

ESTUDO BIOQUÍMICO, IMUNOLÓGICO E FARMACOLÓGICO COMPARATIVO
DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF) PRESENTE NO VENENO DE
Crotalus durissus cascavella, WAGLER, 1824 E NA SALIVA DE CAMUNDONGO.

Geanne Matos de Andrade Cunha

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

TESTE
G13
C.9426
1994

FORTALEZA - 1994

FC-000.02584-1

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
. 470899	
04 1 03 196	

C199281

R470899

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
. III	
10 1 09 1994	

615 Cunha, Geanne Matos de Andrade
C972 e

Estudo bioquímico, imunológico e farmacológico comparativo do fator de crescimento do nervo (NGF) presente no veneno de *Crotalus durissus cascavella* Wagler, 1824 e na saliva de camundongo / Geanne Matos de Andrade Cunha. - Fortaleza, 1994.

133p.: il.

1. Farmacologia - dissertação de mestrado

I. Título

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados, na Biblioteca Central da referida Universidade.

Geanne Matos de Andrade Cunha
Geanne Matos de Andrade Cunha

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 25/02/94

Profª. Glauce Socorro de Barros Viana

Orientadora da dissertação

Talapala Govindaswamy Naidu
Prof. Talapala Govindaswamy Naidu

Prof. José Xavier Filho

Ao Adelino, meu marido, pelo amor e compreensão e aos meus filhos , Lucas e Marina, pelo tempo que lhes deixei de dedicar.

NGF saves neurons; these neurons
are dying in Alzheimer's brains; Let's
give NGF.

WILLIAN MOBLEY

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos a Prof^a. Glauce Socorro de Barros Viana, minha mestra, pela competência, amizade e estímulo demonstrados na orientação e execução deste trabalho.

Ao Prof. Talapala Govindaswamy Naidu, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pela inestimável colaboração e por ter gentilmente cedido seu laboratório nos estudos imunológicos.

Ao Prof. José Xavier Filho e aos doutorandos Maurício e Valdirene, do Departamento de Bioquímica, onde foram realizados parte dos estudos bioquímicos.

Ao Prof. José Santiago Limaverde, do Laboratório Regional de Ofíoides de Fortaleza (LAROF), pelo fornecimento do veneno, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao, pela grande amizade, incentivo e ajuda científica durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus professores de Pós-Graduação, especialmente Prof. Manoel Odorico de Moraes e Eduardo Torres, pela segurança e reconhecida capacidade de incentivar o estudo e o desenvolvimento da Farmacologia.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, especialmente, José Clielder Rebouças da Silva, Antonio Raimundo Nava e Marcos Fábio G. Rocha, pela amizade e bons momentos passados juntos.

A bibliotecária Norma Carvalho Linhares e aos funcionários da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde, pela ajuda na revisão bibliográfica.

A Maria Vilani Rodrigues Bastos, pelo carinho e imprescindível ajuda técnica.

Ao bolsista Marcos Antonio Martins, um grande amigo, e companheiro de trabalho.

Aos secretários do Curso de Pós-graduação, Fabiana Maria da Silva e Wasco Pinheiro Diógenes.

Ao CNPq e FINEP pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	1
• Internalização do NGF e transporte axonal retrógrado	10
• Mecanismo de ação do NGF	12
• O papel dos segundos mensageiros	16
Íons cálcio	17
AMPc	17
Fosfolípidios	18
Fosforilação de proteínas	18
O envolvimento da tirosina quinase	20
• Outras ações biológicas do NGF	20
• Ações do NGF no SNC-Possível papel terapêutico	25
• Ações farmacológicas do NGF	29
OBJETIVOS	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
1. Coleta das amostras	32
1.1 Reagentes	32
1.2 Método	32
2. Diálise e centrifugação	32
2.1 Reagentes e materiais utilizados	33

	página
2.2 Método	33
3. Cromatografia em coluna de gel de Sephadex G-100	33
3.1 Reagentes e materiais utilizados	33
3.2 Método	34
4. Determinação da proteína	35
4.1 Material e reagentes utilizados	35
4.2 Método	35
5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (PAGE-SDS).....	36
5.1 Materiais e reagentes utilizados	36
5.2 Método	38
6. Produção do antisoro contra a fração do veneno de <i>Crotalus durissus</i> <i>cascavella</i>	39
6.1 Reagentes utilizados	39
6.2 Método	39
7. Imunodifusão dupla radial de Ouchterlony	40
7.1 Reagentes utilizados	40
7.2 Método	41
8. Ensaio farmacológicos	42
8.1 Determinação do DL ₅₀ da fração do veneno de <i>C. d. cascavella</i>	42
8.2 Teste de retirada da cauda da água ("Rat water tail immersion")	43
8.3 Teste da placa quente ("Hot plate test")	44
8.4 Teste das contorções abdominais pelo ácido acético (" Writhing test ")	44
8.5 Teste da formalina	45
8.6 Edema de pata induzido por carragenina em camundongos	45
8.7 Edema de pata induzido por dextrano em camundongos	46

	página
8.8 Degranulação de mastócitos	47
8.8.1 Reagentes e drogas utilizadas	47
8.8.2 Método	47
9. Métodos estatísticos	48
RESULTADOS	49
1. Cromatografia em coluna de Sephadex G-100	49
2. Determinação de proteína	54
3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% com SDS	54
4. Determinação de DL ₅₀ da fração de veneno de <i>C. d. cascavella</i> em camundongos	54
5. Imunodifusão dupla radial de Ouchterlony	56
6. Teste da placa quente ("Hot plate test ")	60
7. Teste de retirada da cauda da água ("Rat water tail immersion ")	60
8. Teste das contorções abdominais pelo ácido acético ("Writhing test")	64
9. Teste da formalina	70
10. Edema de pata induzido por carragenina em camundongos	75
11. Edema de pata induzido por dextrano em camundongos	78
12. Degranulação de mastócitos induzida pelas frações de saliva de camundongo e de veneno de <i>C. d. cascavella</i>	81
DISCUSSÃO	87
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1 - Composição de aminoácidos do NGF de camundongo (β NGF) e da serpente <i>Naja naja</i>	3
2 - Efeito do NGF nos neurônios colinérgicos centrais <i>in vitro</i>	27
3 - Efeito da F12-23 de saliva de camundongo no tempo de reação à placa quente em camundongos	61
4 - Efeito da F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no tempo de reação à placa quente em camundongos	62
5 - Efeito da F12-23 de saliva de camundongo no tempo de latência de retirada da cauda ao estímulo térmico em ratos	63
6 - Efeito da F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no tempo de latência de retirada da cauda ao estímulo térmico em ratos	65
7 - Efeito de F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	66
8 - Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no teste de contorções abdominais pelo ácido acético em camundongos	67
9 - Efeito da F12-23 de saliva de camundongo na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos	68
10 - Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela F12-23 de saliva de camundongo, no teste das contorções abdominais pelo ácido acético em camundongos	69
11 - Efeito da F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> na nocicepção induzida pela formalina, na pata do camundongo	71

Tabela	página
12 - Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela F12-30 de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no teste da formalina em camundongos	72
13 - Efeito da F12-23 de saliva de camundongo na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	73
14 - Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela F12-23 de saliva de camundongo no teste da formalina em camundongos	74
15 - Efeito da fração (F12-23) de saliva de camundongo na degranulação de mastócitos em mesentério de rato.	84
16 - Efeito da fração (F12-30) de veneno de <i>C. d. cascavella</i> na degranulação de mastócitos em mesentério de rato	85

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1 - Comparação da sequência de aminoácidos do NGF da serpente <i>Naja naja</i> e da glândula submaxilar de camundongo	8
2 - Cromatografia em gel de Sephadex G-100 da saliva de camundongo	50
3 - Cromatografia em gel de Sephadex G-100 do veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	51
4 - Peso molecular aproximado da fração de saliva	52
5 - Peso molecular aproximado da fração de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	53
6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% com SDS das frações de saliva de camundongo e de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i>	55
7 - Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-NGF, frações de saliva e NGF de <i>Vipera lebetina</i> - Lâmina 1	57
8 - Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-F12-30, frações de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> e NGF - Lâmina 2	58
9 - Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-NGF, frações de saliva e de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> - Lâmina 3	59
10 - Efeito da fração (F12-30) de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos	76
11 - Efeito da fração (F12-23) de saliva de camundongo no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos	77

Figura	página
12 - Efeito da fração (F12-30) de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> no edema de pata induzido por dextrano em camundongos...	79
13 - Efeito da fração (F12-23) de saliva de camundongo no edema de pata induzido por dextrano em camundongo	80
14 - Padrão de degranulação de mastócitos mesentéricos de rato induzida pelas frações de saliva de camundongo e de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> (x 10)	82
15 - Padrão de degranulação de mastócitos mesentéricos de rato induzida pelas frações de saliva de camundongo e de veneno de <i>Crotalus durissus cascavella</i> (x 40)	83
16 - Efeito das frações de saliva (F12-23) de camundongo e de veneno (F12-30) de <i>Crotalus durissus cascavella</i> na degranulação de mastócitos em mesentério de rato.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	-	Acetilcolina
AChE	-	Acetilcolinesterase
BNDF	-	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BU	-	Unidade biológica
<i>C. d. cascavella</i>	-	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
CGRP	-	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
ChAT	-	Colina acetil transferase
DA	-	Doença de Alzheimer
DEAE	-	Dietilaminoetil
DL ₅₀	-	Dose que mata 50% dos animais
DNA _c	-	DNA complementar
DRG	-	Gânglio da raiz dorsal
EGF	-	Fator de crescimento da epiderme
F12-23	-	Fração de saliva de camundongo obtida em Sephadex G-100
F12-30	-	Fração de veneno de <i>C.d.cascavella</i> obtida em Sephadex G-100
FGF	-	Fator de crescimento do fibroblasto
i.p.	-	Intraperitoneal
μg	-	Micrograma
μl	-	Microlitro
mM	-	Milimolar
NGF	-	Fator de crescimento do nervo
NGF-R	-	Receptor para o NGF
NO	-	Óxido nítrico

ODC	- Ornitina descarboxilase
PAF	- Fator de ativação das plaquetas
PI	- Ponto isoelétrico
PM	- Peso molecular
PGD ₂	- Prostaglandina D ₂
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGL ₂	- Prostaglandina I ₂
REL	- Reticulo endoplasmático liso
s.c.	- Subcutâneo
SCG	- Gânglio cervical superior
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
6- TG	- 6-Tioguanina
TNF	- Fator de necrose tumoral
TOH	- Tirosina hidroxilase
V _e	- Volume de eluição
V ₀	- "Void volume"

RESUMO

Os principais objetivos do presente trabalho foram estudar de modo comparativo, as características bioquímicas e imunológicas do fator de crescimento do nervo (NGF), isolado a partir do veneno de *Crotalus durissus cascavella*, uma serpente nativa da caatinga nordestina, e da saliva de camundongo. Foram também estudadas as ações farmacológicas do fator em modelos de inflamação e de dor.

Do fracionamento em Sephadex G-100 do veneno, foi obtida uma fração , com um peso molecular (PM) de 14,5-33 kD. A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS mostrou a presença de 4 bandas migrando na região de 16,9-36,3 kD. No fracionamento da saliva, foi obtida uma fração com PM de 25-45 kD, que revelou na eletroforese, a presença de 1 banda migrando na região de 18,2-21,4 kD. Os resultados apresentados na imunogeldifusão, demonstraram que um NGF imunologicamente reativo está presente nas frações do veneno e da saliva de camundongo em formas moleculares imunologicamente diferente.

As frações mostraram que tem o poder de degranular mastócitos de mesentério de rato, com um máximo de degranulação em torno de 83% de células degranuladas/campo, na dose de 100 $\mu\text{g/ml}$. O NGF presente nesta fração foi o responsável por tal ação, já que a mesma foi inibida pelo anticorpo anti-NGF. Foi mostrado também, que as frações possuem uma atividade anti-edematogênica, no modelo de edema induzido por carragenina em camundongos, com uma ação mais efetiva, 4 horas após o estímulo, na dose de 1 $\mu\text{g/kg}$, s.c. e a inibição do edema foi em torno de 40%. As frações não foram eficazes em inibir o edema induzido por dextrano. Como a ação anti-inflamatória ocorre em doses muito baixas, próximas das concentrações fisiológicas do NGF, é possível que este funcione como uma proteína anti-inflamatória natural.

No teste das contorções abdominais produzidas por ácido acético, em camundongos, as frações de saliva (0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) e de veneno (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.), apresentaram uma ação antinociceptiva, em torno de 80 e 50% respectivamente. No teste da formalina, as frações de veneno (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) e de saliva (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) mostraram uma ação antinociceptiva, na primeira fase da resposta, de 63 e 46% e na segunda fase, de 68 e 78% respectivamente. Esta ação antinociceptiva, não foi bloqueada pelo antagonista opióide naloxone, sugerindo o não envolvimento de opióides endógenos. As frações não revelaram efeitos analgésicos ao estímulo térmico (placa quente e retirada da cauda), indicando uma ação analgésica a nível periférico, mas não a nível central. O mecanismo de ação das frações e possivelmente do NGF nelas presente, não está claro, mas é possível que o fator aja, em pequenas doses, através de estabilização de membranas e/ou dessensibilização dos terminais nervosos periféricos com inibição da liberação de mediadores nociceptivos, tais como substância P.

ABSTRACT

The main objectives of the present work were to study, comparatively, the biochemical and immunological characteristics of the nerve growth factor (NGF) of snake venom from *Crotalus durissus cascavella*, a native species from the Brazilian northeast region, and of mice saliva. The pharmacological actions of the factor in experimental models of inflammation and pain, were also studied.

Through Sephadex G-100 chromatography of the venom, a fraction was isolated which presented a molecular weight (MW) of 14,5-33 kD. Electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) showed 4 bands in the region of 16,9-36,3 kD. In contrast, mice saliva after gel chromatography, a fraction was isolated which presented a MW of 26-44 kD and SDS-PAGE presented only 1 band in the region of 18,2-21,4 kD. The results from the immunodiffusion test demonstrated that NGF immunoreactivity is presented in fractions of both snake venom and mice saliva , but they are not antigenically identical.

The fractions promoted degranulation of mast cells from rat mesentery (approximately 83% of cell degranulation/field at the dose of 100 $\mu\text{g/ml}$). The NGF present in this fraction was responsible for the action, since it was inhibited by anti-NGF.

It was also shown that the fractions possess antiedematogenic activity in the mice paw edema test induced by carrageenan, in the dose of 1 $\mu\text{g/kg}$ with a 40 % inhibition of the edema. The fractions were not effective in causing inhibition of the edema produced by dextran. As the antiinflammatory action occurs at low doses, close to the physiological concentrations, it is possible that it could work as an endogenous antiinflammatory factor.

In the writhing test in mice, the fractions from saliva (0,8 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) and from venom (200 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) showed an antinociceptive action of approximately 80% and 50%, respectively. In the formalin test, the fractions from venom (200 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) and from saliva (100 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) showed an antinociceptive effect of 63% and 46% in the 1st phase

and 68% and 78% in the 2nd phase of the response, respectively. This action was not blocked by the opioid antagonist naloxone. The fractions were not effective in the Hot plate test in rats which is an indication that they possess a predominantly peripheral analgesic effect. The mechanism of action of NGF present in the fractions is not clear. It is possible that the factor acts at low doses through stabilization of membranes and/or desensitization of periferic nerve terminals through the inhibition of the release of nociceptive mediators such as Substance P.

INTRODUÇÃO

A descoberta do Fator de crescimento do nervo (Nerve Growth Factor, NGF) no começo dos anos 50 foi um marco no desenvolvimento da neurobiologia. O NGF é um agente que regula o crescimento e a diferenciação dos neurônios dos tecidos nervosos simpáticos e em alguns casos sensoriais (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1968), cujos principais efeitos biológicos estão relacionados com: 1. crescimento fibrilar de gânglios da raiz dorsal de embrião de pinto em cultura; 2. alongamento *in vivo* de gânglios simpáticos de camundongos recém-nascidos, caracterizados por hiperplasia e hipertrofia; e 3. imunossimpatectomia ou seja, a destruição da cadeia ganglionar simpática pela injeção *in vivo* do soro anti-NGF. Não existem entretanto, funções exócrinas conhecidas para o NGF.

Depois da identificação do fator (LEVI-MONTALCINI, 1952) como uma proteína difusível responsável pela proliferação de neuritos em tecido nervoso de hospedeiros transplantados com sarcomas 37 e 180 , Cohen et al. (1956) observaram que o veneno de serpentes continha muito mais atividade de proliferação de neuritos que os sarcomas. Igualmente importante foi a descoberta de outra fonte rica em NGF, as glândulas submandibulares de camundongos machos adultos (COHEN, 1960). Os soros de crianças com neuroblastoma e em menor quantidade fibrosarcoma (BURDMAN et al.,1964) apresentam altos títulos de NGF. Apesar da ausência do fator no extrato obtido do tumor , os autores acham que o neuroblastoma pode produzir mas não estocar esta substância. O NGF também está presente em pequenas quantidades no embrião de pinto (BUEKER et al., 1960), na urina e saliva de camundongo (LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960), no soro de todos os vertebrados, incluindo o homem, nas células sensoriais embrionárias e nas células nervosas embrionárias e maduras (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1961), na glândula prostática de cobaia, células C₆ de glioma (MURPHY et al., 1977a), células musculares esqueléticas (MURPHY et al., 1977d), fibroblastos de pinto (YOUNG et al.,

1974), medula adrenal e tecido cardíaco de camundongo (HARPER et al., 1976; HARPER et al., 1980) e placenta humana (GOLDSTEIN et al., 1978). De modo geral, em todas estas estruturas os níveis de NGF são baixos (cerca de 1,0 ng/ml de meio condicionado ou menos) sendo necessário a concentração das amostras para que o fator seja detectado.

O NGF do veneno da serpente indiana *Naja naja* é um dos mais bem caracterizados e pode servir como modelo para comparações. Ele é relativamente fácil de purificar, devido a sua boa estabilidade em pH extremos e em condições de desnaturação (ANGELETTI, 1969). O processo inicial de preparação reportado por Angeletti (1970), utilizou filtração em gel e também cromatografia de troca iônica em carboximetil-celulose e DEAE-celulose. Este procedimento foi posteriormente modificado com omissão da etapa envolvendo DEAE-celulose (HOGUE-ANGELETTI et al., 1976). A atividade do NGF no veneno é extremamente difícil de medir não somente no estado bruto mas também durante a purificação, devido à ação de compostos tóxicos presentes nestas frações que interferem com o efeito do NGF nas células nervosas em culturas, método utilizado como base para o bioensaio. Entretanto, após cromatografia em CM-celulose estes compostos são removidos e assim, apesar da recuperação absoluta do NGF não poder ser calculada, aproximadamente 1,5 mg do NGF puro/g do veneno liofilizado pode ser obtido nestas condições. O NGF da *N. naja* possui um peso molecular de 28 kD determinado pelo coeficiente de sedimentação e um peso molecular mínimo de 13 kD em SDS-PAGE , sugerindo uma estrutura dimérica de similar ou idênticas cadeias polipeptídicas, análogas às achadas para a subunidade β do complexo 7S do NGF de camundongo (ANGELETTI et al., 1971; GREENE et al., 1971). A composição dos aminoácidos do NGF da *N. naja* foi determinada (Tabela 1), mostrando uma estrutura com 116 aminoácidos e com menos resíduos básicos que no camundongo, fato que contribui para seu baixo ponto isoelétrico, 6,75 enquanto que para o NGF de camundongo este parâmetro fica em torno de 9,1. Os seis resíduos de cisteína ocorrem na mesma posição encontrada na sequência do NGF do camundongo. Desde que o NGF da *N. naja* é desprovido de grupos

Tabela 1. Composição de aminoácidos do NGF de camundongo (β NGF) e da serpente *Naja naja*

AA	<i>N. naja</i> ^a	Camundongo ^b
Ác. aspártico	16	11
Treonina	12	14
Serina	08	11
Ác. glutâmico	10	08
Prolina	05	02
Glicina	07	05
Alanina	05	08
Cisteína	06	06
Valina	10	13
Metionina	02	01
Isoleucina	06	05
Leucina	03	03
Tirosina	03	02
Fenilalanina	04	07
Lisina	09	08
Histidina	04	04
Arginina	03	07
Triptofano	03	03
Total	116	118

a- De Hogue-Angeletti et al. (1976)

b- De Angeletti e Bradshaw (1971)

sulfidrilas, estes resíduos podem ocorrer como dissulfetos, provavelmente no mesmo padrão da proteína do camundongo (ANGELETTI e BRADSHAW, 1971).

As propriedades biológicas do NGF purificado da *N. naja* (ANGELETTI, 1969) não são muito diferentes das preparações impuras do NGF de crotalídeos (LEVI-MONTALCINI e COHEN, 1956). Este NGF propicia o crescimento de neuritos de gânglios da raiz dorsal de embrião de pinto (LEVI-MONTALCINI, 1966), com uma atividade específica de 1-10 ng/unidade biológica (BU) (ANGELETTI, 1970; SERVER et al., 1976). Além disso, a injeção de 3×10^4 BU/g de peso/dia do NGF do veneno purificado resultou em um aumento no volume do gânglio de três vezes, contrastando com o NGF de camundongo que produziu o mesmo efeito com 10^4 BU/g/dia (ANGELETTI, 1969).

O efeito do NGF da *N. naja* no metabolismo dos neurônios responsivos parece ser inteiramente similar ao do camundongo (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1968; ANGELETTI, 1969). Como primeiramente mostrado por Cohen (1959) com NGF de crotalídeos, a presença de potentes inibidores glicolíticos, tais como fluoretos ou cianetos, não previne o efeito do NGF. Estes achados explicam a capacidade dos gânglios embrionários de utilizar um caminho oxidativo direto para produzir energia a partir de carboidratos. Por outro lado, a inibição da síntese protéica causada por puromicina, bloqueia o crescimento de fibras nervosas induzida por NGF, sugerindo a necessidade de síntese protéica para a produção de neuritos em cultura de gânglios estimulada pelo NGF. Experimentos com mitomicina, um potente inibidor da síntese de DNA, tem indicado que o efeito de crescimento induzido pelo NGF tem lugar sem a estimulação da síntese "de novo" de DNA. A inibição da síntese de ácidos nucléicos com actinomicina D, entretanto não elimina completamente o crescimento de fibras.

Espécies da família *Crotalidae* estudadas em detalhe foram *Agkistrodon piscivorus* e *Crotalus adamanteus*. O NGF da *A. piscivorus* foi o primeiro a ser altamente purificado (COHEN e LEVI-MONTALCINI, 1956; COHEN, 1959), apresentando peso molecular estimado em 20 kD. A atividade biológica foi completamente destruída pela ação de enzimas

proteolíticas, mas não foi afetada por RNase ou DNase. O NGF de *C. adamanteus* foi originalmente isolado e caracterizado por Angeletti (1968 a,b). Quando fracionado em Sephadex G-100 a atividade biológica foi encontrada em fração com peso molecular entre a 20 e 40 kD (ANGELETTI, 1968 a).

O NGF da glândula submaxilar pode ser isolado como um complexo designado 7S (VARON e SHOOTER, 1970), com 3 subunidades (α , β , γ). A estequiometria do complexo é $\alpha_2\beta\gamma_2$ com peso molecular (PM) aproximado de 130 kD (VARON et al., 1967; VARON et al., 1968), e com coeficiente de sedimentação de 7S. A subunidade α tem um PM aproximado de 26 kD e ponto isoelétrico (PI) de cerca de 4,3 sem nenhuma atividade fisiológica (SERVER e SHOOTER, 1977). A subunidade γ tem PM aproximado de 26 kD e PI de 5,5 e é uma peptidase arginina específica. Do total de 229 resíduos de aminoácidos 86 mostraram 35% de identidade com a tripsina bovina (BRADSHAW, 1978). A presença do zinco no complexo 7S é importante para sua estabilidade, funcionando como um inibidor da subunidade γ . Das três cadeias polipeptídicas achadas neste complexo, somente a subunidade β , designada 2,5S (BOCCHINI e ANGELETTI, 1969) contém atividade biológica. Este β -NGF é formado por 2 cadeias idênticas (ANGELETTI et al., 1971), com um PM de 13,25 kD (com dímero de PM de 26,5 kD), com 118 aminoácidos (Tabela 1). A sequência de aminoácidos foi determinada (ANGELETTI e BRADSHAW, 1971) (Figura 1). A subunidade β é ativa sozinha e não requer as outras subunidades para seus efeitos pleiotrópicos. Algumas hipóteses são levantadas sobre a função do complexo 7S. Varon e Raiborn (1972) sugerem que o complexo age como uma proteção contra a clivagem enzimática, carregando as 3 subunidades para agirem em diferentes tipos de células dentro do mesmo tecido, a subunidade α se liga às células gliais ganglionares, a subunidade γ às células mesenquimais (cápsula) e a subunidade β aos neurônios responsivos.

A sequência de aminoácidos do NGF é homóloga a da pró-insulina nas sessões da cadeia que correspondem àquelas das cadeias A e B da insulina (FRAZIER et al., 1972). Esta relação se estende ao hormônio relaxina (SCHWABE e McDONALD, 1977) e ao

fator de crescimento insulina-símile I e II (RINDERKNECHT e HUMBEL, 1978 a,b). O gene inicial produtor do NGF codifica aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos a mais que o NGF, com o extra-peptídeo no COOH terminal. Este pró-NGF é clivado pela subunidade γ no resíduo arginina, na posição 118, gerando a cadeia NGF e ficando a arginina peptidase ligada ao NGF após a clivagem. A subunidade α e o íon zinco podem se associar com o pró-NGF antes da clivagem ou com o complexo subunidade γ e o NGF após a clivagem, sendo o resultado final a formação e estocagem do complexo 7S.

As glândulas submaxilares de camundongos machos contem as mais altas concentrações de NGF de qualquer tecido examinado (COHEN, 1960). Nestas, o NGF está localizado nos túbulos contorcidos (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1961), com o tipo e conteúdo do fator sendo controlado muito mais pelos níveis de testosterona circulantes do que pelo impulso neuronal (JUNQUEIRA et al., 1949; LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1961; BERGER e SHORTER, 1978). Sendo assim, o conteúdo de NGF na glândula do recém-nascido é muito baixo, mas aumenta rapidamente na puberdade. Na glândula da fêmea o conteúdo é menos de 10% daquele do macho, mas pode ser aumentado rapidamente com a injeção de testosterona. Ao contrário, a castração do macho diminui rapidamente os níveis glandulares do fator (CARAMIA et al., 1962, LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1964). Evidências indiretas suportam a idéia de que o NGF é sintetizado e estocado nesta glândula, assim, Burdman e Goldstein (1965) mostraram que a injeção intravenosa de anti-NGF antes da injeção de testosterona na fêmea jovem e na adulta não previne o aumento do NGF na glândula, isto arguindo contra a síntese do NGF em outros tecidos e seu transporte via circulação, para a estocagem na glândula. Usando outros meios os autores não acharam evidências de recaptção pela glândula submaxilar, fígado ou baço, quando o NGF é injetado em grandes quantidades.

Hendry e Iversen (1973) acharam que os níveis de NGF caem após remoção da glândula, mas são restaurados sem a concomitante regeneração da glândula. Em contraste, Murphy et al. (1977c) reportaram um declínio dos níveis de NGF séricos após sialectomia.

Vários estudos tem enfatizados a importância das células gliais na produção do NGF durante o desenvolvimento (VARON,1975; HENDRY, 1976; LONGO, 1978; MURPHY et al., 1977b, LEVI-MONTALCINI, 1975). Até o momento, a síntese "de novo" do NGF foi demonstrada somente em glândulas submaxilares de camundongos machos (BERGER e SHOOTER, 1978). Sob estas condições, nenhuma síntese foi detectada em outros tecidos de camundongos normais ou castrados e tratados com testosterona, incluindo os que receberam forte inervação simpática.

A evidência mais direta de que o NGF de camundongo e do veneno são relacionados é obtida através da comparação da sequência de aminoácidos (Figura 1), detectando-se a existência de 64% de identidade entre estas proteínas (HOGUE-ANGELETTI et al.,1976) As duas proteínas são estruturalmente similares para um grau indicativo de uma relação genética entre membros destas famílias e está estabelecido estatisticamente que existe um precursor comum entre o NGF de camundongo e a pró-insulina (FRAZIER et al., 1972). É interessante notar que a percentagem de resíduos de aminoácidos idênticos do NGF de cobra comparado com a pró-insulina é a mesma daquela observada para camundongos, isto é, 20%. Assim a divergência entre o NGF e a família da insulina provavelmente ocorreu muito cedo na evolução dos vertebrados.

Embora as propriedades biológicas do NGF de serpentes e de camundongo sejam em parte similares, existem algumas diferenças. Assim, apesar da obtenção de curva dose resposta idêntica, a extensão da resposta obtida pelo NGF do veneno *in vitro* é somente 50% daquela do camundongo (SERVER et al.,1976). *In vivo*, cerca de 3 vezes mais NGF do veneno é necessário para produzir o mesmo efeito em camundongos recém-nascidos. Entretanto, os efeitos hiperplásticos e hipertróficos parecem ser o mesmo no exame histológico (ANGELETTI, 1969).

Em testes de imunodifusão, o antisoro para NGF de camundongo foi detectado como uma banda fundindo-se em uma linha de identidade com o NGF de camundongo em concentrações de proteínas 50 vezes maior. Nenhuma linha de precipitação foi achada com NGF de *C. adamanteus* e *B. jararaca*. Os testes de fixação de complemento mostraram reação cruzada entre NGF de *N. naja* e *B. jararaca* quando testada com o anti-NGF de camundongo (ANGELETTI, 1971) e estudos com radioimunoensaio confirmaram estas observações. Entretanto, o antisoro do camundongo inibiu a atividade biológica *in vitro* do NGF da *N. naja*, *C. adamanteus*, *B. jararaca* e *V. russelli* nos níveis de 6, 6, 12 e 12% respectivamente (ANGELETTI, 1969). Ao contrário, anti-NGF de *N. naja* não mostrou reação cruzada com o NGF de camundongo em ensaios de imunodifusão ou de fixação do complemento, no entanto 1% de reação cruzada foi detectada usando o teste de inibição da atividade biológica.

A clara relação evolucionária estabelecida entre o NGF do veneno e de camundongo é suportada pela consideração dos tecidos de origem destas proteínas. A glândula do veneno nas serpentes é uma glândula parótida altamente desenvolvida. A principal parte secretora está na seção posterior, as células epiteliais que revestem os túbulos secretórios contêm grânulos de tamanho e densidade comparáveis àquelas encontradas nas células epiteliais que cobrem os túbulos contorcidos nas glândulas submandibulares do camundongo. Com relação a isto, é de interesse notar que a secreção salivar do camundongo se assemelha ao veneno de serpentes, não somente pelo seu conteúdo de enzimas digestivas e hidrolíticas, mas também por suas propriedades venenosas (LIUZZI e ANGELETTI, 1968). De fato, as glândulas submaxilares de camundongo representam quase a totalidade de órgão secretor de toxina conhecido em mamíferos. Assim, relações estruturais e funcionais achadas para o NGF de veneno e de camundongo parecem ser manifestações de eventos evolucionários que podem também ser traçados no nível morfológico.

O papel do NGF no veneno está muito relacionado ao papel deste fator nas glândulas submaxilares do camundongo. Em outras espécies animais examinadas, baixos níveis de

NGF são encontrados nestas estruturas, de modo semelhante aos níveis encontrados no soro e em outros tecidos (LEVI-MONTALCINI, 1966). A diferença em termos de sexo achado nos camundongos, não é encontrada em outras espécies embora isto não tenha sido examinado em serpentes. Não existe uma explicação clara para a presença de altas concentrações de NGF nestas glândulas (e em suas excreções). Foi sugerido contudo (MELDRUN, 1965) que a glândula do veneno pode ter um papel na remoção do excesso de NGF da circulação. Alternativamente, o NGF pode potencializar o efeito danoso do veneno por estimulação das células responsivas e assim torná-las mais vulneráveis. É possível também que o NGF presente nestes órgãos represente simplesmente uma maneira pela qual este excesso de material sintetizado para funções endócrinas, seja removido destas glândulas ou que estas glândulas sejam órgãos simpáticos finais que sintetizam NGF como parte de uma regulação da porção do sistema nervoso periférico.

