambos os grupos, diabéticos e não diabéticos, o tratamento prévio dos animais com insulina (5, 10 ou 20 UI/kg, s.c.; 30 minutos antes) não promoveu alterações significativas na resposta inflamatória induzida pela SEB, em relação aos seus respectivos controles.

O edema (Fig. 15A) e a exsudação (Fig. 15B) induzidos pela injeção intraplantar de capsaicina (3,2 µg/pata) também apresentaram-se significativamente reduzidos nos animais diabéticos (56 e 77%, respectivamente). O tratamento prévio com insulina (20 UI/kg), em ambos os grupos, diabéticos e não diabéticos, não alterou significativamente a resposta edematogênica evocada pela capsaicina, em relação aos seus respectivos controles.

A tabela 1 mostra que o grupo de animais diabéticos apresentou valores de glicemia marcadamente maiores do que os animais não diabéticos.

A administração de insulina (10 ou 20 UI/kg) reduziu significativamente os valores de glicemia nos animais do grupo-controle. Nos animais diabéticos apenas a dose de 20 UI/kg de insulina reduziu significativamente a glicemia.

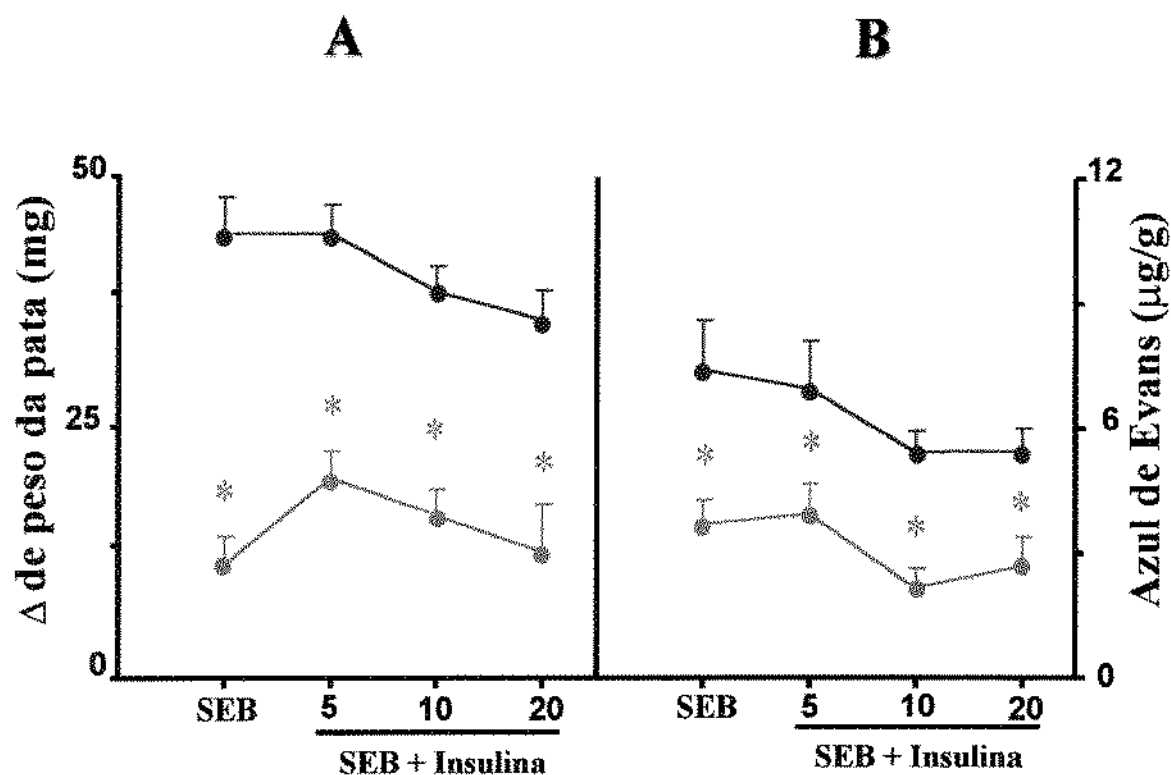


Fig. 14. Efeito do tratamento com insulina sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela SEB. A insulina, nas doses indicadas acima (UI/kg, s.c.), foi administrada 30 minutos antes da injeção intraplantar de SEB (25 μ g/pata). A resposta inflamatória em animais não diabéticos (●) e diabéticos (○) foi avaliada 2 horas após o estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 8 animais. *P < 0,05 em relação ao grupos não diabéticos (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

