

VALFREDO SCHLEMPER

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS E RELAXANTES
PARA A BRADICININA NA TRAQUÉIA ISOLADA DE COBAIA**

FLORIANÓPOLIS

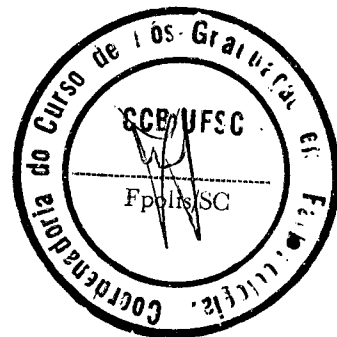
1994

VALFREDO SCHLEMPER

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS E RELAXANTES
PARA A BRADICININA NA TRAQUÉIA ISOLADA DE COBAIA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Farmacologia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS
E RELAXANTES PARA A BRADICININA NA TRAQUEIA
ISOLADA DE COBAIA



POR

VALFREDO SCHLEMPER

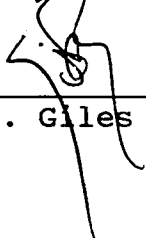
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. João Batista Calixto

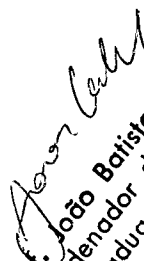


Prof^a Dr^a Maria Cristina de O. Salgado



Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis, abril de 1994.


Prof. João Batista Calixto
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia - CCB/UFSC

A perseverança nos ideais superiores da vida é dos mais difíceis desafios para o homem de bem. Terminada uma etapa, desdobra-se outra à frente. Vencida uma dificuldade, outra se delinea.

Passo dado enseja distâncias a conquistar. Tarefa concluída é começo de tarefas mais desafiadoras. E quando se pensa que os impedimentos mais graves foram ultrapassados, surgem situações e obstáculos de transposição mais demorada.

Diferente, no entanto, não pode ser o cometimento. Cada conquista habilita o indivíduo a mais audaciosos tentames, ao invés de convidá-lo ao parasitismo e à inanição. O exercício é o mestre paciente que capacita qualquer pessoa para as realizações mais complexas.

O que ora parece impossível, mais tarde se torna realização concluída.

Divaldo P. Franco

Dedico esta dissertação à minha família em geral, especialmente minha esposa Susana e meus filhos Lucas e Pedro, pelo apoio e compreensão e por serem elementos chaves onde encontro forças para o sucesso da minha carreira.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Batista Calixto, um cientista admirável, pela confiança no meu trabalho e pelo estímulo e orientação nos caminhos da ciência.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente Dr. Giles Alexander Rae e Dra. Yara dos Santos Medeiros pela colaboração.

À Elizabete Ganzer Ramos e Rosana Ostrosky pela amizade, carinho e assessoria.

Aos funcionários do Departamento que, direta ou indiretamente, auxiliaram-me no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da iniciação científica, pela troca de informações e evolução conjunta.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos Animais, seres que sacrificam-se involuntariamente em prol do desenvolvimento técnico e científico.

Ao Todo Poderoso, porque sem Ele nada teria acontecido.

ÍNDICE

1 -	INTRODUÇÃO	1
1.1 -	Ações das cininas nas vias aéreas	5
1.2 -	Participação da bradicinina na inflamação neurogênica	9
1.3 -	Receptores para as cininas nas vias aéreas	11
1.4 -	Papel do óxido nítrico	13
2 -	OBJETIVOS	15
3 -	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 -	Isolamento e montagem das preparações	16
3.2 -	Procedimentos experimentais	17
3.2.1 -	Análise da reatividade das preparações às cininas e outros agonistas	17
3.2.2 -	Efeito relaxante das cininas na traquéia de cobaia com epitélio	17

3.2.3 - Efeito de antagonistas seletivos de receptores B₂ sobre a resposta bifásica à bradicinina na traquéia de cobaia	18
3.2.4 - Efeito de várias classes de drogas sobre a resposta contrátil ou relaxante à bradicinina na traquéia de cobaia	18
3.2.5 - Possível participação do óxido nítrico no relaxamento causado pela bradicinina na traquéia de cobaia	19
3.2.6 - Contribuição da combinação de inibidores da ciclooxigenase e inibidores do óxido nítrico sobre a resposta relaxante à BK	20
3.3 - Drogas e reagentes utilizados	21
3.4 - Análise estatística	22
4 - RESULTADOS	
4.1 - Efeito contrátil das cininas e demais agonistas na traquéia isolada de cobaia sem epitélio	23
4.2 - Análise da resposta relaxante causada pela bradicina na traquéia isolada de cobaia com epitélio	26
4.3 - Influência de diferentes grupos de drogas sobre a resposta bifásica à bradicinina	28
4.4 - Efeito de antagonistas seletivos de receptores B₂	31
4.5 - Participação do óxido nítrico no relaxamento induzido pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia	36

5 - DISCUSSÃO	46
RESUMO E CONCLUSÕES	63
ABSTRACT	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito contrátil das cininas e outros agonistas	24
FIGURA 2 - Registro típico do efeito relaxante causado pela bradicinina	26
FIGURA 3 - Relaxamento causado pela bradicinina e seus análogos	27
FIGURA 4 - Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores B₂ sobre a contração e o relaxamento à bradicinina	32
FIGURA 5 - Efeito contrátil da bradicinina na ausência ou na presença de antagonistas B₂	34
FIGURA 6 - Efeito relaxante da bradicinina na ausência ou na presença de antagonistas B₂	35
FIGURA 7 - Seletividade de receptores para o efeito relaxante da bradicinina	37
FIGURA 8 - Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre o efeito relaxante da bradicinina	38
FIGURA 9 - Efeito de inibidores e substrato da síntese de óxido nítrico	39

FIGURA 10 - Especificidade dos inibidores da síntese de óxido nítrico sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina	40
FIGURA 11 - Efeito do azul de metileno sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina	42
FIGURA 12 - Efeito da indometacina sobre a resposta relaxante da bradicinina . . .	43
FIGURA 13 - Especificidade do efeito da indometacina sobre o relaxamento produzido pela bradicinina	44
FIGURA 14 - O efeito da combinação de indometacina e inibidores da síntese de óxido nítrico sobre o relaxamento induzido pela bradicinina	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Potência e eficácia das cininas e outros agonistas na traquéia sem epitélio	25
Tabela 2 - Potência e eficácia das cininas na traquéia com epitélio	25
Tabela 3 - Influência de diferentes classes de drogas sobre a contração induzida pela bradicinina	29
Tabela 4 - Influência de diferentes classes de drogas sobre o relaxamento induzido pela bradicinina	30
Tabela 5 - Valores médios de inibição para os antagonistas dos receptores B₂ sobre a contração e relaxamento induzidos pela bradicinina	33

1 - INTRODUÇÃO

O termo cinina (derivado do grego *kineo* = mover) é, na prática, aplicado a uma família de mediadores polipeptídicos que estão presentes em diversos tecidos de várias espécies, aonde exercem importantes funções fisiopatológicas.

Rocha e Silva *et al.* (1949) demonstraram, pela primeira vez, o aparecimento de uma resposta contrátil no fêlo isolado de cobra, causada por uma substância liberada do sangue quando esse era incubado com tripsina ou certos venenos de serpentes. Essa resposta contrátil desenvolvia-se lentamente (bradi), comparada com a produzida pela histamina, não sendo antagonizada pela atropina ou pelo benadril, o que levou os autores a concluir que tal fenômeno era decorrente da liberação de uma nova substância, posteriormente denominada como **bradicinina**. As cininas são peptídeos vasoativos formados durante a resposta inflamatória a partir da α_2 globulinas chamadas cininogênios de alto e de baixo pesos moleculares, pela ação das cininogenses, às quais incluem as calicreínas plasmática e tecidual. O cininogênio de alto peso molecular está presente somente no plasma, enquanto que o de baixo peso também ocorre nos tecidos. Duas cininas são formadas no homem: o nonapeptídeo bradicinina (BK) (Arg-Pro-Gli-Phe-Ser-Arg-Pro-Phe Arg), formado a partir do cininogênio de alto peso molecular (principal substrato para a calicreína plasmática), e o decapeptídeo calidina (lisil-BK), gerado a partir do cininogênio de baixo peso molecular. A calidina é rapidamente convertida em BK pela enzima aminopeptidase-N (Bhoola *et al.*, 1992; Regoli & Barabé, 1980; Proud & Kaplan, 1988).

A bradicinina é um potente agente inflamatório que, ao ser gerado em condições fisiológicas normalmente ou após injúria tecidual, participa de importantes processos fisiopatológicos incluindo, entre outros, controle da pressão arterial, aumento na permeabilidade

vascular, edema, controle da secreção iônica, contração ou relaxamento de músculos lisos, bem como na dor e hiperalgesia via estimulação de fibras nociceptivas A δ e C (para revisão ver: Regoli & Barabé, 1980; Burch *et al.*, 1990; Farmer & Burch, 1991; Hall, 1992; Bhoola *et al.*, 1992). Existem evidências experimentais indicando que a BK e as cininas relacionadas, tais como a lisil-BK e metionil-lisil-BK, contribuem para a resposta inflamatória em doenças agudas e crônicas tais como reações alérgicas, artrite reumatóide, asma, choque séptico, rinite viral e doenças inflamatórias intestinais (Farmer & Burch, 1992; Bhoola *et al.*, 1992; Burch *et al.*, 1990). As ações das cininas liberadas são de caráter transitório devido à sua rápida degradação pelas peptidases teciduais e plasmáticas denominadas de cininases I (carboxipeptidase N e carboxipeptidase M) e cininases II (enzima conversora de angiotensina e endopeptidase neutra) (Bhoola *et al.*, 1992).

As calicreínas constituem um grupo de serino-proteases encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. Dividem-se em dois grupos: tecidual e plasmático (Fiedler, 1979). Os dois tipos diferem quanto ao peso molecular, especificidade pelo substrato, características imunológicas, tipo de cinina liberada e em função da importância biológica (Webster, 1970; Fulier & Funder, 1986; Kaplan e Silverberg, 1987). Um único gene codifica a calicreína plasmática (Seidah *et al.* 1989), enquanto que a tecidual é membro de uma família de multigenes que mostra diferentes padrões de expressão nos tecidos (Mason *et al.*, 1983). As pré-calicreínas plasmáticas geradas no fígado são proteínas precursoras de pequenas calicreínas plasmáticas, já as calicreínas glandulares são proteínas geradas em órgãos exócrinos tais como pâncreas, glândulas salivares e rins, e em não exócrinos como intestinos, próstata e hipófise (Bhoola *et al.*, 1992).

A pré-caliceína (fator de Fletcher) encontrada no plasma é ativada pelo fator de Hageman (Fator XII) quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas negativamente. O fator de Hageman clivado apresenta atividade enzimática contra grande número de proteínas plasmáticas (Proud & Kaplan, 1988). De fato, a ativação do fator de Hageman está relacionada com a estimulação de um grande número de enzimas proteolíticas que circulam como precursores inativos e levam a um complexo de mecanismos reativos, dos quais os mais proeminentes são: coagulação sangüínea, fibrinólise, formação de cininas plasmáticas e reações envolvendo complemento (Regoli & Barabé, 1980). Quando o sistema é ativado inicia-se a formação de trombos junto com a liberação de cininas na superfície endotelial e subendotelial. As cininas formadas no plasma difundem-se através das paredes capilares ou via sistema linfático para os tecidos e são rapidamente inativadas pelas diversas cininases contidas no plasma e nos tecidos. A fração de cininas e metabólitos que resistem a esta inativação combinam-se com os receptores e com proteases localizadas na superfície das células. Estudos recentes indicam que as ações da BK decorrem da ativação de receptores específicos, localizados na membrana celular, que estão acoplados à proteína G e envolvem um complexo mecanismo de efetadores intracelulares. Assim, a BK pode estimular a formação de mensageiros intracelulares, incluindo a geração de vários prostanóides derivados tanto da ciclo como das lipoxigenases, ativação da síntese de óxido nítrico (NO), produção de inositol fosfato e de diacilglicerol, com conseqüente ativação da proteína cinase C, além da ativação de vários canais iônicos (Burch *et al.*, 1990, 1993; Farmer & Burch, 1991).