INTERNALIZAÇÃO DO NGF E TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO

Trabalhos de vários laboratórios indicam que o NGF pode ser internalizado por células alvo (HENDRY et al., 1974b; NORR e VARON, 1975; ANDRES et al., 1977; YANKNER e SHOOTER, 1979). Além disso, já está bem estabelecido que o NGF pode ser internalizado nos terminais nervosos e transportado retrogradamente para o corpo celular dos gânglios da raiz dorsal (DRG) e neurônios simpáticos (HENDRY et al., 1974a,b; STÖCKEL et al., 1975a,b; HENDRY, 1977; JOHNSON et al., 1978; BRUNSO-BECHTOLD e HAMBURGER, 1979). A recaptção nos terminais nervosos parece ser saturável e não afetada por outras proteínas. O NGF que alcança o corpo celular dos neurônios simpáticos desta maneira é biologicamente ativo, e causa indução seletiva da tirosina hidroxilase (PARAVICINI et al., 1975; HENDRY, 1977) e aumento do diâmetro pericarial (HENDRY, 1977). Também parece haver um certo grau de especificidade com respeito ao tipo celular, já que ele é transportado por nervos sensoriais mas não por nervos

motores (STÖCKEL et al., 1975a; STÖCKEL e THOENEN, 1975; BRUNSO-BECHTOLD e HAMBURGER, 1979). Embora se pense que os efeitos biológicos do NGF nos neurônios do gânglio da raiz dorsal são restritos a um limitado período do desenvolvimento, tal recaptção e transporte pelos nervos sensoriais foi observado em animais adultos (STÖCKEL et al., 1975b). Além disso, Marx et al. (1978) demonstraram transporte axonal retrógrado por neurônios dos gânglios ciliares de rato e pinto, embora estes neurônios parassimpáticos não tenham respostas biológicas conhecidas ao NGF. Também foi evidenciado transporte retrógrado em cérebro de rato (EBBOTT e HENDRY, 1978). Tais achados podem indicar a existência de outras células alvo para o NGF ou podem sugerir que o transporte axonal retrógrado do NGF não é restrito somente às células que respondem a este fator.

Uma importante questão a ser esclarecida é o possível sítio de ação do NGF internalizado nos terminais nervosos. Experimentos *in vitro* (Campenot, 1977) mostram que os neuritos de neurônios simpáticos cultivados crescem somente na presença do NGF, sugerindo que o efeito do NGF no alongamento dos neuritos pode, em parte, ser local e não requerer transporte axonal retrógrado para o corpo celular. Já está claro, entretanto, que o (^{125}I)NGF é recaptado dos terminais nervosos e transportado para o corpo celular e que a maioria deste NGF marcado co-migra com o NGF nativo quando analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) (STÖCKEL et al., 1976; JOHNSON et al., 1978). Estudos autoradiográficos com microscópio eletrônico (SCHWAB e THOENEN, 1977) indicam que a maioria do material transportado no axônio está associada com vesículas do retículo endoplasmático liso (REL) e somente 20% esta associado com lisossomos. Não houve evidências de significativa acumulação de radioatividade no núcleo. Estes achados foram confirmados pelo uso de peroxidase acoplada ao NGF (SCHWAB, 1977). Entretanto, a despeito de ausência de evidências morfológicas para a associação de transporte retrógrado com o núcleo, localização subcelular deste material por meios bioquímicos tem indicado que 20 a 30% do material transportado no

corpo celular pode ser isolado com a fração nuclear (STÖCKEL et al., 1976; JOHNSON et al., 1978).

Outros estudos mostram alguns sítios de ligação do NGF com a membrana (YANKNER e SHOOTER, 1979), indicando claramente que existem múltiplos sítios em que o NGF pode interagir com as células alvo (membrana plasmática, citoplasma e núcleo). Isto aumenta a questão do possível papel de cada sítio de interação no mecanismo de ação do NGF. Várias possibilidades existem e uma delas é que a ação do NGF requer somente a interação com o receptor na membrana plasmática e o evento subsequente é mediado por meio de um 2º mensageiro. Uma segunda possibilidade é que os receptores na membrana funcionem somente como carreadores para facilitar a internalização do NGF e o sítio primário de ação seja o citoplasma e/ou o núcleo. Uma terceira possibilidade é que cada um dos múltiplos sítios de interação tem um papel na atividade do NGF e alguma ação biológica do NGF requer que o fator interaja com múltiplos sítios receptores ou a resposta pode envolver diferentes tipos de receptores (BRADSHAW, 1978; YANKNER e SHOOTER, 1979). Tal conceito é consistente com a demonstração (BURSTEIN e GREENE, 1978) de que a estimulação do crescimento de neuritos pelo NGF nas células PC12 requer um caminho transcripcional dependente e independente, sendo a primeira via vinculada à interação com receptores nucleares e a segunda acionada através de receptores na superfície da membrana ou no citoplasma.

MECANISMO DE AÇÃO DO NGF

Entre as células responsivas ao NGF, as células clonais PC12, derivadas de feocromocitoma de rato, são as preferidas para estudar o modo de ação do NGF na modulação da diferenciação celular. Estas células, que não necessitam do NGF para sua sobrevivência e crescimento, adquirem e mantêm um fenótipo neuronal simpático-símile, em resposta a este fator (GREENE e TISCHLER, 1982; LEVI et al., 1988).

A resposta de diferenciação das células PC12 para o NGF é um fenômeno complexo que ocorre dentro de uma escala de tempo de vários dias. Após uma fase inicial mitogênica (BOONSTRA et al., 1983), que parece dispensável para a aquisição do fenótipo diferenciado (RUDKIN et al., 1989), as células PC12 param sua divisão (GREENE e TISCHLER, 1982). Como a replicação do DNA em algumas células não se extingue totalmente, uma pequena proporção de células se tornam poliplóides. A aquisição de uma morfologia neuronal-símile, isto é, crescimento de longos e ramificados neuritos é acompanhada pela expressão de novo de um número de antígenos específicos para as células nervosas e de funções neuroespecíficas tais como, síntese e estocagem de neurotransmissores, excitabilidade elétrica e habilidade para formar sinapses funcionais com células musculares co-cultivadas (GUROFF, 1985).

Com respeito a isto, as células PC12 se comportam como suas sócias não transformadas, as células cromafins imaturas da medula adrenal, que respondem ao NGF *in vivo* e *in vitro* adquirindo um fenótipo neuronal simpático-símile (ALOE e LEVI-MONTALCINI, 1979; UNSICKER et al., 1978; LILLIEN e CLAUDE, 1985). Esta indução de fenótipo é reversível e a remoção do NGF leva à perda do aspecto diferenciado e recomeço do ciclo celular (GREENE e TISCHLER, 1982). Caminhos transcripcionais dependente e independente são necessários para se conseguir completa diferenciação. Este modelo sugere que uma acumulação lenta de um grupo de proteínas seja pré-requisito para a diferenciação morfológica. A acumulação deste material prepara as células para um rápido crescimento de neuritos, que é resistente à inibição da transcrição (BURSTEIN e GREENE, 1978).

A habilidade do NGF para exercer suas ações tróficas, diferenciativas e mitogênicas nas células alvo é mediada por ligações de alta afinidade a receptores de superfície. Após a clonagem e sequenciamento do receptor para o NGF (NGF-R) de humanos (JOHNSON et al., 1986) e ratos (RADEKE et al., 1987), os DNAs codificam uma proteína com peso molecular de 45 kD que aumenta para cerca de 75 kD após glicosilação. Este receptor

polipeptídico pode ser dividido em vários domínios distintos, cada um com diferenças no grau de conservação intra-espécies. O peptídeo sinalizador é seguido por cerca de 160 aminoácidos que apresentam um alto grau de identidade. Similarmente ao receptor do fator de crescimento da epiderme (EGF) e aos genes pertencentes a esta família, esta região parece ser composta de 4 repetições de cerca de 40 aminoácidos (AA) provavelmente causada por repetida duplicação de genes. A comparação de seqüências tem mostrado que a região rica em cisteína mostra um significativo grau de homologia com o antígeno linfócito específico OX 40T (MALLETT et al., 1990), com o antígeno CD40 (50 kD) expresso nos linfócitos B e células de carcinoma (STAMENKOOVIC et al., 1989) e com o receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (LOETSCHER et al., 1990).

A região mais conservada, com 95% de homologia intra-espécies é composta de 21 AA rodeando a membrana, ladeado por 19 AA na porção extracelular da molécula e pelos primeiros 46 resíduos na região citoplasmática, sendo este domínio essencial para a transdução do sinal do NGF. O domínio citoplasmático do receptor não revela a presença de um sítio de ligação de ATP, nem suporta alguma outra semelhança com outros receptores para fatores de crescimento com uma atividade intrínseca de proteína quinase. A metade do receptor reconhecida pelos anticorpos disponíveis é fosforilada somente no resíduo serina e o estado de fosforilação não muda com a ligação do NGF-um comportamento diferente de outros receptores para fatores de crescimento com uma associada atividade de tirosina quinase. Tem sido sugerido que a fosforilação do NGF-R pode ser relacionada com a sua internalização (TANIUCHI et al., 1986).

Embora a maioria das células responsivas mostrem duas classes de receptores para o NGF, o tipo I ou lento e o tipo II ou rápido, diferindo em afinidade por mais de uma ordem de magnitude (de 10 pM para nM), a transfecção de clones cDNA para expressar o receptor para NGF em um número de diferentes células resultou aparentemente so em espécies de baixa afinidade (tipo II). O consenso geral é que o receptor de alta afinidade é o resultado da associação da metade do de baixa afinidade com um diferente polipeptídico,

provavelmente para participar na maquinaria da transdução de sinal (e talvez expresso somente em células responsivas ao NGF) ou ser envolvida na internalização do complexo NGF-receptor (GREEN et al., 1986; HOSANG e SHOOTER, 1987).

Desde que o receptor para NGF existe em um estado dinâmico na membrana celular e é rapidamente internalizado seguindo a ligação com o NGF, o processo de endocitose pode facilmente imitar um complexo de dissociação lento (EVELETH e BRADSHAW, 1988; CATTANEO et al., 1983). Se a "subunidade acessória" do NGF-R participa durante a internalização do complexo, se dissocia dele e se recicla para a membrana via um diferente caminho, isto pode representar um mecanismo para a interconversão entre receptores de baixa e alta afinidade. Seja qual for a base molecular do receptor tipo I ele pode ajudar a célula a discriminar entre NGF e moléculas relacionadas. Em particular, os receptores de alta afinidade tem cerca de 1000 vezes maior afinidade para o NGF que para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), enquanto o receptor tipo II não parece discriminar entre estes dois fatores de crescimento (RODRIGUEZ-TEBAR et al., 1990).

Não se sabe com certeza qual a função do receptor de baixa afinidade, já que ele não parece está envolvido na transdução do sinal. Ele pode, contudo, cooperar com o receptor de alta afinidade na mediação de uma resposta total do NGF. A concentração local de NGF é possivelmente insuficiente para saturação dos receptores, desde que a adição de NGF exógeno tem profundos efeitos na sobrevivência e diferenciação de células alvo (LEVI-MONTALCINI, 1987; THOENEN et al., 1987). O nível de NGF no local onde se faz axotomia pode ser aumentado por nova síntese ou por expressão induzida do receptor de baixa afinidade na superfície das células de Schwann, podendo estes receptores agirem para concentrar o NGF circulante (TANIUCHI et al., 1988). Do mesmo modo, a concentração do NGF requerida para a indução da tirosina hidroxilase nos neurônios simpáticos é mediada por ocupação dos receptores de baixa afinidade (HILL e HENDRY, 1976).

Nas células PC12 o NGF ligado à superfície celular é internalizado por endocitose mediada por receptores (CALISSANO e SHELANSKI, 1980; LEVI et al., 1980) e esta

internalização tem longa meia-vida (MARCHISIO et al., 1980). O mais impressionante é que o transporte axonal retrógrado específico do NGF ocorre *in vivo* em vesículas endocíticas do axônio para o corpo celular (HENDRY, 1980). Por outro lado, se os efeitos biológicos do NGF são presumivelmente mediados ao nível da membrana plasmática com a produção de um (ou mais) segundo mensageiro responsável pela geração de uma cascata intracelular de eventos bioquímicos, então a internalização do complexo NGF-receptor pode servir somente para uma "down-regulation" do sinal. A existência deste transporte sugere que a função do processo de internalização é transferir NGF para um compartimento intracelular estratégico. Embora o papel da internalização ainda esteja sujeito à investigação, a ligação intracelular de fatores de crescimento aos seus receptores é suficiente em algumas células para a produção de respostas autócrinas (BEJCEK et al., 1989; DUNBAR et al., 1989). A hipótese mais aceita é que múltiplos sinais são gerados, alguns ao nível da membrana plasmática, outros seguindo a internalização e transporte para o corpo celular e que estes sinais cooperam sinergicamente para a obtenção das respostas biológicas totais.

O PAPEL DOS SEGUNDOS MENSAGEIROS

Muitos segundos mensageiros clássicos tais como, cálcio, fosfatidilinositóis, AMPc e outros tem sido mostrados como sendo modulados pelo NGF e assim possivelmente mediadores da ação do NGF. Entretanto, nenhum segundo mensageiro demonstrou ser responsável por expressar todas as mudanças induzidas pelo NGF. Assim, um grande número de respostas biológicas antecipadas podem não ser relevantes para o objetivo final, que é o aumento da transcrição de genes de diferenciação específica, mas estas respostas alvo colocariam a célula em uma posição de espera ("stand-by"). Finalmente, para se entender o papel destes mensageiros na diferenciação induzida pelo NGF, dois pontos devem ser considerados: a) A maioria dos segundos mensageiros são modulados transitoriamente, enquanto que o requerimento para o NGF está continuamente presente

sugerindo que alguma modificação de longa duração do caminho celular seja necessário; b) O NGF pode utilizar diferentes caminhos na iniciação de um processo de diferenciação das células PC12 e na manutenção do fenótipo adquirido.

ÍONS CÁLCIO

A ativação da Na^+/K^+ ATPase com consequente aumento do influxo de íons monovalentes é um dos eventos que ocorre precocemente na resposta do NGF (BOONSTRA et al., 1983) e este evento pode estar ligado à estimulação mitogênica inicial exercida pelo NGF nas células PC12. A modulação da concentração intracelular de cálcio pelo NGF já foi estabelecida por medição direta (PANDIELLA-ALONSO et al., 1986) e também por evidência indireta (LAZAROVICI et al., 1989), e é uma consequência do influxo de cálcio e da liberação dos estoques internos. Os eventos posteriores, possivelmente regulados por uma elevação dos níveis de cálcio, são a ativação da proteína quinase III Ca/Calmodulina dependente, fosforilação do fator de alongamento 2 (KOIZUMI et al., 1989), liberação de catecolaminas (NICODIJEVIC et al., 1990) e aumento do "turnover" de fosfatidilinositois (CONTRERAS e GUROFF, 1987).

AMPC

A existência da conexão do AMPC na ação do NGF foi postulada devido a dois fatores, primeiro, os análogos do AMPC permeáveis à célula induzem mudanças fenotípicas similares aos eventos iniciais induzidos pelo NGF e segundo, porque o NGF ativa a proteína quinase A (PK-A) e a atividade desta proteína pode estar envolvida na modulação da expressão do fenótipo de diferenciação e isto é sugerido pela observação de que a indução do canal de sódio em células PC12 diferenciadas é especificamente bloqueada pela injeção de um plasmídeo que codifica a expressão de um inibidor da subunidade catalítica da PK-A (KALMAN et al., 1990). Entretanto é difícil demonstrar uma ativação direta da adenilciclase pelo NGF e estudos conflitantes existem para aumentos no AMPC (SCHUBERT e

WITLOCK, 1977; HATANAKA et al., 1978). Em adição, nenhuma mudança na atividade e no nível de expressão das proteínas G_s e G_i após o tratamento com NGF foi observado nas células PC12.

FOSFOLIPÍDIOS

Uma rápida modulação pelo NGF, da síntese do inositol mono e trifosfato foi demonstrado por Contreras e Guroff (1987), que também demonstraram que a hidrólise dos poli-fosfoinositídeos estimulada pelo NGF dependia do cálcio extracelular. A produção do IP_3 foi observada dentro de segundos após a exposição do NGF e pode ser responsável pelo rápido aumento no cálcio intracelular (PANDIELLA-ALONSO et al., 1986). Trabalhos recentes relacionam a ligação do NGF aos receptores das células PC12 à uma rápida (menos de 1 min) produção de miristato de diacilglicerol, contendo miristato e um inositol fosfato glicano, gerado pela digestão de um glicosil-fosfatidilinositol (LIWAH et al., 1989). A liberação de diacilglicerol por esta via representa um caminho alternativo de estimulação da PK-C, sem a quebra de fosfatidilinositóis. Um tipo diferente de modificação do fosfolípido, a metilação fosfolípídica, tem sido lembrada como possível mediador da ação do NGF , principalmente pela evidência de que a exposição de células alvo ao NGF é rapidamente seguida por um aumento na metilação de fosfolípídios (PFENNINGER e JOHNSON, 1981; SKAPER e VARON, 1984). No entanto, não se demonstrou um aumento significativo da metilação de fosfolípídios em células PC12 expostas ao NGF e inibidores desta metilação falham na prevenção do crescimento de neuritos (FERRARI e GREENE, 1985).

FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Um grupo de proteínas quinases serina e treonina específicas são ativadas pelo NGF, tais como, fosfo quinase A (PK-A) (ACHESON et al., 1986), PK-C (CREMINS et al., 1986; HAMA et al., 1986; HALL et al., 1988), S6 proteína quinase (BLENIS e

ERIKSON, 1986), MAP-2 proteína quinase (MIYASAKA et al., 1990) e a proteína quinase N (ROWLAND et al., 1987). A ativação destas quinases provavelmente não é um evento independente nas células e ocorre com o NGF iniciando uma cascata de ativações inter-relacionadas, dentro de minutos. O uso de inibidores de quinases tem ajudado na compreensão do mecanismo de ação do NGF e alguns destes inibidores frequentemente tem a vantagem de distinguir entre NGF e o fator de crescimento da epiderme (EGF).

O inibidor de quinase K-252a bloqueia a ação do NGF enquanto deixa inalterada a maioria dos efeitos do EGF (KOIZUMI et al., 1988). O análogo da purina, 6-tioguanina (6-TG) especificamente bloqueia a quinase N (VOLONTÈ et al., 1989) e consequentemente alguns, mas não todos os efeitos do NGF transcripcional-dependente e independente (GREENE et al., 1990). Similarmente, a inibição da PK-C pela esfingosina define um grupo de respostas nas células PC12 que são provavelmente mediadas através desta quinase (HALL et al., 1988). Vale mencionar entretanto, que a "down-regulation" da PK-C falha em prevenir o crescimento de neuritos nas células PC12 em resposta ao NGF (DAMON et al., 1990; REINHOLD e NEET, 1989). Mas a principal dificuldade em usar esta ferramenta farmacológica para dissecar uma relação causa-efeito na ativação de várias quinases é a ausência de especificidade absoluta de alguns dos inibidores usados.

O resultado final relacionado com a fosforilação de proteínas é mais relevante para a manutenção do fenótipo diferenciado nas células PC12 do que para a indução de um programa diferenciativo. Existe uma boa correlação temporal entre crescimento de neuritos, aumento da estabilidade dos microtúbulos e a fosforilação de uma classe de proteínas associadas aos microtúbulos, as chartinas (BLACK et al., 1986) e a inibição pelo lítio da diferenciação nas células tratadas com NGF também resulta no decréscimo da fosforilação das chartinas (BURSTEIN et al., 1985).

O ENVOLVIMENTO DE TIROSINA QUINASE

Embora o receptor para o NGF não seja uma tirosina quinase, duas linhas de evidências sugerem o papel da fosforilação de resíduos de tirosina mediando as respostas diferenciativas do NGF. Primeiro, quando as células PC12 são expostas ao NGF, existe uma rápida (dentro de 5 min) e transitória fosforilação de resíduos de tirosina em um limitado número de proteínas celulares (MAHER, 1989). Isto contrasta com a fosforilação mais geral de proteínas nos resíduos de serina e treonina que são mantidos quando o NGF está presente. EGF e dibutilil-AMPC também estimulam a fosforilação de resíduos de tirosina. Entretanto, a fosforilação induzida pelo NGF é inibida pelo K252a (MAHER, 1989), este inibidor de quinase, não inibe a fosforilação induzida pelo EGF, sugerindo que o NGF e o EGF induzem fosforilação da tirosina por diferentes caminhos. Segundo, a infecção de células PC12 com retrovírus que expressam *v-src*, um oncogene viral homólogo ao proto-oncogene *c-src* e que codifica a proteína quinase tirosina específica pp60^{v-src}, eficientemente induz estas células a caminhos de diferenciação, como demonstrado pela emissão de longos neuritos, sobrevivência em condições livre de soro e progressiva retirada destas células do ciclo celular (ALEMÀ et al., 1985; CASALBORE et al., 1986). A mais convincente evidência para o envolvimento da pp60^{c-src} na diferenciação induzida pelo NGF vem de experimentos com microinjeção de anticorpo monoclonal anti-pp60^{c-src}, onde a diferenciação morfológica induzida pelo NGF e FGF foi bloqueada, sugerindo que o pp60^{c-src} pode funcionar depois dos primeiros eventos mediado pelos receptores (LEVI e ALEMÀ, 1991).

OUTRAS AÇÕES BIOLÓGICAS DO NGF

Além da estimulação do crescimento de neuritos e de sua manutenção, o NGF apresenta outras ações biológicas e uma delas está relacionada com a indução da atividade de algumas enzimas. Assim, Stöckel et al. (1974) demonstraram que a indução da atividade

da tirosina hidroxilase (TOH) em ratos recém-nascidos pela administração do NGF pode ser bloqueada pelo pré-tratamento com actinomicina D. Também o processo de síntese da TOH *in vitro* (MACDONNELL et al., 1977b) foi acelerado em ratos tratados em relação aos não tratados pelo NGF. Por outro lado, a síntese enzimática foi abolida em animais pré-tratados com actinomicina 1 hora antes da administração do NGF. Foi verificado que a atividade da TOH e da dopamina β -hidroxilase pelo NGF são bloqueadas por cicloheximida, o que sugere a necessidade da síntese proteica (OTTEN e THOENEN, 1977; OTTEN et al., 1977). Estes estudos indicam que a indução da atividade desta enzima pelo NGF é mediada via estimulação específica da síntese de RNA, mas há controvérsias, pois já foi demonstrado (ROHRER et al., 1978) que o NGF pode induzir a atividade da TOH quando administrado *in vitro* e este aumento não foi bloqueado por agentes que inibem a síntese de RNA concluindo-se que esta indução não requer transcrição. Rohrer et al. (1978) sugeriram que este aparente conflito de resultados pode ser devido a diferenças nas condições de cultivo. Outra possibilidade é que, como no crescimento de neuritos, a indução da TOH requer ações transcricionais e não transcricionais assim, a exposição do gânglio cervical superior ao NGF *in vivo* pode trazer mudanças transcricionais que vão preparar os neurônios e a indução da enzima *in vitro* parece ser insensível à actinomicina D (e não transcricional). Isto também explica porque o bloqueio da transcrição *in vivo* com actinomicina efetivamente abole as respostas subsequentes do gânglio ao NGF.

Uma rápida indução da ornitina descarboxilase (ODC) está associada com as respostas de vários tipos celulares para vários hormônios promotores de crescimento e de diferenciação (RUSSEL et al., 1976). Já foi sugerido que esta enzima e as poliaminas cuja síntese são por ela catalizadas podem ter um papel causal em mediar as subsequentes respostas celulares de tais hormônios (RUSSEL et al., 1976). Alguns de estudos tem demonstrado que o NGF pode causar uma rápida indução da ODC em vários tecidos incluindo o cérebro (ROGER et al., 1974; LEWIS et al., 1978), gânglio cervical superior de rato (MAC DONNEL et al., 1977a), gânglio da raiz dorsal de embrião de pinto (

LAKSHMANAN, 1979) e células PC12 (HATANAKA et al., 1978; GREENE e MC GUIRE, 1978). Estes efeitos parecem requerer síntese contínua de RNA e proteínas (MACDONNELL et al., 1977a). O tratamento de culturas de células com drogas que bloqueiam especificamente ou que suprimem a indução da enzima, não altera a habilidade do NGF para promover o crescimento de neuritos, promover um aumento no volume somático ou manter a sobrevivência celular (GREENE e MC GUIRE, 1978). Concluindo-se que estas ações do NGF não envolvem a indução da ODC. Desta maneira, a indução desta enzima pode ser um efeito do NGF sem consequências biológicas, mas por outro lado, pode haver uma outra ação do NGF dependente da indução da ODC e ainda não esclarecida.

Os receptores muscarínicos nas células PC12 estão sujeitos a uma regulação pelo NGF. Viana et al. (1988) em estudos de "binding" com [³H]-NMS mostraram que o NGF em células PC12 mais que duplica o número de receptores muscarínicos e que os organofosforados inibem os receptores muscarínicos mas não afetam o crescimento de neuritos induzido pelo NGF. Assim, o efeito do NGF nestes receptores pode ser dissociado do seu efeito no crescimento de neuritos, mais provavelmente envolvendo eventos pós-translacionais.

Existem evidências de que o NGF pode alterar a recaptação e acumulação de pequenas moléculas pelas células alvo. Levi e Lattes (1968) mostraram que o NGF aumenta a capacidade dos DRG de embrião de pinto *in vitro* para acumular ácido aspártico e glutâmico, porém não outros tipos de aminoácidos. Horii e Varon (1975, 1977) demonstraram que o NGF mantém a capacidade destas células para recaptar e acumular uridina, citidina, guanosina e também 2-deoxyglucose e ácido α -aminoisobutírico, enquanto que a recaptação de leucina não foi afetada. Em experimentos com (³H)uridina (HORII e VARON, 1975, 1977) e (³H)2-deoxyglucose (SKAPER e VARON, 1979) foi observado que, se o NGF é retirado ou não adicionado ao meio de incubação, a recaptação destas pequenas moléculas pelos DRG em cultura, declina progressivamente. Entretanto, quando o NGF foi reintroduzido à cultura, depois de 6 horas, o transporte foi rapidamente restaurado

(em menos de 10 min) para os níveis de recaptação demonstrados pelas células que não foram desprovidas deste fator. Como discutido acima, este efeito no transporte parece ser o resultado da regulação do NGF nos níveis de Na⁺ intracelular (SKAPER e VARON, 1979). A capacidade do NGF para manter ou restaurar o transporte não foram inibidos pela actinomicina D ou cicloheximida, sugerindo que o fenômeno não depende da síntese de RNA ou proteínas. Estes achados levaram Horii e Varon (1977) a especular que tais efeitos podem regular a extensão das atividades anabólicas da célula e assim, controlar a sobrevivência, proliferação e/ou alargamento, aumento dos neuritos e produção de enzimas específicas.

A habilidade das células PC12 para responder sem precisar do NGF fazem delas um sistema potencial para ser utilizado em estudos dos efeitos do NGF na recaptação de pequenas moléculas. McGuire e Greene (1979) acharam que o NGF aumenta a taxa em que as células PC12 transportam o ácido α -aminoisobutírico. O início desta estimulação foi detectado dentro de 15 min após a administração do NGF. Aumento semelhante na recaptação foi também induzido pela exposição a elevados níveis de soro, entretanto, como o tratamento com soro não induz o crescimento de neuritos neste sistema, foi concluído que o aumento da recaptação por si só não é suficiente para acionar todos os efeitos do NGF. Além disso, tais considerações não excluem a possibilidade de que a modulação da recaptação pode ter um papel necessário em uma ou várias ações do NGF. Particularmente interessante é a possibilidade (HORII e VARON,1977; SKAPER e VARON, 1979) de que a modulação no transporte de pequenas moléculas seja o mecanismo primário pelo qual o NGF mantém a sobrevivência celular e causa sua hipertrofia.

Devido a membrana plasmática ser um dos sítos de interação entre o NGF e as células alvo, é possível que uma ligação no mecanismo de ação do fator inclua alterações na arquitetura das células. Já foi mostrado (SCHUBERT e WHITLOCK, 1977; SCHUBERT et al., 1978) que dentro de 10 a 20 min após a exposição das células PC12 ao NGF, ocorrem mudanças na aglutinabilidade por certas lectinas e na adesão célula à célula.

Connolly et al. (1979 a,b) empregando eletromicroscopia por "scanning" acharam que o NGF causa seqüências de mudanças, de início rápido, altamente sincronizadas e reproduzíveis, na arquitetura da superfície das células PC12. Dentro de 1 min após a exposição ao NGF, grandes enrugamentos aparecem na superfície dorsal das células, os quais foram proeminentes por 3 min e desapareceram quase completamente após 7 min de tratamento. Durante este período de tempo, microvilosidades que estavam presentes em grande número antes do tratamento com NGF desapareceram, entre 15 a 45 min de tratamento a superfície das células estavam lisas, após este tempo, grandes vesículas começaram a aparecer, estas estavam presentes na maioria das células com 2 horas e desapareceram em 4 horas. Após 6 a 7 horas as microvilosidades começaram a reaparecer e com 10 horas elas mais uma vez cobriam toda a superfície das células. Até o presente, é difícil avaliar se estas rápidas mudanças na superfície das células são uma constante no mecanismo de ação do NGF, vez que, tais mudanças só foram descritos em uma linha de células tumorais e ocorrem bem antes do aparecimento de neuritos. Contudo, é passível de especulação, se tais mudanças estão relacionadas a um rearranjo dos receptores para o NGF, internalização do NGF, aumento na recaptção de pequenas moléculas ou alterações na interação das células tratadas com NGF com seus ambientes físicos (CONNOLLY et al., 1979b).

Evidências existem de que o crescimento de neuritos pelos neurônios responsivos ao NGF requer a formação e manutenção de microtúbulos (DANIELS, 1972; ROISEN e MURPHY, 1973). Esta evidência aumenta a possibilidade de que o NGF pode promover o crescimento de neuritos por causar um aumento nos níveis de tubulina e/ou aumento na organização da tubulina para formar microtúbulos. Em estudos com culturas de DRG de embrião de pinto (YAMADA e WESSELLS, 1971; MIZEL e BAMBURG, 1975) e gânglios simpáticos (MIZEL e BAMBURG, 1975), foi concluído que a concentração dos microtúbulos não mudou em resposta ao tratamento com NGF. Stöckel et al. (1974) também mostraram que nem a quantidade total nem a concentração dos microtúbulos estava

alterada no gânglio servical superior (SCG) de ratos neonatos em resposta ao NGF *in vivo*. Uma interpretação destes estudos foi que, o crescimento de neuritos induzido pelo NGF envolve um aumento na polimerização, mas não na síntese de tubulina.

Antes de se chegar a alguma conclusão, existem vários pontos a serem considerados, tais como o fato de que o uso de gânglios cultivados aumentam os problemas de heterogeneidade de tecidos, deteriorização dos controles não tratados com NGF e a influência de uma exposição anterior *in vivo* ao NGF. Apesar dos estudos terem sido feitos ao longo de vários dias, não existe verificação experimental se o NGF de fato afeta ou não a organização da tubulina. Estas questões tem que ser reexaminadas, em situações experimentais onde haja homogeneidade de tecidos, durante a iniciação (e não na regeneração) e durante um tempo maior usando técnicas que permitam medir não somente o teor de tubulina total mas também a polimerizada (PIPELEERS et al., 1977). É também importante distinguir se os possíveis efeitos do NGF na tubulina/microtúbulos são consequências primárias ou secundárias do crescimento de neuritos.