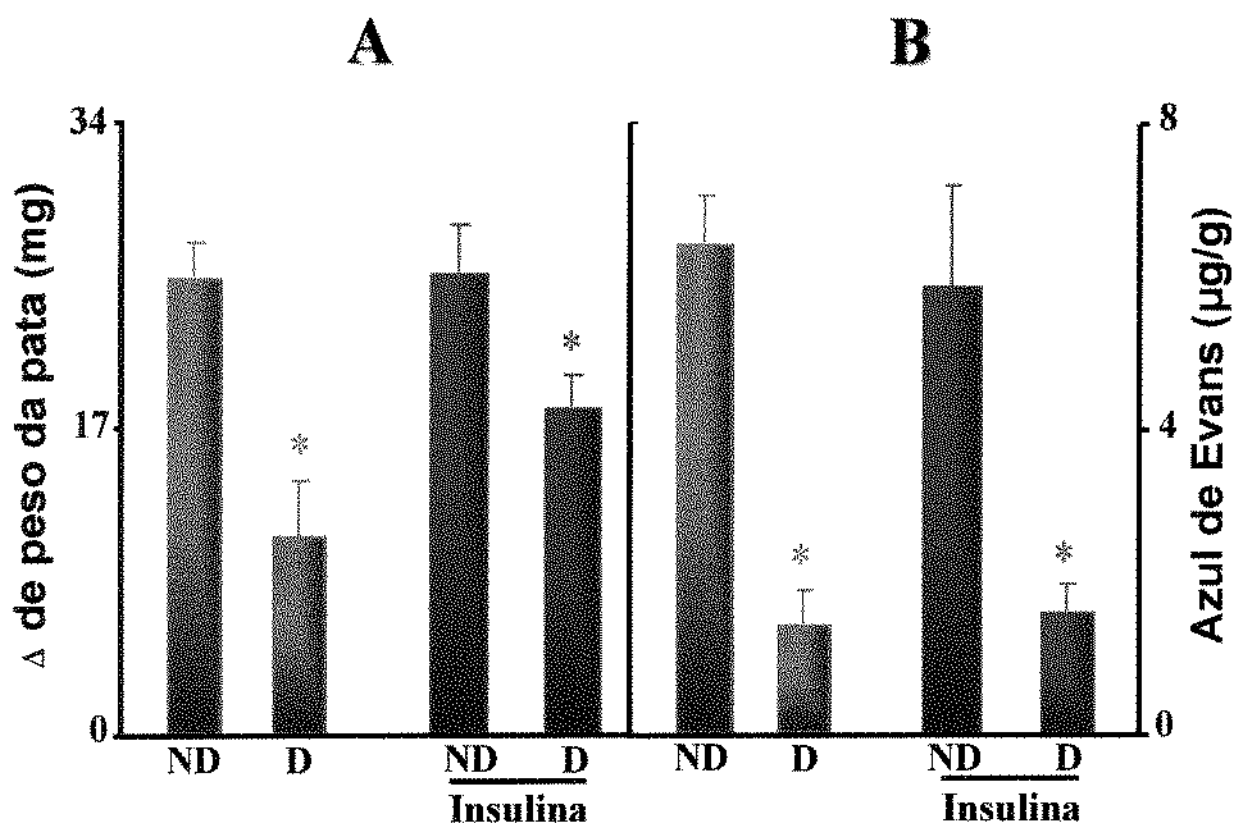


Fig. 15. Efeito do tratamento com insulina sobre o edema (A) e a exsudação plasmática (B) induzidos pela capsaicina. A insulina (20 UI/kg, s.c.) foi administrada 2 horas antes da injeção intraplantar de capsaicina (3,2 $\mu\text{g/pata}$). A resposta inflamatória em animais não diabéticos (ND) e diabéticos (D) foi avaliada 30 minutos após o estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de 8 animais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos não tratados com insulina (teste t-Student não-pareado).

Tab. 1. Efeito do tratamento com insulina sobre a glicemia de animais não diabéticos e diabéticos.

Glicemia (mg/dl)		
	Não diabético	Diabético
CONTROLE	127,3 ± 2,5	416,5 ± 8,8 [#]
INSULINA (UI/Kg)		
5	119,5 ± 11,1	385,3 ± 16,4 [#]
10	68,8 ± 11,1 *	391,8 ± 22,2 [#]
20	75,8 ± 5,1 *	84,8 ± 7,3 *

A insulina, nas doses indicadas abaixo, foi administrada por via subcutânea. Avaliou-se a glicemia 2h30 após a administração da insulina. Os dados representam a média ± EPM de 7 animais. *P < 0,05 em relação ao grupos não tratados com insulina. [#]P < 0,05 em relação aos animais não diabéticos (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

4. Discussão

Estudos prévios mostraram que a injeção intraplantar de SEB em camundongos leva à exsudação plasmática e à formação de edema, sendo esta resposta parcialmente reduzida por antagonistas de receptores H_1 (difenidramina) e pelo tratamento crônico dos animais com capsaicina. Estas observações sugeriram a participação de fibras sensoriais e mastócitos (DESOUZA *et al.*, 1996). No presente estudo, investigamos se os efeitos inflamatórios da SEB em camundongos são de natureza neurogênica, empregando drogas que atuam seletivamente em receptores pré-sinápticos, localizados nos terminais nervosos CSPA, bem como antagonistas de receptores pós-sinápticos, de histamina e serotonina.

Observamos que, tanto o edema quanto a exsudação plasmática, avaliados 2 h após o estímulo com SEB, foram parcialmente reduzidos pelo antagonista de receptores NK_1 (SR140333). A SP, liberada de terminais nervosos CSPA, é um dos neuropeptídeos que mais contribuem para o processo inflamatório neurogênico, atuando principalmente em receptores NK_1 presentes em vênulas pós-capilares (HUGHES *et al.*, 1990). A inflamação induzida pela substância P (SP) e GR73632 é reduzida pelo SR140333 (ANDREWS *et al.*, 1989; EMONDS-ALT *et al.*, 1993). Assim, o fato da atividade edematogênica da SEB ter sido reduzida pelo SR140333, comprova que um agonista de receptores NK_1 , possivelmente a SP, está de fato envolvido com a resposta inflamatória desta enterotoxina. O envolvimento dos receptores NK_2 foi avaliado por meio do tratamento dos animais com o composto SR48968, antagonista de receptores NK_2 (EMONDS-ALT *et al.*, 1992). Nossos resultados mostraram a ausência de efeito desse antagonista, indicando que os receptores NK_2 não apresentam papel importante na resposta edematogênica induzida pela SEB. Isto é esperado, visto que tais receptores, de modo geral,

não estão envolvidos com as ações pró-inflamatórias da SP ou de agonistas NK₁ (GR73632) (EMONDS-ALT *et al.*, 1992; 1993).

Investigamos também o envolvimento de cininas na resposta inflamatória induzida pela SEB. As cininas são formadas pela ação de caliceínas plasmáticas ou teciduais em cininogênios de alto e baixo pesos moleculares (VOGEL, 1979). Uma das principais cininas envolvidas na permeabilidade vascular é a bradicinina, a qual promove seus efeitos principalmente através da estimulação de receptores B₂ (BHOOLA *et al.*, 1992), presentes no sistema nervoso periférico e central (HALL, 1992; DRAY & PERKINS, 1993; SALEH *et al.*, 1997). Somam-se a isso, evidências experimentais que demonstraram que a bradicinina é um potente agente inflamatório endógeno capaz de liberar neuropeptídeos sensoriais de terminais nervosos CSPA e, assim, potencializar indiretamente suas próprias ações inflamatórias (MAGGI & MELLI, 1988; GEPETTI *et al.*, 1990).