Com o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para as cininas, e com base em estudos envolvendo a relação entre estrutura-atividade e na relação de potência para vários análogos das cininas, Regoli & Barabé (1980) classificaram inicialmente os receptores para as

cininas em dois grupos, denominados de B₁ e B₂. Os primeiros receptores são conhecidos por estarem restritos em alguns músculos lisos vasculares (arterial e venoso), principalmente de coelhos, apresentam alta afinidade pelos metabólitos ativos da BK e da lisil-BK, a des-Arg⁹-BK e a des-Arg⁹-lisil-BK, respectivamente, e são antagonizados competitiva e seletivamente pelos antagonistas dos receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK ou a des-Arg⁹-[Leu⁸]-lisil-BK. Por outro lado, os receptores B₂ são constitutivos e estão, de maneira geral, amplamente distribuídos no organismo, podendo serem localizados em tecidos de várias espécies animais, tanto central como periféricamente, sendo ativados tanto pela BK como pela lisil-BK. São bloqueados por vários antagonistas seletivos de origem peptídica, incluindo entre outros, o D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (HOE 140), o D-Arg⁰[Hyp³, D-Hip^E (trans-propil)⁷, Oic⁸]-BK (NPC 17731) e o D-Arg⁰[Hyp³, D-Hip^E (trans-tiofenil)⁷, [Oic⁸]-BK (NPC 17761) (para revisão ver: Burch *et al.*, 1990, 1993; Hall, 1992; Kyle *et al.*, 1992a;b). Mais recentemente, estudos funcionais, bem como aqueles realizados com o emprego de técnicas de radioligantes, sugerem a existência de distintos subtipos de receptores B₂ em vários tecidos, incluindo a musculatura lisa não-vascular, (Hall, 1992; Burch *et al.*, 1993). No entanto, até o momento apenas os receptores do tipo B₂ foram clonados em tecido de murino e de humano (366 e 364 aminoácidos, respectivamente). Como ocorre com outros receptores acoplados à família das proteínas G, os receptores B₂ para a BK apresentam grande homologia entre si (cerca de 81 %) e são bloqueados apenas pelos antagonistas seletivos desses receptores (McEachen *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992).

Já os receptores do tipo B₁, por serem mais complexos, são relativamente menos estudados, embora vários trabalhos recentes indiquem que eles estejam intimamente associados com importantes ações das cininas em várias patologias, podendo inclusive co-existirem no mesmo tecido em associação com os receptores B₂ (para revisão ver: Marceau & Regoli, 1991;

Burch *et al.*, 1990; 1993; Hall, 1992). Uma característica própria e importante dos receptores B_1 é o fato de serem expressos "de novo" após injúria tecidual ou em processos inflamatórios (Regoli & Barabé, 1980; Marceau *et al.*, 1983; Marceau & Regoli, 1991). Vários estudos indicam que essa síntese de receptores ocorre em experimentos realizados *in vivo*, sendo tal fenômeno antagonizado por inibidores da síntese protéica, como a ciclo-heximida. Além disso, a síntese de receptores B_1 pode ser estimulada por citocinas como a interleucina 1, e de modo similar pelo tratamento dos animais com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (Burch *et al.*, 1991; Marceau & Regoli, 1991). Contudo, ao contrário do que se observa para os receptores B_2 , os sistemas de transdução envolvidos nas respostas às cininas mediadas através dos receptores B_1 são, até o momento, pouco conhecidos (Hall, 1992; Burch *et al.*, 1993).

1.1 - Ações das cininas nas vias aéreas

Existem evidências indicando a geração de cininas nas vias aéreas durante modelos experimentais de rinite alérgica bem como durante rinovirose experimental (Naclério *et al.*, 1988) e natural (Proud *et al.*, 1990). A desordem alérgica pode ser imune, envolvendo células apresentadoras de antígenos, ou pode ser dependente da formação de complexos com imunoglobulina E (Bhoola *et al.*, 1992). A secreção nasal de pacientes com rinite alérgica causada por exposição ao antígeno ou à infecção rinoviral contém cininogênios de alto e baixo peso molecular, bem como BK e calidina (Baumgarten *et al.*, 1986).

Vários estudos têm sugerido ser a BK um mediador implicado na patogenia da asma brônquica desde a primeira demonstração do aparecimento de broncoconstricção após inalação desta cinina em pacientes asmáticos (Polosa & Holgate, 1990), como também após sua aplicação endovenosa (Newball *et al.*, 1975). Entretanto, a BK não causa ação broncoconstrictora em

pacientes normais (não-asmáticos) (Fuller *et al.*, 1987). Além da sua ação broncoconstrictora, existem evidências de cininas ativas no lavado broncoalveolar dos pacientes que receberam BK, bem como em processos inflamatórios pulmonares locais (bronquites e pneumonites) (Christiansen *et al.*, 1987) e nos indivíduos submetidos à administração de antígeno (Christiansen *et al.*, 1992). Também nas vias aéreas superiores, independente do estado atópico, a BK induz sintomas de obstrução nasal, rinorréia e dor de garganta (Proud *et al.*, 1983). Além disso, o aumento dos componentes locais e sistêmicos geradores de cininas, correlacionam-se com os sintomas associados à rinite (Proud *et al.*, 1983) e ataques de asma (Abe *et al.*, 1967).

A BK liberada durante a resposta inflamatória é um potente agente espasmogênico do músculo liso, estimula terminações nervosas sensoriais, causa vasodilatação, extravasamento microvascular, efeitos esses decorrentes, em parte, da liberação de mediadores inflamatórios como o fator ativador de plaquetas (PAF), peptidoleucotrienos, leucotrieno B₄, ácidos hidroxitetraenóicos, e várias prostaglandinas (Farmer & Burch, 1991a,b). Além disso, a BK pode estimular a liberação de neuropeptídeos de neurônios aferentes sensoriais, incluindo as taquicinininas (substância P e neurocinina A) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), em muitos tecidos incluindo as vias aéreas (Burch *et al.*, 1990; Geppetti, 1993). Dessa forma, as cininas podem contribuir para a inflamação neurogênica do trato respiratório. Todas as substâncias liberadas pela BK, ao atuarem em seus receptores, tem sido implicadas na patogênese da asma (Farmer & Burch, 1991).

A broncoconstrição causada pela injeção intravenosa de BK é fortemente inibida pela indometacina, sugerindo o envolvimento de substâncias broncoconstrictoras derivadas da via da ciclooxigenase (provavelmente tromboxano A₂) (Ichinose *et al.*, 1990). Por outro lado, a resposta broncoconstrictora à BK aplicada diretamente nas vias aéreas não é afetada pela indometacina,

sugerindo não ser esse efeito mediado por liberação de prostanóides (Ichinose *et al.*, 1990). Quando analisada *in vitro*, a BK apresenta efeitos diretos mínimos sobre as vias aéreas de muitas espécies incluindo a humana (Fuller *et al.*, 1987), canina (Waalder, 1961) e leporina (Hauge *et al.*, 1966), sugerindo que seu potente efeito broncoconstrictor observado em pacientes asmáticos é mediado indiretamente. Em contraste com estas espécies, a BK é um potente estimulante direto da musculatura lisa das vias aéreas da cobaia (Farmer *et al.*, 1989, Bramley *et al.*, 1990) e do furão (Dusser *et al.*, 1988), causando potente contração de maneira concentração-dependente. Muitos estudos realizados *in vitro* foram conduzidos com tecidos das vias aéreas de cobaia, particularmente preparações traqueais, onde a BK causa contração (Bhoola *et al.*, 1962) ou relaxamento em preparações pré-contraídas (Mizrahi *et al.*, 1982 ; Rhaleb *et al.*, 1988; Bramley *et al.*, 1990). Contudo, tanto a contração como o relaxamento causados por baixas concentrações da BK envolvem a liberação de prostanóides (Bhoola *et al.*, 1962; Farmer *et al.*, 1989; Bramley *et al.*, 1990).

Foi sugerido que as células epiteliais podem liberar prostaglandinas relaxantes tais como prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂) (Bramley *et al.*, 1990; White *et al.*, 1992), bem como uma substância não relacionada com os prostanóides denominada fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF) (para revisão ver Bertrand & Tschirhart, 1993). Essas substâncias atuam modulando o tônus e a reatividade das vias aéreas através de antagonismo funcional (Vanhoutte, 1988; Fedan & Frazer, 1992). Estudos realizados com técnicas de radioimunoensaio demonstraram a produção de PGE₂ na traquéia de cobaia com epitélio (Bramley *et al.*, 1990) e podem explicar a inibição causada pela indometacina do relaxamento epitélio-dependente induzido pela BK em cães e cobaias (Barnett *et al.*, 1988; Bramley *et al.*, 1990). Além disso, em cobaias, existem evidências sugerindo que as ações da BK podem ser moduladas pela

endopeptidase neutra (NEP) epitelial e pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Vidyasagar *et al.*, 1991). Assim, os relaxamentos epitélio-dependentes e as contrações na traquéia sem epitélio, em resposta à BK, são ambos potencializados por inibidores dessas enzimas, como o fosforamidon (inibidor da NEP) ou o captopril (inibidor da ECA) (Frossard *et al.*, 1990).

O efeito estimulatório causado pela BK nas vias aéreas após remoção epitelial pode ser relevante quando comparamos com o rompimento e perda do epitélio durante a asma (Laitinen *et al.*, 1985). O efeito da remoção do epitélio da traquéia nas respostas para muitos agentes (predominantemente constritores) foi extensamente estudado, mas os efeitos que mais chamam a atenção estão associados com o uso de ácido araquidônico, que causa relaxamento da traquéia de cobaia *in vitro*, mas após a remoção epitelial as respostas são convertidas de relaxamento para contração (Nijkamp & Folkerts, 1987; Farmer *et al.*, 1987). A resposta contrátil à BK na traquéia de furão, em contraste com o observado na traquéia de cobaia, não foi alterada pela retirada do epitélio (Dusser *et al.*, 1988). Porém, inibidores da ECA ou da NEP causaram aumento da sensibilidade da traquéia do furão à BK e à calidina (Dusser *et al.*, 1988).

A contração induzida pela BK na traquéia isolada de cobaia, a exemplo da broncoconstricção observada *in vivo* pela injeção endovenosa de altas doses de BK, também é suprimida por inibidores da ciclooxigenase (Farmer *et al.*, 1989) sugerindo que a resposta contrátil é mediada por prostaglandinas excitatórias. Quando analisada em cultura de células musculares lisas obtidas da traquéia de cobaia, a BK pode liberar PGE_2 bem como o metabólito estável da PGI_2 , a prostaciclina 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$ e a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), mas não foi detectada a liberação de tromboxano A_2 (Farmer *et al.*, 1991, 1992; White *et al.*, 1992). Na presença de indometacina, a BK em altas concentrações ($\geq 0.1 \mu M$) induziu contração traqueal

(Farmer *et al.*, 1989), sendo esse efeito mediado por mecanismos dependentes e independentes de prostaglandinas. A contração causada pela BK pode envolver o aumento dos níveis de inositol trifosfato (IP_3), pois a concentração deste segundo mensageiro nas células musculares lisas obtidas de traqueais de diversas espécies (Marsh & Hill, 1992a;b;c; 1993; Pyne & Pyne, 1993; Yang *et al.*, 1994) em cultura é elevada em resposta à BK mesmo na presença de indometacina (Pyne & Pyne, 1993b).