ACÇÕES DO NGF NO SNC-POSSÍVEL PAPEL TERAPÊUTICO

A doença de Alzheimer (DA) ou demência senil do tipo Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta vários sistemas de neurotransmissores cerebrais. O deficit do sistema colinérgico é contudo, da mais alta importância nesta patologia e apresenta grande correlação com as alterações observadas para o lado das funções cognitivas. O deficit colinérgico consiste na redução da: a) captação de colina, b) atividade da colina acetiltransferase e acetilcolinesterase e na síntese de acetilcolina (para revisão ver NORDBERG, 1992).

Por outro lado, a presença do NGF no SNC é da mais alta importância como fator de desenvolvimento para os neurônios colinérgicos embrionários e como fator de manutenção para os neurônios colinérgicos adultos (LAPCHAK, 1992). A perda dos

neurônios colinérgicos no cérebro dos pacientes com DA representa um dos achados neuropatológicos mais consistentes. Os neurônios afetados são os que formam o caminho colinérgico ascendente no prosencéfalo basal, o corpo celular destes neurônios estando localizado na área septal e no nucleus basalis de Meynert, estes axônios inervando a amígdala, hipocampo e neocórtex (MESULAM et al., 1983). Existe perda de enzimas colinérgicas marcadoras, declínio na recaptação de colina, na síntese de acetilcolina, além da perda dos corpos celulares colinérgicos (COYLE et al., 1983; DAVIES, 1985; MARCHBANKS, 1982). O decréscimo nestes parâmetros colinérgicos estão correlacionados com o número de placas e a demência clínica (ARENDT et al., 1984; FRANCIS et al., 1985; PERRY et al., 1978). Para muitos pesquisadores, o principal fator para a perda de memória característica desta doença é a perda dos neurônios colinérgicos (BARTUS et al., 1982; COYLE et al., 1983).

Appel (1981) formulou uma hipótese geral propondo que a perda de fatores neurotróficos seja o responsável pela degeneração de populações neuronais seletivas observadas, não somente na doença de Alzheimer mas também na doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral e que a aplicação do fator correspondente pode prevenir a degeneração neuronal. Baseado nesta hipótese, Hefti (1983) propos que a perda do NGF está envolvida na patogênese da DA.

Nos últimos anos se acumularam evidências mostrando que o NGF age como um fator neurotrófico para os neurônios colinérgicos centrais (TABELA 2), num caminho similar a sua influência nos neurônios periféricos simpáticos. O NGF e o RNA_m que o codifica, estão presentes no cérebro do rato (CRUTCHER e COLLINS, 1982, KORSCHING et al., 1985; SHELTON e REICHARDT, 1986). Os níveis de NGF são muito altos no hipocampo, córtex, área septal e nucleus basalis (isto é, em áreas alvo e area de origem dos neurônios colinérgicos ascendentes no prosencéfalo basal) e são baixos no tectum optico, cerebelo e medula (em áreas que não recebem um impulso de neurônios colinérgicos prosencefálicos), o correspondente RNA_m é detectado somente no hipocampo

Tabela 2. Efeito do NGF nos neurônios colinérgicos centrais *in vitro*

Cultura	Estágio do desenvolvimento	marcador colinérgico
Neurônios septais	E15-E17, P21 E15-E17, P1-P4 P1-P4	↑ atividade ChAT ↑ atividade AChE ↑ sobrevivência e cresc. de fibras
	P1 P14	↑ conteúdo de Ach ↑ atividade ChAT ↑ sobrevivência neuronal
Neurônios estriatais	P19-20	↑ atividade ChAT

Sumarizado de Hartikka e Hefti, 1988; Hatanaka et al., 1988; Hsiang et al., 1989 e Takei et al., 1988

E- idade embrionária; P- idade pós-natal

e córtex (KORSCHING et al., 1985).

Quando o NGF é injetado no hipocampo e córtex, ele é recaptado pelos nervos terminais e transportado retrogradamente para o corpo celular colinérgico localizado no prosencéfalo anterior mas não em outros corpos celulares que projetam para esta área (SCHWAB et al., 1979; SEILER e SCHWAB, 1984). Receptores para o NGF foram demonstrados no cérebro de rato por imunoprecipitação com anticorpo monoclonal (TANIUCHI e JOHNSON, 1985; TANIUCHI et al., 1986) e receptores para o NGF no cérebro de humanos foram visualizados usando imunohistoquímica (ROSS et al., 1984).

Os efeitos do NGF em animais experimentalmente lesionados em uma parte do sistema neuronal colinérgico do prosencéfalo anterior (este caminho se degenera na DA), mostram um aumento na atividade da ChAT no septum e hipocampo na área lesionada (

HEFTI et al., 1984) e análises histológicas revelaram que o NGF resgatou os neurônios colinérgicos septais lesionados (a redução ficou em 10%). Lesões nesta área resultam em déficits na memória de ratos (FLICKER et al., 1983; HEPLER et al., 1985; SALAMONE et al., 1984) e na habilidade para aprender uma tarefa no modelo do labirinto radial. E o tratamento com NGF neutraliza estas deficiências induzidas pela lesão. Ratos tratados com NGF aprenderam a tarefa que lhes foi apresentada no modelo do labirinto mais rapidamente que os ratos não tratados, com a mesma lesão (WILL e HEFTI, 1985). Entretanto, a possibilidade de que o efeito tenha sido mediado por outros sistemas neuronais não pode ser excluída. O NGF pode estar envolvido na patogênese de DA, apesar de não haver evidências indicando que a perda de NGF ou uma reduzida resposta a ele seja responsável pela morte dos neurônios colinérgicos na DA, a perda destes neurônios pode refletir uma degeneração secundária à atrofia de áreas alvo como o córtex e o hipocampo.

A relação entre memória, neurônios colinérgicos e NGF leva à hipótese de que o NGF pode ser uma arma a ser utilizada na terapêutica da DA. Tuszynski et al. (1990) demonstraram que a degeneração de neurônios colinérgicos de primatas induzidos por lesão é prevenida por terapia com NGF. Assim o NGF pode ser benéfico em prevenir a degeneração dos neurônios colinérgicos na DA, que pode assim melhorar alguns déficits cognitivos que são característicos desta desordem (BARTUS et al., 1982; COYLE et al., 1983; HEFTI e WEINER, 1986). Estudos com NGF recombinante humano mostraram sua eficácia em prevenir a degeneração dos neurônios colinérgicos após transecção na fimbria-fornix (no complexo magnocelular do prosencéfalo) *in vivo* (KOLIATSOS et al., 1991) e *in vitro* (KNÜSEL et al., 1990) e este NGF mostrou ser equivalente em eficácia ao NGF de camundongo. Assim, o tratamento de animais com lesão no sistema septo-hipocampal pode restaurar, parcialmente, a inervação no campo terminal desafenciado (HAROUTUNIAN et al., 1986) e pode melhorar transitoriamente deficiências comportamentais relacionados a uma denervação hipocampal (WILL e HEFTI, 1985). Entretanto, o NGF só pode ser benéfico para os neurônios colinérgicos não funcionais se a

deficiência de síntese ou uma aumentada degradação de NGF, não é um evento primário na desordem. A intervenção com fatores neurotróficos pode ser mais eficaz no início do curso da DA, quando uma grande população de neurônios colinérgicos permanece intacta e susceptível à ação do NGF. Após um certo estágio de degeneração, a perda da população colinérgica pode tornar a terapia com NGF ineficaz. Existe a possibilidade de que o NGF possa promover mudanças neuronais aberrantes no cérebro (MOBLEY et al., 1988) e portanto o tratamento crônico com NGF deve ser feito com cautela, uma vez que o uso e os possíveis efeitos colaterais são ainda questões em aberto.

ACÇÕES FARMACOLÓGICAS DO NGF

Já está demonstrado que o NGF eleva o número de mastócitos em ratos recém-nascidos (ALOE e LEVI-MONTALCINI, 1977) e na presença de fosfatidil serina, libera histamina de mastócitos peritoneais de rato (BRUNI et al., 1982; MAZUREK et al., 1986) como o faz o composto 48/80 e o peptídeo 401 do veneno de abelha. Além do mais, o NGF aumenta a permeabilidade vascular na pele de rato de uma maneira dose-dependente (OTTEN et al., 1984) e está aumentado no exsudato inflamatório (WESKAMP e OTTEN, 1987) o que pode sugerir que a produção de NGF está relacionada com as células inflamatórias que se acumulam no exsudato ao mesmo tempo que o NGF (CAPASSO et al., 1975). Por outro lado, outros estudos mostram que o NGF tem um efeito inibitório no aumento da permeabilidade vascular em alguns tipos de inflamação aguda (peritonite com ácido acético e edema de pata induzido por carragenina, serotonina e dextrano) (AMICO-ROXAS et al., 1989). Em doses baixas (0,25-5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), o NGF tem uma ação anti-inflamatória 100 vezes maior que a indometacina e 10 vezes maior que a dexametazona (BANKS et al., 1984) e esta dose corresponde à quantidade de NGF presente no soro de animais adultos (BANKS et al., 1973) levantando a possibilidade de que ele aja como um anti-inflamatório natural.

Em trabalhos recentes (LEWIN et al., 1993) foi demonstrado que a administração de altas doses de NGF por várias semanas em ratos recém-nascidos ou jovens, leva a uma profunda hiperalgesia mecânica que persiste até os animais alcançarem a maturidade (6 semanas) e esta hiperalgesia pode ser explicada por sensibilização mediada pelo NGF das fibras aferentes nociceptivas do tipo A δ . Em animais adultos, a hiperalgesia mecânica induzida pelo NGF é devido a mudanças a nível central (LEWIN et al., 1992), enquanto a hiperalgesia térmica é provavelmente o resultado de uma sensibilização dos receptores periféricos ao calor. O NGF pode influenciar as propriedades dos nervos sensoriais por regular a expressão de vários genes, o NGF estimula a síntese de substância P, CGRP (peptídeo gene relacionado à calcitonina) e do receptor de capsaicina nos neurônios sensoriais de ratos adultos (LINDSAY et al., 1989; WINTER et al., 1988). Níveis elevados de NGF podem levar a um aumento da síntese e da liberação de peptídeos *in vivo*, que podem ser compatíveis com os achados de níveis aumentados de substância P em tecidos inflamados (MARSHALL et al., 1990). A substância P pode ativar macrófagos a liberar interleucina-1, que agiria em células tais como fibroblastos e células de Schwann para estimular a produção de NGF, formando um "feedback" positivo entre a liberação da substância P e a produção do NGF, o que pode ser importante para alguns dos crônicos eventos associados com inflamação e sensitização neuronal.

Não existem informações a respeito do NGF presente no veneno de serpentes do gênero *Crotalus* que habitam o sertão nordestino, é interessante se fazer um estudo comparativo com o NGF de saliva de camundongo já estudado e também investigar outras ações farmacológicas deste fator. Tais informações podem ser úteis para o eventual aproveitamento do NGF como instrumento farmacológico.

OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- a- Estudar de modo comparativo, as características bioquímicas e imunológicas do fator de crescimento do nervo (NGF), isolado do veneno de *Crotalus durissus cascavella*, Wagler, 1984 e da saliva de camundongo.
- b- Estudar as ações farmacológicas do NGF, em modelos de inflamação e de dor.

MATERIAL E MÉTODOS

1- COLETA DAS AMOSTRAS

1.1-REAGENTES

- Epinefrina (bitartarato)- Sigma, USA
- Pentobarbital sódico - Sigma, USA

1.2- MÉTODO

O veneno de *Crotalus durissus cascavella*, Wagler, 1984, foi obtido do Laboratório Regional de Ofiologia de Fortaleza (LAROF) e foram sempre colhidos de serpentes machos adultas não anestesiadas, no período da manhã, através da compressão da glândula produtora de veneno.

A saliva foi obtida de camundongos Swiss machos de 10 a 16 semanas, segundo Wallace e Partlow (1976) com pequenas modificações. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) e a salivação induzida pela injeção subcutânea de epinefrina (5mg/kg). A secreção salivar foi coletada com auxílio de uma seringa durante 45-60 min após a injeção do secretagogo. Aproximadamente 25-30 μ l de saliva foi obtida por camundongo sendo seu pH em torno de 8,5.

As amostras foram congeladas a -20°C imediatamente após a coleta, até o momento de uso.

2- DIÁLISE E CENTRIFUGAÇÃO

2.1- REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- Saco de Diálise- 250-11 (Sigma)
- Agitador Magnético- modelo 120MR, Fisher, USA
- Centrífuga refrigerada, modelo J21C, Beckman, Alemanha
- Tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,8

2.2- MÉTODO

As amostras de saliva e veneno (1-1,5 ml) foram dialisadas durante toda a noite a 4°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 6,8. Depois foram centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 10 min e o sobrenadante coletado foi usado para cromatografia.

3- CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE GEL DE SEPHADEX G-100

3.1- REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- Blue Dextran 2000 - Sigma, USA
- Albumina bovina- Sigma, USA
- Ovoalbumina- Sigma, USA
- Citocromo C- Sigma, USA
- Inibidor de Tripsina de Soja- Sigma, USA
- Sephadex G-100 -120 - Sigma, USA
- Fosfato monobásico de sódio - Reagen, Brasil
- Colunas Cromatográficas K15/90 - Pharmacia Fine Chemicals, USA
- Coletor de frações - LKB 2070 Ultro Rac II, Suécia

-Espectrofotômetro Beckman DU modelo G-4700 acoplado a um sistema de modernização Gilford -USA

3.2- MÉTODO

A cromatografia em coluna de Sephadex G-100 foi realizada segundo metodologia descrita por ANDREWS (1970).

Inicialmente o pó de Sephadex (15 g) foi adicionado à água deionizada (400 ml) e em seguida deixado em repouso por 72 h para haver o entumescimento do gel. Após resfriamento (4°C) as partículas mais finas foram decantadas e o gel foi lavado várias vezes com água. Na última lavagem foi adicionado tampão fosfato monobásico de sódio 25 mM pH 6,8, na proporção 1:1 (volume do tampão: volume da suspensão do gel). Em seguida, duas colunas cromatográficas com dimensões de 1,5 x 90 cm foram compactadas com o gel, por gravidade, a 4°C, tendo-se o cuidado para que a altura entre a superfície do líquido no topo da colunas e o fim do polietileno de escoamento do tampão das mesmas, não ultrapassasse 10 cm. As colunas foram lavadas com o tampão, utilizando-se um fluxo de 30 ml/hora.

Antes da aplicação das amostras, 1 ml de uma solução a 0,2 % (p/v) de Blue Dextran 2000 foi cromatografada com a finalidade de verificar possíveis defeitos na compactação do gel e também de determinar o "void volume" (V_0). A reta foi obtida através de regressão linear pelo gráfico do logaritmo do peso molecular das proteínas usadas como padrões versus volume de eluição das amostras/"void volume". As seguintes proteínas puras foram utilizadas como padrões para a determinação do peso molecular: Albumina bovina (PM 66 kD), Ovoalbumina (PM 45 kD), Inibidor de Tripsina de Soja (PM 22,5 kD), Citocromo C (PM 12,5 kD). Todas as proteínas foram aplicadas na concentração de 5 mg/ml , no volume de 1,0 ml, dissolvidas no tampão de eluição.

As amostras de veneno e saliva foram aplicadas em colunas separadas, num volume de 1,0 ml. As frações obtidas foram coletadas num volume de 2 ml por tubo e a atividade da proteína existente foi detectada através de espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm.

4- DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

4.1- MATERIAL E REAGENTES UTILIZADOS

- Saco de colóide para concentração de proteína- 10 S & S Collodion Bags nº100, Schlei & Schuell, Inc, USA.
- Sistema para concentração de proteínas SELECTRON, USA
- Espectrofotômetro Beckman acoplado a um sistema de modernização Gilford, USA

Soluções e reagentes usados:

- Solução A: Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 N
- Solução B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 1%
- Solução C: 24ml da solução A misturado com 1ml da solução B no momento de uso
- Reagente de Folin-Ciocalteu-Fenol (Labordin) 1:1 em água bidestilada
- Albumina sérica bovina - Sigma, USA

4.2- MÉTODO

As frações onde estavam a maior atividade de proteína foram reunidas e no caso da saliva foram concentradas por diálise à vácuo usando o sistema para concentração de proteína SELECTRON e em seguida a concentração de proteína foi determinada pelo

método de Lowry (1951). Este método emprega duas reações de formação de cor. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa do ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais orgânicos, o reagente de Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 750nm.

5- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 7,5 % COM SDS

5.1- MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

- Cuba para eletroforese- modelo, LKD-Bromma, Suécia
- Fonte para eletroforese - LKB-Bromma 2197, Suécia
- Albumina bovina - Sigma, USA
- Tripsinogênio - Sigma, USA
- Anidrase carbônica - Sigma, USA
- Lactalbumina - Sigma, USA
- Azul de Bromofenol - Sigma, USA
- Tris (hidroximetil)- amino metano - Sigma, USA
- Glicina - Sigma, USA
- Acrilamida - Sigma, USA
- Bis-acrilamida - Sigma, USA
- TEMED (N,N,N',N'- Tetrametiletenodiamina) - Sigma, USA

- Persulfato de amônio- Reagen, Brasil
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Sigma, USA
- Coomassie R - Merck, Brasil
- Ácido acético p.a - Reagen, Brasil
- Metanol p.a - Reagen, Brasil
- Ácido clorídrico p.a. - Reagen, Brasil
- Sacarose p.a - Reagen, Brasil

- Main gel estoque:

Acrilamida -----34g
 Bis-acrilamida -----0,153g
 Água destilada -----q.s.p. 100ml

- Stacking gel estoque:

Acrilamida -----7,5g
 Bis-acrilamida -----0,2g
 Água destilada -----q.s.p. 25ml

- Tampão de corrida:

Glicina -----7,055g
 Tris ----- 3,0g
 SDS -----0,5g
 Água destilada -----q.s.p. 500ml

- Solução de azul de Bromofenol a 0,25%

- Solução corante:

Coomassie R -----0,67g
 Metanol -----400ml
 Água destilada ----- 530ml
 Ácido acético -----70ml

- Solução descorante:

Ácido acético -----	100ml
Água destilada -----	800ml
Metanol -----	350ml

Main gel (de uso):

- Tris / HCl 1M pH 8,8 ----- 2,5ml
- Água bidestilada ----- 0,5ml
- Main gel estoque ----- 3,4ml
- SDS a 10% ----- 0,08ml
- TEMED conc. ----- 15 μ l
- Persulfato de amônio a 2,0%----- 0,2ml

- Stacking Gel (de uso):

- Tris / HCl 1M pH 6,8 ----- 0,625ml
- Stacking gel estoque ----- 0,315ml
- Água bidestilada -----1,315ml
- TEMED conc. ----- 7,5 μ l
- SDS a 10% ----- 0,1ml
- Persulfato de amônio a 2% ----- 0,125ml

5.2- MÉTODO

A eletroforese foi realizada segundo LAEMMLI (1970). Foram empregadas placas de vidro de 10 x 13,5 cm. Primeiramente foi adicionado o Main gel (gel de separação) com uma pipeta, cuidadosamente para não criar bolhas no espaço entre as placas de vidro,

acopladas à cuba de eletroforese cheia de tampão Tris/HCl, depois se adicionou o Stacking gel (gel de aplicação). Após o preenchimento das placas, foi introduzido um "pente" de acrílico formando "poços" com a sua retirada após a polimerização da poliacrilamida. As amostras foram preparadas em tampão Tris/HCl 0,01M pH 8,0, contendo 1% de SDS, 10% de sacarose e 20 μ l de Azul de Bromofenol e aplicados em um volume de 30 μ l. O processo foi desenvolvido utilizando-se uma corrente de 15 mA durante aproximadamente 3 horas. Após a corrida o gel foi corado com Comassie R 0,2% por duas horas e descorado por lavagens sucessivas de ácido acético a 7%.

6- PRODUÇÃO DO ANTISORO CONTRA A FRAÇÃO DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella*

6.1- REAGENTES UTILIZADOS

- Formaldeído p.a. - Reagen, Brasil
- Adjuvante completo de Freund (FCA)- Sigma, USA

6.2-METODO

A produção do anticorpo contra a fração do veneno (F12-30) foi realizado segundo Zanini et al. (1968). A fração do veneno (2 mg/ml) foi misturada com formaldeído (solução final de 0,4%) por 15 dias a 40°C, com o objetivo de eliminar o toxóide do veneno.

No momento da imunização, a fração formalizada foi emulsionada com igual volume de Adjuvante completo de Freund. A seguir, coelhas jovens (3 meses) foram divididas em dois grupos (n=2) e injetadas com 1ml da emulsão por via intramuscular em várias partes da coxa. O primeiro grupo recebeu uma dose de reforço com 30 dias e o segundo recebeu o reforço com 15 e 30 dias. A coleta de amostras de sangue para a pesquisa de anticorpos foi

feita através da veia marginal da orelha antes de cada reforço. O sangue colhido foi deixado em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente , depois centrifugado e congelado até o momento da imunodifusão.

7- IMUNODIFUSÃO DUPLA RADIAL DE OUCHTERLONY

7.1- REAGENTES UTILIZADOS

- Ácido bórico p.a.- Reagen, Brasil
- Borato de sódio p.a.- Reagen, Brasil
- Cloreto de sódio p.a.- Reagen, Brasil
- Agarose - tipo I - Sigma, USA
- Azida sódica - Reagen, Brasil
- Coomassie 25 R - Merk, Brasil
- Metanol p.a.- Reagen, Brasil
- Ácido acético p.a.- Reagen, Brasil

Nerve Growth Factor (NGF) de veneno de *Vipera lebetina* - Sigma, USA

Anticorpo anti-NGF 2,5S de saliva de camundongo - Sigma, USA

Tampão (estoque)

- Ácido bórico -----0,62 g
- Borato de sódio-----0,95 g
- NaCl -----0,44 g
- Água destilada-----100 ml

Gelose

- Agarose -----1,0 g

- Tampão a 5 % -----100 ml
- Azida sódica-- ----- 30 mg

Solução para coloração

- Coomassie 25 R -----67mg
- Metanol -----40ml
- Ácido acético ----- 7ml
- Água destilada -----53ml

7.2- MÉTODO

Essa técnica segue o método de OUCHTERLONY (1958). Foi utilizado gel de agarose a 1% em salina tamponada colocado sobre lâmina de vidro. Nesse foram feitos pequenos poços, sendo um central e os demais periféricos, equidistantes entre si e do central. Foram feitas três lâminas, na lâmina 1 foi colocado no poço central, o soro anti-NGF de saliva de camundongo (5 μ l), nos poços periféricos foram usadas frações (5 μ l) da saliva obtidas em várias cromatografias de Sephadex G-100 (poço 1- saliva de camundongo, poço 2- F31-36, poço 3- F12-23, poço 4- F20-30, poço 5- F17-25, poço 6- F4-9, poço 7- F13-23, poço 8- NGF de *Vipera lebetina* (0,1 μ g/5 μ l). Na lâmina 2 foi colocado no poço central, o soro de coelho anti-fração de veneno F12-30, e nos periféricos, frações de veneno obtidas de cromatografias em Sephadex e DEAE-celulose (poço 1- F4-7 (DEAE), poço 2- 19-27 (Sephadex), poço 3- veneno de *Crotalus durissus cascavella*, poço 4- F8-20 (Sephadex), poço 5- F12-30 formalizada (Sephadex), poço 6- F12-30 não formalizada, poço 7- NGF de *V. lebetina*, poço 8- F33-39 (DEAE). Na lâmina 3 foi colocado no poço central, o anticorpo anti-NGF de saliva de camundongo e nos periféricos, as frações a serem testadas (poço 1- NGF de *Vipera lebetina*, poço 2- veneno de *Crotalus*

durissus cascavella, poço 3- fração de veneno F12-30, poço 4- fração de veneno F8-20, poço 5- fração de veneno F5-8, poço 6- fração de veneno F4-7, poço 7- fração de saliva F17-25 e poço 8- saliva de camundongo. Em todos os poços foram colocados um volume de 5 μ l. As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 h em câmara úmida quando foram observadas o desenvolvimento de linhas de precipitação (reação antígeno-anticorpo) entre o orifício central e o(s) periférico(s).

O fundamento dessa reação é baseado na proposição de que o complexo antígeno-anticorpo é solúvel tanto na região de excesso de antígeno como na região de excesso de anticorpo, precipitando apenas na zona de equivalência. Como consequência, se tivermos num meio gelificado, os reagentes migram em direções opostas e ao se encontrarem haverá a formação de uma linha de precipitação. Uma preparação contendo vários antígenos e migrando contra um antisoro contendo mais de um anticorpo, irá produzir múltiplas linhas. Uma outra aplicação deste método diz respeito ao estudo das semelhanças entre antígenos. Se deixarmos duas preparações de antígenos difundirem contra uma mesma preparação de anticorpos, diversas situações podem ocorrer; as linhas de precipitação podem ser completamente confluentes, indicando identidade imunológica; podem apresentar um "esporão", no caso de antígenos parcialmente relacionados ou podem, ainda, entrecruzar-se indicando a ausência de relação imunológica entre os antígenos. Devemos lembrar, entretanto, que mesmo no caso de linhas confluentes isto indica apenas uma identidade imunológica em termos de epítomos presentes, não significando, necessariamente, uma semelhança completa do ponto de vista molecular.

8- ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

8.1 DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ DA FRAÇÃO DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella*

A DL_{50} (dose que mata 50% dos animais) foi determinada pelo método de Miller e Tainter (1944). Realizou-se a contagem do número de animais mortos e calculou-se a percentagem de mortes para cada grupo, a qual foi convertida em probitos e colocada na ordenada enquanto que na abscissa constou o log da dose da fração do veneno. Foi usada a fração do veneno F12-30 obtida da cromatografia em Sephadex, nas doses de 0,06; 0,125, 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg, por via intraperitoneal e subcutânea, O mesmo procedimento foi feito para a fração do veneno formalizada (0,4% de formaldeído), nas doses de 1; 2; 4; 6 e 12 mg/kg, por via intraperitoneal.

8.2- TESTE DE RETIRADA DA CAUDA DA ÁGUA QUENTE (" RAT WATER TAIL IMMERSION")

A resposta de retirada da cauda de ratos Wistar (120-150g) machos não anestesiados à estímulos nocivos foi determinada pelo método de Janssen et al. (1963) e serve para avaliar efeitos analgésicos centrais. As caudas (5 cm) foram imersas em água quente ($54 \pm 1^{\circ}C$) e o tempo de latência de retirada da cauda foi medido com 15 minutos de intervalo até 60 minutos. Uma interrupção do teste foi feita quando os ratos não retiravam a cauda da água quente aos 30 segundos. A fração de saliva (F12-23) foi injetada nas concentrações de 0,16, 0,32, 0,8 e 4 μg de proteína/kg, s.c. e a fração do veneno (F12-30) nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μg de proteína/kg, s.c. em um volume de 1 ml/kg (n=6 por dose), 30 minutos antes de começar o teste. O grupo controle recebeu um igual volume de salina a 0,9%.

8.3- TESTE DA PLACA QUENTE ("HOT PLATE TEST")

O teste da placa quente foi feito em camundongos Swiss (20-25g), machos, segundo o método de Eddy e Leimback (1953) e serve para avaliar efeitos analgésicos centrais. Os camundongos que exibiram respostas características ao estímulo térmico ($55 \pm 1^\circ\text{C}$) na placa quente (lamber as patas posteriores e/ou saltar sobre a placa) em cerca de 10 segundos, foram selecionados para o teste. Os animais foram divididos em grupos de 6 animais cada e tratados com a fração de saliva (F12-23) nas doses de 0,8 e 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. e com a fração de veneno (F12-30) nas doses de 10; 50 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou com salina a 0,9% (grupo controle) . Eles foram testados nos intervalos de 0, 30 e 60 min após a administração das frações e registrado o tempo decorrido até que o animal demonstrasse resposta ao estímulo térmico.

8.4- TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS PELO ÁCIDO ACÉTICO ("WRITHING TEST")

A habilidade das frações de inibir as contorções induzidas pelo ácido acético a 0,6% ("writhing test") foi ensaiada em camundongos Swiss (20-25g) machos não anestesiados, pelo método de Koster (1959) . A fração de saliva (F12-23) foi injetada nas doses de 0,16, 0,32, 0,8 e 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. e a fração do veneno (F12-30) nas doses de 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. em um volume de 5 ml/kg (n=6 por dose), o grupo controle recebeu um igual volume de salina a 0,9%. Após 30 minutos do tratamento os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0,1 ml/10g de peso de uma solução de ácido acético a 0,6%. O número total de contorções foi então determinado por um período de 20 minutos começdos a contar 10 minutos após a administração do ácido acético. Uma contorção sendo identificada como uma extensão da pata traseira acompanhada por constrição do abdômen. Em alguns experimentos, naloxone (Sigma), na dose de 1 mg/kg,

um antagonista dos receptores opióides foi administrado subcutâneamente 15 min antes do tratamento com as frações.

8.5- TESTE DA FORMALINA

O teste da formalina foi feito segundo o método de Dubuisson e Dennis (1977), modificado por Hunskaar e Hole (1987). Camundongos Swiss (20-25g) machos foram pré-tratados com a fração do veneno (F12-30) nas doses de 1, 50 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e com a fração de saliva nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.. Os animais controle receberam salina a 0,9%. Um volume de 20 μl de formalina a 1% foi injetada s.c. na região plantar da pata traseira esquerda dos camundongos 30 min após o tratamento. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata injetada foi medido nos tempos 0-5 min (primeira fase) e 20-25 min (segunda fase) após a injeção de formalina. Em outro grupo de experimentos, o naloxone (Sigma), um antagonista de receptores opióides, foi injetado subcutâneamente, na dose de 1 mg/kg, 15 min antes do tratamento com as frações.

8.6- EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

Este teste serve para estudar a ação antiinflamatória de drogas (WINTER et al., 1962). Camundongos Swiss machos (120-150g), escolhidos aleatoriamente e divididos em grupos de 6 animais cada, foram tratados com a fração (F12-23) de saliva e de veneno (F12-30) nas doses de 1; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. com salina, 30 minutos antes da injeção subplantar de 50 μl de uma solução de carragenina (tipo I - Sigma, USA) a 1% na pata traseira direita. O volume da pata foi medido por pletismógrafo (Ugo Basile, Itália), nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após a injeção de carragenina.

A atividade anti-edematogênica das frações foi considerada em termos de inibição percentual do edema, de acordo com a seguinte fórmula:

Percentagem de inibição = $1 - V_t / V_c \times 100$, onde V_t e V_c representam a média das diferenças entre as medidas das patas nos grupos tratados e controle respectivamente.

Método pletismográfico:

Foi utilizado uma variante do método de Winder et al. (1957).

A pata traseira direita do animal foi estendida firmemente e introduzida até uma determinada região referencial (borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar) em um recipiente cheio, a quantidade de fluido deslocado é medida por um transdutor e a leitura feita em um monitor digital. O fluido utilizado foi uma solução de NaCl 0,05% acrescido de uma solução detergente (Imbibente BBC97, Ornano- Itália), na proporção de 5 ml/l.

8.7. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANO A 1,5% EM CAMUNDONGOS

Este teste serve para estudar a atividade anti-inflamatória de drogas e segue o modelo descrito por Parrat e West (1958). Camundongos Swiss machos (20-25 g), escolhidos aleatoriamente e divididos em grupos de 6 animais cada, foram tratados com a fração (F12-23) de saliva e de veneno (F12-30), nas doses de 1; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. ou com salina, 30 min antes da injeção subplantar de 50 μl de uma solução de dextrano, Sigma, USA (PM-12000) a 1,5% na pata traseira direita . O volume da pata foi medido por pletismógrafo (Ugo Basile) nos tempos 0; 0,5; 1; 2 e 3 h após a injeção do dextrano.