Nossos resultados mostraram que a resposta inflamatória evocada pela SEB foi significativamente inibida nos animais tratados com antagonista de receptores B₂ (HOE 140). A dose do HOE 140 foi adequada, visto que praticamente aboliu o aumento de permeabilidade vascular induzido pela bradicinina. Esses resultados sugerem que, pelo menos em parte, a resposta edematogênica induzida pela SEB é dependente da formação local de cininas.

É interessante ressaltar que, ao administrarmos concomitantemente o SR140333 e o HOE 140, não notamos uma redução maior do que aquela observada com os antagonistas administrados separadamente. Estes resultados parecem sugerir que a resposta edematogênica, induzida pela SEB, é desencadeada por uma única via, envolvendo geração local de cininas e, posteriormente, ativação local de neurônios CSPA e liberação de

neuropeptídeos. Dessa forma, resolvemos investigar o efeito do SR140333 sobre a resposta edematogênica induzida pela bradicinina. Observamos que o SR140333 reduziu marcadamente a resposta edematogênica evocada pela bradicinina, confirmando nossas suposições.

Tem-se demonstrado que o peptídeo vasodilatador CGRP, quando administrado, isoladamente, é ineficaz em evocar resposta edematogênica (BRAIN & WILLIAMS, 1985); entretanto, é capaz de potencializar a resposta inflamatória induzida pela SP em ratos (GAMSE & JANCSON, 1985; HOLZER, 1988; BRAIN & WILLIAMS, 1989; HOLZER, 1998). Em nossos estudos, verificamos que o CGRP potencializou o edema, mas não a exsudação plasmática, evocados pelo GR73632. Isto se deve, provavelmente, à ação vasodilatadora do CGRP em arteríolas, promovendo um aumento do fluxo sanguíneo local que não acarreta, necessariamente, em aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício.

Dados da literatura demonstraram que o extravasamento plasmático evocado pela IL-1 β em camundongos é potencializado pela administração de CGRP (AHUWALIA & PERRETI, 1994). Entretanto, outros autores relatam que o CGRP reduz a resposta inflamatória induzida por diferentes estímulos como o ácido araquidônico na orelha de camundongos (GIUSEPPE *et al.*, 1994), bem como a resposta edematogênica evocada por mediadores como histamina, serotonina e leucotrieno B₄ na pata de ratos (RAUD *et al.*, 1991). Em relação a SEB, observamos que o CGRP não modificou o edema e a exsudação induzidos pela mesma. Poderíamos especular que a SEB, ao estimular as fibras sensoriais, já libera grandes concentrações de CGRP endógeno, de forma que a administração exógena do peptídeo não

necessariamente resultaria em uma ampliação da resposta evocada pela toxina. Assim, estudos adicionais seriam necessários para esclarecer a ausência de efeito do CGRP sobre a SEB.

A capsazepina, um análogo estrutural da capsaicina, é um potente inibidor das respostas inflamatórias evocadas pela capsaicina (URBAN & DRAY, 1991; PERKINS & CAMPBELL, 1992; MAGGI *et al.*, 1993) bem como pela resiniferatoxina (SZALLASI *et al.*, 1993). De fato, o tratamento de camundongos com capsazepina reduziu de modo dose-dependente a resposta edematogênica induzida pela capsaicina. Da mesma forma, a capsazepina reduziu significativamente tanto o edema quanto a exsudação evocados pela SEB. Tais resultados reforçam achados de DESOUZA *et al.* (1996) e confirmam que a SEB atua, pelo menos em parte, pela estimulação de fibras nervosas sensoriais, via mecanismos mediados por receptores vanilóides. Estes dados, somados àqueles que demonstraram o envolvimento de cininas na resposta edematogênica induzida pela SEB, parecem sugerir que a toxina evoca uma resposta inflamatória através de duas vias distintas: 1) liberação de bradicinina com conseqüente ativação de fibras CSPA através de receptores B₂, e 2) ativação dos terminais CSPA através de receptores vanilóides.

Embora a ativação de terminais CSPA pela combinação de histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandina E₂, possa ser prevenida pela capsazepina, especula-se que estes mediadores inflamatórios não interajam diretamente em receptores vanilóides, mas sim levam à liberação de outros mediadores que vão atuar nesses receptores (VYKLICKY *et al.*, 1998). Entretanto, HUA *et al.* (1995) demonstraram que a capsazepina não altera a liberação de neuropeptídeos induzida pela bradicinina em traquéia de ratos, sugerindo que os efeitos desse mediador não estejam envolvidos com a

ativação de receptores vanilóides, mas sim com sua ação em receptores B₂ localizados em terminais sensoriais periféricos (HALL, 1992; DRAY & PERKINS, 1993; SALEH *et al.*, 1997).

A SP ativa mastócitos, promovendo a liberação de histamina e serotonina (HUGHES *et al.*, 1990). Visto que a resposta edematogênica mediada pela SEB é reduzida pelo antagonista de receptores NK₁ procuramos investigar a relação entre mediadores liberados de fibras sensoriais e mastócitos. Isto realizou-se mediante a utilização de antagonistas de receptores H₁ (mepiramina) e 5-HT (metisergida), os quais reduziram a atividade edematogênica evocada pela SEB. Da mesma forma, tanto a mepiramina quanto a metisergida reduziram o aumento de permeabilidade vascular evocados pela histamina e serotonina, respectivamente, confirmando a eficácia do tratamento. Tais resultados confirmam achados de DESOUZA *et al.* (1996) que mostraram a participação de histamina na resposta edematogênica evocada pela SEB na pata de camundongos.