Foi demonstrado por vários pesquisadores que a BK e a calidina induzem uma resposta bifásica na traquéia de cobaia com epitélio (Bewley *et al.*, 1987; Bramley *et al.*, 1990). Tal resposta é caracterizada por relaxamento concentração-dependente, sendo esse efeito precedido de um pequeno e transitório pico contrátil (Bewley *et al.*, 1987; Bramley *et al.*, 1990). Com a retirada do epitélio essa resposta bifásica é parcialmente alterada para uma contração tônica concentração-dependente. Além disso, os autores observaram também relaxamento, ainda que reduzido, em segmentos de traquéia de cobaia sem epitélio, pré-contraídos com acetilcolina (Bramley *et al.*, 1990). Foi sugerido que as respostas da traquéia de cobaia à BK e à PGE_2 são dependentes do tônus das preparações (Braunstein, 1988; Bramley *et al.*, 1990). Assim, esses dois agentes podem ter efeitos relaxantes ou constrictores no músculo liso traqueal, dependendo do tônus da preparação e da presença ou não do epitélio. A participação da PGE_2 como componente inibitório nas vias aéreas é complexa, tendo sido propostas inclusive, ações inibitórias pré-juncionais sobre neurotransmissores excitatórios (Ito *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992).

1.2 - Participação da bradicinina na inflamação neurogênica

Uma das mais importantes ações da BK nas vias aéreas é sua capacidade de ativar terminais nervosos sensoriais das fibras C aferentes. A inflamação neurogênica é um processo

aonde neuropeptídeos broncoconstrictores e vasoativos, tais como substância P, neurocinina A e o CGRP, são liberados de terminais nervosos sensoriais próximos a vasos sanguíneos, glândulas secretoras e músculo liso, causando dor e hiperalgesia inflamatória (Payan, 1989; Barnes, 1992; Geppetti, 1993). Em cobaias, a resposta broncoconstrictora à BK inalada é reduzida pela atropina e pela capsaicina, indicando que tanto um reflexo colinérgico como liberação de neuropeptídeos dos nervos sensoriais participam dessa resposta (Ichinose *et al.*, 1990; Geppetti, 1993). Foi demonstrado também que a BK causou importante liberação de taquicininas imunorreativas em traquéia de rato e de cobaia (Ray *et al.*, 1989; Manzini *et al.*, 1989) e pulmão de cobaia perfundidos (Saria *et al.*, 1988). Similar liberação foi também acompanhada pela estimulação nervosa vagal, presumivelmente devido à estimulação antidrômica de fibras C aferentes (Saria *et al.*, 1988).

O extravasamento microvascular imediato nas vias aéreas induzido pela BK é parcialmente mediado via liberação de neuropeptídeos (provavelmente substância P) dos nervos sensoriais. Em ratos, a injeção local de BK na traquéia causou extravasamento de proteínas que foi drasticamente reduzido pelo tratamento neonatal com capsaicina (Lundberg & Saria, 1983). A injeção endovenosa de BK também aumentou a permeabilidade microvascular das vias aéreas de cobaias (Qian *et al.*, 1993) e esse efeito foi inibido pela capsaicina e pelo CP 96,345 (antagonista dos receptores NK_1) (Qian *et al.*, 1993). O extravasamento microvascular prolongado induzido pela BK, na cobaia parece envolver a liberação de prostaglandinas e PAF, pois tanto o WEB 2086, um antagonista do PAF, como a indometacina inibiram o efeito da BK (Rogers *et al.*, 1990). Além disso, a BK *per se* também aumenta a permeabilidade vascular, contribuindo ainda mais para a resposta inflamatória aguda em diferentes espécies animais. Mais recentemente, foi demonstrado que a BK induz a uma resposta contrátil concentração-dependente na traquéia de

cobaia, efeito esse que sugere um sítio de ação pré-sináptico, liberando produtos da ciclooxigenase e possivelmente através da estimulação de fibras C aferentes (Molimard & Advenier, 1993).

Em pacientes asmáticos, a resposta broncoconstrictora à BK é também reduzida pelo pré-tratamento com drogas anticolinérgicas, indicando que o reflexo colinérgico é importante na resposta *in vivo* (Fuller *et al.*, 1987). A BK pode ser um importante mediador da tosse e do desconforto torácico em pacientes asmáticos (Choudry *et al.*, 1989) e está implicada na tosse induzida por inibidores da enzima conversora de angiotensina (Fuller, 1989). Além disso, as prostaglandinas tais como a PGE₂ e a PGF_{2α} podem contribuir em parte para essas ações da BK (McEwan *et al.*, 1990).

1.3 - Receptores para as cininas nas vias aéreas

A distribuição de receptores B₂ foi mapeada em pulmão humano e de cobaias por autorradiografia com BK (Mak & Barnes, 1991). Há uma alta densidade de sítios ligantes nas células epiteliais, músculos lisos das vias aéreas (particularmente nas vias aéreas periféricas), glândulas submucosas, nervos e pulmões (Mak & Barnes, 1991; Barnes, 1992). Ao contrário, vários trabalhos sugerem que não existe evidência funcional para a participação do receptor B₁ nas ações da BK nas vias aéreas (Rhaleb *et al.*, 1990; Farmer *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1989). Além disso, foi proposta a existência de um receptor B₃ na musculatura lisa das vias aéreas (Farmer *et al.*, 1989; 1991a,b), mas existem muitas dúvidas acerca de sua existência, pois foi definido com antagonistas pouco potentes (D-Phe⁷-substituídos) (Stewart & Vavrek, 1990; Farmer *et al.*, 1989, Farmer & Burch, 1991; 1992). Em experimentos de broncoconstricção, antagonistas desse grupo, o D-Arg-[Hyp³, D-Phe⁷]-BK (NPC 567) e o D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (NPC

349) (Steranka *et al.*, 1989), administrados por via endovenosa ou por inalação, inibiram apenas parcialmente a broncoconstrição induzida pela BK (Farmer *et al.*, 1989).

Quando analisada *in vitro*, a contração induzida pela BK na traquéia e no parênquima pulmonar de cobaia foi resistente à inibição por diversos análogos da BK, incluindo o D-Arg[Hyp³,Thi^{5,8}D-Phe⁷]-BK (NPC 349), o D-Arg-[Hyp³,D-Phe⁷]-BK (NPC 567), o [D-Phe⁷]-BK (NPC 361) e o [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (NPC 431) (Farmer *et al.*, 1989), que mostraram baixa afinidade quando comparados com outras preparações (Hall, 1992). Estudos com o emprego de radioligantes realizados na musculatura lisa do pulmão e da traquéia de cobaia revelaram sítios de ligação saturáveis e específicos para a BK (Farmer *et al.*, 1989). No entanto, o NPC 567 e o NPC 349 não deslocaram a BK dos sítios de ligação em membranas obtidas de traquéia de cobaia, já em membranas pulmonares, estes antagonistas B₂ deslocaram cerca de 60% do "binding" total da BK (Farmer *et al.*, 1989). Estudos de "binding" realizados em pulmão por Mak & Barnes (1991), mostraram que o NPC 349 deslocou somente 70% do "binding" específico à BK. Esses resultados sustentaram, em parte, a hipótese de um novo tipo ou subtipo de receptor B₂ para a BK nas vias aéreas, denominado receptor B₃ (Farmer *et al.*, 1989).

Com relação ao relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia com epitélio (Mizrahi *et al.*, 1982; Rhaleb *et al.*, 1988; Bramley *et al.*, 1990; Bewley *et al.*, 1987), foi proposto que os receptores envolvidos na resposta relaxante da BK na traquéia isolada de cobaia são do tipo B₂ (Mizrahi *et al.*, 1982). Entretanto, apesar da alta atividade do agonista seletivo de receptores B₂, [Tyr(Me)⁸]-BK, um grande número de antagonistas D-Phe⁷-BK, não inibiram o relaxamento causado pela BK nas preparações traqueais (Rhaleb *et al.*, 1988). Sugeriu-se também que o efeito relaxante causado pela BK na traquéia de cobaia, mediado por liberação de PGE₂ poderia ocorrer por mecanismos independentes da ativação do receptor B₂, através de um

mecanismo indireto via ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (Regoli *et al.*, 1990; Mizrahi *et al.*, 1982; Rhaleb *et al.*, 1988). Recentemente foram identificados, através de estudos com uso de radioligantes, dois sítios de ligação nas células epiteliais traqueais em cultura: um com alta e outro com baixa afinidade; esse último está relacionado com a produção de PGE₂. Ambos os sítios foram bloqueados pelos antagonistas B₂ o HOE 140 e o NPC 567, sendo que o HOE 140 mostrou afinidade comparável à da BK nos dois sítios (Proud *et al.*, 1993). Evidências adicionais de subtipos de receptores foram obtidas com cultura de células musculares lisas das vias aéreas. Assim, estudos bioquímicos com traquéia de cobaia mostraram que a BK estimulou a síntese de PGE₂ e PGI₂ e induziu um efluxo de cálcio (⁴⁵Ca²⁺). Este último efeito foi resistente às ações dos antagonistas dos receptores B₂ (Farmer *et al.*, 1991). Por outro lado, o novo antagonista de receptor B₂, o [Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Tic⁸]-BK (NPC 16731) inibiu completamente o efluxo de ⁴⁵Ca²⁺ induzido pela BK em células musculares lisas traqueais mantidas em cultura (Farmer *et al.*, 1991).

1.4 - Papel do óxido nítrico nas vias aéreas

Atualmente está bem estabelecido que a BK e peptídeos relacionados produzem vasodilatação endotélio-dependente pela liberação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), recentemente identificado como NO (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). A resposta vasorrelaxante endotélio-dependente causada pela BK é mediada através da ativação dos subtipos de receptores B₁ e B₂ (Wiemer & Wirth, 1992; Schini *et al.*, 1990) e em alguns leitos vasculares a BK pode liberar radicais livres derivados do oxigênio, como resultado da estimulação de PLA₂ que, por sua vez, determina a liberação de prostanóides (Kontos *et al.*, 1984).

Estudos recentes demonstraram que o NO está presente em muitos tecidos (para revisão ver Moncada *et al.*, 1991) e que a resposta relaxante causada pela BK em diversos tecidos tais como corpo cavernoso humano (Kimoto *et al.*, 1990), artéria coronária de porco (Cowan & Cohen, 1991; Vials & Burnstock, 1992), rim de rato (Fulton *et al.*, 1992), coração isolado de cobaia (Kelm & Schrader, 1988) é mediado, ao menos em parte, pela liberação de NO ou uma substância a ele relacionada. Além disso, existem numerosos estudos indicando que o NO pode atuar como uma substância inibitória não-adrenérgica, não-colinérgica (NANC) em um grande número de tecidos, incluindo a traquéia (Buga *et al.*, 1989; Gibson *et al.*, 1990; Lefebvre *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1993; Balligand *et al.*, 1993; Knudsen & Tottrup, 1992; Tucker *et al.*, 1990; Kannan & Johnson, 1992; Fischer *et al.*, 1993). Evidências recentes indicam que o NO está presente no ar exalado por coelho, cobaia e homem (Gustafsson *et al.*, 1991). Foi também demonstrado que o epitélio, bem como o músculo liso das vias aéreas, podem secretar NO e/ou compostos NO-relacionados (Munakata *et al.*, 1990; Burke-Wolin *et al.*, 1992). Estes produtos produzem aumento dos níveis de GMP_c intracelular e conseqüentemente, induzem relaxamentos do músculo liso das vias aéreas, tanto em tecidos humanos como naqueles obtidos de animais (Gillespie & Sheng, 1988; Gaston *et al.*, 1992)

2 - OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

Analisar através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores B_1 e B_2 para as cininas, bem como com o auxílio de bloqueadores seletivos de canais iônicos e de inibidores de várias enzimas, os mecanismos de ação envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes causadas pela BK na traquéia isolada de cobaia.