A atividade anti-edematogênica das frações foi considerada em termos de inibição percentual do edema, de acordo com a seguinte fórmula:

Percentagem de inibição = $1 - V_t / V_c \times 100$, onde V_t e V_c representam a média das diferenças entre as medidas das patas nos grupos tratados e controle respectivamente

8.8- DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS

8.8.1- REAGENTES E DROGAS UTILIZADOS

Formaldeído p.a.- Reagen, Brasil

Azul de toluidina - Sigma, USA

Acetona p.a.- Reagen, Brasil

Composto 48/80 - Sigma, USA

Solução de Ringer- Locke:

- NaCl ----- 0,9%

- KCl ----- 0,042%

- CaCl₂ -----0,024%

- NaHCO₃ ----- 0,015%

- Dextrose ----- 0,1%

8.8.2 - MÉTODO

A degranulação foi feita segundo Norton (1954). Ratos Wistar foram sacrificados e cortes do mesentério foram retirados e colocados em solução de Ringer-Locke. As peças de mesentério foram incubadas por 30 min em solução de Ringer-Locke (5 ml), contendo as frações de saliva e de veneno a serem testadas, nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Como controle positivo de degranulação foi usado o composto 48/80 (Sigma), na dose de 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Com o objetivo de tentar bloquear a degranulação, 10 μl do anticorpo anti-NGF (1:8), foi incubado 30 min com a fração de saliva (100 $\mu\text{g/ml}$), e depois adicionados à solução de Ringer-Locke. Após o período de incubação, a peças foram colocadas por 20 min em solução de formaldeído a 4% contendo 0,1% de azul de toluidina. Depois, as peças foram descoradas com duas lavagens de acetona, fixadas com xilol e montadas em lâminas. Após a montagem, o excesso de gordura foi retirado das peças e as lâminas foram lidas no

microscópio ótico, com o aumento de 400. Usualmente duas a três peças de mesentério foram usadas para cada concentração da droga. De cada peça, 6-10 campos foram contados ao acaso e a porcentagem de células degranuladas por campo foi obtida. Para avaliar a porcentagem de degranulação, a marcação das lâminas foi coberta e as lâminas foram contadas em sequência randômica.

9- MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os resultados obtidos que exigiram uma análise estatística foram expressos como MÉDIA \pm E.P.M., a significância estatística foi calculada de acordo com o teste "t" de Student, para amostra não pareadas, obedecendo os níveis de significância de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1- CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-100

As amostras de saliva e de veneno, 1 ml aproximadamente, foram cromatografadas em coluna de Sephadex G-100 e as frações obtidas, foram lidas em 280 nm. Os perfis cromatográficos estão apresentados nas Figuras 2 e 3. O volume de eluição (V_e) correspondente a maior absorção de luz em 280 nm das frações da saliva variou de 64 até 80 ml, como o "void volume" (V_0) da coluna usada foi de 51 ml, o valor de V/V_0 é de 1,254-1,568. Plotando este ponto no gráfico da regressão linear obtida do logaritmo do PM de proteínas padrões usadas para calibrar a coluna (Albumina- 4,819, Ovoalbumina- 4,653, Inibidor de tripsina de soja- 4,352, Citocromo C- 4,097) versus V/V_0 destas mesmas proteínas para esta coluna (Albumina- 1,059, Ovoalbumina- 1,314, Inibidor de tripsina de soja- 1,627, Citocromo C- 1,941) (Figura 4) foi obtido o logaritmo do peso molecular variando de 4,40 a 4,65, equivalente a um PM aparente do "pool" de frações (F12-23) de 25-45 kD. Com relação ao veneno o V_e obtido das frações coletadas variou de 73 a 100 ml, como o V_0 da coluna usada foi de 54 ml, o valor de V/V_0 é de 1,352-1,852, plotando este ponto no gráfico da regressão linear obtida do logaritmo do PM de proteínas padrões usadas para calibrar a coluna (ver acima) versus o V/V_0 destas mesmas proteínas para esta coluna (Albumina- 1,055, Ovoalbumina- 1,148, Inibidor de tripsina de soja- 1,444, Citocromo C- 1,963) (Figura 5) foi obtido o logaritmo do peso molecular variando de 4,16-4,52, o que equivale a um PM de 14,5-33 kD para este "pool" de frações (F12-30).

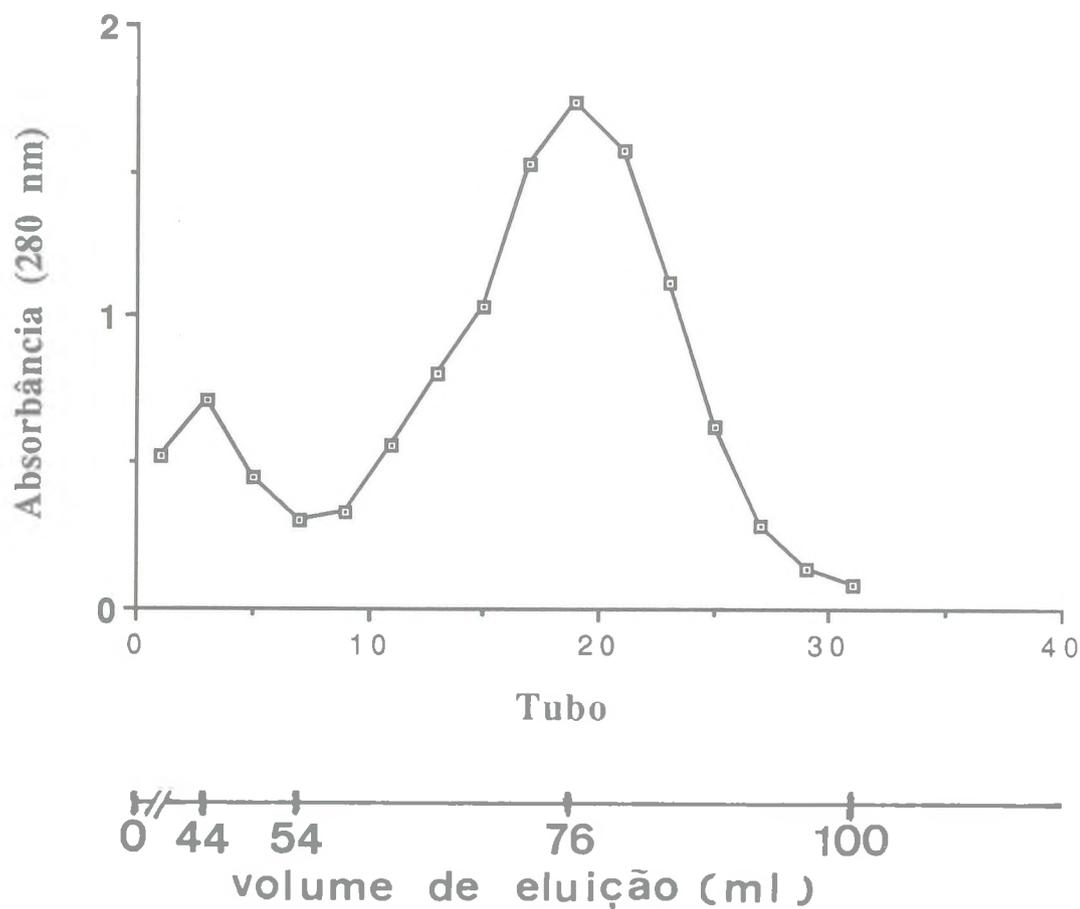


Figura 2. Cromatografia em gel de Sephadex G-100 da saliva do camundongo

A cromatografia foi feita em gel de Sephadex G-100, como descrita em "Materiais e Métodos". A saliva foi dialisada em tampão fosfato de sódio, 25 mM pH 6,8 e depois centrifugada. O sobrenadante (1 ml) foi usado para a cromatografia. A ordenada representa a absorbância das frações coletadas lidas num comprimento de onda de 280 nm. A abcissa representa o número de tubos usados para coletar as frações. O volume de eluição das frações está mostrado abaixo da abcissa.

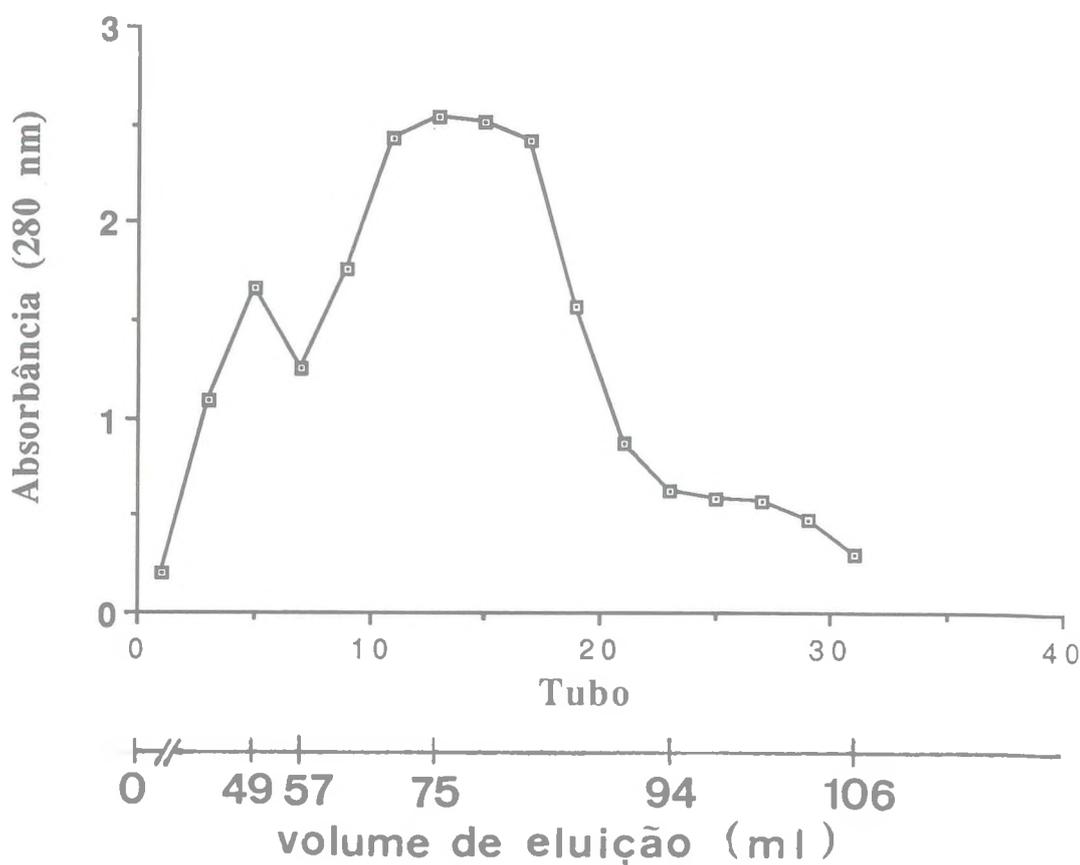


Figura 3. Cromatografia em gel de Sephadex G-100 do veneno de *Crotalus durissus cascavella*

A cromatografia foi feita em gel de Sephadex G-100, com descrito em "Materiais e Métodos". O veneno foi dialisado em tampão fosfato de sódio, 25 mM pH 6,8 e depois centrifugado. O sobrenadante (1 ml) foi usado para a cromatografia. A ordenada representa a absorbância das frações coletadas lidas num comprimento de onda de 280 nm. A abcissa representa o número de tubos usados para coletar as frações. O volume de eluição das frações está mostrado abaixo da abcissa.

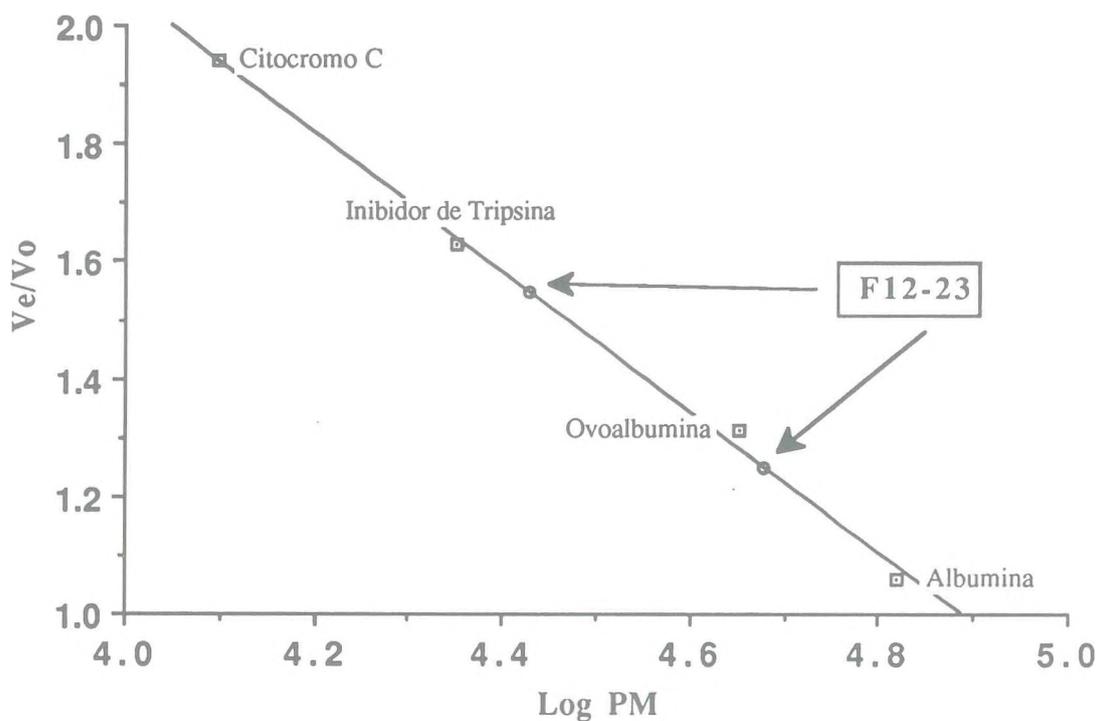


Figura 4. Peso molecular aproximado (PM) da fração de saliva

Peso molecular aproximado da fração de saliva (F12-23) obtida na cromatografia em Sephadex G-100. A regressão linear foi obtida pelo gráfico do logaritmo do PM das proteínas usadas para calibrar a coluna (albumina, ovoalbumina, inibidor de tripsina, citocromo C) versus o volume de eluição das proteínas/" void volume "(V_e/V_o).

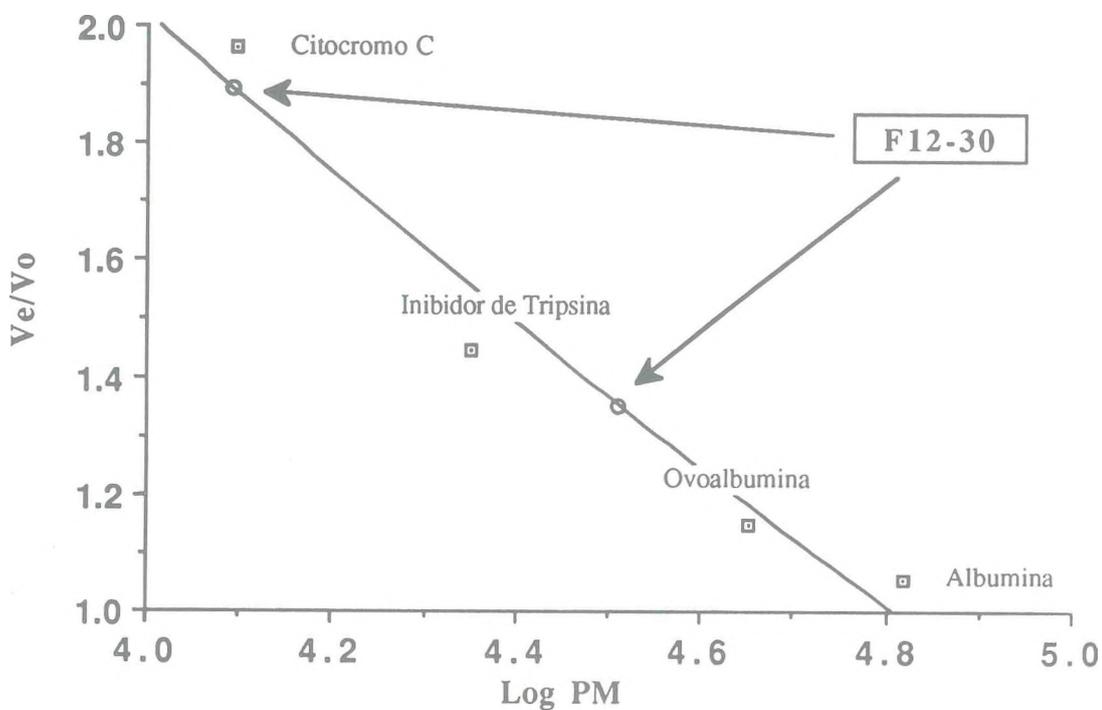


Figura 5. Peso molecular aproximado (PM) da fração do veneno de *Crotalus durissus cascavella*

Peso molecular aproximado da fração de veneno (F12-30) obtida na cromatografia em Sephadex G-100. A regressão linear foi obtida pelo gráfico do logaritmo do peso molecular das proteínas usadas para calibrar a coluna (albumina, ovoalbumina, inibidor de tripsina, citocromo C) versus o volume de eluição das proteínas/"void volume" (V_e/V_o).

2- DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A concentração de proteína existente na fração da saliva (F12-23) obtida da cromatografia foi de 1,1 mg/ml e para a fração de veneno (F12-30), foi de 3,1 mg/ml. Posteriormente as frações foram concentradas à vácuo resultando numa concentração final de 3,1 e 5,6 mg/ml para as frações de saliva e de veneno respectivamente.

3- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 7,5% COM SDS

O perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida a 7,5% com SDS está mostrada na Figura 6. Na fração de saliva (F12-23) vemos a presença de uma banda que migrou para a região de 18,2-21,4 kD baseado nas proteínas de PM conhecidas usadas (albumina bovina- 66kD, anidrase carbônica- 29 kD, tripsinogênio- 24 kD e lacatalbumina- 14,2 kD. Na fração do veneno (F12-30) foi observado que a fração ainda está impura, com quatro bandas de migração, nas regiões de 16,9-36,3 kD (Figura 6).

4- DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ DA FRAÇÃO DO VENENO DE *Crotalus durissus cascavella* EM CAMUNDONGOS

A DL₅₀ da fração F12-30 formalizada foi de 5,0 ± 0,9 mg/kg e da não formalizada foi de 0,125 ± 0,04 mg/ kg, quando injetadas por via intraperitoneal. Quando injetada por via subcutânea, a DL₅₀ da fração F12-30 não formalizada foi de 1,0 ± 0,1 mg/kg.

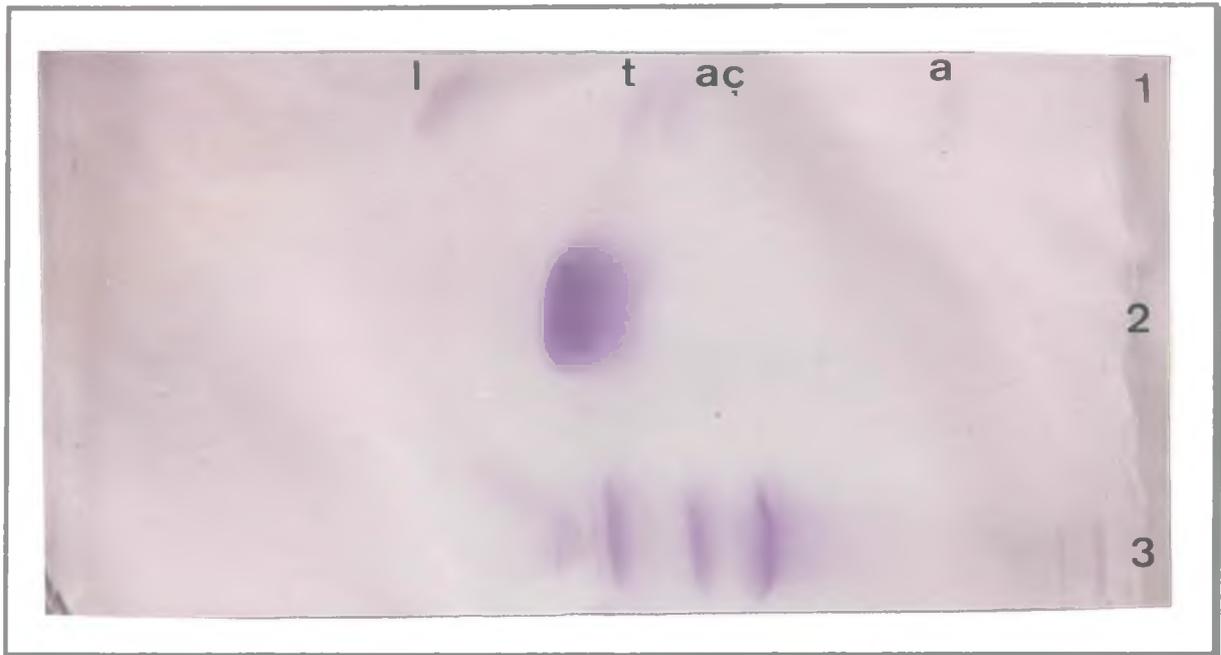


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% com SDS das frações de saliva e de veneno

A eletroforese foi feita segundo o descrito em "Materiais e Métodos". 1- Marcador de peso molecular (a→ albumina (66 kD), aç→ anidrase carbônica (29 kD), t→ tripsinogênio (24 kD), l→ lactalbumina (14,2 kD)). 2- Fração de saliva (F12-23). 3- Fração de veneno (F12-30).

5- IMUNODIFUSÃO DUPLA RADIAL DE OUCHERLONY

Na lâmina 1 foram observadas linhas de precipitação entre o anticorpo anti-NGF de saliva (poço central), a saliva de camundongo (poço 1) e as frações de saliva, F31-36 (poço 2), F12-23 (poço 3) e F20-30 (poço 4). Com as demais frações usadas não foram observadas nenhuma linha de precipitação. Também foi visto, que o NGF de *Vipera lebetina*, não dá reação cruzada com o anticorpo anti-NGF de saliva (poço 8). Foram detectadas, também, a presença de duas proteínas na saliva, das quais uma apareceu na fração F12-23 e a outra na fração F20-30 (Figura 7). Na lâmina 2 foram vistas linhas de precipitação entre o soro de coelho anti-fração F12-30 (poço central) e as frações de veneno testadas (poço 1- F4-7, poço 2- F19-27, poço 3- veneno de *Crotalus durissus cascavella*, poço 4- F8-20, poço 5- F12-30 formalizada, poço 6- F12-30 não formalizada, poço 8- F33-39). Foi detectado uma reação entre o NGF do veneno de *Vipera lebetina* (poço 7) e o soro anti-F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Foi observada também, a presença de duas linhas de precipitação em todas as frações testadas, significando a presença de duas proteínas com identidade imunológica. (Figura 8). Na lâmina 3, foram observadas duas linhas de precipitação entre o anticorpo anti-NGF de saliva (poço central) e a saliva (poço 8), demonstrando a presença de duas proteínas na saliva com identidade imunológica com o anticorpo usado. Nem o NGF de *Vipera lebetina* (poço 1), nem as frações de veneno testadas (poço 2- veneno de *Crotalus durissus cascavella*, poço 3- F12-30, poço 4- F8-20, poço 5- F5-8, poço 6- F4-7) reagiram com o anticorpo anti-NGF de saliva (Figura 9).

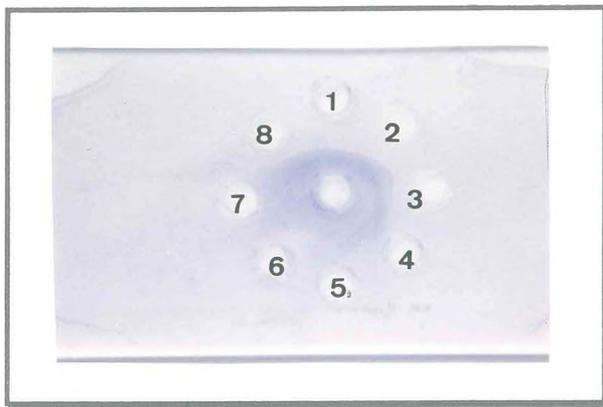


Figura 7. Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-NGF, frações de saliva e NGF de *Vipera lebetina* - Lâmina 1

As frações foram obtidas de cromatografias em Sephadex G-100. Poço central- anticorpo anti-NGF de saliva de camundongo, poço 1- saliva de camundongo, poço 2- F31-36, poço 3- F12-23, poço 4- F20-30, poço 5- F17-25, poço 6- F4-9, poço 7- F13-23, poço 8- NGF de *Vipera lebetina*. Nos poços foram colocados 5 μ l das amostras.

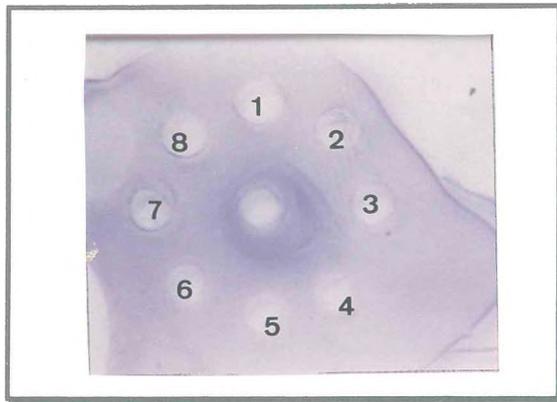


Figura 8. Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-F12-30, frações de veneno de *Crotalus durissus cascavella* e NGF - Lâmina 2

As frações de veneno de *Crotalus durissus cascavella* foram obtidas de cromatografias em Sephadex G-100 e de DEAE-celulose. Poço central- anticorpo anti-F12-30, poço 1- F4-7 (DEAE), poço 2- F19-27 (Sephadex), poço 3- veneno de *C. d. cascavella*, poço 4- F8-20 (Sephadex), poço 5- F12-30 formalizada (Sephadex), poço 6- F12-30 não formalizada (Sephadex), poço 7- NGF de *Vipera lebetina*, poço 8- F33-39. Nos poços foram colocados 5 μ l das amostras.

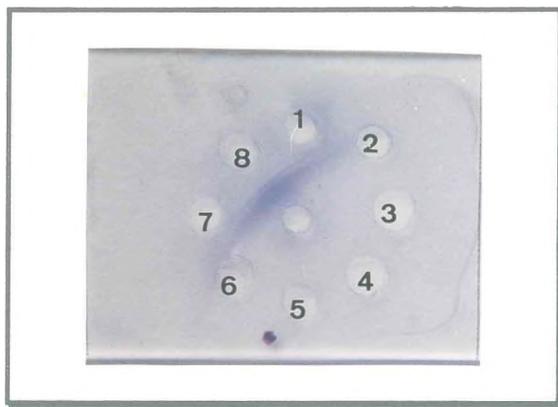


Figura 9. Imunodifusão dupla radial com anticorpo anti-NGF e frações de saliva de camundongo e de veneno de *Crotalus durissus cascavella* - Lâmina 3

As frações de veneno e de saliva foram obtidas de cromatografias em Sephadex G-100. Poço central- anticorpo anti-NGF de saliva de camundongo, poço 1- NGF de *Vipera lebetina*, poço 2- veneno de *C. d. cascavella*, poço 3- F12-30 (veneno), poço 4- F8-20 (veneno), poço 5- F5-8 (veneno), poço 6- F4-7 (veneno), poço 7- F17-25 (saliva), poço 8- saliva de camundongo. Nos poços foram colocados 5 μ l das amostras.

6- TESTE DA PLACA QUENTE EM CAMUNDONGOS ("HOT PLATE TEST")

As frações testadas não influenciaram significativamente o tempo de reação à placa quente ($55 \pm 1^\circ\text{C}$). Foi observado que os animais tratados com a fração de saliva (F12-23) na dose de $0,1 \mu\text{g}$ de proteína /kg, mostraram um tempo de reação de $1,9 \pm 0,2$; $1,9 \pm 0,4$ e $1,6 \pm 0,2$ segundos, na dose de $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo de reação foi de $3,0 \pm 0,8$; $2,2 \pm 0,4$ e $2,9 \pm 0,7$ segundos e na dose de $4,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $4,0 \pm 0,8$; $3,0 \pm 0,7$ e $2,8 \pm 1,0$ segundos, nos tempos de 0, 30 e 60 min após o tratamento, enquanto nos animais controle o tempo foi de $2,8 \pm 0,7$; $2,2 \pm 0,5$ e $2,7 \pm 1,0$ segundos para os mesmos tempos (Tabela 3). Em outro grupo de experimentos os animais foram tratados com a fração de veneno (F12-30) nas doses de 10, 50 e $200 \mu\text{g}/\text{kg}$. Na dose de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo de reação foi de $10,5 \pm 1,3$; $7,5 \pm 1,2$; $5,0 \pm 0,8$ segundos, na dose de $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $11,3 \pm 1,9$; $7,5 \pm 1,8$; $4,3 \pm 0,8$ segundos, na dose de $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $10,2 \pm 2,0$; $6,6 \pm 1,8$; $6,7 \pm 1,8$ segundos. Nos animais do grupo controle o tempo de reação à placa quente foi de $11,0 \pm 1,4$; $8,8 \pm 1,1$; $7,0 \pm 1,6$ segundos para os tempos de 0, 30 e 60 min após o tratamento (Tabela 4).

7- TESTE DA RETIRADA DA CAUDA EM RATOS ("RAT WATER TAIL IMMERSION")

As frações não influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o tempo de latência de retirada da cauda da água quente ($54^\circ\text{C} \pm 1$). Os animais nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após tratamento com a fração de saliva (F12-23) na dose de $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ mostraram um tempo de latência de retirada da cauda de $4,7 \pm 0,6$; $6,3 \pm 0,5$; $5,8 \pm 0,6$; $6,1 \pm 0,3$ e $7,3 \pm 0,4$ segundos respectivamente, na dose de $4,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $5,4 \pm 0,7$; $6,6 \pm 0,9$; $8,0 \pm 1,4$; $6,7 \pm 0,5$ e $6,8 \pm 0,7$ s respectivamente, nos animais do grupo controle a tempo foi de $4,5 \pm 0,4$; $5,8 \pm 0,9$; $4,3 \pm 0,6$; $6,5 \pm 1,5$ e $5,5 \pm 0,7$ segundos respectivamente (Tabela 5).

Tabela 3. Efeito da F12-23 de saliva de camundongo no tempo de reação à placa quente em camundongos.

Grupo	Dose $\mu\text{g/kg}$, s.c.	Tempo de reação (s)		
		0 min	30 min	60 min
Controle	-----	$2,8 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,5$	$2,7 \pm 1,0$
F12-23	0,1	$1,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$
	0,8	$3,0 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,7$
	4,0	$4,0 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,7$	$2,8 \pm 1,0$

Os números representam média \pm EPM do tempo de reação à placa quente (55 ± 1 °C) em segundos cronometrados nos tempos 0, 30 e 60 min após o tratamento. Foram utilizados grupos de 6 animais. Os resultados do test "t" de Student não apresentaram nenhuma diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao grupo controle injetado com salina.

Tabela 4. Efeito da F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* no tempo de reação à placa quente em camundongos.

Grupo	Dose $\mu\text{g/kg}$, s.c.	Tempo de reação (s)		
		0 min	30 min	60 min
Controle	-----	$11,0 \pm 1,4$	$8,8 \pm 1,1$	$7,0 \pm 1,6$
F12-30	10	$10,5 \pm 1,3$	$7,5 \pm 1,2$	$5,0 \pm 0,8$
	50	$11,3 \pm 1,9$	$7,5 \pm 1,8$	$4,3 \pm 0,8$
	200	$10,2 \pm 2,0$	$6,6 \pm 1,8$	$6,7 \pm 1,8$

Os números representam média \pm EPM do tempo de reação à placa quente (55 ± 1 °C) em segundos cronometrados nos tempos 0, 30 e 60 min após o tratamento. Foram utilizados grupos de 6 animais. Os resultados do teste "t" de Student não apresentaram nenhuma diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao grupo controle injetado com salina.