Da mesma forma, SCHEUBER *et al.* (1987) relataram que a SEB induz na pele de macacos uma reação de hipersensibilidade imediata causada, provavelmente, pela ativação de mastócitos, já que a mesma foi inibida por antagonistas de receptores H₁ e H₂. Somados a isso, KOMISAR *et al.* (1992) demonstraram que a SEB, quando incubada com mastócitos de roedores, induz a liberação de serotonina, que pode ser aumentada pela adição de bradicinina. É interessante citar, ainda, que análogos da capsaicina promovem aumento na concentração de cálcio em mastócitos, fenômeno semelhante ao encontrado em fibras sensoriais, sugerindo a presença de receptores vanilóides em mastócitos (BIRÓ *et al.*, 1998a).

Em conjunto, nossos dados mostram que os efeitos da resposta

edematogênica evocada pela SEB é também dependente de mastócitos. Entretanto, nosso estudo não nos permite concluir se a SEB ativa diretamente os mastócitos ou se a ativação dessas células é indireta, através da bradicinina (formada localmente em resposta à SEB), SP (liberada pela SEB) ou algum componente “vanilóide-símile” formado no sítio inflamado.

As respostas inflamatórias a estímulos variados, incluindo histamina e serotonina (FORTES *et al.*, 1984; GARCIA LEME *et al.*, 1992) em animais diabéticos apresentam-se reduzidas, indicando um papel pró-inflamatório importante para a insulina. De fato, o tratamento de animais diabéticos com insulina restaura a resposta inflamatória. Quanto ao papel pró-inflamatório da insulina, sabe-se que a mesma estimula receptores próprios presentes na superfície luminal das células endoteliais (BAR *et al.*, 1978; FORTES *et al.*, 1984).

Neste estudo, observamos que a resposta edematogênica evocada pela administração intraplantar de SEB (ou capsaicina) em camundongos diabéticos apresenta-se substancialmente reduzida, corroborando os achados prévios (FORTES *et al.*, 1984; GARCIA LEME *et al.*, 1992). Entretanto, embora o tratamento agudo dos animais diabéticos com insulina tenha sido eficaz, uma vez que reduziu a glicemia, não se observou restauração da resposta da SEB (ou capsaicina). No entanto, trabalho recente demonstrou que a redução do edema neurogênico resultante da estimulação elétrica em ratos diabéticos é restaurada somente com tratamento crônico, mas não agudo, de insulina (BENNET *et al.*, 1998). Dessa forma, estudos adicionais com o uso de insulina são necessários para esclarecermos se este hormônio exerce papel importante na resposta inflamatória induzida pela SEB.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a SEB causa uma resposta

inflamatória neurogênica complexa que envolve geração local de cininas, ativação de receptores vanilóides e degranulação de mastócitos.

5. Conclusões

a) O aumento de permeabilidade induzido pela injeção intraplantar de SEB é parcialmente neurogênico, e envolve a liberação de um agonista NK_1 (provavelmente SP) do terminal das fibras CSPA;

b) A ativação das fibras CSPA pela SEB parece ocorrer através de dois mecanismos distintos, ou seja, liberação de cininas (provavelmente bradicinina) e ativação (direta ou indireta) de receptores vanilóides;

c) A atividade edematogênica induzida pela SEB parece envolver ativação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina e serotonina.

6. Summary

In this study, we investigated the participation of sensory fibers in the mouse paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin type B (SEB; 25 µg/paw).

The NK₁ receptor antagonist SR140333 (120 nmol/kg, s.c. + 120 nmol/kg, i.v.) significantly inhibited the plasma protein extravasation and oedema formation induced by SEB (37 and 35%, respectively). The oedema and exsudation induced by the NK₁ receptor agonist (GR73632; 50 pmol/paw) were also reduced significantly by SR140333 (40 and 88%, respectively). The oedematogenic activity of the NK₂ receptor antagonist SR48968 (1.7 µmol/Kg, i.v.) did not affect SEB or GR73632. In addition, the oedema and plasma exsudation-induced by SEB were not altered by the vasodilator CGRP (100 and 300 pmol/paw). However, GR73632-induced oedema (50 pmol/paw) was significantly increased by CGRP.

Pretreating the mice with the B₂ antagonist receptor (HOE 140; 400 nmol/kg, i.v.) showed a significantly reduced the SEB-induced oedema and exsudation (35 and 34%, respectively). Oedema caused by bradykinin (3 nmol/paw) was also significantly reduced by HOE 140. Simultaneous treatment with SR140333 and HOE 140 inhibited SEB-induced paw oedema, but only to an extent similar to that observed when these antagonists were administered alone. SR140333 (120 nmol/kg, s.c. + 120 nmol/kg, i.v.) significantly reduced the oedema (62%) and exsudation (49%) induced by bradykinin.

The vanilloid antagonist capsazepine (100 µmol/Kg, s.c.) significantly reduced in the oedema (53%) and exsudation (45%) induced by SEB. This antagonist (50 and 100 µmol/kg, s.c.) also dose-dependently inhibited the paw oedema induced by capsaicin (5 µg/paw).

7. Referências bibliográficas

- ÁCS, G.; BIRÓ, T.; ÁCS, P.; MODARRES, S.; BLUMBERG, P.M. - Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. **J. Neurosci.**, **17**: 5622-56226, 1997.
- ÁCS, G.; LEE, J.; MARQUEZ, V.; BLUMBERG, P.M - Distinct structure-activity relations for stimulation of ^{45}Ca uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. **Mol. Brain Res.**, **35**: 173-182, 1996.
- AHLUWALIA, A. & PERRETTI, M. - Calcitonin gene-related peptides modulate the acute inflammatory response induced by interleukin-1 in the mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, **264**: 406-415, 1994.
- AMARA, S.G.; ARRIZA, J.L.; LEFF, S.E.; SWANSON, L.W.; EVANS, R.M.; ROSENFELD, M.G. - Expression in brain of an mRNA encoding a novel neuropeptide homologous to CGRP. **Science**, **229**: 1094-1097, 1985.
- AMARA, S.G.; JONAS, V.; ROSENFELD, M.G.; ONG, E.S.; EVANS, R.M. - Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, **298**: 240-244, 1982.
- ANDOH, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURAISHI, Y. - Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK₁ tachykinin receptors in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **286**: 1140-1145, 1998.
- ANDREWS, P.V.; HELME, R.D.; THOMAS, K.L. - NK₁ receptor mediation of neurogenic plasma extravasation in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 1232-1238, 1989.
- AUBERSON, S. & LUNDBERG, J.M. - Lactic acid-induced plasma protein extravasation in rat airways by stimulation of sensory nerves and NK₁ receptor activation. **Pharmacol. Toxicol.** **73**: 305-310, 1993.
- BAR, R.S.; HOACK, J.C.; PEACOCK, M.L. - Insulin receptors in human endothelial cells: identification and characterization. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **46**: 699-702, 1978.