Investigar a possível participação da via L-arginina/NO no relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na traquéia isolada de cobaia com o auxílio de antagonistas seletivos da síntese de NO, a N^w -nitro-L-arginina (L-NOARG) e a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA), e do D-enantiômero da L-NMMA, o D-NMMA, bem como com o auxílio do azul de metileno, um agente que inibe a guanilato ciclase solúvel ativada pelo NO. Além disso, foi avaliado o efeito de inibidores da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico oriundos da via da ciclooxigenase isoladamente ou em combinação com a L-NOARG e a L-NMMA, no relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na traquéia de cobaia.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 - Isolamento e montagem das preparações

Cobaias de ambos os sexos (200 - 400 g) foram sacrificadas com pancada na cabeça, seguida de secção das artérias carótidas. A traquéia foi rapidamente removida e cuidadosamente dissecada dos tecidos adiposo e conectivo. Usualmente quatro anéis transversos (3 - 4 mm de largura) foram obtidos de cada animal. Os anéis foram abertos e preparações com cerca de 8-10 mm de comprimento foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução nutritiva de Krebs-Henseleit mantida à 37°C através de banho circulante, pH 7.2 - 7.4, borbulhada com 5% de CO₂ em 95% de O₂ com a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.1, KH₂PO₄ 1.1 e glicose 11. As preparações permaneceram em equilíbrio durante 60 - 120 min antes da adição de drogas ao banho, sob tensão basal de 1 g, sendo a solução nutriente renovada a cada 15 min. As alterações na tensão foram registradas por meio de transdutores de força F-60 acoplados a registrador Narco 40 (ambos da Narco Biosystems). Quando as preparações foram montadas para análise do relaxamento, o epitélio da traquéia foi mantido íntegro, enquanto que para estudo da contração o epitélio foi removido com auxílio de algodão imerso na solução nutriente (Flavahan *et al.*, 1985). A integridade do epitélio foi avaliada pela capacidade da BK (100 nM) em induzir relaxamento. As preparações foram consideradas com epitélio íntegro quando a BK (100 nM) causou cerca de 80% de relaxamento relativo à sua resposta máxima (ou seja, aproximadamente 300-400 mg), em preparações sob tensão basal de 1 g. A completa remoção do epitélio foi confirmada quando a BK (100-300 nM) causou somente contrações acima de 200 mg.

3.2 - Procedimentos experimentais

3.2.1 - Análise da reatividade das preparações às cininas e outros agonistas

Decorrido o período de equilíbrio de 60 minutos, as preparações foram contraídas com solução rica em potássio (por substituição equimolar de 80 mM de NaCl por KCl). Após o completo relaxamento das preparações seguindo-se a sucessivas lavagens, foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta à BK, lisil-BK, metionil-lisil-BK ou tirosina⁸-BK (1 - 3000 nM) ou para outros agonistas incluindo a endotelina-1 (0,1 - 100 nM), substância P (1 nM - 10 μ M), carbacol (10 nM - 300 μ M), histamina (0,01 - 300 μ M), prostaglandina F_{2 α} (0,01 - 100 μ M), Bay-K 8644 (0,01 - 100 μ M, ativador de canais de cálcio do tipo "L" dependentes de voltagem), serotonina (0,01 - 10 μ M) ou pelo U 46619 (0,1 - 300 nM, análogo estável do tromboxano A₂/prostaglandina H₂-mimético). Nos experimentos aonde foram analisadas as ações das cininas ou ET-1, apenas uma única curva concentração-resposta completa foi obtida para cada agonista na mesma preparação. As respostas para a BK e demais cininas foram obtidas na presença de captopril (3 μ M), para evitar sua degradação pelas cininases II. As respostas contráteis obtidas para o KCl (80 mM, por substituição equimolar de NaCl) antes da adição de drogas ao banho foram consideradas como 100%.

3.2.2 - Efeito relaxante das cininas na traquéia de cobaia com epitélio

Em outra série de experimentos, após o período de equilíbrio e a confirmação da presença de epitélio das preparações, foram obtidas curvas concentração-resposta completas através de método não-cumulativo à BK, lisil-BK, metionil-lisil-BK e tirosina⁸-BK (0.1 - 1000 nM) em preparações sob tensão basal (1 g) ou à BK (0,1-1000 nM) em preparações pré-contraídas pelo carbacol (0,1 - 1 μ M), a intervalos de 20 min entre cada concentração.

3.2.3 - Efeito de antagonistas seletivos dos receptores B₂ sobre a resposta bifásica da traquéia de cobaia à bradicinina

Após a obtenção de pelo menos duas respostas estáveis à BK (100 nM) (contração ou relaxamento), foram incubadas ao banho concentrações crescentes de HOE 140, NPC 17731 ou NPC 17761 (1 - 1000 nM, antagonistas potentes e seletivos dos receptores B₂) por 10 min e novas respostas foram obtidas à BK (100 nM) na presença dos mesmos. Somente um antagonista foi testado por tecido. Além disso, foi também analisada a influência da des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (1 μM, antagonista seletivo dos receptores B₁) sobre as respostas contráteis ou relaxantes à BK.

Em outra série de experimentos, decorrido o período de equilíbrio das preparações, foram construídas curvas concentração-resposta completas de contração (cumulativas) ou de relaxamento (não-cumulativas) à BK (0,1 - 3000 nM) na ausência ou na presença do HOE 140 ou NPC 17761 (0,1 - 30 nM), adicionados às preparações 10 min antes. Visando eliminar o estabelecimento de taquifilaxia, somente uma única curva concentração-resposta completa foi obtida à BK em cada tecido.

3.2.4 - Efeito de várias classes de drogas sobre a resposta contrátil ou relaxante da traquéia à bradicinina

Decorrido o período de equilíbrio das preparações, foram obtidas curvas de contração ou de relaxamento à BK (100 nM) na ausência ou na presença de uma das seguintes drogas: indometacina (1 μM, inibidor de ciclooxigenase), fenidona (30 μM, inibidor de ciclooxigenase e de lipoxigenase), forbol (1 μM, ativador da proteína cinase C), H-7 (30 μM) e estaurosporina (0,3 μM) (inibidores da proteína cinase C), tetrodotoxina (0,3 μM, bloqueador de canais de sódio voltagem-dependentes), dazoxiben (1 μM, inibidor da tromboxano-sintetase), pirilamina (1 μM,

antagonista dos receptores H_1 para a histamina), atropina (1 μM , antagonista muscarínico), apamina (0,3 μM , bloqueador de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+}), glibenclamida (1 μM , bloqueador de canais de K^+ dependentes de ATP), cloreto de níquel (100 μM , bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo T), nicardipina (1 μM , diidropiridina que bloqueia canais de Ca^{2+} do tipo "L"), quinacrina (10 μM , inibidor de fosfolipase A_2), CP 96,345 (1 μM , antagonista dos receptores NK-1 para taquicininas), propranolol (1 μM , antagonista dos receptores β -adrenérgicos), L-655,240 (0.03 μM , antagonista seletivo dos receptores TP para tromboxano), LY 171883 (0,3 μM) e MK-571 (0,3 μM) (antagonistas dos receptores do leucotrieno D_4 e E_4), WEB 2086 (0,3 μM , antagonista dos receptores para o PAF), CGRP_{8-37} (0,1 μM , antagonista dos receptores para o CGRP) ou o [D-p-Cl-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP (0,1 μM , antagonista dos receptores para o peptídeo intestinal vasoativo - VIP). Todas as drogas permaneceram em contato com os tecidos por cerca de 20 - 30 min, com exceção do forbol éster (60 min).

Além disso, foi também analisada a influência do cálcio externo sobre a resposta contrátil à BK (100 nM). Após a obtenção da resposta controle à BK, a solução nutritiva foi substituída por outra similar mas livre de cálcio contendo EGTA (1mM), e novas curvas à BK (100 nM) foram obtidas em meio sem cálcio.

3.2.5 - Possível participação do óxido nítrico no relaxamento causado pela bradicinina na traquéia de cobaia

Decorrido o período de equilíbrio das preparações sob tônus basal (1 g), foram obtidas curvas concentração-resposta não-cumulativas completas à BK (0,3 a 1000 nM) a intervalos de 20 min entre cada concentração. Com o objetivo de analisar o possível efeito da inibição da síntese do NO nas ações da BK, as respostas relaxantes causadas pela adição de BK (100 nM)

foram obtidas na ausência ou na presença da N^G-metil-L-arginina (L-NMMA) ou N^w-nitro-L-arginina (L-NOARG) (1 - 100 μ M, inibidores seletivos e competitivos da síntese de NO) incubados com as preparações 20 min antes da adição de BK (100 nM). Para obter mais informações sobre a participação do NO no relaxamento induzido pela BK, foram obtidas respostas relaxantes à BK (100 nM) na presença de excesso de L-arginina (substrato para a formação de NO) ou do seu isômero inativo a D-arginina (ambos 1 mM), ou ainda na presença do D-enantiômero do L-NMMA, o D-NMMA (100 μ M), incubados simultaneamente no banho por 20 min. Para efeito de comparação e da análise da especificidade dos inibidores de NO usados, foram obtidas respostas relaxantes ao isoproterenol (que produz relaxamento por ativação de receptores β_2 adrenérgico e aumento dos níveis de AMP_c intracelular), ou para o nitroprussiato de sódio (droga vasodilatadora que gera NO sem ativação da NO-sintase), na ausência ou na presença dos inibidores de NO. Em outro grupo de experimentos foi investigado o efeito do azul de metileno (10 μ M, droga que inibe a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO) sobre o relaxamento à BK, sendo essas drogas incubadas com as preparações 20 min antes.

3.2.6 - Contribuição da combinação de inibidores da ciclooxigenase e inibidores do óxido nítrico sobre a resposta relaxante à bradicinina

Com o objetivo de analisar a contribuição dos produtos derivados das ciclooxigenases do ácido araquidônico sobre o relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia, após a obtenção da resposta relaxante estável à BK (100 nM), as preparações foram incubadas por 30 min com indometacina (0,3 - 10 nM) ou pela combinação de indometacina (1 nM) com L-NOARG ou L-NMMA (100 μ M) e novas respostas relaxantes à BK (100 nM) foram obtidas em suas presenças. Para corrigir a eventual redução do tônus espontâneo das preparações na

presença de indometacina, foram adicionados ao banho baixas concentrações do análogo estável de tromboxano A_2 /prostaglandina H_2 -mimético U46619 (0,1 - 10 nM).