Tabela 5. Efeito da F12-23 de saliva de camundongo no tempo de latência de retirada da cauda ao estímulo térmico em ratos

Grupo	Dose $\mu\text{g/kg}$, s.c.	Tempo de reação (s)				
		0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Controle	-----	$4,5 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,6$	$6,5 \pm 1,5$	$5,5 \pm 0,7$
F12-23	0,8	$4,7 \pm 0,6$	$6,3 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,4$
	4,0	$5,4 \pm 0,7$	$6,6 \pm 0,9$	$8,0 \pm 1,4$	$6,7 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,7$

A cauda dos ratos (5 cm) foi imersa na água quente ($54^{\circ}\text{C} \pm 1$) e o tempo de latência de retirada da cauda foi medido nos tempos 0; 15; 30; 45 e 60 min após o tratamento com a fração. Os números representam média \pm EPM do tempo de latência de retirada da cauda em segundos. Foram utilizados grupos de 6 animais. Os números não diferem estatisticamente em relação ao controle. Os resultados do teste "t" de Student não apresentaram nenhuma diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao grupo controle injetado com salina.

Os animais tratados com a fração de veneno (F12-30) na dose de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mostraram um tempo de latência de $5,2 \pm 0,7$; $7,3 \pm 1,2$; $8,9 \pm 0,9$; $6,5 \pm 0,8$ e $6,0 \pm 0,6$ segundos respectivamente, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após o tratamento, na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo de latência foi de $8,0 \pm 1,9$; $8,8 \pm 0,8$; $6,8 \pm 0,8$; $6,2 \pm 0,7$ e $6,3 \pm 0,4$ segundos respectivamente, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $7,2 \pm 0,8$; $5,8 \pm 0,5$; $6,3 \pm 0,7$; $6,7 \pm 0,6$ e $5,3 \pm 0,2$ segundos respectivamente e na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o tempo foi de $8,3 \pm 1,6$; $7,2 \pm 0,6$; $5,7 \pm 0,3$; $7,5 \pm 0,7$ e $5,7 \pm 0,3$ segundos, nos animais do grupo controle o tempo de latência foi de $5,3 \pm 0,2$; $4,7 \pm 0,6$; $6,3 \pm 0,5$; $5,7 \pm 0,8$ e $6,5 \pm 0,5$ segundos respectivamente (Tabela 6).

8- TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS PELO ÁCIDO ACÉTICO

A fração do veneno (F12-30) nas doses de 1, 10, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, administrado por via subcutânea, reduziu significativamente ($p < 0,05$) e de maneira dose dependente, o número médio das contorções abdominais produzidas pelo ácido acético de um valor controle de $51,0 \pm 1,5$ para $33,3 \pm 3,6$; $30,8 \pm 6,4$; $28,0 \pm 7,1$ e $25,5 \pm 6,9$, correspondendo a uma inibição de 34, 39, 45 e 50% respectivamente (Tabela 7). Em outro grupo de experimentos o naloxone (1 mg/kg) não foi efetivo em bloquear a inibição causada pela F12-30 na dose de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (F12-30= $28,0 \pm 6,6$; F12-30 + Naloxone= $28,5 \pm 3,7$) (Tabela 8). A fração da saliva (F12-23) nas doses de 0,16; 0,32 e 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. inibiu as contorções de maneira dose dependente de um valor controle de $38,1 \pm 7,8$ para $22,5 \pm 4,2$; $18,0 \pm 4,8$; $7,3 \pm 2,8$, correspondendo a uma inibição de 41, 53 e 81% respectivamente, um posterior aumento da dose para 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ entretanto, resultou em menor inibição ($13,5 \pm 3,3$, equivalente a 65%) (Tabela 9). Em outro grupo de experimentos o naloxone, à semelhança do que foi observado com a fração do veneno, não foi efetivo em reverter a inibição causada por esta fração na dose de 0,32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (F12-23= $16,4 \pm 3,2$; F12-23 + Naloxone= $22,0 \pm 3,0$) (Tabela 10).

Tabela 6. Efeito da F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* no tempo de latência da retirada da cauda ao estímulo térmico em ratos.

Grupo	Dose $\mu\text{g/kg}$, s.c.	Tempo de reação (s)				
		0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Controle	-----	$5,3 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,6$	$6,3 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,5$
F12-30	25	$5,2 \pm 0,7$	$7,3 \pm 1,2$	$8,9 \pm 0,9$	$6,5 \pm 0,8$	$6,0 \pm 0,6$
	50	$8,0 \pm 1,9$	$8,8 \pm 0,8$	$6,8 \pm 0,8$	$6,2 \pm 0,7$	$6,3 \pm 0,4$
	100	$7,2 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,2$
	200	$8,3 \pm 1,6$	$7,2 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,3$

A cauda dos animais (5 cm) foi imersa em água quente ($54 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$) e o tempo de latência de retirada da cauda foi medido nos tempos 0; 15; 30; 45 e 60 min, após o tratamento com a fração. Os números representam média \pm EPM do tempo de latência de retirada da cauda em segundos. Foram utilizados grupos de 6 animais. Os números não diferem estatisticamente em relação ao controle injetado com salina.

Tabela 7. Efeito da F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.

Grupo	Dose $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.	Numero de contorções	Inibição (%)
Controle	-----	$51,0 \pm 1,5$	-----
F12-30	1	$33,3 \pm 3,6 *$	34,7
	10	$30,8 \pm 6,4 *$	39,6
	100	$28,0 \pm 7,1 *$	45,1
	200	$25,5 \pm 6,9 *$	50,0

Foi injetado ácido acético 0,6% (0,1 ml/10 g de peso, i.p.), 30 min após o tratamento com a fração. O número de contorções exibidos pelos animais foi contado após 10 min da injeção do ácido, durante 20 min. Os valores representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado)

Tabela 8. Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* no teste de contorções abdominais pelo ácido acético em camundongos.

Grupo	Dose s.c.	Número de contorções	Inibição (%)
Controle	-----	70,5 ± 5,2	-----
F12-30	200 µg/kg	28,0 ± 6,6 *	60,1
F12-30 +	200 µg/kg		
Naloxone	1 mg/kg	28,5 ± 3,7 *	59,6

Os valores representam média ± EPM de 6 animais por grupo. O ácido acético a 0,6% (0,1 ml/10 g) foi injetado i.p. 30 min após o tratamento com a fração. O naloxone foi injetado 15 min antes do tratamento com a fração. O número de contorções exibidos pelos animais foi contado 10 min após a injeção do ácido, durante 20 min. * p < 0,05 quando comparado com o grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 9. Efeito da F12-23 de saliva de camundongo na nocicepção induzida por ácido acético em camundongo.

Grupo	Dose $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.	Número de contorções	Inibição (%)
Controle	-----	$38,1 \pm 7,8$	-----
F12-23	0,16	$22,5 \pm 4,2$	41
	0,32	$18,0 \pm 4,8$	53
	0,80	$7,3 \pm 2,8$ *	81
	4,00	$13,5 \pm 3,3$ *	65

Os números representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. O ácido acético a 0,6% (0,1 ml/10 g) foi injetado i.p., 30 min após o tratamento com a fração. O número de contorções exibidos pelos animais foi contado 10 min a partir da injeção do ácido, durante 20 min. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado)

Tabela 10. Efeito do naloxone na antinocicepção induzida pela (F12-23) de saliva de camundongo no teste das contorções abdominais pelo ácido acético.

Grupo	Dose (s.c.)	Número de contorções	Inibição (%)
Controle	-----	45,5 ± 5,9	-----
F12-23	0,32 µg/kg	16,4 ± 3,2 *	64
F12-23 +	0,32 µg/kg		
Naloxone	1 mg/kg	22,0 ± 3,0 *	52

Os números representam média ± EPM de 6 animais por grupo. O ácido acético a 0,6% (0,1 ml/10 g) foi injetado i.p. 30 min após o tratamento com a fração. O naloxone foi injetado 15 min antes do tratamento com a fração. O número de contorções exibidos pelos animais foi contado 10 min após a injeção do ácido, durante 20 min. * p < 0,05 quando comparado com o grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

9- TESTE DA FORMALINA

A fração de veneno (F12-30) nas doses de 1, 50 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ reduziu significativamente o tempo de lambe a pata na primeira fase da resposta de um valor controle de $51,1 \pm 3,4$ para $32,5 \pm 6,5$; $34,0 \pm 3,8$; $27,8 \pm 4,5$ segundos, correspondendo a uma inibição de 36, 33 e 45% respectivamente, na segunda fase da resposta a atividade de lambe a pata foi reduzida de um valor controle de $39,6 \pm 6,4$ para um valor de $24,0 \pm 9,2$; $10,6 \pm 3,4$; $11,1 \pm 3,3$ segundos, correspondendo a uma inibição de 39, 73 e 78% (Tabela 11). Em outro grupo de experimentos o naloxone não foi efetivo em reverter a inibição causada por esta fração na dose de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, na primeira fase da resposta (F12-30= $27,5 \pm 1,0$, F12-30 + Naloxone= $25,0 \pm 3,2$ segundos), nem na segunda fase da resposta (F12-30= $7,2 \pm 2,0$, F12-30 + Naloxone= $2,0 \pm 0,7$ segundos) (Tabela 12). A fração de saliva (F12-23) nas doses de 1, 10 e 100 reduziu o tempo de lambe a pata na primeira fase da resposta de um valor controle de $59,5 \pm 2,7$ para $25,5 \pm 2,4$; $23,3 \pm 3,1$; $22,0 \pm 2,1$ segundos, correspondendo a uma inibição de 57, 61 e 63% respectivamente, na segunda fase da resposta o tempo de lambe a pata foi reduzida de um valor controle de $12,5 \pm 2,6$ para $5,5 \pm 3,0$; $9,0 \pm 1,7$; $4,0 \pm 1,0$ segundos, correspondendo a uma inibição de 56, 28 e 68% (Tabela 13). Em outro grupo de experimentos o naloxone não foi efetivo em reverter a inibição causada por esta fração na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, na primeira fase da resposta (F12-23= $22,0 \pm 2,1$, F12-23 + Naloxone= $24,7 \pm 1,4$), na segunda fase da resposta apesar de haver uma tendência para uma reversão estes resultados não foram diferentes estatisticamente (F12-23= $4,0 \pm 1,0$, F12-23 + Naloxone= $7,8 \pm 1,7$ segundos) (Tabela 14).

Tabela 11. Efeito da F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* na nocicepção induzida pela formalina na pata do camundongo.

Grupo	Dose $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.	Tempo gasto lambendo a pata (s)	
		1ª fase (0-5 min)	2ª fase (20-25 min)
Controle	-----	51,1 \pm 3,4	39,6 \pm 6,4
F12-30	1	32,5 \pm 6,5 * (36,4%)	24,0 \pm 9,2 (39,5%)
	50	34,0 \pm 3,8 * (33,5%)	10,6 \pm 3,4 * (73,1%)
	200	27,8 \pm 4,5 * (45,6%)	11,1 \pm 3,3 * (78,1%)

Os valores representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. A formalina 1% (20 μl /pata) foi injetada s.c. na região plantar da pata do camundongo, 30 min após o tratamento com a fração. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata foi medido nos tempos 0-5 min e 20-25 min após a injeção da formalina. Os valores entre parênteses representam a percentagem de inibição. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 12. Efeito do naloxone na antinocicepção induzida causada pela F12-30 de veneno de *Crotalus durissus cascavella* no teste da formalina a 1%

Grupo	Dose (s.c.)	Tempo gasto lambendo a pata (s)	
		1ª fase (0-5 min)	2ª fase (20-25 min)
Controle	-----	59,5 ± 2,7	12,5 ± 2,6
F12-30	200 µg/kg	27,5 ± 1,0*	7,2 ± 2,0
F12-30 +	200 µg/kg		
Naloxone	1,0 mg/kg	25,0 ± 3,2*	2,0 ± 0,7*

Os valores representam média ± EPM de 6 animais por grupo. A formalina a 1% (20 µl/pata) foi injetada s.c. na região plantar da pata do camundongo, 30 min após o tratamento com a fração. O naloxone foi injetado 15 min antes do tratamento com a fração. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata foi medido nos tempo 0-5 e 20-25 min após a injeção da formalina. * p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 13. Efeito da F12-23 de saliva de camundongo na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.

Grupo	Dose $\mu\text{g/kg}$, s.c.	Tempo gasto lambendo a pata (s)	
		1ª fase (0-5 min)	1ª-fase (20-25 min)
Controle	-----	59,5 \pm 2,7	12,5 \pm 2,6
F12-23	1	25,5 \pm 2,4 * (57%)	5,5 \pm 3,0 (56%)
	10	23,3 \pm 3,1 * (61%)	9,0 \pm 1,7 (28%)
	100	22,0 \pm 2,1 * (63%)	4,0 \pm 1,0 * (68%)

Os valores representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. Os números entre parênteses representam a percentagem de inibição. A formalina a 1% (20 μl /pata) foi injetada s.c. na região plantar da pata do camundongo, 30 min após o tratamento com a fração. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata foi medido nos tempos 0-5 e 20-25 min após a injeção da formalina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 14. Efeito do naloxone na antinocicepção induzida por F12-23 de saliva de camundongo no teste da formalina a 1%.

Grupo	Dose (s.c.)	Tempo gasto lambendo a pata (s)	
		1ª fase (0-5 min)	2ª fase (20-25 min)
Controle	-----	59,5 ± 2,7	12,5 ± 2,6
F12-23	100 µg/kg	22,0 ± 2,1*	4,0 ± 1,0*
F12-23 +	100 µg/kg		
Naloxone	1 mg/kg	24,7 ± 1,4*	7,8 ± 1,7

Os números representam média ± EPM de 6 animais por grupo. A formalina a 1% (20 µl/ pata) foi injetada s.c. na região plantar da pata do camundongo, 30 min após o tratamento com a fração. O naloxone foi injetado 15 min antes do tratamento com a fração. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata foi medido nos tempos 0-5 e 20-25 min após a injeção da formalina. *p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com salina (teste "t" de Student não pareado).

10- EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A figura 10 mostra uma curva de tempo da ação da fração de veneno (F12-30), nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. O edema foi medido nos tempos 0,5, 1, 2, 3 e 4 h, após a carragenina. Na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores do edema foram os seguintes: 0,5 h= $0,14 \pm 0,01$ ml ; 1 h= $0,20 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,24 \pm 0,02$ ml; 3 h= $0,20 \pm 0,02$ ml ; 4 h= $0,14 \pm 0,02$ ml, na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ os valores foram: 0,5 h= $0,18 \pm 0,01$ ml ; 1 h= $0,16 \pm 0,03$ ml ; 2 h= $0,17 \pm 0,01$ ml ; 3 h= $0,18 \pm 0,01$ ml ; 4 h= $0,17 \pm 0,05$ ml, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ os valores foram: 0,5 h= $0,19 \pm 0,03$ ml ; 1 h= $0,18 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,20 \pm 0,03$ ml ; 3 h= $0,20 \pm 0,03$ ml ; 4 h= $0,22 \pm 0,08$ ml. Os valores do grupo controle foram: 0,5 h= $0,11 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,16 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,24 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,28 \pm 0,02$ ml ; 4 h= $0,29 \pm 0,02$ ml . A inibição só foi significativa após 4 h, com uma percentagem de inibição de 52, 41 e 24%, para as doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

A figura 11 mostra uma curva de tempo da ação da fração de saliva (F12-23), nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sobre o edema de pata induzido por carragenina. Na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ os valores foram os seguintes: 0,5 h= $0,17 \pm 0,03$ ml ; 1 h= $0,19 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,17 \pm 0,02$ ml ; 3h= $0,20 \pm 0,03$ ml ; 4 h= $0,17 \pm 0,02$ ml, na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ os valores foram: 0,5 h= $0,19 \pm 0,01$ ml ; 1 h= $0,15 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,28 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,20 \pm 0,03$ ml ; 4 h= $0,21 \pm 0,03$ ml, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores foram: 0,5 h= $0,24 \pm 0,03$ ml ; 1 h= $0,24 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,32 \pm 0,01$ ml ; 3 h= $0,27 \pm 0,03$ ml ; 4 h= $0,20 \pm 0,02$ ml. Os valores do controle são os mesmos do experimento com a fração de veneno. A inibição só foi significativa após 4 h, com uma percentagem de inibição de 41, 28 e 31%, para as doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente

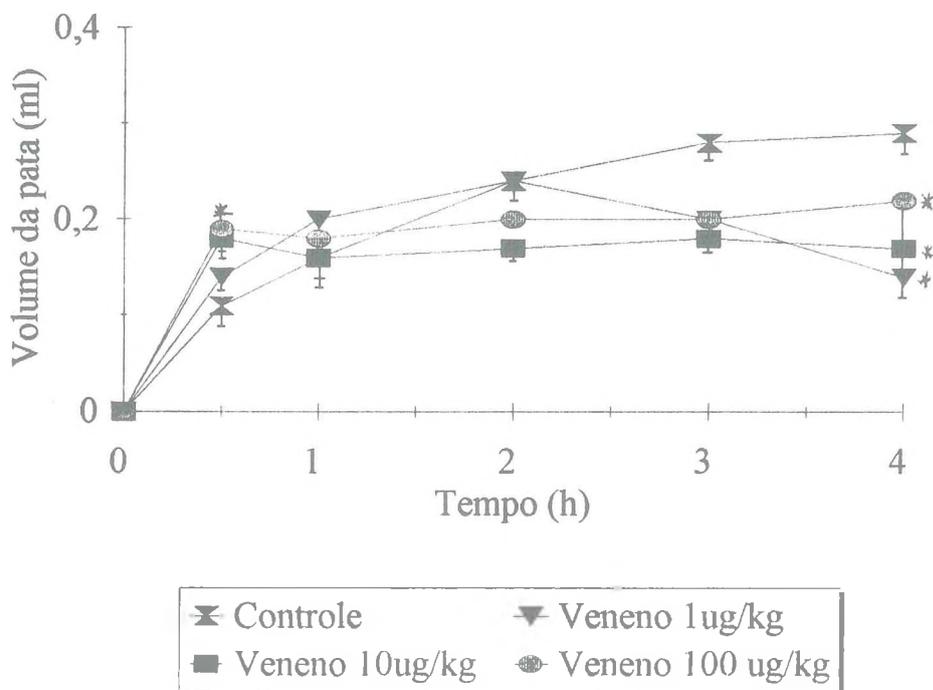


Figura 10. Efeito da fração (F12-30) de veneno de *Crotalus durissus cascavella* no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos

Os animais foram tratados com a fração de veneno 30 min antes da injeção da carragenina. A carragenina a 1% (50 μ l/pata) foi injetada s.c. na região dorsal da pata traseira dos animais e o edema foi medido nos tempos 0,5, 1, 2, 3 e 4 h . Os valores representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. $p^* < 0,05$ (teste "t" de Student não pareado)

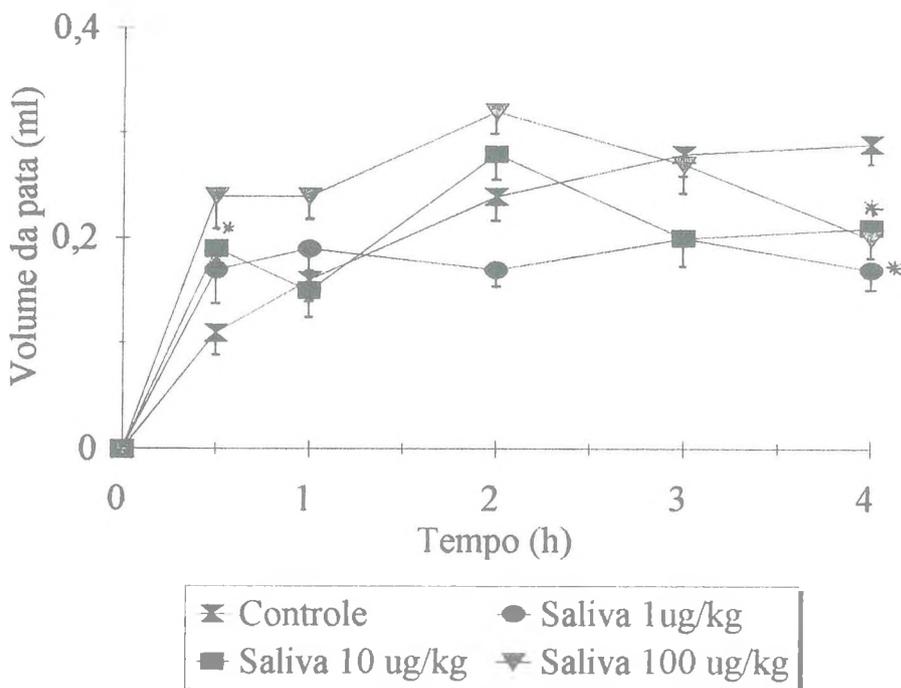


Figura 11. Efeito da fração (F12-23) de saliva de camundongo no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos

Os animais foram tratados com a fração de saliva 30 min antes da injeção da carragenina. A carragenina a 1% (50 μ l/pata) foi injetada s.c. na região dorsal da pata traseira dos animais e o edema foi medido nos tempos 0,5, 1, 2, 3 e 4 h. Os números representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. *p < 0,05 (teste "t" de Student não pareado).

11- EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRANO A 1,5% EM CAMUNDONGOS

A figura 12 mostra uma curva de tempo da ação da fração de veneno (F12-30), nas doses de 1 , 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sobre o edema de pata induzido por dextrano. O edema foi medido nos tempos 0,5, 1, 2 e 3 horas após a injeção do dextrano. A fração não teve nenhuma ação significativa sobre o edema. Para a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores encontrados foram: 0,5 h= $0,15 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,22 \pm 0,01$ ml ; 2 h= $0,21 \pm 0,03$ ml ; 3 h= $0,20 \pm 0,01$ ml, para a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores foram: 0,5 h= $0,13 \pm 0,01$ ml ; 1 h= $0,18 \pm 0,01$ ml ; 2 h= $0,19 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,13 \pm 0,03$ ml, para a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ os valores foram: 0,5 h= $0,19 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,23 \pm 0,03$ ml ; 2 h= $0,22 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,19 \pm 0,03$ ml. Os valores do grupo controle foram: 0,5 h= $0,10 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,14 \pm 0,03$ ml ; 2 h= $0,17 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,16 \pm 0,02$ ml.

A fração de saliva (F12-23) também não teve ação significativa sobre o edema. Para a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores foram: 0,5 h= $0,09 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,15 \pm 0,04$ ml ; 2 h= $0,18 \pm 0,03$ ml ; 3 h= $0,14 \pm 0,02$ ml, para a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores foram: 0,5 h= $0,09 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,15 \pm 0,02$ ml ; 2 h= $0,26 \pm 0,02$ ml ; 3 h= $0,21 \pm 0,01$ ml, para a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os valores foram: 0,5 h= $0,19 \pm 0,02$ ml ; 1 h= $0,19 \pm 0,03$ ml ; 2 h= $0,17 \pm 0,03$ ml ; 3 h= $0,14 \pm 0,03$ ml. Os valores do controle são os mesmos do experimento com a fração do veneno (Figura 13).

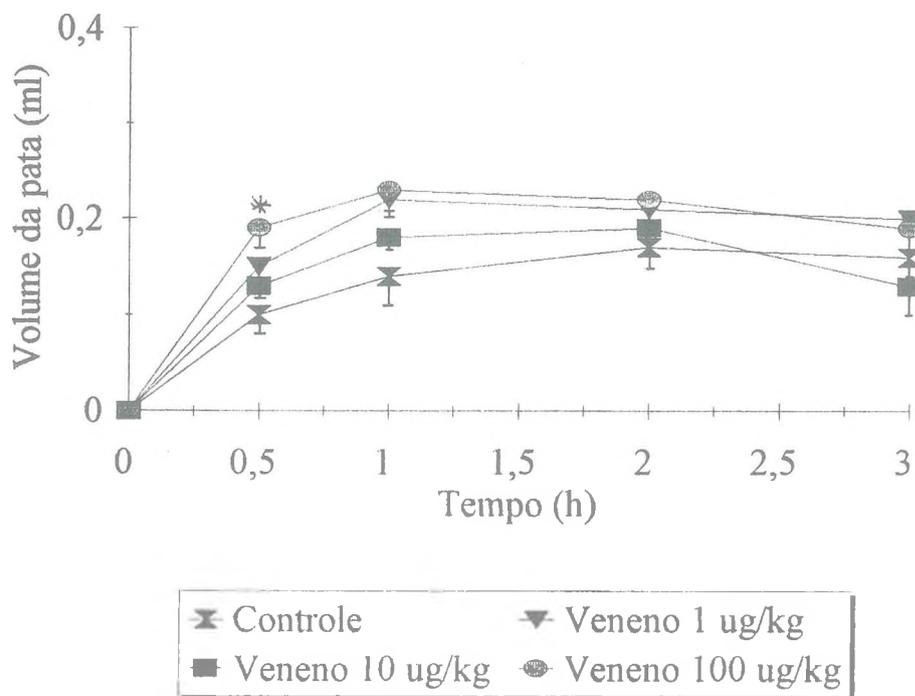


Figura 12. Efeito da fração (F12-30) do veneno de *Crotalus durissus cascavella* no edema de pata induzido por dextrano em camundongos

Os animais foram tratados com a fração do veneno 30 min antes da injeção do dextrano. O dextrano a 1,5% (50 μ l/pata), foi injetado s.c. na região dorsal da pata traseira dos animais e o edema, medido nos tempos 0,5, 1 2 e 3 h. Os números representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. Os valores do grupo tratado com veneno não diferem significativamente do controle.

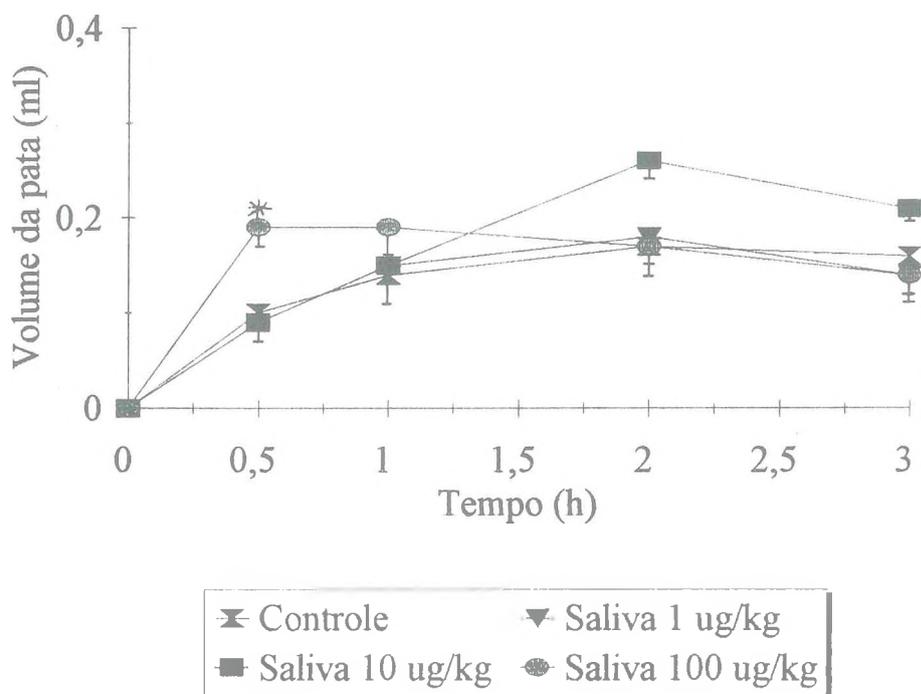


Figura 13. Efeito da fração (F12-23) de saliva de camundongo no edema de pata induzido por dextrano em camundongo.

Os animais foram tratados com a fração de saliva 30 min antes da injeção do dextrano. O dextrano a 1,5% (50 μ l/pata), foi injetado s.c. na região dorsal da pata traseira dos animais e o edema, medido nos tempos 0,5, 1, 2 e 3 h. Os números representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. Os valores do grupo tratado com saliva não diferem significativamente do controle.

12 DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELAS FRAÇÕES DE SALIVA DE CAMUNDONGO E DE VENENO DE *Crotalus durissus cascavella*

As figuras 14a e 15a mostram os mastócitos do mesentério de rato do grupo controle, onde se pode observar a ausência de degranulação, as figuras 14b e 15b mostram o padrão de degranulação dos mastócitos após o tratamento com as frações de saliva e de veneno, observa-se a grande quantidade de mastócitos degranulados. A fração de saliva nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ provocou a degranulação dos mastócitos de mesentério de rato de uma maneira dose dependente. Os valores em porcentagem de células degranuladas/campo foram, $36,6 \pm 6,0$; $43,6 \pm 4,6$; $82,8 \pm 3,1$ para as doses de 1,10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, o valor do grupo controle foi, $11,2 \pm 2,2\%$ células degranuladas/campo. O anticorpo anti-NGF bloqueou significativamente esta degranulação, o valor foi $37,7 \pm 5,1\%$ células degranuladas/campo. O valor encontrado para o composto 48/80, um conhecido degranulador de mastócitos, foi $79,3 \pm 2,8\%$ de células degranuladas/campo (Tabela 15).

A fração de veneno nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ também provocou a degranulação dos mastócitos significativamente ($p < 0,05$). Os valores foram, $25,2 \pm 3,9$; $62,7 \pm 6,8$; $86,3 \pm 3,8\%$ células degranuladas/campo, para as doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabela 16).

A figura 16 compara os efeitos obtidos pelas frações de saliva e de veneno na degranulação de mastócitos. Foi observado, que na dose de 10 $\mu\text{g/kg}$, a fração de veneno mostrou ser mais potente que a fração de saliva, com uma % de células degranuladas/campo de 62,7% para o veneno e de 43,6% para a saliva. Nas demais doses, 1 e 100 $\mu\text{g/kg}$, as frações mostraram potências que não diferem significativamente, se comparadas em termos de dose.

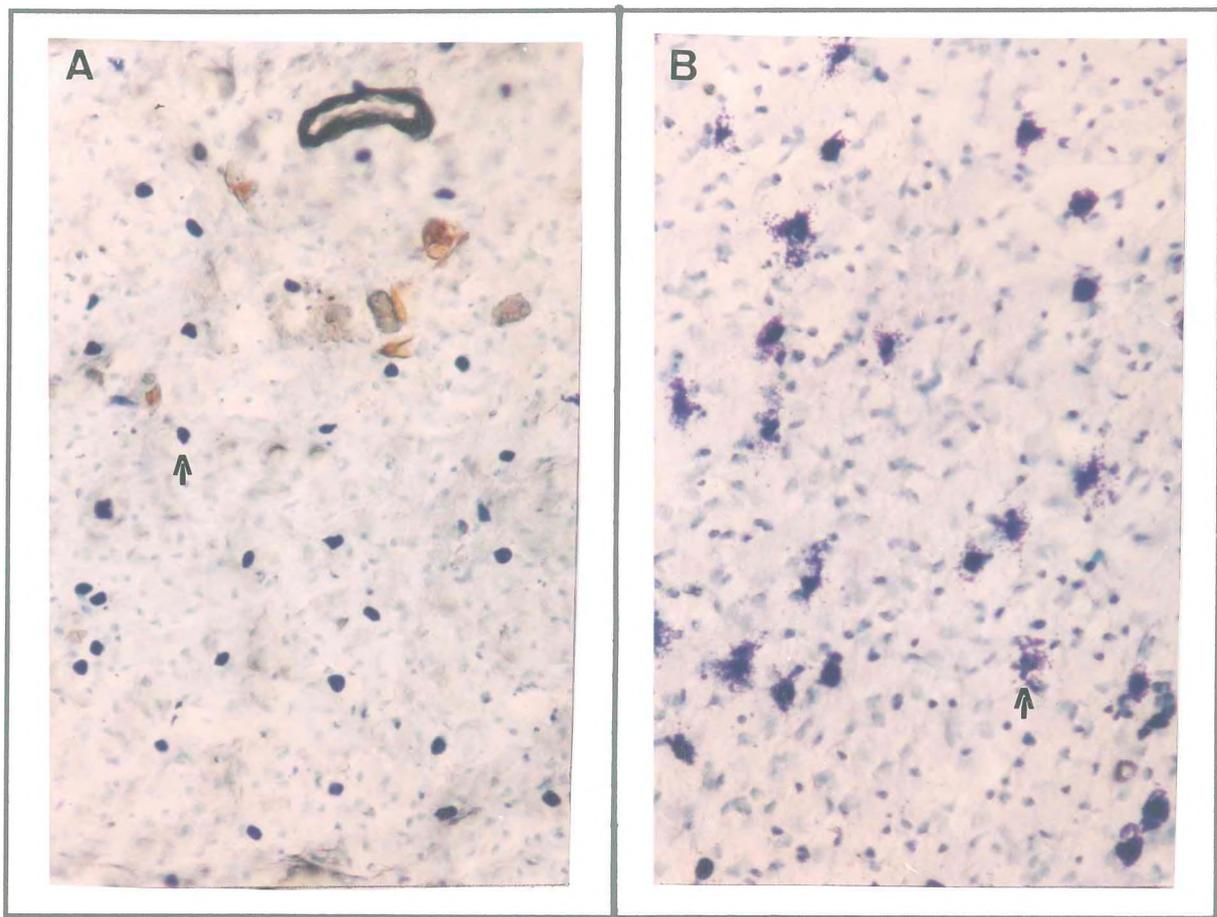


Figura 14. Padrão de degranulação de mastócitos mesentéricos de rato induzida pelas frações da saliva de camundongo e do veneno de *Crotalus durissus cascavella* (x 10)

A- Grupo controle, B- Grupo tratado com as frações.