- BARBER, A. - μ - and κ -opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. **Eur. J. Pharmacol.**, **236**: 113-120, 1993.
- BARNES, P.J.; BELVISI, M.G.; ROGERS, D.F. - Modulation of neurogenic inflammation: a novel approach to inflammatory disease. **TIPS**, **11**: 185-189, 1990.
- BARTHÓ, L.; AMANN, R.; SARIA, A.; SZOLCSANYI, J.; LEMBECK, F. - Peripheral effect of opioid drugs on capsaicin-sensitive neurons of the guinea-pig bronchus and rabbit ear. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **336**: 316-320, 1987.
- BARTHÓ, L. & SZOLCSÁNYI, J. - Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **73**: 101-104, 1981.
- BAYLISS, W.M. - On the origin from the espinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb, and on the nature of these fibres. **J. Physiol.**, **26**: 173-209, 1901.
- BELVISI, M.G.; ICHINOSE, M.; BARNES, P.J. - Modulation of non-adrenergic non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig airways via GABA_B receptors. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 1225-1231, 1989.
- BENNETT, G.S.; GARRET, N.E.; DIEMEL, L.T.; BRAIN, S.D.; TOMLINSON, D.R. - Neurogenic cutaneous vasodilation and plasma extravasation in diabetic rats: effect of insulin and nerve growth factor. **Br. J. Pharmacol.**, **124**: 1573-1579, 1998.
- BERGDOLL, M.S. - Enterotoxins. In: ADLAM, C. & EASMON, C.S.F. **Staphylococci and staphylococcal infections**. London, Academic Press, 1983. cap. 16, p.559-593.
- BERGDOLL, M.S. - Staphylococcal intoxications. In: REIMANN, H. & BRYAN, F.L. **Food borne infections and intoxications**. New York, Academic Press, 1979. cap. 9, p.443-494.

- BESSON, J.M & CHAOUCH, A. – Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, **67**: 67-186, 1987.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.A.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; SHAH, K.; WALPOLE, C.S.J.; YEATS, J.C. - Development of a competitive antagonist for the sensory neurone excitant capsaicin. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 77P, 1991.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. - Bioregulation of kinin: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, **44**: 4-80, 1992.
- BIRÓ, T.; ÁCS, G.; ÁCS, P.; MODARRES, S.; BLUMBERG, P.M. - Recent advances in understanding of vanilloid receptors: A therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, **2**: 56-60, 1997.
- BIRÓ, T.; BRODIE, C.; MODARRES, S.; LEWIN, N.E.; ÁCS, P.; BLUMBERG, P.M. - Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. **Mol. Brain Res.**, **56**: 89-98, 1998b.
- BIRÓ, T.; MAURER, M.; MODARRES, S.; LEWIN, N.E.; BRODIE, C.; ÁCS, G.; ÁCS, P.; PAUS, R.; BLUMBERG, P.M. - Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. **Blood**, **91**: 1332-1340, 1998a.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, **23**: 85-101, 1992.
- BRAIN, S.D. Sensory neuropeptides in the skin. In: GEPPETTI, P. & HOLZER, P. **Neurogenic inflammation**. CRC Press, Boca Ratón, 1996. p. 229-244.

- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. - Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, **86**: 855-860, 1985.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. - Interaction between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema and blood flow in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 77-82, 1989.
- BREIMER, L.H.; MACINTYRE, I.; ZAIDI, M. - Peptides from the calcitonin genes: Molecular genetics, structure and function. **Biochem. J.**, **255**: 377-390, 1988.
- BRUCE, A.N. - Vasodilator axon reflex. **Q. J. Exp. Physiol.**, **6**: 339-354, 1913.
- BÜNKER, C.B.; REAVLEY, C.; O'SHAUGHNESSY, D.J.; DOWD, P.M. - Calcitonin gene-related peptide in the treatment of severe peripheral vascular insufficiency in Raynaud's phenomenon. **Lancet**, **342**: 80-83, 1993.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. - The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, **23**: 816-824, 1997.
- CERVERO, F. & LAIRD, J.M.A. - One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. **News Physiol. Sci.**, **6**: 268-273, 1991.
- CHAHN, L.A. - The effects of ruthenium red on the response of guinea-pig ileum to capsaicin. **Eur. J. Pharmacol.**, **169**: 241-247, 1989.
- CHOI, Y.; KOTZIN, B.; HERRON, L.; CALLAHAN, J.; MARRACK, P. - Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, **86**: 8941-8945, 1989.