3.3 - Drogas e reagentes utilizados

Bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), lisil-bradicinina, metionil-lisil-bradicinina, tirosina⁸-bradicinina, substância P (Arg-Pro-Lis-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gli-Leu-Met-NH₂), captopril, cloridrato de carbacol, difosfato de histamina, N^w-nitro-L-arginina, N^G-monometil-L-arginina, L-arginina, D-arginina, N^G-monometil-D-arginina, nitroprussiato de sódio (nitroferrocianeto sódico), azul de metileno, indometacina, bitartarato de L-isoproterenol, 5-hidroxitriptamina (complexo creatinina sulfato), maleato de pirilamina, sulfato de atropina, apamina, diidrocloreto de quinacrina, fenidona (1-fenil-3-pirazolona), EGTA (etilenoglicol-bis-(β-amino-etil éter)N,N'-tetra-ácido acético), prostaglandina E₂, CGRP₈₋₃₇, [D-p-Cl-Phe⁶,Leu¹⁷]-VIP, DL-propranolol, estaurosporina, tetrodotoxina, H-7 (1(5-isoquinolinil sulfonil)-2 metilpiperazina), hidrocloreto de nicardipina, PBS (solução tampão-fosfato, concentração: NaCl 137 mmol; KCl 2.7 mmol e tampão fosfato 10 mmol), albumina bovina (grau V), (todas obtidas da Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), prostaglandina F_{2α} (Enzaport F-Chinoin-Hungria), endotelina-1 (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japão), Bay K 8644 (metil-1,4-diidro-2,6-dimetil-3-nitro-4-(2-trifluorometilfenil)-piridina-5-carboxilato) (Bayer Leverkusen, Alemanha), U 46619 (9,11-dideóxi-9α, 11α-metanoepóxi prostaglandina F_{2α} (Up John, Kalamazoo, MI, EUA), HOE 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) e glibenclamida (Hoescht, Frankfurt, Alemanha), NPC 17731 (D-Arg⁰ [Hip³, D-Hip^E (trans-propil)⁷, Oic⁸]-BK) e NPC 17761 (D-Arg⁰ [Hyp³, D-Hip^E(trans-tiofenil)⁷, [Oic⁸]-BK (Scios Nova, Baltimore, EUA), des-arg⁹-bradicinina e des-arg⁹[leu⁸]-bradicinina (Península, Belmont, CA, EUA), cloreto de níquel-6-hidrato (Riedel-de Haën, Alemanha), forbol-12 miristato 13 acetato (L. C. Services Corporation, MA, EUA), CP

96,345 ((C25,35)-cis-2-(difenilmetil)-N-[(2-metoxifenil)-metil]-1-azobicyclo[2.2.2.] octan-3-amina] (Research Biochemicals International, MA, EUA), dazoxiben (UK-37,248-01) (Pfizer Central Research, Kent, Inglaterra), LY 171883 (Lilly Research Laboratories, Eli Lilly & Co., Ind., EUA), WEB 2086 (3-(4-[2-clorofenil]-9-metil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]-triazolo-[4,3-a][1,4]-diazepina-2-yl)-1-(4-mofolinil)-1-propanona) (Du Pont NEN, MA, EUA), L-655,240 (gentilmente cedido pelos Doutores Pedro D'Orléans-Juste e Pierre Sirois, Universidade de Sherbrooke, Canadá), L-660,711 (MK-571) (Merck Frosst, Québec, Canadá). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e de procedência Merck.

3.4 - Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto as CE_{50} (concentração que produz 50% do efeito máximo em experimentos individuais) e as CI_{50} (concentração dos inibidores que produziu 50% de inibição da resposta em relação aos grupos controle, em experimentos individuais), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança ao nível de 95% (Fleming *et al.*, 1972). Os valores das CE_{50} e das CI_{50} são determinados a partir de experimentos individuais de curva concentração-resposta completas ao agonista ou ao antagonista, respectivamente, usando o método dos quadrados mínimos. Experimentos controles (preparações obtidas do mesmo animal) foram conduzidos em paralelo na presença de PBS visando corrigir eventuais mudanças espontâneas da reatividade das preparações. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de teste *t* de Student para amostras relacionadas ou não, ou através de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação pelo método de Dunnett, quando apropriado. $P < 0.05$ ou menos foi considerado como indicativo de significância.

4 - RESULTADOS

4.1 - Efeito contrátil das cininas e demais agonistas na traquéia isolada de cobaia sem epitélio

Os resultados da figura 1 (A e B) mostram que a adição de concentrações crescentes de BK (0,1 nM - 10 μ M), lisil-BK (0,1 - 3000 nM), metionil-lisil-BK (0,1 - 3000 nM), tirosina⁸-BK (0,1 - 3000 nM), endotelina-1 (0,1 - 100 nM), substância P (0,1 - 3000 nM), carbacol (1 nM - 100 μ M), histamina (3 - 300 μ M), prostaglandina F_{2 α} (3 nM - 100 μ M), Bay K 8644 (3 nM - 100 μ M), serotonina (1 nM - 10 μ M) ou U 46619 (0,1 - 300 nM) determinou resposta contrátil concentração-dependente na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Além disso, apenas foi observada evidência de taquifilaxia aos efeitos contráteis causados pelas cininas, endotelina-1 e para o U 46619 (resultados não apresentados). Os resultados da Tabela 1 indicam que a ordem de potência encontrada foi: endotelina-1 \geq U 46619 \geq tirosina⁸-BK \geq BK \geq Lisil-BK \geq metionil-lisil-BK \geq substância P $>$ serotonina \geq histamina \geq carbacol $>$ Bay K 8644 \geq Prostaglandina F_{2 α} . Porém, no que se refere à resposta máxima obtida, nas concentrações testadas, o carbacol desenvolveu maior tensão, seguido da substância P $>$ histamina $>$ U 46619 $>$ endotelina-1 = metionil-lisil-BK $>$ lisil-BK $>$ tirosina⁸-BK = BK = prostaglandina F_{2 α} = serotonina $>$ Bay K 8644 (Tabela 1). O agonista de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, até a concentração de 1 μ M foi inativo (Figura 1 A).

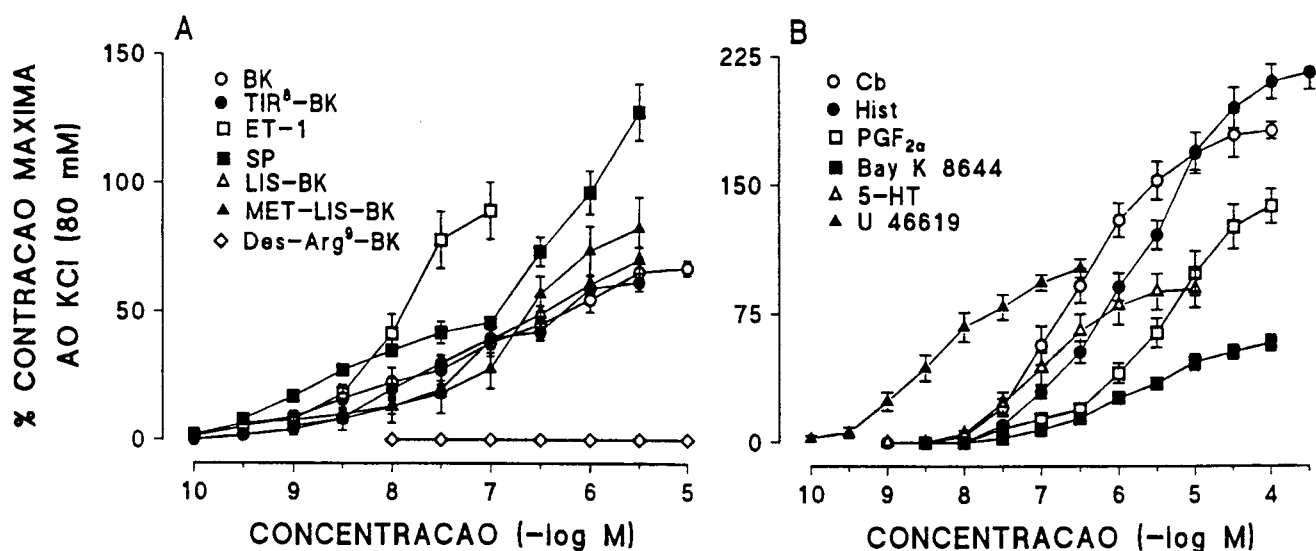


FIGURA 1 - Curvas concentração-resposta médias obtidas para a bradicinina (BK), endotelina-1 (ET-1), substância P (SP), lisil-BK (Lis-BK), metionil-lisil-BK (Met-Lis-BK) e des-Arg⁹-BK (A) ou para o carbacol (Cb), histamina (His), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), Bay K 8644, serotonina (5-HT) ou para o U 46619 (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as linhas verticais indicam os erros padrão das médias.

Tabela 1- Potência e respostas contráteis máximas obtidas para as cininas e outros agonistas na traquéia isolada de cobaia sem epitélio.

Agonista	CE ₅₀	Resposta máxima % KCl (80 mM)	Resposta máxima (g)
Endotelina-1 (nM)	6,3 (3,5 - 11,0) ^a	89 ± 11	0,64 ± 0,06
U 46619 (nM)	5,2 (2,2 - 12,0)	105 ± 5	0,73 ± 0,04
Tirosina ⁸ -BK (nM)	31,3 (18 - 54,0)	61 ± 3	0,47 ± 0,07
Bradicinina (nM)	40,0 (19 - 83,0)	65 ± 4	0,44 ± 0,03
Lisil-BK (nM)	56,0 (20 -155,0)	70 ± 5	0,55 ± 0,10
Metionil-lisil-BK (nM)	77,0 (23 -125,0)	83 ± 13	0,59 ± 0,07
Substância P (nM)	84,0 (66 -105,0)	141 ± 12	0,86 ± 0,07
Serotonina (μM)	0,1 (0,1 - 0,2)	90 ± 11	0,45 ± 0,09
Carbacol (μM)	0,4 (0,2 - 0,8)	183 ± 15	1,12 ± 0,17
Histamina (μM)	0,2 (0,8 - 3,0)	216 ± 15	0,77 ± 0,06
Bay K 8644 (μM)	1,6 (1,0 - 2,5)	58 ± 5	0,30 ± 0,02
Prostaglandina F _{2α} (μM)	2,0 (1,4 - 2,6)	126 ± 15	0,44 ± 0,07

Cada grupo representa a média de 5 a 6 experimentos.

a - Limite de confiança (P < 0,05)

4.2 - Análise da resposta relaxante causada pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia com epitélio

A adição de BK e análogos (0,1 - 3000 nM) na traquéia de cobaia sob tônus normal, determinou discreto efeito contrátil, seguido de resposta relaxante lenta que ocorreu de maneira concentração-dependente (Figuras 2 e 3). O efeito relaxante da BK foi bem reproduzível, sem evidência de taquifilaxia. As CE_{50} e as respostas máximas causadas estão representadas na Tabela 2, indicando que a ordem de potência foi tirosina⁸-BK > lisil-BK ≥ BK ≥ metionil-lisil-BK e em relação à resposta máxima a seqüência foi BK = tirosina⁸-BK > lisil-BK ≥ metionil-lisil-BK.

Já nas preparações contraídas pelo carbacol (0,01 - 1 μ M), a adição de BK (0.1 - 1000 nM) causou relaxamentos concentração-dependentes (Figura 3 A). As CE_{50} e as respostas máximas estão representadas na Tabela 2. Porém, cerca de 40% das preparações com epitélio falharam em apresentar respostas relaxantes à BK (resultados não apresentados).

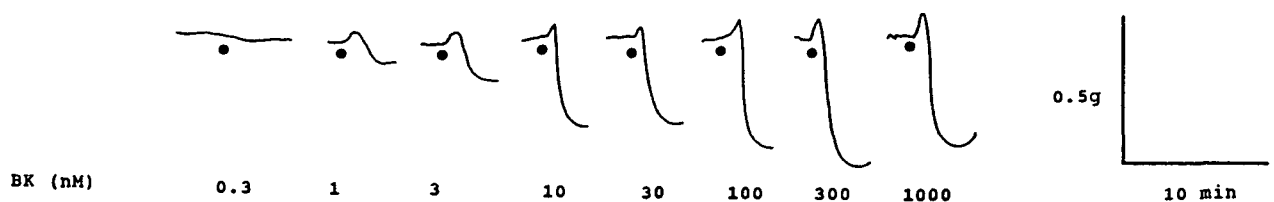


FIGURA 2 - Registro típico representativo mostrando o efeito relaxante causado pela bradicinina (BK) na traquéia isolada de cobaia com epitélio, submetida a tensão basal de 1 g. Resultados similares obtidos em 5 a 7 experimentos adicionais.