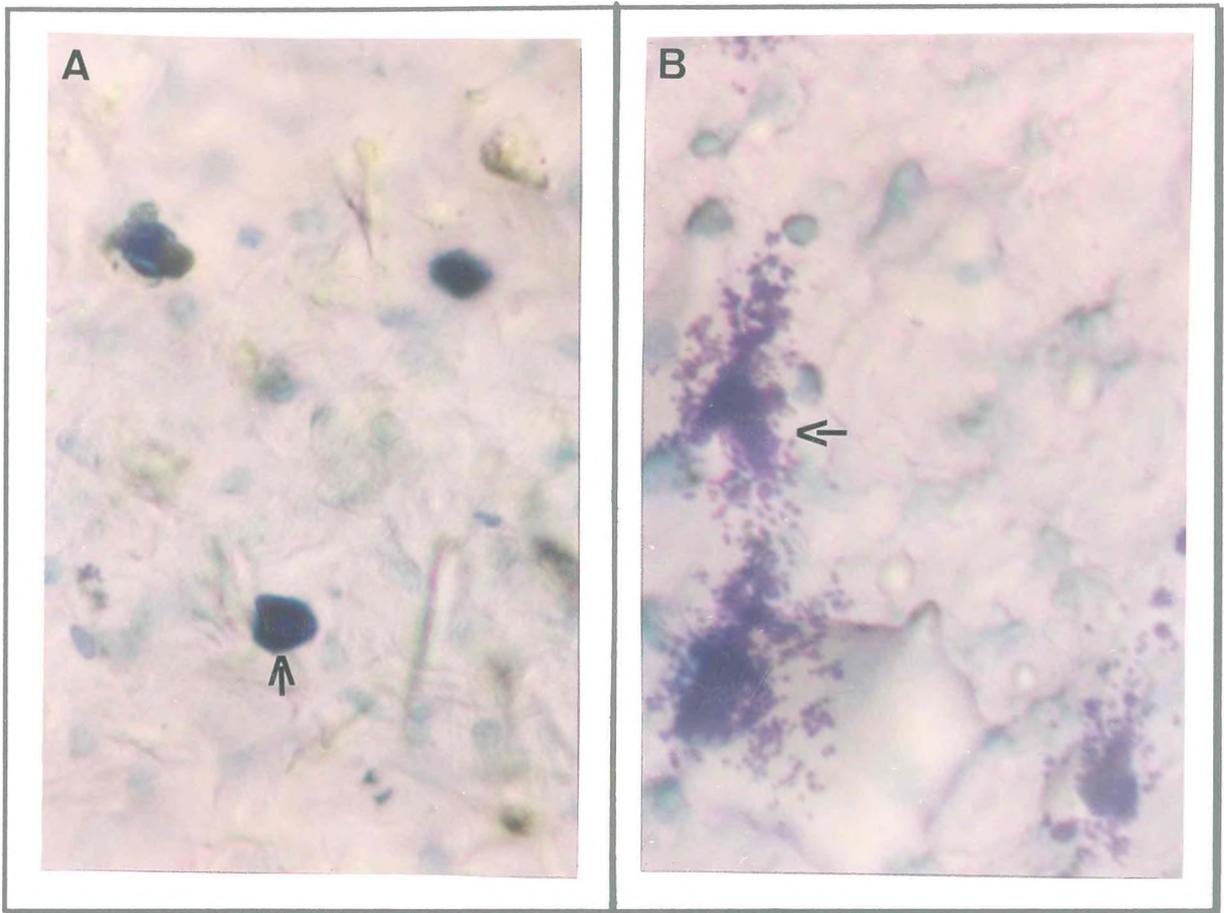


Figura 15. Padrão de degranulação de mastócitos mesentéricos de rato induzida pelas frações de saliva de camundongo e de veneno de *Crotalus durissus cascavella* (x 40)

A- Grupo controle, B- Grupo tratado com as frações

Tabela 15. Efeito da fração de saliva de camundongo na degranulação de mastócitos em mesentério de rato.

Grupo	Dose	Células degranuladas/campo (%)
Controle	-----	11,2 ± 2,2 (25)
Composto 48/80	0,8 µg/ml	79,3 ± 2,8 (30) *
F12-23	1 µg/ml	36,6 ± 6,0 (21) *
	10 µg/ml	43,6 ± 4,6 (34) *
	100 µg/ml	82,8 ± 3,1 (24) *
F12-23 +	100 µg/ml +	
Anticorpo anti-NGF	2 µl/ml	37,7 ± 5,1 (19) * #

As peças de mesentério foram incubadas 30 min com a fração de saliva. O anticorpo anti-NGF de saliva (1:8) foi pré-incubado junto com a fração de saliva (F12-23), 30 min antes da incubação com as peças de mesentério. O composto 48/80 foi usado como controle positivo de degranulação. Os números entre parênteses representam o número de campos contados. Os números representam média ± EPM da porcentagem de células degranuladas/campo. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação à F12-23 (100µg/kg), (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 16. Efeito da fração (F12-30) de veneno de *Crotalus durissus cascavella* na degranulação de mastócitos em mesentério de rato.

Grupo	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Células degranuladas/campo (%)
Controle	-----	11,2 \pm 2,2 (25)
Composto 48/80	0,8	79,3 \pm 2,8 (30) *
F12-30	1	25,2 \pm 3,9 (20) *
	10	62,7 \pm 6,8 (22) *
	100	86,3 \pm 3,8 (11) *

As peças de mesentério foram incubadas 30 min com a fração de veneno. O composto 48/80 foi usado como controle positivo de degranulação. Os números entre parêntesis representam o número de campos contados. Os números representam média \pm EPM da percentagem de células degranuladas/campo. * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste "t" de Student não pareado).

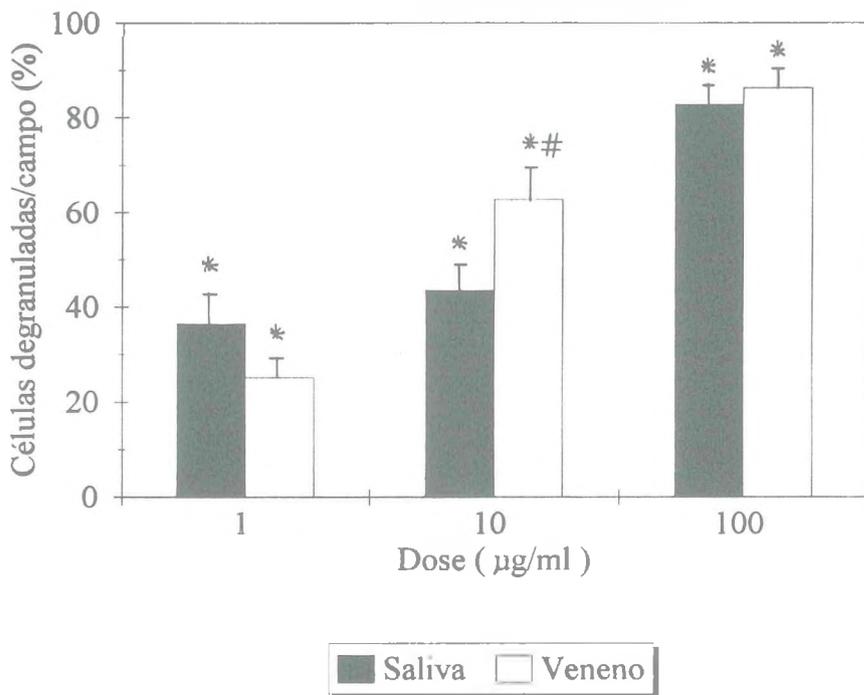


Figura 16. Efeito das frações de saliva (F12-23) de camundongo e de veneno (F12-30) de *Crotalus durissus cascavella* na degranulação de mastócitos em mesentério de rato.

As peças de mesentério foram incubadas 30 min com as frações. Os números representam média \pm EPM da percentagem de células degranuladas/campo. * $p < 0,05$ (em relação ao controle, # $p < 0.05$ em relação à saliva (10 $\mu\text{g/ml}$) (teste "t" de Student)

DISCUSSÃO

O fator de crescimento do nervo (NGF), uma proteína com a propriedade de promover o crescimento de nervos, foi isolado e purificado de vários tecidos e fluidos corporais, principalmente do veneno de serpentes e de glândulas submaxilares de camundongos (LEVI-MONTALCINI e COHEN; 1956, LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960; COHEN, 1960). Levi-Montalcini et al. (1954) desenvolveram um ensaio biológico para determinar a concentração de NGF de uma maneira semi-quantitativa, determinando a habilidade deste fator, para produzir o crescimento de fibras nervosas de gânglios sensoriais de embrião de pinto *in vitro*. O tratamento com o anticorpo anti-NGF, além de inibir o efeito deste crescimento *in vitro* (bioensaio inibitório), resulta em uma destruição completa da cadeia ganglionar simpática (imuno-simpatectomia), quando administrado a animais por via intracerebroventricular (LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960; LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1966). Evidências indicam que o NGF tem um papel fundamental na vida de células nervosas e também está envolvido no desenvolvimento e função de uma população de neurônios sensoriais peptidérgicos relacionados com a nocicepção e possivelmente com a inflamação.

Neste trabalho foi feito um estudo comparativo entre frações contendo NGF, isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella*, uma serpente nativa da caatinga nordestina e da saliva de camundongos machos, além da caracterização farmacológica dos resultados obtidos com a administração deste fator, em modelos experimentais de inflamação e dor.

A purificação total do NGF do veneno de serpentes por cromatografia em gel de Sephadex não é muito fácil, devido à baixa concentração deste fator, como também, devido à presença de glicoproteínas no veneno, substâncias conhecidas por serem capazes de ter um comportamento anômalo em filtração em gel e em cromatografia de troca iônica. O NGF de *Vipera russelli* mostra a propriedade de ser adsorvido em muitas superfícies. Por exemplo,

forte adsorção ocorre em vidro e vidro coberto por silicone ou polipropileno (PEARCE et al., 1972) e isto pode explicar a ocorrência de um retardo na passagem do NGF e consequente erro na determinação do peso molecular. A purificação da saliva do camundongo é mais fácil, devido a uma maior concentração do fator e à presença de poucas proteínas interferentes (VARON et al., 1967; BOCCHINI e ANGELETTI, 1969). A filtração em gel pode ser usada para estimar o peso molecular (PM) de proteínas, pois existe uma correlação entre o PM de proteínas globulares e seu comportamento em Sephadex ou coluna de agar-gel (ANDREWS, 1965).

Neste trabalho, conseguimos fracionar o veneno de *Crotalus durissus cascavella* e obter uma fração semi-purificada com peso molecular aproximado de 14,5-33 kD, peso este muito semelhante ao PM da subunidade β do NGF que é de aproximadamente 28 kD. A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS mostrou a presença de quatro bandas proteicas migrando na região de 16,9-36,3 kD. Existem algumas diferenças entre os NGFs das diferentes espécies de serpentes. O NGF mais bem estudado é o da *Naja naja*, nesta serpente, o NGF tem PM de 25-28 kD (ANGELETTI, 1970), já o veneno de *Vipera russelli* tem PM de 37 kD (PEARCE et al., 1972), o de *Agkistrodon piscivorus* PM de 20 kD (COHEN, 1959), o de *Crotalus adamanteus* PM de 20-40 kD (ANGELETTI, 1968b) e o de *Bothrops jararaca* PM de 25 kD (ANGELETTI, 1968a).

Na purificação da saliva do camundongo macho em Sephadex, foi encontrada uma proteína com PM de aproximadamente 25-45 kD, que revelou, na eletroforese em poliacrilamida com SDS, uma banda proteica na região de 18,2-21,4 kD. É muito provável que esta proteína seja o NGF, cuja presença já está comprovada em glândulas salivares de camundongo macho (BOCCHINI e ANGELETTI, 1969) em no mínimo duas formas de PM dependendo do método de purificação, uma desta forma sendo chamada de 2,5S NGF (β -NGF) referente ao seu coeficiente de sedimentação, um dímero com cerca de 26,5 kD (COHEN, 1960, ZANINI et al., 1973) e a outra forma conhecida como 7S NGF (VARON et al., 1968), uma grande molécula com um PM de 130-140 kD, composta das subunidades

α , β e γ . O NGF dímero é muito estável, tendo uma constante de dissociação menor que 10^{-13}M (BOTHWELL e SHOOTER, 1978). Nenhuma dissociação do NGF dímero em monômero foi detectada em filtração em gel do NGF nativo na concentração de 5 nM ou com ^{125}I -NGF em concentrações menores que 5 pM.

Os resultados apresentados na imunodifusão dupla radial demonstraram que um NGF imunologicamente reativo está presente na fração de saliva e na fração do veneno e que eles não são antigenicamente iguais, concordando com os dados constantes do trabalho de Angeletti (1971) que, em testes de imunodifusão mostrou que o anticorpo anti-NGF de camundongo não reagia com NGF de *C. adamanteus* e *B. jararaca*. Testes de fixação do complemento mostraram reação cruzada para o NGF de *N. naja* e *B. jararaca* quando testado com anti-NGF de camundongo e os estudos de radioimunoensaio confirmaram estas observações. Além disso, o anticorpo anti-NGF de camundongo inibiu *in vitro* a atividade biológica do NGF de *N. naja*, *C. adamanteus*, *B. jararaca* e *V. russelli*, em torno de 6,6, 12 e 12% respectivamente (ANGELETTI, 1969). Ao contrário, anticorpo anti-NGF de *N. naja* não revelou reação cruzada com o NGF de camundongo em ensaios de imunodifusão ou em testes de fixação do complemento. Entretanto, uma pequena reação cruzada em torno de 1% foi detectada pelo teste de bioensaio inibitório com anticorpo. Estes dados indicaram uma relação estrutural parcial entre o NGF de camundongo e o de veneno de serpentes (BAILEY et al., 1976).

Como já foi dito, o NGF pode ser isolado das glândulas submaxilares em duas formas, uma de alto peso molecular (7S NGF) contendo β -NGF e duas subunidades do NGF inativas e outra contendo só o β -NGF, em peso molecular de aprox. 30 kD sem carboidrato em sua molécula (BOCCHINI, 1970). O NGF do veneno de *V. russelli* tem um PM de 37 kD e é uma glicoproteína com 20% de carboidratos. Como em nosso trabalho foram encontrados duas linhas de precipitação na reação do anticorpo anti- β -NGF de saliva, com a saliva pura e também com a fração de saliva, é possível que isto seja devido à presença de pequena quantidade de anticorpos contra as subunidades inativas (α e γ -NGF).

Este fenômeno também poderia ter acontecido na reação do NGF do veneno, e das frações do veneno contra o anticorpo anti-veneno usado. Resultado similar foi encontrado por Wallace e Partlow (1976).

Embora os NGFs de saliva e de veneno tenham efeitos biológicos semelhantes, existem diferenças entre as cadeias polipeptídicas ativas dos NGF. O componente carboidrato dos antígenos glicoproteicos são conhecidos por serem capazes de contribuir ou determinar as propriedades imunológicas das moléculas (CLAUSEN, 1969). O que é surpreendente é que o NGF presente no soro de camundongo e de homem é, em termos do teste descrito acima, praticamente indistinguível do veneno de serpentes, porém não é tão parecido com o NGF da glândula salivar. A significância deste achado não está clara, mas é possível que o fator presente no soro seja uma glicoproteína como acontece com o NGF do veneno. Alguns autores (CARAMIA et al., 1962; HENDRY, 1972) têm sugerido que o NGF no soro de camundongo seja derivado diretamente da glândula submaxilar, assim sendo, a proteína seria modificada na secreção salivar de tal modo que suas propriedades antigênicas são alteradas. Esta modificação poderá ser o resultado da introdução de carboidrato à proteína sintetizada, de modo a promover o transporte da glicoproteína para o ambiente extracelular. Tal papel para o carboidrato das glicoproteínas já foi sugerido por Eylar (1965) cujos trabalhos demonstraram que a maioria das proteínas extracelulares, especialmente as proteínas séricas, contém carboidratos.

Os mastócitos são células envolvidas em muitos processos inflamatórios. Os mastócitos estão presentes em todos os tecidos do corpo, com exceção dos ossos e das cartilagens. Existe uma heterogeneidade muito grande entre os mastócitos de diferentes tecidos, particularmente ao nível de receptores e conteúdo de mediadores. Por exemplo, os mastócitos peritoneais de rato contêm uma quantidade muito maior de histamina que os mastócitos da mucosa intestinal, os mastócitos peritoneais de rato contêm heparina e os intestinais contêm pouca heparina e muito sulfato de condroitina, já os mastócitos humanos contêm os dois (METCALFE et al., 1980; ELIAKIM et al., 1986). Os mediadores

presentes nos mastócitos podem ser divididos em duas categorias (BEFUS et al., 1988), os pré-formados e estocados, que podem ser solúveis, como a histamina, serotonina (rato), proteinase II, exoglicosidades e fatores quimiotáticos ou insolúveis, como os proteoglicanos (heparina), proteinase I, carboxipeptidase, fatores inflamatórios, peroxidase e superóxido dismutase. E os mediadores que são sintetizados depois da ativação celular, entre eles, adenosina, leucotrienos, prostaglandinas, fator de ativação de plaquetas (PAF). É possível identificar os mastócitos pela presença de proteoglicanos aniônicos, pois estes ao serem corados com azul de toluidina dão ao grânulo uma coloração metacromática vermelha ou violeta.

Os anticorpos responsáveis pela reação de hipersensibilidade imediata (IgE), têm a capacidade de se ligar, através de receptores específicos, na superfície celular dos mastócitos e basófilos após reação com o antígeno. Entretanto, as características do receptor e os caminhos que levam à exocitose permanecem controversos (FROESE, 1984). Sabe-se que a degranulação mediada por IgE se caracteriza por uma série de eventos, incluindo a "ativação da célula", alargamento dos grânulos citoplasmáticos, solubilização granular e fusão da membrana dos grânulos adjacentes com a superfície da célula. Os condutos formados entre os grânulos e a membrana, permitem a comunicação dos grânulos com o espaço extracelular (ISHIZAKA e ISHIZAKA, 1984). A ativação celular consiste principalmente da ativação de uma pro-esterase, devido a uma perturbação da membrana, resultando no aparecimento de uma esterase quimiotripsina-símile ativada, que depende do cálcio para sua ativação (LEWIS, 1986; BOURNE et al, 1974).

Embora o fator principal para a degranulação e liberação de mediadores dos mastócitos e basófilos, seja a reação mediada por IgE, vários agentes químicos e neuropeptídeos são capazes de promover a degranulação diretamente. Entre eles, peptídeo intestinal vasoativo, substância P, neurotensina, polímero 48/80, dextrano, polimixina B, morfina, curare, as anafilotoxinas (C3a e C5a) e os ionóforos de cálcio, tais como o

A23184 (SHANAHAN et al., 1985; JOHNSON e ERDÖS, 1973; FOREMAN et al., 1982, MARKS e GREAVES, 1977; KAZIMIERCZAK et al., 1976; LEWIS, 1986).

As frações de veneno e de saliva isoladas no presente trabalho, mostraram que tem o poder de degranular mastócitos. Foi demonstrado que o NGF presente nestas frações foi o responsável por este efeito, já que o anticorpo anti-NGF inibiu esta ação significativamente. Já está comprovado (BRUNI, 1982) que o NGF do veneno e da glândula de camundongo libera histamina e que esta liberação pode ser aumentada pela lisofosfatidilserina (BRUNI et al., 1982). Com esta substância, o NGF em concentrações fisiológicas (1-10 ng/ml) pode aumentar a liberação de histamina em torno de 50% e esta liberação é dependente de cálcio extracelular e não resulta de danos na membrana celular, vez que foi observado (BRUNI et al., 1982) não existir atividade de lactato desidrogenase nas células em teste e que a 0°C não ocorre liberação. Mazurek (1986) também mostrou a ocorrência de degranulação (em torno de 67%) com concentrações de NGF em torno de $10^{-7}M$, sendo possível que os mastócitos tenham receptores específicos para o NGF, pois esta ação foi bloqueada pelo anticorpo anti-NGF. Esta degranulação é muito semelhante àquela induzida pelo 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), ambos causando exocitose sem afetar a concentração de cálcio intracelular. Mas apesar dos ésteres de forbol atuarem via proteína quinase C, parece improvável que a ação do NGF esteja ligada a esta proteína (MAZUREK, 1986). Bourne et al. (1974) mostraram que agentes que levam a um aumento no AMPc intracelular, como as catecolaminas, certas prostaglandinas, histamina, teofilina, inibem a degranulação dos mastócitos.

O extravazamento de proteínas pelos vasos é uma reação de defesa fisiológica da pele e das membranas mucosas contra traumas químicos e mecânicos. Mecanismos neuronais e não neuronais estão envolvidos no aumento da permeabilidade vascular (FOREMAN e JORDAN, 1984). O extravazamento plasmático mediado por neurônios pode ser prevenido por capsaicina, que afeta principalmente as fibras C primárias (JANCSÓ et al., 1967). A injeção do NGF de camundongo ou bovino, aumenta a permeabilidade

vascular de uma maneira dose dependente (OTTEN et al., 1985) e esta ação pode ser devida a um efeito direto nos vasos, pela estimulação dos neurônios sensoriais aferentes primários e subsequente liberação de mediadores ou devido a uma liberação local de substâncias mediadoras, tais como histamina. O tratamento com capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) resulta em uma redução no aumento da permeabilidade vascular promovida pelo NGF e é conhecido que esta substância causa uma intensa redução nos peptídeos contidos nos neurônios sensoriais primários, incluindo substância P (GAMSE et al., 1980) o principal mediador da inflamação neurogênica (isto é, vasodilatação e edema local) (LEMBECK, 1983; FOREMAN e JORDAN, 1984). Desta forma é possível que o aumento da permeabilidade vascular induzido pelo NGF seja principalmente neurogênico em origem. Entretanto, este aumento de permeabilidade foi inibido pelo pré-tratamento com antagonistas histaminérgicos (mepiramine e cimetidina), sugerindo um importante papel da histamina endógena nesta ação do NGF. Assim, o aumento da permeabilidade pelo NGF pode ser explicado por uma ação direta nos mastócitos levando à liberação de histamina (OTTEN et al., 1985).

Existem muitos mediadores químicos endógenos que podem explicar os sinais da inflamação aguda e é muito difícil determinar sua importância em diferentes reações e a possível sequência em que elas produzem seus efeitos. Evidências mostram que a histamina e a serotonina são as responsáveis pelas primeiras mudanças vasculares e depois, numa fase posterior, as respostas podem resultar da formação de bradicinina e por último a formação de prostaglandinas, leucotrienos e talvez a formação de compostos vasoativos derivados do complemento (C5a e C3a) (DI ROSA et al.,1971; DI ROSA e SORENTINO, 1970; WILLIS, 1969). Entretanto, existe uma certa variabilidade em diferentes tipos de inflamação e é possível que o C5a e o C3a possam ser gerados primeiro e serem responsáveis pela liberação de histamina (GIROUD e WILLOUGHBY, 1970).

Existem muitos modelos para a avaliação de drogas anti-inflamatórias, o mais usado é baseado na capacidade de drogas inibirem o edema produzido na pata de rato, pela injeção

de um agente flogístico. Os agentes mais usados são a carragenina, um polissacarídeo sulfatado, derivado da alga *Chondrus crispus* e o dextrano, um polímero da glicose, derivado da ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* sobre a sacarina. O edema de pata induzido pela carragenina é bifásico consistindo de uma fase rápida, detectada em torno de uma hora, resultante da liberação de histamina e serotonina e uma fase tardia, resultante da liberação de bradicinina e prostaglandinas, que aparecem após duas e tres horas respectivamente (VINEGAR et al., 1969; DI ROSA et al., 1971; HALSAPPLE et al., 1980). Já o edema induzido pelo dextrano resulta principalmente da liberação de histamina e serotonina e tem um pico máximo de edema em torno de duas horas (DI ROSA e WILLOUGHBY,1971).

No presente trabalho foi demonstrado que as frações do veneno e da saliva possuem uma atividade anti-edematogênica no modelo de inflamação induzida pela carragenina, com uma ação efetiva quatro horas após o estímulo edematogênico. Curiosamente, as frações induziram o edema após meia hora do estímulo e não apresentaram nenhuma atividade no edema de pata provocado por dextrano, o que pode ser explicado por uma estimulação inicial da liberação de histamina. Porém, apesar de já ter sido demonstrado que o NGF libera histamina dos mastócitos, alguns pesquisadores apontam para uma potente ação antiinflamatória deste fator. Amico-Roxas et al.(1989) mostraram que o NGF inibe o efeito do aumento da permeabilidade vascular em alguns tipos de inflamação aguda, isto é, peritonite por ácido acético e edema de pata induzido por carragenina, serotonina e dextrano. Esta atividade foi observada em doses variando entre 1-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c., contudo, uma redução no efeito antiinflamatório foi observado em doses maiores. Estes resultados confirmam as observações de Banks et al. (1984), que mostraram uma ação antiinflamatória no edema induzido por carragenina, mais potente que dexametasona e indometacina, sendo possível que esta ação seja diferente das drogas antiinflamatórias esteróides e não esteróides. E como o NGF só tem ação em alguns tipos de inflamação aguda (não tem efeito por

exemplo nos modelos de pleurisia), esta ação pode ser devida a uma redução da permeabilidade vascular.

A produção de superóxidos e outros radicais livres podem ter algum papel nas mudanças vasculares durante as reações inflamatórias (DEL MAESTRO et al., 1981), porém, Amico-Roxas et al. (1989) mostraram que o NGF não tem efeito na peroxidação lipídica em modelos de fígado de rato.

Já está bem conhecido que diferentes proteínas inflamatórias são produzidas endogenamente em resposta à injúria (McARTHUR et al., 1972; SAEED et al., 1977; BONTA, 1978). Atualmente duas famílias de proteínas antiinflamatórias são induzidas por glicocorticóides, uma, de glicoproteínas inibitória da fosfolipase A₂, a lipocortina (FLOWER e BLACKWELL, 1979; HIRATA et al., 1980; CLOIX et al., 1983; DI ROSA et al., 1984), que são especialmente associadas com os efeitos inibitórios dos estéróides na liberação do ácido araquidônico e nos processos inflamatórios quimiotáticos (BLACKWELL et al., 1982; MIYASAKA e MIKAMI, 1982) e uma proteína até agora não bem caracterizada, antigamente chamada proteína X (OYANAGUI, 1981) e atualmente denominada vasorregulina (OYANAGUI e SUSUKI, 1985) ou vasocortina (CARNUCCIO et al., 1987). Diferente da lipocortina, a vasocortina é capaz de inibir o edema de pata induzido por serotonina, histamina, bradicinina e dextrano (TSURUFUGI et al., 1979; OYANAGUI, 1981; OYANAGUI e SUSUKI, 1985; CARNUCCIO et al., 1987), provavelmente através de uma inibição da liberação e ou atividade destes autacóides (CARNUCCIO et al., 1987).

Em vista dos nossos resultados, não é fácil explicar o mecanismo de ação antiinflamatória das frações isoladas, mas é possível que esta ação envolva uma inibição da permeabilidade vascular mediada pelo NGF e o efeito antiinflamatório natural deste fator manifestado nos processos inflamatórios do organismo.

Na inflamação as células não neuronais produzem uma variedade de mediadores químicos que agem nos neurônios nociceptivos. A descarga destes neurônios é controlada pela atividade de canais iônicos na membrana. Alguns mediadores químicos (por exemplo,

ATP, prótons, serotonina) agem nos receptores que são ligados diretamente a canais iônicos (KRISHTAL e PIDOPLICHKO, 1980; KRISHTAL et al., 1988; PETERS e LAMBERT, 1989). Outros, como a bradicinina, agem indiretamente, através de receptores de membrana ligado a sistemas de segundos mensageiros e por este caminho, modulam a atividade dos canais iônicos e assim, ativam ou sensibilizam os neurônios (BURGESS et al., 1989; THAYER et al., 1988). Os eicosanóides (PGE_2 , PGD_2 e PGI_2) que são produzidos por muitas células, têm um papel importante intra e inter-celular na nocicepção (FERREIRA et al., 1990). As interações entre células neuronais e não neuronais são complexas e já está demonstrado, que alguns tipos de células não neuronais tem receptores para neuropeptídios sensoriais (substância P) (LOTZ et al., 1988). Recentes estudos também sugerem que as citocinas (FOLLENFANT et al., 1990; FERREIRA et al., 1988) e os fatores de crescimento podem ter efeitos na função dos neurônios nociceptivos (WINTER et al., 1988; LINDHOLM ET AL., 1987).

Os modelos de nocicepção química mais usados para se investigar a atividade analgésica são os testes das contorções abdominais pelo ácido acético e o teste da formalina. O teste das contorções pelo ácido é baseado na aplicação de um estímulo de alta intensidade e a resposta nociceptiva é de curta duração. A desvantagem deste modelo é ser inespecífico, com a resposta sendo bloqueada por muitas classes de drogas, tais como, anti-histamínicos, hipotensores, estimulantes e depressores do SNC (HENDERSHOT e FORSAITH, 1959). Os prótons tem um efeito excitatório em muitos neurônios, produzindo uma breve despolarização que se inativa dentro de poucos segundos (KRISHTAL e PIDOPLICHKO, 1980). Em alguns neurônios sensoriais, entretanto, esta resposta é seguida por uma despolarização que é mantida, associada com um aumento na condutância iônica (BEVAN e YEATS, 1991). Estes neurônios também são sensíveis à capsaicina, o que indica que eles também são nociceptivos. As respostas a prótons e à capsaicina mostram muitas similaridades, o que aumenta a possibilidade de que o H^+ seja o ativador endógeno de um canal de membrana associado com o receptor da capsaicina (BEVAN e YEATS, 1991).

O teste da formalina é considerado um dos modelos mais válidos para se estudar processos dolorosos observados na prática médica. O teste permite monitorar a resposta do animal a uma dor moderada e contínua gerada pelo tecido injuriado e permite conhecer o papel de sistemas endógenos de regulação da dor (TJOLSEN et al., 1992). A injeção de formalina produz um aumento bifásico na concentração de substância P no cordão espinhal (McCARSON e GOLDSTEIN, 1990). O aumento inicial observado nos primeiros 10 minutos parece ser o resultado da ativação direta dos nociceptores periféricos, enquanto que o decréscimo após este tempo pode ser devido a uma inativação desta proteína pela formalina. O segundo aumento com 60 minutos por sua vez, pode ser devido a um subsequente recrutamento de células inflamatórias, pelos neurônios aferentes primários adjacentes.