- DICKENSON, A.H.; DRAY, A.; HUGHES, G.A.; WALPOLE, C.S.J. - The selective capsaicin antagonist capsazepine inhibits capsaicin-induced anti-nociception: electrophysiological studies in rodents. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 79P, 1991.
- DÓCHERTY, R.J.; YEATS, J.C.; PIPER A.S. - Capsazepina block of voltage-gated calcium channels in adult rat dorsal ganglion neurones in culture. **Br. J. Pharmacol.**, **121**: 1461-1467, 1997.
- DRAY, A. & PERKINS, M.N. - Bradykinin and inflammatory pain. **TINS**, **16**: 99-104, 1993.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. - Pharmacology of chronic pain. **TIPS**, **15**: 190-197, 1994.
- ELLIS, J.L. & UNDEM, B.J. - Inhibition by capsazepine of resiniferatoxin and capsaicin-induced contractions of guinea-pig trachea. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **268**: 85-89, 1994.
- EMONDS-ALT, X.; DOUTREMEPUICH, J.D.; HEAULME, M.; NELIAT, G.; SANTUCCI, V.; STEINBERG, R.; VILAIN, P.; BICHON, D.; DUCOUX, J.P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; SOUBRIÈ, P.; LE FUR, G.; BRELIÈRE, J.C. - *In vitro* and *in vivo* biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK₁ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **250**: 403-413, 1993.
- EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOIC, P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; ADVENIER, C.; NALINE, E.; NELIAT, G.; LE FUR, G.; BRELIÈRE, J.C. - A pot and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK₂) receptor. **Life Sci.**, **50**: PL101-PL106, 1992.
- FERREIRA, S.H. - Inflammatory pain, prostaglandin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **25**: 659-664, 1981.
- FLEISCHER, B.; SCHREZENMEIER, H.; CONRADT, H.P. - Cell stimulation by staphylococcal enterotoxins: Role of class II molecules and T cell surface structures. **Cell Immunol.**, **119**: 92-101, 1989.

- FOREMAN, J.C. - Peptides and neurogenic inflammation. **Br. Med. Bull**, **43**: 386-400, 1987.
- FLORQUIN, S.; AMRAOUI, Z.; ABRAMOWICZ, D.; GOLDMAN, M. - Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **J. Immunol.**, **153**: 2618-2623, 1994.
- FORTES, Z.B.; GARCIA-LEME, J.; SCIVOLETTO, R. - Vascular reactivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. **Br. J. Pharmacol.**, **83**: 635-643, 1984.
- GADDUM, J.H. & PICARELLI, Z.P. - Two kinds of tryptamine receptors. **Br. J. Pharmacol.**, **12**: 323-328, 1957.
- GAMSE, R.; HOLZER, P.; LEMBECK F. - Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **Br. J. Pharmacol.**, **68**: 207-213, 1980.
- GAMSE, R. & JANCsó, G. - Reduced neurogenic changes in inflammation in streptozotocin-diabetic rats due to microvascular changes but not to substance P depletion. **Eur. J. Pharmacol.**, **118**: 175-180, 1985.
- GAMSE, R. & SARIA, A. - Antidromic vasodilatation in the hindpaw measured by laser doppler flowmetry: pharmacological modulation. **J. Auton. Nerv. Syst.**, **19**: 105-111, 1987.
- GARCIA-LEME, J.; BÖHM, G.M.; MIGLIORINI, R.H.; SOUZA, M.Z.A. - Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. **Eur. J. Pharmacol.**, **29**: 175-180, 1974.
- GARCIA-LEME, J.; HAMAMURA, L.; MIGLIORINI, R.H.; LEITE, M.P. - Influence of *diabetes mellitus* upon the inflammatory response of the rat. A pharmacological analysis. **Eur. J. Pharmacol.**, **23**: 74-81, 1973.
- GARCIA-LEME, J.; FORTES, Z.B.; SANNOMIYA, P.; FARSKY, S.P. - Insulin, glucocorticoids and the control of inflammatory responses. In: **Autacoid Pharmacology** Birkhäuser, Verlag Basel: 1992, p. 99-118.

- GEPPETTI, P.; FRILLI, S.; RENZI, D.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A. - Distribution of CGRP-like immunoreactivity in various rat tissues: correlation with substance P and other tachykinins and sensitivity to capsaicin. **Regul. Pept.**, **23**: 289-298, 1988.
- GEPPETTI, P.; TRAMONTANA, M.; SANTICIOLI, P.; DEL BIANCO, E.; GIULIANI, S.; MAGGI, C.A. - Bradykinin-induced release of CGRP from capsaicin-sensitive nerves in guinea-pig atria: mechanism of action and calcium requirements. **Neuroscience**, **38**: 687-692, 1990.
- GIULIANI, S.; MAGGI, C.A.; MELLI, A. - Opioid receptors and prejunctional modulation of capsaicin-sensitive sensory nerves in guinea-pig left atrium. **Gen. Pharmacol.**, **163**: 91-96, 1990.
- GIUSEPPE, C.; AMICO-ROXAS, M.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M.C.; PRATO, A.; MAUGERI, S.; BERNARDIS, E.; SCAPAGNINI, U. - Effects of CGRP in different models of mouse ear inflammation. **Life Sci.**, **54**: PL119-PL124, 1994.
- GONZALO, J.A.; GONZALEZ-GARCIA, A.; CARLOS, M.A.; KROEMER G. - Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells *in vivo*. **J. Exp. Med.**, **177**: 1239-1246, 1993.
- GOTTFRIED, A.; SCHEUBER, P.H.; BERNHARD, R.; SAILER-KRAMER, B.; HARTMANN, A. - Role of substance P in immediate-type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **84**: 880-885, 1989.
- GRIFFITHS, C.D.; ELDERSHAW, T.P.D.; GERAGHTY, D.P.; HALL, J.L.; COLQUHOUN, E.Q. - Capsaicin-induced biphasic oxygen uptake in rat muscle: antagonism by capsazepine and ruthenium red provides further evidence for peripheral vanilloid receptor subtypes (VN₁/VN₂). **Life Sci.**, **59**: 105-117, 1996.
- HALL, J.M. - Bradykinin receptors, pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, **56**: 131-190, 1992.