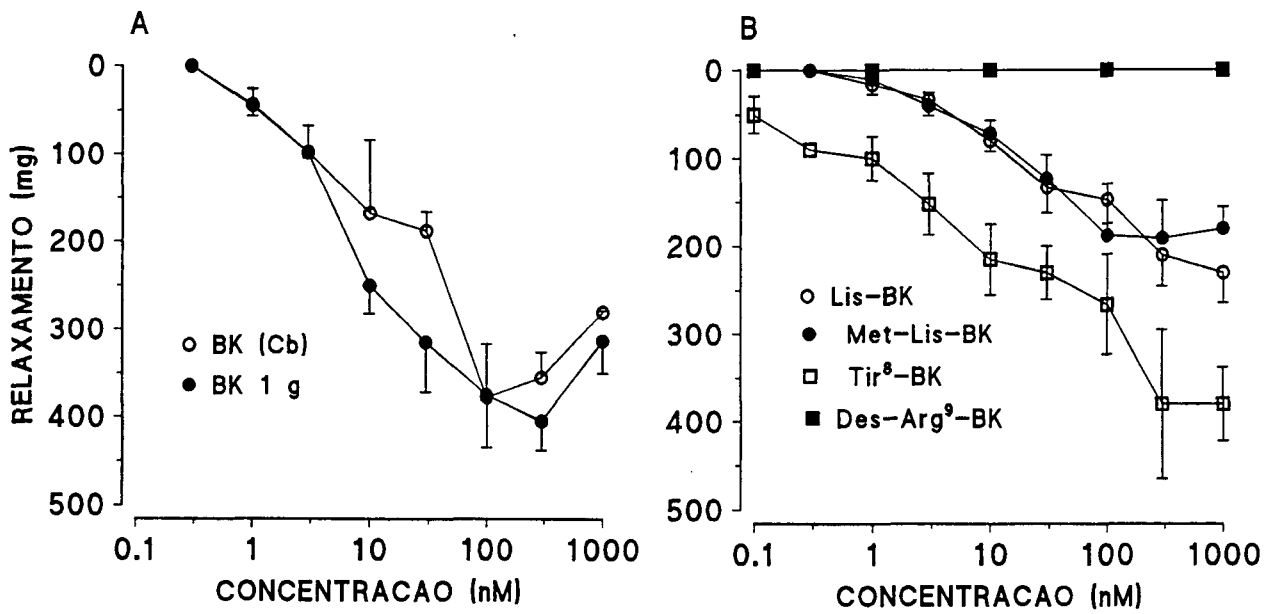


FIGURA 3 - Curvas concentração-resposta médias de relaxamento para a bradicinina (BK) na traquéia isolada de cobaia com epitélio submetida a tensão basal de 1 g ou nas preparações pré-contraídas pelo carbacol (Cb, 0,01 - 1 μ M) (A) ou para os análogos da BK, tirosina⁸-BK (Tir⁸-BK), lisil-BK (Lis-BK) ou metionil-lisil-BK (Met-Lis-BK) e des-Arg⁹-BK na traquéia de cobaia com epitélio sob tensão basal de 1 g (B). Cada ponto representa a média de 5-6 experimentos e as linhas verticais indicam os erros padrão das médias.

Tabela 2 - Potência e respostas relaxantes máximas obtidas para as cininas na traquéia de cobaia com epitélio.

Agonistas	CE₅₀ (nM)	Relaxamento máximo
Tirosi⁸-BK^{**}	5,8 (4,2 -8,1)[*]	380 ± 42
BK[*]	17,7 (3,1-69,4)	450 ± 50
Lisil-BK^{**}	18,0 (11 - 29)	230 ± 34
BK^{**}	21,1 (6,3-69,6)	380 ± 49
Metionil-lisil-BK^{**}	30,0 (13 - 70)	191 ± 43

Cada grupo representa a média de 6 experimentos.

*** Limite de confiança (P < 0,05)**

*** Pré-contraído pelo carbacol (0,1 - 1,0 μM).**

**** Tônus normal de 1 g.**

4.3 - Influência de diferentes grupos de drogas sobre a resposta bifásica à bradicinina

A resposta contrátil causada pela BK (100 nM) nas preparações sem epitélio foi inibida significativamente pela indometacina (1 μM), forbol (1 μM), H-7 (30 μM) ou fenidona (10 μM). Ao contrário, o dazoxiben (1 μM) potencializou significativamente a resposta contrátil à BK, enquanto que a tetrodotoxina (0,3 μM), pirilamina (1 μM), atropina (1 μM), apamina (0,3 μM), glibenclamida (1 μM), cloreto de níquel (100 μM), nicardipina (1 μM), estaurosporina (0,3 μM), quinacrina (10 μM), CP 96,345 (1 μM), propranolol (1 μM), L-655,240 (0,03 μM), WEB 2086 (0,3 μM), LY 171883 (0,3 μM), MK-701 (0,3 μM), CGRP₈₋₃₇ (0,1 μM), des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (1 μM), ou a remoção de cálcio da solução nutriente e adição de EGTA, não afetaram a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia (Tabela 3). Dentre essas drogas apenas indometacina, fenidona promoveram redução do tônus das preparações e o CGRP₈₋₃₇ discreta elevação na tensão.

Tabela 3 - Influência de diferentes classes de drogas sobre a contração induzida pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio.

Droga	Concentração (μ M)	Contração (mg)	
		Ausência	Presença
Pirilamina	1	366 \pm 130	370 \pm 128
Atropina	1	628 \pm 100	582 \pm 77
Apamina	0,3	786 \pm 125	776 \pm 73
Glibenclamida	1	391 \pm 79	404 \pm 69
Tetrodotoxina	0,3	630 \pm 9	523 \pm 80
Cloreto de níquel	100	486 \pm 36	414 \pm 39
Nicardipina	1	353 \pm 18	316 \pm 20
Estaurosporina	0,3	367 \pm 70	355 \pm 50
Forbol ester	1	371 \pm 23	237 \pm 27**
H - 7	30	882 \pm 39	470 \pm 67**
Quinacrina	10	259 \pm 40	219 \pm 49
0 Ca ²⁺ /EGTA	-	360 \pm 23	323 \pm 34
Indometacina	1	720 \pm 180	210 \pm 60**
Fenidona	30	423 \pm 90	278 \pm 71*
CP 96345	1	476 \pm 90	565 \pm 143
Dazoxiben	1	325 \pm 15	491 \pm 28**
WEB 2086	0,3	344 \pm 51	360 \pm 67
LY 171883	0,1	444 \pm 77	480 \pm 84
MK - 571	0,3	440 \pm 35	416 \pm 57
CGRP ₈₋₃₇	0,03	390 \pm 5	366 \pm 28
L 655,240	0,1	366 \pm 28	453 \pm 35
Des-Arg ⁹ [Leu ⁸]-BK	1,0	368 \pm 46	368 \pm 58

*P < 0,05 **P < 0,01, em relação ao respectivo controle.

Cada grupo representa a média de 5 - 14 experimentos.

Por outro lado, o relaxamento induzido pela BK (100 nM) foi significativamente inibido pela apamina (0,3 μ M), nicardipina (1 μ M) ou indometacina (10 nM). Porém, a resposta relaxante à BK não foi afetada pela des-Arg⁹[Leu⁸]-BK, atropina (1 μ M), tetrodotoxina (0,3 μ M), glibenclamida (1 μ M), NiCl₂ (100 μ M), propranolol (1 μ M), estaurosporina (0,3 μ M), quinacrina (10 μ M) ou pelo [D-p-Cl-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP (0,03 μ M) (Tabela 4). Nenhuma dessas drogas interferiram significativamente no tônus das preparações.

Tabela 4 - Influência de diferentes classes de drogas sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio.

Droga	Concentração (μ M)	Relaxamento (mg)	
		Ausência	Presença
Atropina	1	183 \pm 34	197 \pm 62
Apamina	0,3	270 \pm 30	181 \pm 27*
Glibenclamida	1	236 \pm 20	254 \pm 23
Tetrodotoxina	0,3	329 \pm 36	313 \pm 35
Cloreto de níquel	100	400 \pm 30	355 \pm 40
Nicardipina	1	324 \pm 24	184 \pm 20**
Quinacrina	1	396 \pm 38	324 \pm 31
Antagonista-VIP ^a	0,03	405 \pm 56	350 \pm 99
Propranolol	1	384 \pm 75	441 \pm 60
Estaurosporina	0,3	258 \pm 35	313 \pm 66
Des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK	1	420 \pm 28	440 \pm 25

*P < 0,05 **P < 0,01, em relação ao respectivo controle.

^a- [D-p-Cl-Phe⁶, Leu¹⁷]-VIP

Cada grupo representa a média de 5 - 14 experimentos.

4.4 - Efeito de antagonistas seletivos de receptores B₂

A incubação das preparações com o HOE 140, NPC 17731 ou o NPC 17761 (1 - 1000 nM) (antagonistas seletivos dos receptores B₂) inibiu de maneira concentração-dependente e reversível a contração causada pela adição de BK (100 nM) (Figura 4 A). As CI₅₀ estão relacionadas na Tabela 5, e indicam que a ordem de potência foi: HOE 140 > NPC 17761 > NPC 17731. No entanto, apenas o HOE 140 foi capaz de inibir completamente a resposta contrátil à BK (Figura 4 A). As CI₅₀ relacionadas na Tabela 4 indicam que a ordem de potência de inibição da contração foi a seguinte: HOE 140 > NPC 17761 > NPC 17731, sendo que o HOE 140 foi cerca de 4 e 13 vezes mais potente que o NPC 17761 e NPC 17731, respectivamente. Quando analisados sobre a resposta relaxante causada pela mesma concentração de BK (100 nM), todos os antagonistas dos receptores B₂ testados causaram inibição concentração-dependente e completa do relaxamento à BK na traquéia de cobaia (Figura 4 B). Os dados da Tabela 5 indicam a mesma ordem de potência: HOE 140 > NPC 17761 > NPC 17731, sendo o HOE 140 cerca de 13 e 83 vezes mais potente que o NPC 17761 e o NPC 17731, respectivamente. Além de inibir completamente a resposta relaxante à BK, o HOE 140, o NPC 17761 e o NPC 17731 foram respectivamente cerca de 13, 3 e 2 vezes mais potentes em inibir o relaxamento que a contração causada pela BK (100 nM) (Tabela 5).