Como foi demonstrado no presente trabalho, as frações do veneno e da saliva mostraram um efeito inibitório significativo a estímulos químicos (teste da formalina e do ácido acético), mas não a estímulos térmicos (teste da placa quente e da retirada da cauda da água quente), sugerindo uma analgesia predominantemente periférica. É possível que a proteína responsável por esta analgesia seja o NGF e por ter características de molécula básica (ponto isoelétrico 9), não consiga atravessar a barreira hematoencefálica devido a polaridade. Alternativamente, é possível também que o NGF esteja em concentrações tão pequenas na fração e não consiga atingir o sistema nervoso central em concentrações suficientes para exercer efeito farmacológico significativo. Seriam necessários, então, estudos utilizando as frações administradas por via intracerebroventricular, permitindo deste modo a detecção de um possível efeito central.

Por outro lado, o fato do efeito antinociceptivo não ter sido influenciado pelo antagonista opióide naloxone, indica o não envolvimento de opióides endógenos nesta ação

Está claro que os neurônios nociceptivos tem interações complexas com outros tipos de células que são de importância crítica na inflamação e hiperalgesia. Uma variedade de agentes produzidos a partir de tecidos danificados ou por células inflamatórias ativam ou

sensibilizam estes nervos. A substância P induz muitos dos eventos associados com a inflamação neurogênica causando mudança no calibre vascular e na permeabilidade, que são potenciados pelas aminas (histamina e serotonina) liberada dos mastócitos. Esta substância libera um fator relaxante do endotélio vascular (NO) e estimula a liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF) e ácido araquidônico (LOTZ et al., 1988). A sensibilização ou a ativação dos nervos terminais pela liberação de mediadores inflamatórios, provavelmente, leva a liberação de substância P, formando um " feedback " positivo entre os neurônios sensoriais e as células envolvidas no processo inflamatório.

Entre os compostos importantes para os neurônios sensoriais estão os fatores de crescimento, entre eles o NGF. Weskamp e Ottem (1987) mostraram que a produção de NGF está elevada em tecidos inflamados (por exemplo, no exsudato pleural após injeção de carragenina). O NGF estimula a síntese de substância P, CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e o receptor da capsaicina, nos neurônios sensoriais (LINDSAY et al., 1989, WINTER et al., 1988). A capsaicina é um composto algogênico (BEVAN e SZOLCSANYI, 1990) que, aplicado localmente na pele ou nas membranas mucosas, ativa as fibras C dos neurônios aferentes, produzindo uma breve dor, sensação de queimação e uma longa hiperalgesia. Ela ativa os nociceptores por abrir os canais permeáveis a cátions (sódio e cálcio) (WOOD et al., 1988), com o influxo de íons, despolarizando os neurônios. O influxo de cálcio nos neurônios e o seu aumento intracelular, por sua vez, inibem a condutância do canal de cálcio voltagem dependente. A ação inibitória da capsaicina no canal de cálcio voltagem dependente, inibe a liberação de transmissores e isto pode ser relevante para os efeitos antinociceptivos agudos e antiinflamatórios da capsaicina. Esta substância também pode iniciar mudanças nos níveis de segundos mensageiros (GMP_c , diacilglicerol, inositol trifosfato e ácido araquidônico) nos neurônios sensoriais (BURGESS et al., 1989, WOOD et al., 1989).

Níveis elevados de NGF podem levar a um aumento da síntese e liberação de peptídios *in vivo*, que podem ser compatíveis com os achados de níveis elevados de substância P em tecidos inflamados. Os níveis teciduais de NGF podem também ser regulados por peptídios liberados dos neurônios sensoriais. A substância P pode ativar macrófagos para liberar interleucina-1 (HARTUNG e TOYKA, 1983), que agindo em células como os fibroblastos e células de Schwann, estimula a produção de NGF (LINDHOLM et al., 1987). A interrelação entre a liberação de substância P e a produção de NGF poderá ser importante para alguns dos eventos associados com a inflamação e sensibilização neuronal.

Já está demonstrado por Lewin et al. (1993) que o NGF administrado em excesso (1 $\mu\text{g/g}$, s.c. por 14 dias) pode causar uma profunda hiperalgesia após seis horas da injeção em ratos. Em animais recém-nascidos, o tratamento pode resultar em uma hiperalgesia mecânica persistente até a idade adulta. A hiperalgesia mecânica é observada quase sempre na inflamação ou lesão dos nervos e foi postulada ser devido primariamente a mudanças nos processamentos da informação da dor vinda dos impulsos sensoriais, a nível central (HARDY et al., 1950; McMAHON e WALL, 1984). Esta hiperalgesia pode ser explicada por uma sensibilização do NGF nas fibras nociceptivas A δ . Em animais adultos a hiperalgesia mecânica começa 24 horas após a injeção, também sendo acompanhada de hiperalgesia ao calor e não parece envolver sensibilização de fibras A δ e sim um receptor de alta afinidade localizado nos neurônios sensoriais periféricos (DAVIES et al., 1987). Também foi mostrado que o NGF injetado diretamente na pata, não modifica o limiar para a dor e não foram observadas mudanças no limiar agudo para a dor mecânica usando o teste de Randall-Sellito (TAIWO et al., 1991), que é mais sensível para pequenas mudanças no limiar.

É conhecido que receptores de alta afinidade para o NGF estão presentes nos mastócitos e sua ativação pode levar à degranulação (MAZUREK et al., 1986). Assim, a

presença de altas concentrações de NGF pode levar à liberação de substâncias que podem sensibilizar os neurônios aferentes primários ao calor.

Assim, não está inteiramente claro se o NGF regula a função nociceptiva através de mecanismos outros além daqueles que promovem o crescimento celular durante o desenvolvimento. É possível portanto, que o tratamento agudo com o NGF em doses únicas (1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) produza efeitos antinociceptivos e em doses maiores e administrado cronicamente (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, durante algumas semanas) cause efeito oposto, funcionando assim como uma proteína moduladora no controle da dor.

Os experimentos em animais que foram pré-tratados com capsaicina também mostraram que para o desenvolvimento de algumas respostas inflamatórias, os nervos terminais nociceptores devem estar intactos. Os animais dessensibilizados são insensíveis a todos as substâncias algogênicas químicas mas, ao mesmo tempo, eles respondem facilmente à dor física e aos estímulos tácteis (JANCSÓ, 1960,). Por meio de registros de potenciais de ação de nervos sensoriais, foi mostrado que o efeito de dessensibilização é causado por uma lesão ao nível dos receptores da dor (PÓRSZÁSZ e JANCSÓ, 1959). Green e Tregear (1964) mostraram que, após aplicações repetidas de capsaicina, os potenciais de ação evocados por diferentes irritantes são bloqueados, sem causar mudanças na resposta ao frio ou aos estímulos mecânicos.

Através do bloqueio dos nociceptores terminais, os efeitos inflamatórios do óleo de mostarda, xileno, capsaicina, acil amidas, podem ser completamente inibidos (JANCSÓ, 1967). Estas substâncias também produzem dor intensa quando administradas em ratos. Os agentes que induzem edema e que agem pela liberação de substâncias vasoativas sem causar dor, como o dextrano por exemplo e também substâncias com uma ação direta vascular (histamina e serotonina), não exercem seus efeitos em ratos dessensibilizados. E o aumento da permeabilidade destes agentes não muda após a denervação. A dessensibilização pela capsaicina vai inibir os efeitos somente das substâncias que exercem suas ações pela via neurogênica.

É possível que a ação analgésica das frações de veneno e de saliva e possivelmente o NGF nela contido, seja devido a um efeito hiperpolarizante na membrana. Estudos mostram (SKAPER e VARON, 1979b) que o NGF aumenta a extrusão de sódio em gânglios da raiz dorsal *in vitro*. A extrusão de sódio por hormônios ou outros fatores reguladores já foi mostrada, é conhecido que a insulina faz isso em músculo esquelético de sapo, possivelmente através de mecanismos envolvente a bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (GRINSTEIN e ERLIJ, 1974). Não podemos esquecer que muitos segundos mensageiros são modulados pelo NGF. Schubert e Whitlock (1977) mostraram que o NGF pode estar envolvido no aumento do AMPc. Também foi demonstrada a produção de IP_3 dentro de segundos após a exposição de células neuronais ao NGF e isto pode ser responsável por um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular (PANDIELLA-ALONSO et al., 1986). Assim, não é fácil explicar a ação analgésica e antiinflamatória do NGF, já que nestas ações podem estar envolvidos vários mecanismos.

Estudos mais profundos terão que ser feitos, a nível de eletrofisiologia, de canais de cálcio e também a nível de segundos mensageiros, para podermos comprovar o mecanismo de ação através do qual as frações e provavelmente o NGF nela contido produzem seus efeitos.

A história do NGF pode ser definida como uma longa sequência de eventos imprevisíveis. Ela começou com a descoberta deste fator 35 anos atrás, por Rita Levi-Montalcini. A principal causa desta imprevisibilidade reside muito mais nos caminhos intrincados percorridos pelo NGF, tais como o SNC e o sistema imune, do que no próprio NGF. A enorme complexidade destes dois caminhos, que em vista de recentes achados estão inter-relacionados e influenciam um ao outro, através de sinais bidirecionados, abrem intermináveis possibilidades para a ativação pelo NGF de diferentes tipos de células pertencentes a um ou ao outro sistema. Quantos efeitos indiretos podem ser conseguidos pelas ações diretas do NGF nos neurônios colinérgicos, adrenérgicos e peptidérgicos

interligados via fibras e canais humorais ou através de difusão à curta distância? Quantos efeitos podem se seguir a simples liberação de histamina pelo NGF através da ativação de mastócitos, considerando o conhecido papel desta amina, como imunomodulador e imunossupressor? Estes conhecimentos levam a utilização do NGF em desordens do cérebro e do sistema imune. Por exemplo, sempre que uma célula ou população neuronal específica morre devido a um decréscimo na disponibilidade de fatores neurotróficos tais como o NGF, seu suprimento exógeno ou a estimulação de sua produção endógena via agentes farmacológicos, pode oferecer um promissor tratamento para as doenças neurodegenerativas crônicas das quais a doença de Alzheimer é um excelente exemplo.

Muitos estudos têm mostrado que neurônios colinérgicos do prosencéfalo sofrem profundas alterações degenerativas na doença de Alzheimer. Entre as características prevalentes da DA está o declínio da função colinérgica na formação hipocampal e circuitos basalocorticais. Finalmente a possibilidade de que o NGF possa vir a ser tratamento potencial na DA baseia-se na eficácia do NGF em atenuar as lesões induzidas por deficits colinérgicos e as alterações cognitivas em modelos experimentais. A diminuição de marcadores colinérgicos em tecido hipocampal na DA é semelhante aquela observada após lesão experimental do circuito septo-hipocampal quais sejam, diminuição da atividade da ChAT e dos níveis de Ach. Portanto, a maioria dos estudos farmacológicos utilizando NGF, sugere que o tratamento de pacientes com DA com NGF poderá ser eficaz em aumentar a capacidade funcional dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo ao longo dos seus terminais no hipocampo e córtex cerebral, melhorando assim os deficits cognitivos associados com a diminuição de função colinérgica naquelas estruturas cerebrais.

CONCLUSÕES

- 1- As frações da saliva e do veneno obtidas na cromatografia em gel de Sephadex G-100, tem um peso molecular aproximado de 25-45 e 14,5-33 kD respectivamente.
2. A imunodifusão dupla radial mostrou uma grande identidade antigênica entre as frações obtidas da saliva e do veneno e o fator de crescimento do nervo (NGF).
3. O NGF contido nas duas frações estudadas, causou degranulação de mastócitos de mesentério de rato, com uma potência similar em doses altas.
4. As frações exibiram um efeito anti-edematogênico no edema de pata induzido por carragenina. No edema causado por dextrano, as frações não mostraram atividade significativa.
5. As frações e provavelmente o NGF nela contido, mostraram uma ação antinociceptiva a estímulos químicos mas não a estímulos térmicos, ação esta, que não foi bloqueada pelo antagonista opióide naloxone, sugerindo o não envolvimento de opióides endógenos neste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, A., VOGL, W., HUTTNER, W. B., THOENEN, H. Methyltransferase inhibitors block NGF-regulated survival and protein phosphorylation in sympathetic neurons. **EMBO J.**, v. 5, p. 2799-803, 1986.
- ALEMÀ, S., CASALBORE, P., AGOSTINI, E., TATÒ, F. Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by *v-src* oncogene. **Nature**, v. 316, p. 557-59, 1985.
- ALOE, L., LEVI-MONTALCINI, R. Mast cell increase in tissue of neonatal rats injected with nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 133, p. 358-66, 1977.
- ALOE, L., LEVI-MONTALCINI, R. Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effects of antiserum to nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 1246-50, 1979.
- AMICO-ROXAS, M., CARUSO, A., LEONE, M.G., SCIFO, R., VANELLA, A., SCAPAGNINI, U. Nerve growth factor inhibits some acute experimental inflammations. **Arch. int. Pharmacodyn.**, v. 299, p. 269-85, 1989.
- ANDRES, R.Y., JENG, I., BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor receptors: Identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 2785-89, 1977.
- ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochem. J.** v. 96, p. 595-606, 1965.
- ANDREWS, P. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. **Methods Biochem. Anal.**, v. 18, p. 1-53, 1970.
- ANGELETTI, R.H. Studies on the nerve growth factor (NGF) from snake venom. Gel filtration patterns of crude venoms. **J. Chromatog.**, v. 36, p. 535-37, 1968a.
- ANGELETTI, R.H. Studies on the nerve growth factor (NGF) from snake venom. Molecular heterogeneity. **J. Chromatog.**, v. 37, p. 622-69, 1968b.

- ANGELETTI, R.H. Nerve growth factor from snake venom and mouse submaxillary gland: interaction with serum proteins. **Brain Res.**, v. 12, p. 234-37, 1969.
- ANGELETTI, R.H. Nerve growth factor from cobra venom. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 65, p. 668-74, 1970.
- ANGELETTI, R.H. Immunological relatedness of nerve growth factors. **Brain Res.**, v. 25, p. 424-27, 1971.
- ANGELETTI, R.H., BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 68, p. 2417-20, 1971.
- ANGELETTI, R.H., BRADSHAW, R.A., WADE, R.D. Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor. **Biochemistry**, v. 10, p. 463-69, 1971.
- APPEL, S.H. A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism and Alzheimer disease. **Ann. Neurol.**, v. 10, p. 499-505, 1981.
- ARENDET, T., BIGI, A., TENNSTEDT, A., ARENDT, A. Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v. 48, p. 81-5, 1984.
- BAILEY, G. S., BANKO, B. E. C., CARSTAIRS, J. R., EDWAEDS, D. C. PEARCE, F.L., VERNON, A. Immunological properties of nerve growth factor. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 437, p. 259-63, 1976.
- BANKS, B.E.C., BANTHORPE, D.V., CHARLWOOD, K.A., PEARCE, F.L., VERNON, C.A., EDWARDS, D.C. Distribution and immunology of mammalian nerve growth factor. **Nature (London)**, V. 246, p. 503-4, 1973.
- BANKS, B.E.C., VERNON, C.A., WARNER, J.A. Nerve growth factor has anti-inflammatory activity in the rat hindpaw oedema test. **Neurosci. Lett.**, v. 47, p. 41-5, 1984.
- BARTUS, R.T., DEAN, R.L., BEER, B., LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, p. 408-17, 1982.

- BEFUS, D., FUJIMAKI, H., LEE, T. D. G., SWIETER, M. Mast cell polymorphisms, presents concepts, future directions. **Digestive Diseases and Science**, v. 33, n. 3 (supplement), p. 16-24, 1988.
- BEJCEK, B.E., LI, D.Y., DEUEL, T.F. Transformation by *v-sis* occurs by internal autoactivation mechanism. **Science**, v. 245, p. 1496-99, 1989.
- BERGER, E.A., SHOORTER, E.M. The biosynthesis of β nerve growth factor in mouse submaxillary gland. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 804-10, 1978.
- BEVAN, S., SZOLCSANYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 330-33, 1990.
- BEVAN, S., YEATS, J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. **J. Physiol.**, v. 433, p. 145-61, 1991.
- BLACK, M.M., ALETTA, J.M., GREENE, L.A. Regulation of MT composition and stability during NGF-promoted neurite outgrowth. **J. Cell. Biol.**, v. 103, p. 545-57, 1986.
- BLACKWELL, G. J., CARNUCCIO, R., DI ROSA, M., FLOWER, R. J., LANGHAM, C. S. J., PARENTE, L., PERSICO, P., RUSSELL-SMITH, N. C., STONE, D. Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. **Br. J. Pharmac.**, v. 76, p. 185-94, 1982.
- BLENIS, J., ERIKSON, R.L. Regulation of protein kinase activities in PC12 pheochromocytoma cells. **EMBO J.**, v. 5, p. 3441-47, 1986.
- BOCCHINI, V. The nerve growth factor, amino acid composition and physicochemical properties. **Eur. J. Biochem.**, v. 15, p. 127-31, 1970.
- BOCCHINI, V., ANGELETTI, P.U. The nerve growth factor: Purification as a 30,000-Molecular-weight protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 64, p. 787-94, 1969.
- BONTA, I. L. Endogenous modulators of the inflammatory response. In: VANE, J. R., FERREIRA, S. J. **Inflammation**. Berlin: Springer-Verlag, 1978, p. 523-67.

- BOONSTRA, J., MOOLENAR, W.H., HARRISON, P.H., MOED, P., VAN DER SAAG, P.T., DE LAAT, S.W. Ionic response and growth stimulation induced by nerve growth factor and epidermal growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells. **J. Cell. Biol.**, v. 97, p. 92-8, 1983.
- BOTHWELL, M. A., SHOOTER, E. M. Thermodynamics of the interaction of the subunits of 7S nerve growth factor. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 8458-64, 1978.
- BOURNE, H. R., LICHTENSTEIN, L. M., MELMON, K. L., HENNEY, C. S., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G. M. Modulation of inflammation regulate many leukocyte functions. **Science**, v. 184, p. 19-27, 1974.
- BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 47, p. 191-216, 1978.
- BRUNI, A., BIGON, E. BORATO, E., MIETTO, L., LEON, A., TOFFANO, G. Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cell. **FEBS Lett.**, v. 138, p. 190-2, 1982.
- BRUNSO-BECHTOLD, J.K., HAMBURGER, V. Retrograde transport of nerve growth factor in chicken embryo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 1494-96, 1979
- BUEKER, E.D., SCHENKEIN, I., BANE, J.L. The problem of a nerve growth factor specific for spinal and sympathetic ganglia. **Cancer Res.**, v. 20, p. 1220-28, 1960.
- BURDMAN, J.A., GOLDSTEIN, M.N. Long-term tissue culture of neuroblastomas III. In-vitro studies of a nerve growth stimulating factor in sera of children with neuroblastoma. **J. Cancer Inst.**, v. 33, p. 123-33, 1964.
- BURDMAN, J.A., GOLDSTEIN, M.N. Synthesis and storage of a nerve growth protein in mouse submandibular glands. **J. Exptl. Zool.**, v. 160, p. 183-88, 1965.
- BURGES, G. M., MULLANEY, I., McNEILL, M., COOTE, P. R. MINHAS, A., WOOD, J. N. Activation of guanylate cyclase in rat sensory neurons is mediated by calcium influx: possible role of the increase in cGMP. **J. Neurochem.**, v. 53, p. 1212-18, 1989.

- BURSTEIN, D.E., GREENE, L.A. Evidence for both RNA-synthesis-dependent and independent pathways in stimulation of neurite outgrowth by nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 75, p. 6059-63, 1978.
- BURSTEIN, D.E., SEELEY, P.J., GREENE, L.A. Lithium ions inhibit nerve growth factor-induced neurite outgrowth and phosphorylation of nerve-growth factor-modulated microtubule-associated proteins. **J. Cell Biol.**, v. 101, p. 862-70, 1985.
- CALISSANO, P., SHELANSKI, M.L. Interaction of NGF with pheochromocytoma cells: evidence for tight binding and sequestration. **Neuroscience**, v. 5, p. 1033-39, 1980.
- CAMPENOT, R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 4516-19, 1977.
- CAPASSO, F., DUNN, C.J., YAMAMATO, S., WILLOUGHBY, D.A., GIROUD, J.P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **J. Pathol.**, v. 116, p. 117-25, 1975.
- CARAMIA, F., ANGELETTI, P.U., LEVI-MONTALCINI, R. Experimental analysis of the mouse submaxillary salivary gland in relationship to its nerve growth factor content. **Endocrinology**, v. 70, p. 915-22, 1962.
- CARNUCCIO, R., DI ROSA, M., GUERRASIO, B., IUVONE, T., SAUTEBIN, L. Vasocortin: a novel glucocorticoid-induced anti-inflammatory protein. **Br. J. Pharmacol.**, v. 90, p. 443-45, 1987.
- CASALBORE, P., AGOSTINI, E., TATÒ, F., ALEMÀ, S. Expression of the *v-src* oncogene induces differentiation in PC12 cells. In: LEVI-MONTALCINI, R., CALISSANO, P. **Molecular Aspects of Neurobiology**, Berlin: Springer-Verlag, 1986, p. 37-39.
- CATTANEO, A., BIOCCA, S., NASI, S., CALISSANO, P. Hidden receptors for nerve growth factor in PC12 cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 135, p. 285-90, 1983.
- CLAUSEN, J. In: **Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biology**, Part III, ed by Work, T. S., London, 1969, p. 418.

- CLOIX, J. F., COLARD, O., ROTHUT, B., RUSSO-MARIE, F. Characterization and partial purification of "renocortins": two polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase-like action of glucocorticoids. **J. Pharmac.**, v. 79, p. 313-21, 1983
- COHEN, S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 234, p. 1129-37, 1959.
- COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 46, p. 302-11, 1960.
- COHEN, S., LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 42, p. 571-74, 1956.
- CONNOLLY, J.L., GREENE, L.A., VISCARELLO, R.R. Rapid sequential surface changes of PC12 pheochromocytoma cells in response to nerve growth factor **Fed. Proc.**, v. 38, p. 1430-37, 1979a.
- CONNOLLY, J.L., GREENE, L.A., VISCARELLO, R.R., RILEY, W.D. Rapid sequential changes in surface morphology of PC12 pheochromocytoma cells in response to nerve growth factor. **J. Cell Biol.**, v. 82, p. 820-27, 1979b.
- CONTRERAS, M.L., GUROFF, G. Calcium-dependent nerve growth factor-stimulated hydrolysis of phosphoinositides in PC12 cells. **J. Neurochem.**, v. 48, p. 1466-72, 1987.
- COYLE, J.T., PRICE, D.L., DELONG, M.R. Alzheimer's disease: a disease of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-90, 1983.
- CREMIS, J., WAGNER, J.A., HALEGOUA, S. Nerve growth factor action is mediated by cyclic AMP and Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinases. **J. Cell Biol.**, v. 103, p. 887-93, 1986.
- CRUTCHER, K.A., COLLINS, F. In vitro evidence for two distinct hippocampal growth factors: basis of neuronal plasticity? **Science**, v. 217, p. 67-70, 1982.
- DAMON, D.H., D'AMORE, P.A., WAGNER, J.A. Nerve growth factor and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and gene expression in PC12 cells via both

- protein kinase C- and cAMP-independent mechanisms. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1334-39, 1990.
- DANIELS, M.P. Colchicine inhibition of nerve fiber formation in vitro. **J. Cell. Biol.**, v. 53, p. 164-76, 1972.
- DAVIES, A. M., BANDTLOW, C., HEUMANN, R., KORSCHING, S. ROHRER, H., THOENEN, H. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. **Nature**, v. 326, p. 353-58, 1987.
- DAVIES, P. Is it possible to design rational treatment for the symptoms of Alzheimer's disease? **Drug Dev. Res.**, v. 5, p. 69-75, 1985.
- DEL MAESTRO, R. F., BJORK, J., ARFORS, K. E. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. I. In vivo study. **Microvasc. Res.**, v. 22, p. 239-54, 1981.
- DI ROSA, M., FLOWER, R. J., HIRATA, F., PARENTE, L., RUSSO-MARIE, F. Nomenclature announcement. Anti-phospholipase proteins. **Prostaglandins**, v. 28, p. 441-42, 1984.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Pathology**, v. 104, p. 15-28, 1971.
- DI ROSA, M., SORRETINO, L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. **Br. J. Pharmac.**, v. 38, p. 214-20, 1970.
- DI ROSA, M., WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmac.**, v. 23, p. 2297-98, 1971.
- DUBUISSON, D., DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-74, 1977.

- DUNBAR, C.E., BROWDER, T.M., ABRAMS, J.S., NIENHUIS, A.W. COOH-terminal-modified interleukin-3 is retained intracellularly and stimulates autocrine growth. *Science*, v. 245, p. 1493-96, 1989.
- EBBOTT, S., HENDRY, I. Retrograde transport of nerve growth factor in the rat central nervous system. *Brain Res.*, v. 139, p. 160-63, 1978.
- EDDY, N. B., LEIMBACH, D. J. Synthetic analgesics. II Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, v. 107, p. 385-93, 1953.
- ELIAKIM, R., GILEAD, L., LIGUMSKY, M., OKON, E., RACHMILEWITZ, D., RAZIN, E. Histamine and chondroitin sulfate e proteoglycan released by cultured human colonic mucosa: Indication for possible presence of E mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 83, p. 461-64, 1986.
- EVELETH, D.D., BRADSHAW, R.A. Internalization and cycling of nerve growth factor in PC12 cells interconversion of type II (fast) and type I (slow) nerve growth factor receptors. *Neuron*, v. 1, p. 929-36, 1988.
- EYLAR, E. H. On the biological role of glycoproteins. *J. Theor. Biol.*, v. 10, p. 89-113, 1965.
- FERRARI, G., GREENE, L.A. Does phospholipid methylation play a role in the primary mechanism of action of nerve growth factor? *J. Neurochem.*, v. 45, p. 853-59, 1985.
- FERREIRA, S. H. LORENZETTI, B. B., BRISTOW, A. F. POOLE, S. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, v. 334, p. 698-700, 1988.
- FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., DE CAMPOS, D. I. Induction blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, v. 422, p. 365-71, 1990.
- FLICKER, C. DEAN, R.L., WATKINS, D.L. et al. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 18, p. 973-81, 1983.

- FLOWER, R. J., BLACKWELL, G. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, p. 456-59, 1979.
- FOLLENFANT, R. L., NAKAMURA-CRAIG, M. GARLAND, L. G. Sustained hyperalgesia in rats evoked by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid is attenuated by the protein kinase inhibitor H-7. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, p. 289, 1990.
- FOREMAN, J. C., JORDAN, C. C., PIOTROWSKI, W. Interaction of neurotensin with the substance P receptor mediating histamine release from rat mast cells and the flare in human skin. **Br. J. Pharmac.**, v. 77, p. 531-39, 1982.
- FOREMAN, J. C., JORDAN, C. C. Neurogenic inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, march, v. 5, p.116, 1984.
- FRANCIS, P.T., PALMER, A.M. SIMS, N.R. et al. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. **Lancet**, v. 2, p. 7-11, 1985.
- FRAZIER, W.A., ANGELETTI, R.H., BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor and insulin. **Science**, v. 176, p. 482-88, 1972.
- FROESE, A. Receptors for IgE on mast cells and basophils. **Progress in Allergy: Mast cell activation and mediator release**. K. Ishizaca (ed). Basel, S. Karger, 1984, p. 142-87
- GAMSE, R., HOLZER, P., LEMBECK, F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **Br. J. Pharmac.**, v. 68, p. 207-13, 1980.
- GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D.A. The interrelations of complement and a prostaglandin-like substance in acute inflammation. **J. Path.**, v. 101, p. 241-49, 1970.
- GOLDSTEIN, L.A., REYNOLDS, C.P., PEREZ-POLO, J.R. Isolation of human nerve growth factor from placental tissue. **Neurochem. Res.**, v. 3, p. 175-83, 1978.
- GREEN, D. M., TREGEAR, R. T. The action of sensory irritants on the cat's cornea. **J. Physiol.**, v. 175, p. 37-38, 1964.

- GREEN, S.H., RYDEL, R.E., CONNOLLY, J.L., GREENE, L.A. PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. **J. Cell. Biol.**, v. 102, p. 830-43, 1986.
- GREENE, L.A., Mc GUIRE, J.C. Induction of ornithine decarboxylase by nerve growth factor dissociated from effects on survival and neurite outgrowth. **Nature**, v. 276, p. 191-94, 1978.
- GREENE, L.A., TISCHLER, A.S. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. **Adv. Cell Neurobiol.**, v. 3, p. 373-414, 1982.
- GREENE, L.A., VARON, S., PILTCH, A., SHOOTER, E.M. Substructure of the β subunit of mouse 7S nerve growth factor. **Neurobiology**, v. 1, p. 37-48, 1971.
- GREENE, L.A., VOLONTÈ, C., CHALAZONITIS, A. Purine analogs inhibit nerve growth factor-promoted neurite outgrowth by sympathetic and sensory neurons. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 1479-85, 1990.
- GRINSTEIN, S., ERLIJ, D. Insulin unmasks latent sodium pump sites in frog muscle. **Nature**, v. 251, p. 57-58, 1974.
- GUROFF, G. PC12 cells as a model of neuronal differentiation. In: BOTTENSTEIN, J. E., SATO, J. **Cell Culture in Neuroscience**, New York: Plenum, 1985, p. 245-66.
- HALL, F.L., FERNYHOUGH, P., ISHII, D.N., VULLIET, P.R. Suppression of nerve-growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells by sphingosine, an inhibitor of protein kinase C. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 4460-66, 1988.
- HAMA. T., HUANG, K. P., GUROFF, G. Protein kinase C as a component of nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC12 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 83, p. 2353-57, 1986.
- HARDY, J. D., WOLFF, H. G., GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. **J. Clin. Invest.**, v. 29, p. 115-40, 1950.

- HAROUTUNIAN, V.P., KANOF, P.D., DAVIS, K.L. Partial reversal of lesion-induced deficits in cortical cholinergic markers by nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 396, p. 397-99, 1986.
- HARPER, G. P., AL-SAFFAR, A. M., PEARCE, F. L., VERNON, C. A. The production of nerve growth *in vitro* by tissues of the mouse, rat, and embryonic chick. **Developmental Biology**, v. 77, p. 379-90, 1980
- HARPER, G.P., PEARCE, F.L., VERNON, C.A. Production of a nerve growth factor by the mouse adrenal medulla. **Nature (London)**, v. 261, p. 251-53, 1976.
- HARTIKKA, J., HEFTI, F. Comparison of nerve growth factor's effects on development of septum, striatum and nucleus basalis cholinergic neurons in vitro. **J. Neurosci. Res.** , v. 21, p. 352-64, 1988.
- HARTUNG, H. P., TOYKA, K. Activation of macrofages by substance P induction of oxidative burst and thromboxane release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 89, p. 310-05, 1983.
- HATANAKA, H., OTTEN, U., THOENEN, H. Nerve growth factor-mediated selective induction of ornithine decarboxylase in rat pheochromocytoma: a cyclic AMP-independent process. **FEBS Lett.**, v. 92, p. 313-16, 1978.
- HATANAKA, H., TSUKI, H., NIHONMATSU, I. Developmental change in nerve growth factor action from induction of choline acetyltransferase to promotion of cell survival in cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. **Dev. Brain Res.**, v. 39, p. 88-96, 1988.
- HEFTI, F. Is Alzheimer disease caused by lack of nerve growth factor? **Ann. Neurol.**, v. 13, p. 109-10, 1983.
- HEFTI, F., DRAVID, A., HARTIKKA, J. Chronic intraventricular injections of nerve growth factor elevate hippocampal choline acetyltransferase activity in adult rats with partial septo-hippocampal lesions. **Brain Res.**, v. 293, p. 305-09, 1984.
- HEFTI, F., WEINER, W. J. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, v. 20, p. 275-81, 1986.