- HAMON, M.; GALLISSOT, M.C.; MENARD, F.; GOZLAN, H.; BOUGOIN, S.; VERGÉ, D. - 5-HT₃ receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibres in the rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, **164**: 315-322, 1989.
- HAMMOND, D.L. & YAKSH, T.L. - Peripheral and central pathways in pain. **Pharmacol. Ther.**, **12 Suppl.**: 33-49, 1983.
- HANDWERKER, H.O. & KOBAL, G. - Psychophysiology of experimentally induced pain. **Physiol. Rev.**, **73**: 639-671, 1993.
- HERNANZ, A.; MUELAS, G.; BORBUJO, J. - Plasma neuropeptide pattern in acute idiopathic urticaria. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **90**: 198-200, 1989.
- HOLLENBERG, N.K. - Serotonin vascular responses. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **28**: 41-59, 1988.
- HOLZER, P. - Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 143-201, 1991.
- HOLZER, P. - Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, **24**: 739-768, 1988.
- HOLZER, P. - Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen. Pharmacol.**, **30**: 5-11, 1998.
- HOLZER, P. - Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, **121**: 49-146, 1992.
- HOLZER, P., WACHTER, A., HEINEMANN, A., JOCIC, M., LIPPE, I.T.H. & HERBERT, M.K. - Sensory nerves, nitric oxide and nanc vasodilation. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **329**: 67-79, 1995.

- HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLCHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P.A. - VII International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 157-203, 1994.
- HUA, X.Y.; WONG, S.; JINNO, S.; YAKSH, T. - Pharmacology of calcitonin gene related peptide release from sensory terminals in the rat trachea. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **73**: 99-1006, 1995.
- HUGHES, S.R.; WILLIAMS, T.J; BRAIN, S.D. - Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by systemic substance P. **Eur. J. Pharmacol.**, **191**: 481-484, 1990.
- ICHINOSE, M. & BARNES, P.J. - A potassium channel activator modulates both excitatory noncholinergic and cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **252**: 1207-1212, 1990.
- INOUE, H.; ASAKA, T.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. - Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **333**: 231-240, 1997.
- LANDOLO, J.J. - Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, **43**: 375-402, 1989.
- LANGLEY, J.N. - Antidromic action. **J. Physiol.**, **57**: 428-440, 1923.
- JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, 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.; KIRÁLY, E.; JANCSÓ-GÁBOR, A. - Chemosensitive pain fibres and inflammation. **Int. J. Tissue React.**, **11**: 57-64, 1980.
- KHAKH, B.S. & KENNEDY, C. - Adenosine and ATP: progress in their receptors' structures and functions. **TIPS**, **19**: 39-41, 1998.

- KOMISAR, J.; RIVERA, J.; VEGA, A.; TSENG, J. - Effects of staphylococcal enterotoxin B on rodent mast cells. **Infect. Immun.**, **60**: 2969-2975, 1992.
- LECLAIRE, R.D.; KELL, W.L.; SADIK, R.A.; DOWS, M.B.; PARKER, G.W. - Regulation of staphylococcal enterotoxin B-elicited nitric oxide production by endothelial cells. **Infect. Immun.**, **63**: 539-546, 1995.
- LEMBECK, F. & HOLZER, P. - Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **310**: 175-183, 1979.
- LEVY, L. - Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sci.**, **8**: 601-606, 1969.
- LIU, L. & SIMON, S.A. - Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. **Neurosci. Lett.**, **228**: 29-32, 1997.
- LLORACH, M.S.A.; BÖHM, G.M.; GARCIA-LEME, J. - Decreased vascular reaction to permeability factors in experimental diabetes. **Br. J. Exp. Pathol.**, **57**: 747-754, 1976.
- 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. Pharmacol.**, **11**: 173-208, 1991.
- MAGGI, C.A.; BEVAN, S.; WALPOLE, C.S.J.; RANG, H.P.; GIULIANI, S. - A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, **108**: 801-805, 1993.

- MAGGI, C.A. & MELLI, A. - The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Gen. Pharmacol.**, **19**: 1-43, 1988.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. - The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, **248**: 705-711, 1990.
- MARTLING, C.R. & LUNDBERG, J.M. - Capsaicin-sensitive afferents contribute to the acute airway edema following tracheal instillation of hydrochloride acid or gastric juice in the rat. **Anesthesiology**, **68**: 350-356, 1988.
- MORAES, F.R. & GARCIA-LEME, J. - Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvascular Res.**, **23**: 281-293, 1982.
- NAUKKARINEN, A.; NICKLOFF, B.J.; FARBER, E.M. - Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. **J. Invest. Dermatol.**, **92**: 126-129, 1989.
- OTTLECH, A.; KOLTAL, M.; DEKOV, E. - Effect of insulin and alloxan diabetes on carrageenan inflammation in rats. **Int. Arch. Allergy Appl. Immun.**, **50**: 546-554, 1976.
- PATACCHINI, R. & MAGGI, C.A. - Tachykinin receptors and receptor subtypes. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, **329**: 161-184, 1995.
- PERKINS, M.N. & CAMPBELL, E.A. - Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 329-333, 1992.
- PEROUTKA, S.J. & SNYDER, S.H. - Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]-lysergic acid diethylamide and [³H]-spiroperidol. **Mol. Pharmacol.**, **16**: 687-699, 1979.

- PERLSTEIN, R.S.; WHITNALL, M.H.; ABRAMS, J.S.; MOUGEY, E.H.; NETA, R. - Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1 and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide *in vivo*. **Endocrinology**, **132**: 946-952, 1993.
- PILLION, D.J.; HASKELL, J.F.; MEEZAN, E. - Cerebral cortical microvessels: an insulin-sensitive tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **104**: 686-692, 1982.
- PINTER, E.; BROWN, B.; HOULT, J.R.; BRAIN, S.D. - Lack of evidence for tachykinin NK₁ receptor-mediated neutrophil accumulation in the rat cutaneous microvasculature by thermal injury. **Eur. J. Pharmacol.**, **369**: 91-98, 1999.
- PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-JUSTE P.; TONUSSI, C.R.; ERA, G.A. - Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **351**: 15-22, 1998.
- PTAK, W.; CZARNIK, Z.; HANCZAKOWSKA, M. - Contact sensitivity in alloxan diabetic mice. **Clin. Exp. Immunol.**, **19**: 319-326, 1975.
- RAUD, J.; LUNDEBERG, T.; BRODDA-JANSEN, G.; THEODORSSAN, E.; HEDQVIST, P. - Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **180**: 1429-1435, 1991.
- RECHTMAN, M.P.; BOURA, A.L.A.; KING, R.G.; OLLEY, J.E.; SCHILLER, P.W. - Effects of morphine, 5-tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (DALDA) and B-HT920 on noncholinergic nerve mediated bronchoconstriction in pithed guinea-pigs. **Br. J. Pharmacol.**, **101**: 269-272, 1990.
- REGOLI, D. & BARABÉ, J. - Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, **32**: 1-46, 1980.
- RICHARDSON, B.P.; ENGEL, G.; DONTSCH, P.; STADLER, P.A. - Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. **Nature**, **316**: 126-131, 1985.