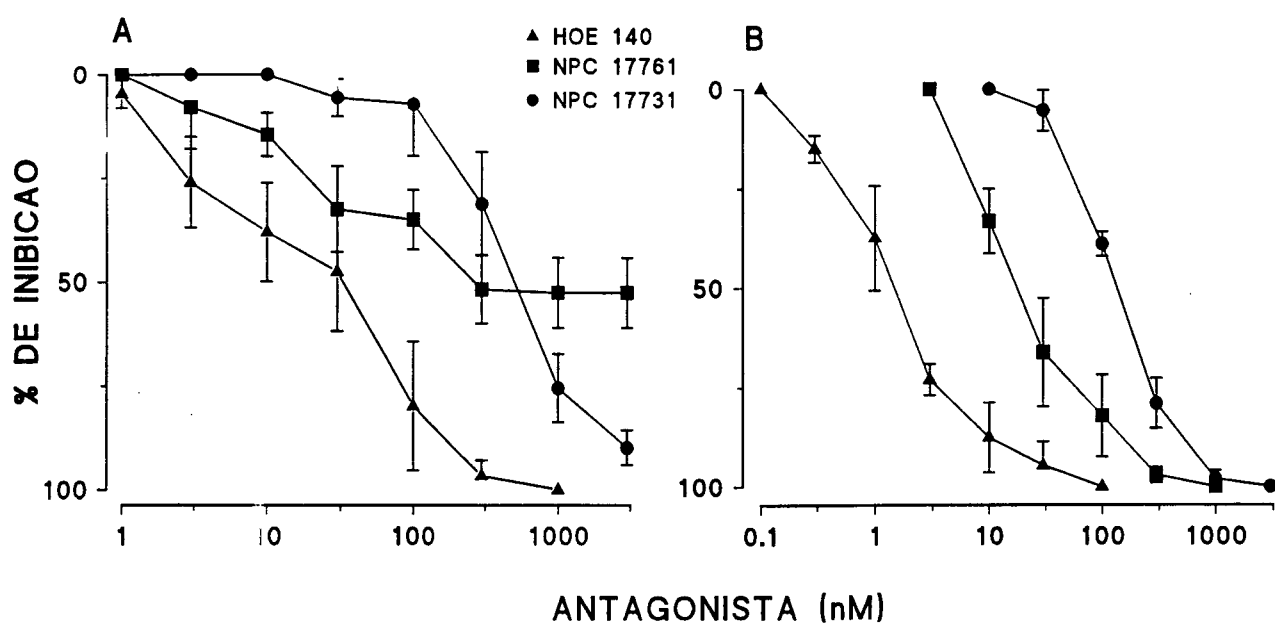


FIGURA 4 - Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores B_2 HOE 140, NPC 17761 e NPC 17731 sobre a contra o (A) ou relaxamento (B) induzida pela bradicinina (100 nM) em segmentos de traquéia de cobaia sem (A) ou com epitélio (B). Cada ponto indica a média 5 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

Tabela 5 - Valores médios de inibição (CI_{50}) para os antagonistas dos receptores B_2 sobre as respostas contráteis ou relaxantes à bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia

Antagonistas	Contração	Relaxamento
	CI_{50} (nM)	CI_{50} (nM)
HOE 140	17,7 (5,0 / 62,2) ^a	1,4 (0,7 / 2,7)
NPC 17761	64,2 (17,0 / 241,0)	19,1 (7,6 / 48,0)
NPC 17731	217 (96,0 / 490,0)	116,1 (77,2 / 174,0)

a - Intervalo de confiança ($P < 0,05$)

Cada grupo representa a média de 6 a 9 experimentos.

A incubação prévia das preparações sem epitélio com o HOE 140 (1 - 30 nM) por 10 min causou deslocamento à direita associado com redução da resposta máxima da curva concentração-resposta contrátil induzida pela BK (0,01 - 3000 nM) (Figura 5 A). Nas mesmas condições o NPC 17761 (1 a 30 nM) não causou deslocamento significativo à direita da curva concentração-resposta à BK nem redução da resposta máxima (Figura 5 B). As ações do HOE 140 (100 nM) ou do NPC 17761 (100 nM) foram seletivas para os receptores B_2 , na concentração capaz de inibir quase completamente a resposta contrátil induzida pela BK (100 nM), esses antagonistas falharam em inibir as contrações induzidas pela histamina ou pela substância P (resultados não apresentados).

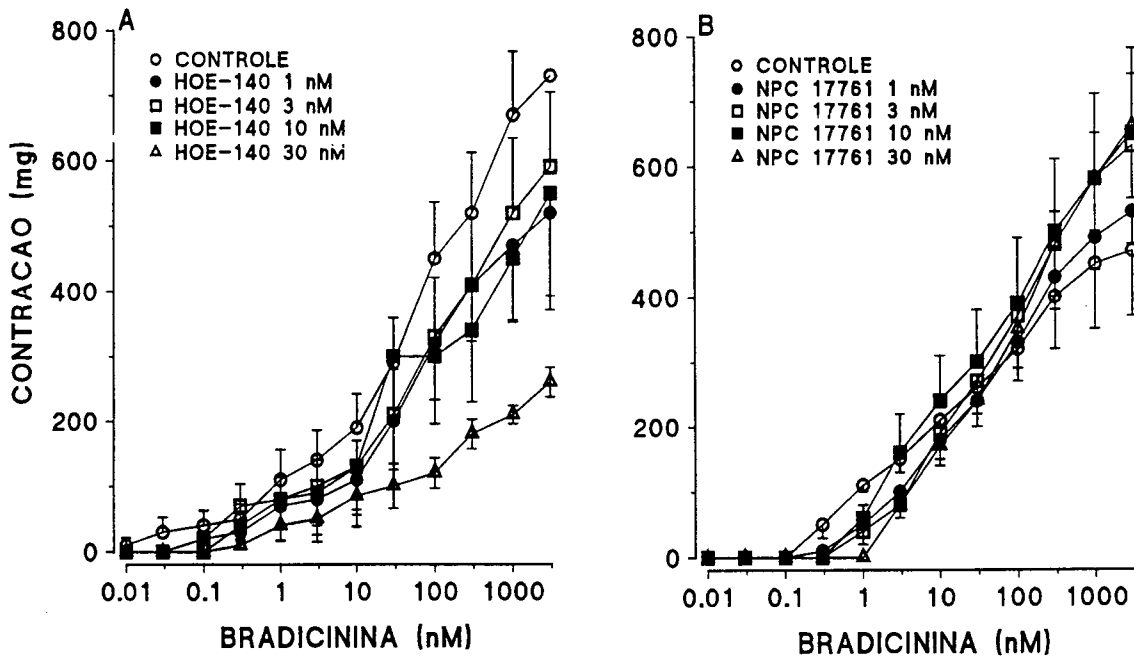


FIGURA 5 - Curvas concentração-resposta médias obtidas aos efeitos contráteis da bradicinina, na ausência ou na presença do HOE 140 (A) ou do NPC 17761 (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Cada ponto indica a média de 4 a 5 experimentos e as barras verticais os erros padrão das médias.

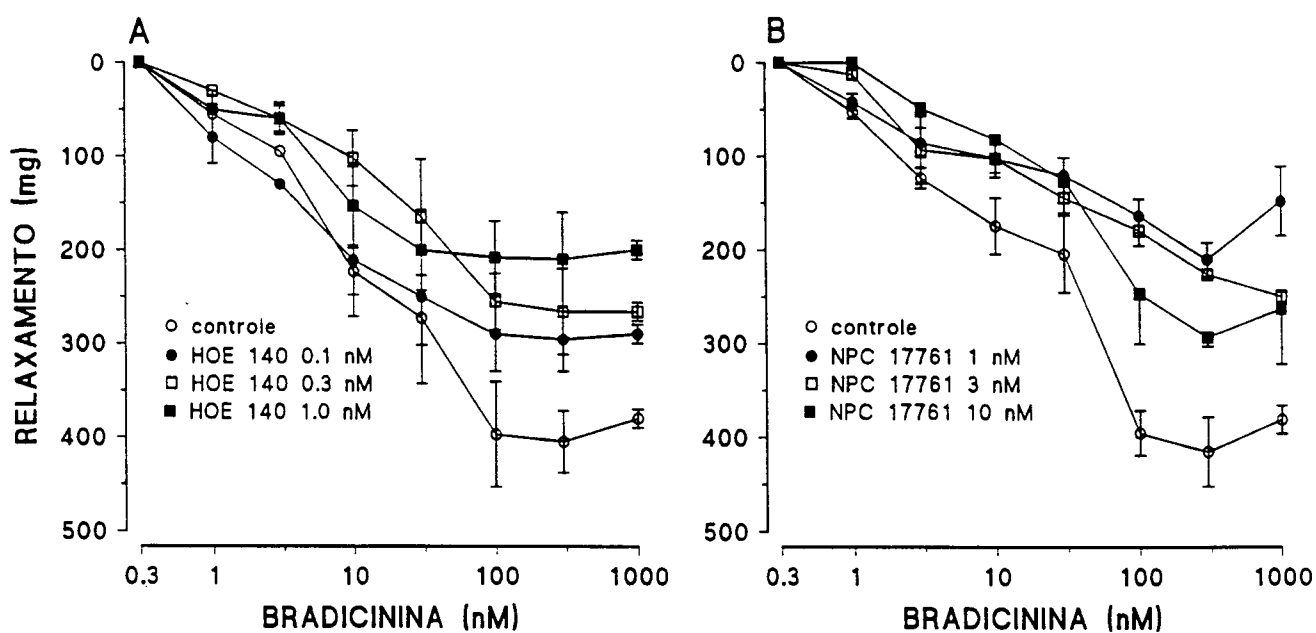


FIGURA 6 - Curvas concentração-resposta e médias de relaxamento para a bradycinin obtidas na traquéia isolada de cobaia sob tônus de 1g na ausência ou na presença do HOE 140 (A) ou do NPC 17761 (B). Cada ponto indica a média de 4 a 5 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

Quando analisados sobre a resposta relaxante à BK (0,3 - 1000 nM) nas preparações com epitélio, o HOE 140 (0,1 a 1 nM) e o NPC 17761 (1 a 10 nM) causaram deslocamento à direita da curva concentração-resposta à BK, associado também com marcada inibição da resposta máxima (Figuras 6 A e 6 B). Em todos os experimentos, as ações dos antagonistas dos receptores B₂ testados foram reversíveis após lavagem das preparações (resultados não apresentados). As ações do HOE 140 (100 nM) ou do NPC 17761 (100 nM) foram seletivas em inibir o relaxamento à BK, sendo que na concentração em que antagonizaram quase completamente o relaxamento induzido pela BK (100 nM), esses antagonistas falharam em inibir os relaxamentos causados pelo isoproterenol (1 μM) ou pelo nitroprussiato de sódio (1 μM) (Figuras 7 A e 7 B).

4.5 - Participação do óxido nítrico no relaxamento induzido pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia

O relaxamento causado pela BK (100 nM) na traquéia isolada de cobaia sob tônus normal (1 g) foi inibido de maneira concentração-dependente pela adição ao banho de L-NMMA (1 - 100 μM) ou pela L-NOARG (1 - 100 μM), com CI₅₀ (e intervalo de confiança de 95%) de 7,0 (4,2 - 12,3) μM e 9,0 (6,9 - 11,6) μM, respectivamente (Figuras 8 A e 8 B). Entretanto, mesmo em altas concentrações (100 μM), esses inibidores da síntese de NO não inibiram completamente o relaxamento induzido pela BK (inibição máxima de 67 ± 7 e 80 ± 7 % para a L-NMMA e a L-NOARG, respectivamente). Por outro lado, o D-enantiômero da L-NMMA, o D-NMMA (100 μM) não alterou o relaxamento induzido pela BK (Figura 9 A). As inibições dos relaxamentos causadas pela L-NMMA ou pela L-NOARG (ambas 100 μM) foram parcialmente revertidas pela adição de excesso de L-arginina mas não de D-arginina (ambas 1 mM) (Figuras 9 A e 9 B). No entanto, os relaxamentos causados pelo isoproterenol (1 μM) ou pelo nitroprussiato de sódio (1 μM) não foram afetados pela L-NMMA ou pela L-NOARG (30 μM) (Figuras 10 A e 10 B).