- HENDERSHOT, L. C., FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and non-analgesics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 125, p. 237-40, 1959.
- HENDRY, I. A. Developmental changes in tissue and plasma concentrations of the biologically active species of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. **Biochem. J.**, v. 120, p. 1265-72, 1972.
- HENDRY, I.A. Control in the development of the vertebrate sympathetic nervous system. In: EPHRENPREIS, S., KOPIN, I. J. **Review of Neuroscience**. New York: Raven, 1976, v. 2, p. 149-94, New York: Raven. 1976.
- HENDRY, I.A. The effect of the retrograde axonal transport of the nerve growth factor on the morphology of adrenergic neurons. **Brain Res.**, v. 134, p. 213-23, 1977.
- HENDRY, I.A., IVERSEN, L.L. Reduction in the concentration of nerve growth factor in mice after sialectomy and castration. **Nature**, v. 243, p. 500-04, 1973.
- HENDRY, I.A. Retrograde axonal transport. In: BRADSHAW, R. A., SCHNEIDER, D. M. **Proteins of the Nervous System**, New York: Raven, 1980, p. 183-211.
- HENDRY, I.A., STACH, R., HERRUP, K. Characteristics of the retrograde axonal transport system for nerve growth factor in sympathetic nervous system. **Brain Res.**, v. 822, p. 117-28, 1974a.
- HENDRY, I.A., STÖCKEL, K., THOENEN, H., IVERSEN, L.L. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 68, p. 103-21, 1974b.
- HEPLER, D.J., OLTON, D.S., WENK, G.L., COYLE, J.T. Lesions in nucleus basalis magnocellularis and medial septal area of rats produce qualitatively similar memory impairments. **J. Neurosci.**, v. 5, p. 866-73, 1985.
- HILL, C.E., HENDRY, I.A. Differences in sensitivity of nerve growth factor of axon formation and tyrosine hydroxylase induction in cultured sympathetic neurons. **Neuroscience**, v. 1, p. 489-96, 1976.

- HIRATA, F., SCHIFFMANN, E. VENKATASUBRAMANIAN, K. SALOMON, D., AXELROD, J. A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 77, p. 2533-36, 1980.
- HOGUE-ANGELETTI, R.A., FRAZIER, W.A., JACOBS, J.D., NIALI, H.D., BRADSHAW, R.A. Purification, characterization, and partial amino acid sequence of nerve growth factor from cobra venom. **Biochemistry**, v. 15, p. 26-34, 1976.
- HOLSAPPLE, M. P., SCHNUR, M., YIM, G. K. W. Pharmacological manipulation of the inflammatory oedema mediated by prostaglandin, histamine and serotonin. **Agents Actions**, v. 10, p. 368-73, 1980.
- HORII, Z. I., VARON, S. Nerve growth factor-induced rapid activation of RNA labeling in dorsal root ganglionic dissociates from chick embryos. **J. Neurosc. Res.**, v. 1, p. 361-75, 1975.
- HORII, Z. I., VARON, S. Nerve growth factor action on membrane permeation to exogenous substrates in dorsal root ganglion dissociates from the chick embryo. **Brain Res.**, v. 124, p. 121-33, 1977.
- HOSANG, M., SHOOTER, E.M. The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. **EMBO J.**, v. 6, p. 1197-1212, 1987.
- HSIANG, J., HETLER, A., HOFFMANN, P. C., MOBLEY, W. C., WAINER, B. H. The effects of nerve growth factor on the development of septal cholinergic neurons in reaggregate cell cultures. **Neuroscience**, v. 29, p. 209-23, 1989.
- HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-14, 1987.
- ISHIZAKA, T., ISHIZAKA, K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy**, v. 34, p. 188-235, 1984.
- JANCSÓ, N. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactins. **Bull. Millard Fillmore Hosp.**, Buffalo, New York, v. 7, p. 53-77, 1960.

- JANCSÓ, N., JANCSÓ-GABOR, A., SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 31, p. 138-151, 1967.
- JANSSEN, P. A. J., NIEMEGEERS, C. J., DONY, G. H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal in rats. **Arzeim. Forsch.**, v. 13, p. 502-07, 1963.
- JOHNSON, A. R., ERDÖS, E. G., Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 142, p. 1252-56, 1973.
- JOHNSON, D., LANAHAN, A., BUCK, C.R., SEHGAL, A. MORGAN, C. et al. Expression and structure of the human NGF receptor. **Cell**, v. 47, p. 545-54, 1986.
- JOHNSON, E.M. JR, ANDRES, R.Y., BRADSHAW, R.A. Characterization of the retrograde transport of nerve growth factor (NGF) using high specific activity (¹²⁵I)NGF. **Brain Res.**, v. 150, p 319-31, 1978.
- JUNQUEIRA, L.C.U., FAJER,A., RABINOVITCH, M., FRANKENTHAL, L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. **J. Cellular Comp. Physiol.**, v. 34, p. 129-158, 1949.
- KALMAN, D., WONG, B., HORVAL, A.E., CLINE, M.J., O'LAGUE, P.H. Nerve growth factor acts through cAMP-dependent protein kinase to increase the number of sodium channels in PC12 cells. **Neuron**, v. 2, p. 355-66, 1990.
- KAZIMIERCZAK, W., PERET, M., MASLINSKI, C. The action of local anaesthetics on histamine release. **Biochem. Pharmac.**, v. 25, p. 1747-50, 1976.
- KNÜSEL, B.L., BURTON, L.E., LONGO, F.M., MOBLEY, W.C., KOLIATSOS, V.E., PRICE, D.L., HEFTI, F. Trophic actions of recombinant human nerve growth factor on cultured rat embryonic CNS cells. **Exp. Neurol.**, v. 110, p. 274-83, 1990.
- KOIZUMI, S., CONTRERAS, M.L., MATSUDA, Y., HAMA, T., LAZAROVICI, P., GUROFF, G. K252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC12 cells. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 715-21, 1988.

- KOIZUMI, S. RYAZANOV, A., HAMA, T., CHEN, H. C., GUROFF, G. Identification of Nsp 100 as elongation factor 2 (EF-2). **FEBS Lett.**, v. 253, p. 55-58, 1989.
- KOLIATSOS, V.E., APPLGATE, M.D., KNÜSEL, B., JUNARD, E.O., BURTON, L.E., MOBLEY, W.C., HEFTI, F.F. e PRICE, D.L. Recombinant human nerve growth factor prevents retrograde degeneration of axotomized basal forebrain cholinergic neurons in the rat. **Exp. Neurol.**, v. 112, p. 161-173, 1991.
- KORSCHING, S., AUBURGER, G. HEUMANN, R. et al. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. **Eur. Med. Biol. Organization J.**, v. 4, p. 1389-93, 1985.
- KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proc.**, v. 18, p. 412, 1959.
- KRISHTAL, O. A., MARCHENKO, S. M., OBUKHOV, A. G. Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v. 27, p. 995-1000, 1988.
- KRISHTAL, O. A., PIDOPLICHKO, V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. **Neuroscience**, v. 5, p. 2325-27, 1980.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.
- LAKSHMANAN, J. Involvement of cytoskeletal structures in nerve growth factor-mediated induction of ornithine decarboxylase. **Biochem. J.**, v. 178, p. 245-48, 1979.
- LAPCHAK, P. A. Therapeutic potential for nerve growth factor in Alzheimer's disease insights from pharmacological studies using lesioned central cholinergic neurons. **Rev. Neurosc.**, v. 3, p. 109-19, 1992.
- LAZAROVICI, P., LEVI, B.-Z., LELKES, P.I., KOIZUMI, S., FUJITA, K. et al. K252a inhibits the increase in *c-fos* transcription and the increase in intracellular calcium produced by nerve growth factor in PC12 cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 23, p 1-8, 1989.
- LEMBECK, F. Sir Thomas Lewi's nocifensor system, histamine and substance P-containing primary afferent nerves. **Trends Neurol. Sci.**, march, p. 106, 1983.

- LEVI, A., ALEMÀ, S. The mechanism of action of nerve growth factor. **Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.**, v. 31, p. 205-28, 1991.
- LEVI, A., BIOCCA, S., CATTANEO, A., CALISSANO, P. The mode of action of nerve growth factor in PC12 cells. **Mol. Neurobiol.**, v. 2, p. 201-26, 1988.
- LEVI, A., SCHECHTER, Y. NEUFELD, E.J., SCHLESSINGER, J. Mobility, clustering and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 77, p. 3469-73, 1980.
- LEVI, G., LATTES, M.G. Effects of a nerve growth factor on the transport of amino acids in spinal ganglia from chick embryos. **Life Sci.**, v. 7, p. 827-34, 1968.
- LEVI-MONTALCINI, R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 55, p. 330-43, 1952.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. **Harvey Lect.**, v. 60, p. 217-59, 1966.
- LEVI-MONTALCINI, R. A new role for the glial cell? **Nature**, v. 253, p. 687, 1975.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, v. 237, p. 1154-62, 1987.
- LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U. Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor. **Quart. Rev. Biol.**, v. 36, p. 99-108, 1961.
- LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U. Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mouse. In: SCREEBURY, L. M., MEYER, J. **Salivary Glands and their Secretions**. Oxford: Pergamon, p 129-141, 1964.
- LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P. U. Immunosympathectomy. **Pharmacol. Rev.** v. 18, p. 619-628, 1966.
- LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U. Nerve growth factor. **Physiol. Rev.**, v. 48, p. 534-569, 1968.

- LEVI-MONTALCINI, R., BOOKER, B. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 42, p. 373-84, 1960.
- LEVI-MONTALCINI, R., COHEN, S. In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 42, p. 695-99, 1956.
- LEVI-MONTALCINI, R., MEYER, H., HAMBURGER, V. In-vitro experiments on the effects of mouse sarcoma 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. **Cancer Res.**, p. 49-57, 1954.
- LEWIN, G.R., RITTER, A.M., MENDELL, L.M. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 2136-148, 1993.
- LEWIN, G.R., WINTER, J., McMAHON, S.B. Regulation of afferent connectivity in the adult spinal cord by nerve growth factor. **Eur. J. Neurosci.**, v. 4, p. 700-07, 1992.
- LEWIS, G. P. Mediators of immediate hypersensitivity. In: _____. **Mediators of inflammation**. Bristol: Wright, 1986, cap. 9, p. 96-106.
- LEWIS, M.E., LAKSHMANAN, J., NAGAIAH, K., MACDONNELL, P.C., GUROFF, G. Nerve growth factor increases activity of ornithine decarboxylase in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 75, p. 1021-23, 1978.
- LILLIEN, L.E., CLAUDE, P. Nerve growth factor as a mitogen for cultured chromaffin cells. **Nature**, v. 317, p. 632-34, 1985.
- LINDHOLM, D., HEUMMAN, R., MEYER, M., THOENEN, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature**, v. 330, p. 658-659, 1987.
- LINDSAY, R.M., LOCKETT, C., STERNBERG, J., WINTER, J. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and CGRP levels by nerve growth factor. **Neuroscience**, v. 33, p. 53-65, 1989.

- LIUZZI, A., ANGELETTI, P.U. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. **Experientia (Basel)**, v. 24, p. 1034-35, 1968.
- LIWAH CHAN, B., CHAO, M.V., SALTIEL, A.L. Nerve growth factor stimulates the hydrolysis of glycosyl-phosphatidylinositol in PC12 cells: a mechanism of protein kinase C regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 86, p. 1756- 60, 1989.
- LOETSCHER, H., PAN, Y.C.E., LAHM, H.W., GENTZ, R. BROCKHAUS, M. et al Molecular cloning and expression of the human 55 kD tumor necrosis factor receptor **Cell**, v. 61, p. 351-59, 1990.
- LONGO, A.M. Synthesis of nerve growth factor in rat glioma cells. **Dev. Biol.**, v. 65, p. 260-70, 1978.
- LOTZ, M., VAUGHAN, J. H., CARSON, D. A. Effects of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. **Science**, v. 241, p. 1218-21, 1988.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., LEWIS FARR, A., RANDALL, J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-75, 1951
- MACDONNELL, P.C., NAGATAH, K., LAKSHMANAN, J. e GUROFF, G. Nerve growth factor increases activity of ornithine decarboxylase in superior cervical ganglia of young rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 4681-84, 1977a.
- MACDONNELL, P.C., TOLSON, N. e GUROFF, G. Selective de novo synthesis of tyrosine hydroxylase in organ cultures of rat superior cervical ganglia after in vivo administration of nerve growth factor. **J. Biol. Chem.**v. 252, p. 5859-63, 1977b.
- MAHER, P. Role of protein tyrosine phosphorylation in the NGF-response. **J. Neurosci. Res.**, v. 24, p. 29-37, 1989.
- MALLET, S., FOSSUM, S., BARCLAY, A.N. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes-a molecule related to nerve growth factor receptor. **EMBO J.**, v. 9, p. 1063-68, 1990.
- MARCHBANKS, R.M. Biochemistry of Alzheimer's dementia. **J. Neurochem.**, v. 39, p. 9-15, 1982.

- MARCHISIO, P.C., NALDINI, L., CALISSANO, P. Intracellular distribution of nerve growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells: evidence for a perinuclear and intranuclear location. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 77, p. 1656-60, 1980.
- MARKS, R., GREAVES, M. W. Vascular reactions to histamine and compound 48/80 in human skin: suppression by a histamine H₂-receptor blocking agent. **Br. J. Clin. Pharmac.**, v. 4, p. 367-69, 1977.
- MARSHALL, K.W., CHIU, B., INMAN, R.D. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. **Arthritis Rheumatism**, v. 33, p. 87-90, 1990.
- MAX, S.R. SCHWAB, M. DUMAS, M., THOENEN, H. Retrograde axonal transport of nerve growth factor in the ciliary ganglion of the chick and rat. **Brain Res.**, v. 159, p. 411-15, 1978.
- MAZUREK, N., WESKAMP, G., ERNE, P., OTTEN, U. Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. **FEBS Lett.**, v. 198, p. 315-20, 1986.
- McARTHUR, J. N., SMITH, M. J. H., FREEMAN, P. C. Anti-inflammatory substance in human serum. **J. Pharm. Pharmac.**, v. 224, p. 699-71, 1972.
- McCARSON, K. E., GOLDSTEIN, B. D. Time course of the alteration in dorsal horn substance P levels following formalin: blockade by naloxone. **Pain**, v. 41, p. 95-100, 1990.
- McGUIRE, J.C., GREENE, L.A. Rapid stimulation by nerve growth factor of amino acid uptake by clonal PC12 pheochromocytoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 3362-67, 1979.
- McMAHON, S. B., WALL, P. D. Receptive fields of lamina I projection cells move to incorporate a nearby area of injury. **Pain**, v. 19, p. 235-47, 1992.
- MESULAM, M.-M., MUFSON, E.J., WAINER, B.H., LEVEY, A.I. Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6) **Neuroscience**, v. 10, p. 1185-1201, 1983.

- METCALFE, D. D., SOTER, N. A., WASSERMAN, S. I., AUSTEN, K. F. Identification of sulfated mucopolysaccharides including heparin in the lesional skin of a patient with mastocytosis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 74, p. 210-15, 1980.
- MILLER, L. C., TAINTER, M. L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 2261-4, 1944.
- MIYASAKA, T., CHAO, M.V., SHERLINE, P., SALTIEL, A.R. Nerve growth factor stimulates a protein kinase in PC12 cells that phosphorylates microtubule-associated protein-2. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 4730-35, 1990.
- MIZEL, S.B., BAMBURG, J.R. Studies on the action of nerve growth factor. II Neurotubule protein levels during neurite outgrowth. **Neurobiology**, v. 5, p. 283-90, 1975.
- MOBLEY, W.C., NEVE, R. L., PRUSINER, S. B., McKINLEY, M. P., Nerve growth factor induces gene expression for prion- and Alzheimer's beta amyloid proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 9811-15, 1988.
- MURPHY, R.A., OGER, J., SAIDE, J.D., BLANCHARD, M.H., ARNASON, B.G.W., HOGAN, C., PANTAZIS, N.J., YOUNG, M. Secretion of a nerve growth factor by central nervous system glioma cells in culture. **J. Cell Biol.**, v. 72, p. 769-73, 1977a.
- MURPHY, R.A., SAIDE, J.D., BLANCHARD, M.H., YOUNG, M. Molecular properties of the nerve growth factor secreted in mouse saliva. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 2672-76, 1977b.
- MURPHY, R.A., SAIDE, J.D., BLANCHARD, M.H., YOUNG, M. Nerve growth factor in mouse serum and saliva: Role of the submandibular gland. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 2330-33, 1977c.
- MURPHY, R.A., SINGER, R.H., SAIDE, J.D., PANTAZIS, N.J., BLANCHARD, M.H., BYRON, K.S., ARNASON, B.G.W., YOUNG, M. Synthesis and secretion of a high molecular weight form of nerve growth factor by skeletal muscle cells in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 4496-4500, 1977d.

- NICODIJEVIC, B., CREVELING, C.R., KOIZUMI, S., GUROFF, G. Nerve growth factor and K252 a increase catecholamine release from PC12 cells. **J. Neurosci. Res.**, v 26, p. 288-95, 1990.
- NORDBERG, A. Biological markers and the cholinergic hipotesis in Alzheimer's disease. **Acta Neurol. Scand.**, v. 139, p. 54-58, 1992.
- NORR, S.C., VARON, S. Dynamic temperature-sensitive association of ¹²⁵I-nerve growth factor in vitro with ganglionic and nonganglionic cells from embryonic chick. **Neurobiology**, v. 5, p. 101-18, 1978.
- NORTON, S. Quantitative determination of mast cell fragmentation by compoud 48/80. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 9, p. 494-97, 1954.
- OTTEN, U. Nerve growth factor and the peptidergic sensory neurons. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 5, p. 307-10, 1984.
- OTTEN, U. BAUMANN, J.B., GIRARD, J. Nerve growth factor induces plasma extravasation in the rat skin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 199-201, 1985.
- OTTEN, U., SCHWAB, M., GAGNON, C., THOENEN, H. Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase by nerve growth factor: Comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. **Brain Res.**, v 133, p. 291-303, 1977.
- OTTEN, U., THOENEN, H. Effect of glucocorticoids on nerve growth factor-mediated enzyme induction in organ cultures of rat sympathetic ganglia: Enhanced response and reduced time requirement to initiate enzyme induction. **J. Neurochem.**, v. 29, p. 69-75, 1977.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reations in coordinated systems of diffusion. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 32, suppl., p. 232-46, 1953.

- ÖYANAGUI, Y. Steroid-like anti-inflammatory effect of superoxide dismutase in serotonin-, histamine- and kinin-induced edemata of mice: existence of vascular permeability regulating protein (s). **Biochem. Pharmacol.**, v. 30, p. 1791-98, 1981.
- ÖYANAGUI, Y., SUZUKI, S. Vasoregulin, a glucocorticoid-inducible vascular permeability inhibitory protein. **Agents and Actions**, v. 17, p. 270-77, 1985.
- PANDIELLA-ALONSO, A., MALGAROLI, A., VICENTINI, L.M., MELDOLESI, J. Early rise of cytosolic Ca²⁺ induced by NGF in PC12 and chromaffin cells. **FEBS Lett.**, v. 2208, p. 48-51, 1986.
- PARAVICINI, U., STÖCKEL, K., THOENEN, H. Biological importance of retrograde axonal transport of nerve growth factor in adrenergic neurons. **Brain Res.**, v. 84, p. 279-91, 1975.
- PARRAT, J. R., WEST, G. B. Isolation by various substances of oedema formation in the hind paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg white and compound 48/80. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, v. 33, p. 501-12, 1958.
- PEARCE, F. L., BANKS, B. E. C., BANTHORPE, D. V., BERRY, A. R., DAVIES, H. S., VERNON, C. A. The isolation and characterization of nerve-growth factor from the venom of *Vipera russelli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 29, p. 417-25, 1972.
- PERRY, E.K., TOMLINSON, B.E., BLESSED, G. et al. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 1457-59, 1978.
- PETERS, J. A., LAMBERT, J. J. Electrophysiology of 5-HT₃ receptors in neural cell lines **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, p. 172-75, 1989.
- PFENNINGER, K.H., JOHNSON, M.P. Nerve growth factor stimulates phospholipid methylation in growing neurites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, p. 7797-800, 1981.

- PIPELEERS, D.G., PIPELEERS-MARIEHAL, M.A., SHERLINE, P., KIPNIS, D.M. A sensitive method for measuring polymerized and depolymerized forms of tubulin in tissues. **J. Cell. Biol.**, v. 74, p. 341-50, 1977.
- PÓRSZÁSZ, J., JANCSÓ, N. Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. **Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.**, v. 16, p. 299-306, 1959
- RADEKE, M.J., MISKO, T.P., HSU, C., HERZENBERG, L.A., SHOOTER, E.M. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. **Nature**, v. 325, p. 593-97, 1987.
- REINHOLD, D.S., NEET, K.E. The lack of a role for protein kinase C in neurite extension and in induction of ornithine decarboxylase by nerve growth factor in PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 3558-64, 1989.
- RINDERKNECHT, E., HUMBEL, R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with pro-insulin. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 2769-76, 1978a.
- RINDERKNECHT, E., HUMBEL, R.E. Primary structure of human insulin-like growth factor II. **FEBS Lett.**, v. 89, p. 283-86, 1978b.
- RODRIGUEZ-TEBAR, A., DACHANT, G., BARDE, Y. A. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. **Neuron**, v. 4, p. 487-92, 1990.
- ROGER, L.J., SCHAUBERG, S.M., FELLOWS, R.F. Growth and lactogenic hormone stimulation of ornithine decarboxylase in fetal rat brain. **Endocrinology**, v. 95, p. 904-11, 1974.
- ROHRER, H., OTTEN, U., THOENEN, H. On the role of RNA synthesis in the selective induction of tyrosine hydroxylase by nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 159, p. 436-39, 1978.
- ROISEN, F.J., MURPHY, R.A. Neurite development in vitro. II. The role of microfilaments and microtubules in dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and nerve growth factor stimulated maturation. **J. Neurobiol.**, v. 4, p. 397-412, 1973.

- ROWLAND, E.A., MULLER, T.H., GOLDSTEIN, M., GREENE, L.A. Cell-free detection and characterization of a novel NGF-activated protein kinase in PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 4730-35, 1987.
- RUDKIN, B.B., LAZAROVICI, P., LEVI, B. Z., ABE, Y., FUJITA, K., GUROFF, G. Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. **EMBO J.**, v. 8, p. 3319-25, 1989.
- RUSSEL, D.H., BYUS, C.V., MANEN, C.A. Proposed model of major sequential biochemical events of a trophic response. **Life Sci.**, v. 19, p. 1297-1306, 1976.
- SAEED, S. A., McDONALD-GIBSON, W. J., CUTHBERT, J., COPAS, J. L., SCHNEIDER, C. et al. Endogenous inhibitor of prostaglandin synthetase. **Nature**, v. 270, p. 32-36, 1977.
- SALAMONE, J.D., BEART, P.M., ALPERT, J.E., IVERSEN, S.D. Impairment in T-maze reinforced alternation performance following nucleus basalis magnocellularis lesions in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 13, p. 63-70, 1984.
- SCHUBERT, D.S., LACORBIERE, M., WHITLOCK, C., STALLEUP, W. Alterations in the surface properties of cells responsive to nerve growth factor. **Nature**, v. 273, p. 718-23, 1978.
- SCHUBERT, D.S., WHITLOCK, C. Alterations of cellular adhesion by nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 4055-58, 1977.
- SCHWAB, M.E. Ultrastructural localization of a nerve growth factor-horseradish peroxidase (NGF-HRP) coupling product after retrograde axonal transport in adrenergic neurons. **Brain Res.**, v. 130, p. 190-96, 1977.
- SCHWAB, M.E., OTTEN, U., AGID, Y., THOENEN, H. Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. **Brain Res.**, v. 168, p. 473-83, 1979

- SCHWAB, M.E., THOENEN, H. Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nervous. A comparison with nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 122, p. 459-74, 1977.
- SEILER, M., SCHWAB, M.E. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. **Brain Res.**, v. 300, p. 33-36, 1984.
- SERVER, A.C., HERRUP, K., SHOOTER, E.M., HOGUE-ANGELETTI, R.A., FRAZIER, W.A., BRADSHAW, R.A. Comparison of the nerve growth factor proteins from cobra venom (*Naja naja*) and mouse submaxillary gland. **Biochemistry**, v. 15, p. 35-39, 1976.
- SERVER, A.C., SHOOTER, E.M. Nerve growth factor. **Adv. Protein Chem.**, v. 31, p. 339-409, 1977.
- SHANAHAN, F., DENBURG, J., FOX, J., BIENENSTOCK, J., BEFUS, D. Mast cell heterogeneity: effects on neuroenteric peptides on histamine release. **J. Immunol.**, v. 135, p. 1331-37, 1985.
- SHELTON, D.L., REICHARDT, L.F. Studies on the expression of the β nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 83, p. 2714-18, 1986.
- SKAPER, S.D., VARON, S. Nerve growth factor action on 2-deoxy-D-glucose transport in dorsal root ganglionic dissociates from chick embryo. **Brain Res.**, v. 163, p. 89-100, 1979a.
- SKAPER, S. D., VARON, S. Nerve growth facotr influences sodium ion extrusion from chick embryonic dorsal root ganglionic neurons. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 88, p. 563-68, 1979b.
- SKAPER, S.D., VARON, S. Nerve growth factor stimulates phospholipid methylation in target ganglionic neurons independently of the cAMP and sodium pump responses. **J. Neurochem.**, v. 42, p. 116-22, 1984.

- STAMENKOOVIC, I., CLARK, E.A., SEED, B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas **EMBO J.**, v. 8, p. 1403-10, 1989.
- STÖCKEL, K., GUROFF, G., SCHWAB, M.E., THOENEN, H. The significance of retrograde axonal transport for the accumulation of systemically administered nerve growth factor (NGF) in the rat superior cervical ganglia. **Brain Res.**, v. 109, p. 271-84, 1976.
- STÖCKEL, K., PARAVICINI, U., THOENEN, H. Specificity of the retrograde axonal transport of nerve growth factor. **Brain Res.**, v. 76, p. 413-21, 1974.
- STÖCKEL, K., SCHWAB, M.E., THOENEN, H. Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. **Brain Res.**, v. 99, p. 1-16, 1975a.
- STÖCKEL, K., SCHWAB, M.E., THOENEN, H. Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study **Brain Res.**, v. 89, p. 1-14, 1975b.
- STÖCKEL, K., SOLOMON, F., PARAVICINI, U., THOENEN, H. Dissociation between effects of nerve growth factor on tyrosine hydroxylase and tubulin synthesis in sympathetic ganglia. **Nature (London)**, v. 250, p. 150-51, 1974.
- STÖCKEL, K., THOENEN, H. Retrograde axonal transport of nerve growth factor specificity and biological importance. **Brain Res.**, v. 85, p. 337-41, 1975.
- TAIWO, Y. O., LEVINE, J. D., BURCH, R. M., WOO, J. E., MOBLEY, W. C. Hyperalgesia induced in the rat by the amino-terminal octapeptide of nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, p. 5144-148, 1991.
- TAKEI, N., TSUKUI, H., HATANAKA, H. Nerve growth factor increases the intracellular content of acetylcholine in cultures of septal neurons from developing rats. **J. Neurochem.**, v. 51, p. 1118-25, 1988.

- TANIUCHI, M., JONHSON, E.M. Characterization of the binding properties and retrograde axonal transport of a monoclonal antibody directed against the rat nerve growth factor receptor. **J. Cell. Biol.**, v. 101, p. 1100-06, 1985.
- TANIUCHI, M., JOHNSON, E.M., ROACH, P.J., LAWRENCE, J.C. Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 13342-49, 1986.
- TANIUCHI, M., CLARK, H.B., SCHWEITZER, J.B., JOHNSON, E.M. Expression of nerve growth factor receptors in Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 664-81, 1988.
- THAYER, S. A., PERNEY, T. M., MILLER, R. J. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 4089-97, 1988.
- THOENEN, H., BANDTLOW, C., HEUMANN, R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 109, p. 145-78, 1987.
- TJOLSEN, A., BERGE, O. G., HUNSKAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.
- TSURUFUJI, S., SUGIO, K., TAKEMASA, F. The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the inflammatory action of dexamethasone. **Nature**, v. 2280, p. 408-10, 1979.
- TUSZYNSKI, M.H., BUZSAKI, G., GAGE, F.H. NGF infusions combined with fetal hippocampal grafts enhance reconstruction of the lesioned septo-hippocampal projection. **Neuroscience**, v. 36, p. 32-44, 1990.
- UNSICKER, K., KRISCH, B., OTTEN, J., THOENEN, H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 75, p. 3498-502, 1978.

- VARON, S. Nerve growth factor and its mode of action. **Exp. Neurol.**, v. 43, p. 75-92, 1975.
- VARON, S., NOMURA, J., SHOOTER, E.M. The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. **Biochemistry**, v. 6, p. 2202-09, 1967
- VARON, S., NOMURA, J., SHOOTER, E.M. Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. **Biochemistry**, v. 7, p. 1296-303, 1968.
- VARON, S., RAIBORN, C. Dissociation, fractionation and culture of chick embryo sympathetic ganglionic cells. **J. Neurocytol.**, v. 1, p. 211-21, 1972.
- VARON, S., SHOOTER, E.M. In: BOMMAN, R. E., DATTA, S. P. **Biochemistry of Brain Behavior**. New York: Plenum, 1970, p. 41-64.
- VIANA, G. B., DAVIS, L. H., KAUFFMAN, F. C. Effects of organophosphates and nerve growth factor on muscarinic receptor binding number in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 93, p. 257-66, 1988.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R. Biphasic development of carrageenin oedema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 96-103, 1969.
- VOLONTÈ, C., RUKENSTEIN, A., LOEB, D.M., GREENE, L.A. Differential inhibition of nerve growth factor response by purine analogues: correlation with inhibition of a nerve growth factor-activated protein kinase. **J. Cell Biol.**, v. 109, p. 2395-403, 1989.
- WALLACE, L., PARTLOW, L. α -Adrenergic regulation of secretion of mouse saliva rich in nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 73, p. 4210-14, 1976.
- WESKAMP, G., OTTEN, U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): A tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. **J. Neuroch.**, v. 48, p. 1779-86, 1987.
- WILL, B., HEFTI, F. Behavioral and neurochemical effects of chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult rats with fimbria lesions. **Behav. Brain Res.**, v. 17, p. 17-24, 1985.

- WILLIS, A. L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. **J. Pharm. Pharmac.**, v. 21, p. 126-28, 1969.
- WINDER, C. V., WAX, J., BEEN, M. A. Rapid foot volume measurements on anaesthetized rats, and the question of a phenilbutazone effect on anaphylactoid oedema. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 112, p. 174, 1957.
- WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-47, 1962.
- WINTER, J., FORBES, C.A., STERNBERG, J., LINDSAY, R.M. Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to capsaicin. **Neuron**, v. 1, p. 973-981, 1988.
- WOOD, J. N., COOTE, P. R., MINHAS, A., MULLANEY, J., McNEIL, M., BURGESS, G. M. Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurones in culture. **J. Neurochem.**, v. 53, p. 1203-11, 1989.
- WOOD, J. N., WINTER, J., JAMES, I. F., RANG, H. P., YEATS, J., BEVAN, S. J. Capsaicin-induces ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. **J. Neurosc.**, v. 8, p. 3208-20, 1988.
- YAMADA, K.M., WESSELLS, N.K. Axonal elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. **Exp. Cell Res.**, v. 66, p. 346-52, 1971.
- YANKNER, B.A., SHOOTER, E.M. Nerve growth factor in the nucleus: Interaction with receptors on the nuclear membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, p. 1269-73, 1979.
- YOUNG, M., OGER, J., BLANCHARD, M. H., ASDOURIAN, H., AMOS, H., ARNASON, B.G.W. Secretion of a nerve growth factor by primary chick fibroblast cultures. **Science**, v. 187, p. 361-62, 1974.
- YOUNG, M., SAIDE, J. D., MURPHY, R. A., ARNASON, B. G.W. Molecular size of nerve growth factor in dilute solution. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 459-64, 1976.

ZANINI, A., ANGELETTI, P., LEVI-MONTALCINI, R. Immunochemical properties of the nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 61, p. 835-42, 1968.