- ROSENFELD, M.G.; MERMOD, J.; AMARA, S.G.; SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVIER, J.; VALE, W.W.; EVANS, R.M. - Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, **304**: 129-135, 1983.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. - Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, **331**: 43-52, 1997.
- SALOGA, J.; LEUNG, D.Y.M.; REARDON, C.; GIORNO, R.C.; WILLI, B.; GELFAND, W.E. - Cutaneous exposure to the superantigen staphylococcal enterotoxin B elicits a T-Cell-dependent inflammatory response. **J. Invest. Dermatol.**, **106**: 982-988, 1996.
- SAMPAIO, A.L.; ERA, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; HENRIQUES, M.G. - ET_A receptor antagonist inhibits allergic inflammation in the mouse. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **26**: S416-S418, 1995.
- SASAMURA, T.; SASAKI, M.; TOHDA, C.; KURAISHI, Y. - Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. **Neuroreport**, **9**: 2045-2048, 1998.
- SCHEUBER, P.H.; DENZLINGER, C.; WILKER, D.; BECK, G.; KEPPLER, D.; HAMMER, D.K. - Staphylococcal enterotoxin B as a nonimmunological mast cell stimulus in primates: the role of endogenous cysteinyl leukotrienes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **82**: 289-291, 1987.
- SCHOLZEN, T.; ARMSTRONG, C.A.; BUNNET, N.W.; LUGER, T.A.; OLERUD, J.E.; ANSEL, J.C. - Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune system. **Exp. Dermatol.**, **7**: 81-96, 1998.
- SENEPATI, A.; ANAND, P.; MCGREGOR, G.P.; GHATEI, M.A.; THOMPSON, R.P.; BLOOM, S.R. - Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. **Neurosci. Lett.**, **71**: 101-105, 1986.

- SHURIN, G.; SHANKS, N.; NELSON, L.; HOFFMAN, G.; HUANG, L.; KUSNECOV, A.W. - Hypothalamic-pituitary-adrenal activation by the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B: role of macrophages and T cells. **Neuroendocrinology**, **65**: 18-28, 1997.
- STRANGE, P.; SKOV, L.; LISBY, S.; NIELSEN, P.L.; BAADSGAARD, O. - Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. **Arch. Dermatol.**, **132**: 27-33, 1996.
- SUBRAMANIAN, N. & BRAY, M.A. - Interleukin-1 releases histamine from human basophils and mast cell *in vitro*. **J. Immunol.**, **138**: 271-275, 1987.
- SZALLASI, A. - Perspectives on vanilloids in clinical practice. **Drug News Persp.**, **10**: 522-527, 1997.
- SZALLASI, A. - The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. **Gen. Pharmacol.**, **25**: 223-243, 1994.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P.M. - Resiniferatoxin and analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sci.**, **47**: 1399-1408, 1990.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P.M. - Vanilloid receptors: New insights enhance potencial as a therapeutic target. **Pain**, **68**: 195-208, 1996.
- SZALLASI, A.; BIRÓ, T.; SZABÓ, T.; NODARRES, S.; PETERSEN, M.; KLUSCH, A.; BLUMBERG, P.M.; KRAUSE, J.E.; STERBER, O. - A non-pungente triprenyl phenol of fungal origin, scutigeral, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. **Br. J. Pharmacol.**, **126**: 1351-1358, 1999.
- SZALLASI, A.; LEWIS, N.E.; BLUMBERG, P.M. - Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **266**: 678-683, 1993.

- SZIKSZAY, M.; SÁNDOR, B.; GYÖNGYI, H.; GYÖGY B. - Multiple nitric oxide sources in neurogenic plasma extravasation in rat hindpaw skin. **Life Sci.**, **63**: 1119-1125, 1998.
- SZOLCSÁNYI, J. - A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. **J. Physiol.**, **73**: 251-259, 1977.
- SZOLCSÁNYI, J., JANCsó-GÁBOR, A.; JÓO, F. - Functional and fine structural characteristics of the sensory neurone blocking effect of capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **287**: 157-168, 1975.
- TRATSK, K.S.; CAMPOS, M.M.; VAZ, Z.R.; FILHO, V.C., SCHLEMPER, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. - Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflamm. Res.**, **46**: 509-514, 1997.
- UEDA, N.; MURAMATSU, I.; FUJIWARA, M. - Dual effects of dynorphin-(1-13) on cholinergic and substance P-ergic transmission in the rabbit iris sphincter muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **232**: 545-550, 1985.
- UEDA, N.; MURAMATSU, I.; HAYASHI, H.; FUJIWARA, M. - Effects of Met-enkephalin on the substance P-ergic and cholinergic responses in the rabbit iris sphincter muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **226**: 507-511, 1983.
- URBAN, L. & DRAY, A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonises the effects of capsaicin in the mouse spinal cord *in vitro*. **Neurosci. Lett.**, **134**: 9-11, 1991.
- VYKLiCKY, L.; KNOTKOVÁ-URBANCOVÁ, H.; VITASKOVÁ, Z.; VLACHOVÁ, V.; KRESS, M.; REEH, P.W. - Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. **J. Neurophysiol.**, **79**: 670-676, 1998.
- VOGEL, R. - Kallikrein inhibitors. In: **Bradykinin, kallidin and kallikrein**. Handb. Exp. Pharmacol. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 1979, vol.25, p.163-225.

WHITY, C.J.; WALKER, P.D.; GOEBEL, D.J.; POOSCH, M.S.; BANNON, M.J. - Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. **Neuroscience**, **64**: 419-425, 1995.