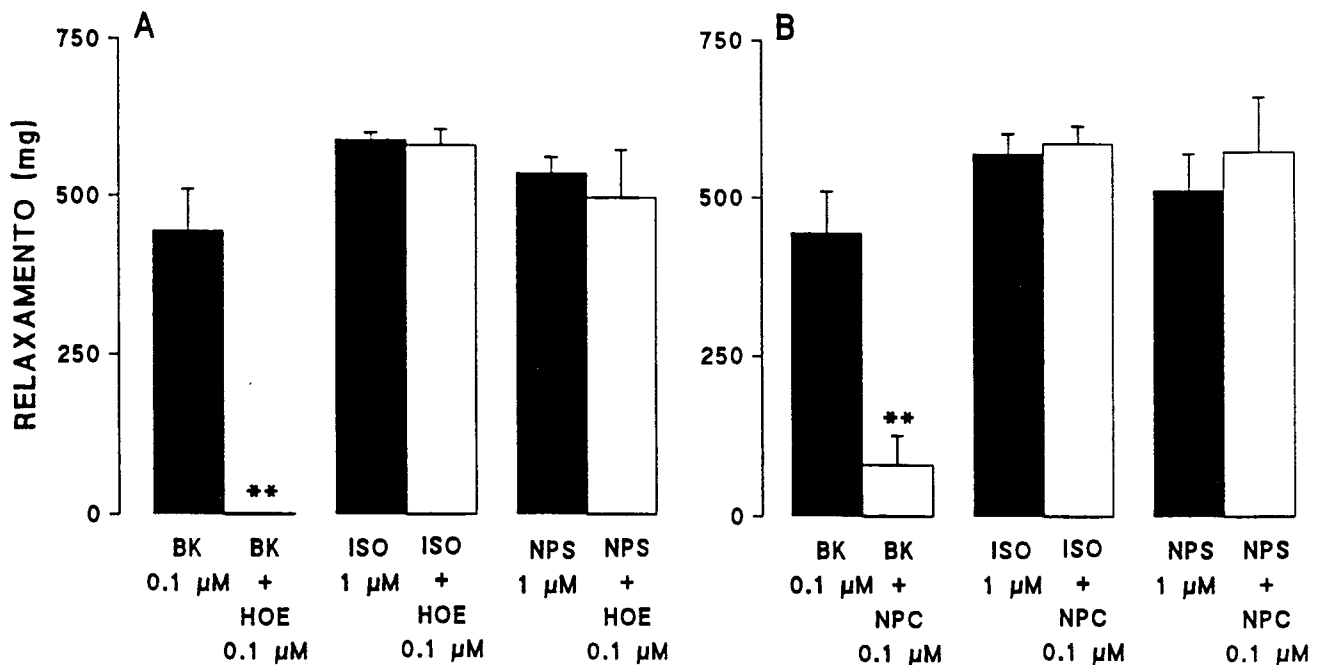


FIGURA 7 - Efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores B₂ HOE 140 (0,1 μ M) (A) ou NPC 17761 (0,1 μ M) (B) sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina (BK, 100 nM), isoproterenol (ISO, 1 μ M) e nitroprussiato de sódio (NPS, 1 μ M) na traquéia isolada de cobaia com epitélio sob tónus de 1 g. Cada coluna representa a média de 4-6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente dos valores controle, ** P < 0,01.

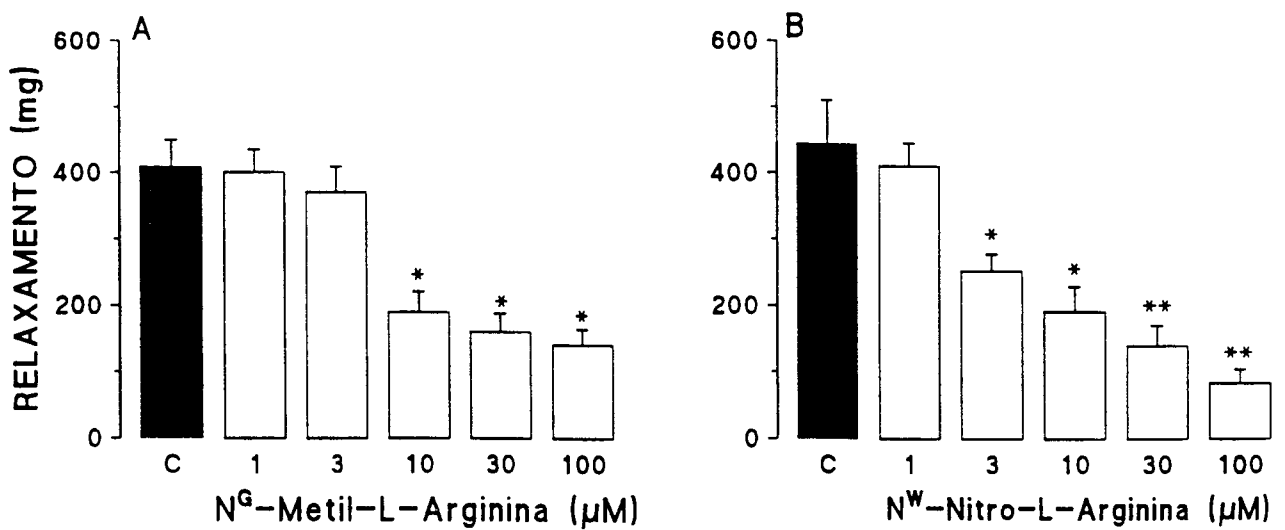


FIGURA 8 - Efeitos da N^G-metil-L-arginina (A) e da N^W-nitro-L-arginina (B) sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio sob tônus de 1g. Cada coluna representa a média de 8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, * P < 0,05; ** P < 0.01. C indica resposta controle à BK.

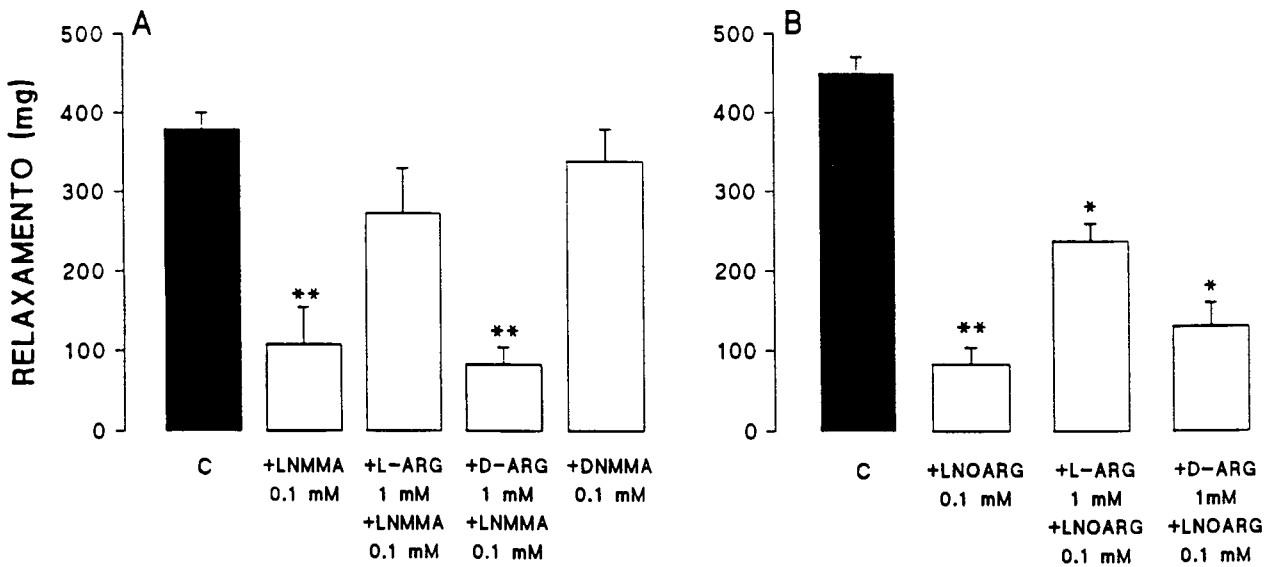


FIGURA 9 - Efeitos da N^G -metil-L-arginina (L-NMMA) ou da N^G -metil-D-arginina (D-NMMA) (A) ou da N^w -nitro-L-arginina (L-NOARG) (B) sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio sob tônus de 1g, na ausência ou na presença de L-arginina ou D-arginina. Cada coluna representa a média de 6-8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente em relação aos grupos controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. C indica a resposta controle à BK.

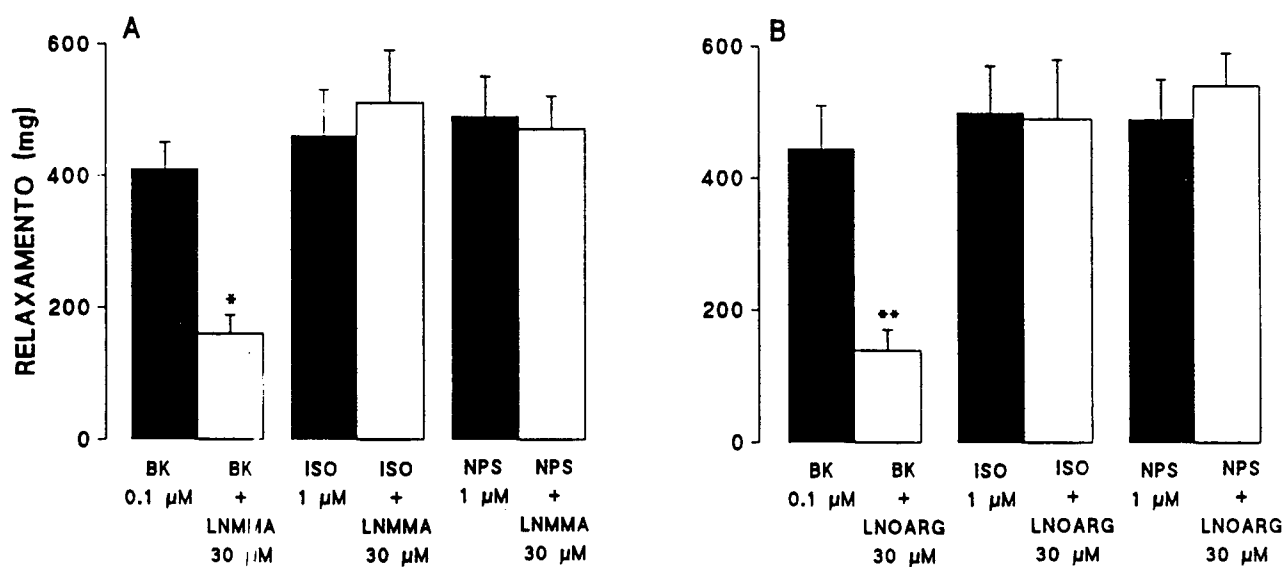


FIGURA 10 - Efeito da N^G -metil-L-arginina (L-NMMA, 30 μ M)(A) ou da N^w -nitro-L-arginina (L-NOARG, 30 μ M) (B) (30 μ M) sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina (BK), isoproterenol (ISO) ou pelo nitroprussiato de sódio (NPS) na traquéia de isolada de cobaia com epitélio, sob tensão de 1g. Cada coluna representa a média de 6-8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente do respectivo grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

A adição, ao banho, de azul de metileno ($10 \mu\text{M}$), semelhante ao observado para a L-NOARG ou a L-NMMA, também inibiu significativamente o relaxamento induzido pela BK, sem afetar contudo, as respostas relaxantes causadas pelo isoproterenol ($1 \mu\text{M}$) (Figura 11).

A adição, ao banho, de baixas concentrações de indometacina ($0,3 - 10 \text{ nM}$) por 30 min, inibiu de maneira concentração-dependente o relaxamento induzido pela BK (100 nM) na traquéia de cobaia com epitélio, com CE_{50} de $2,6 (1,7 - 3,8) \text{ nM}$ (Figuras 12 A e 12 B). Porém a indometacina, mesmo em concentrações elevadas ($1 \mu\text{M}$) não interferiu com as respostas relaxantes induzidas pelo isoproterenol ou pelo nitroprussiato de sódio (Figura 13).

A pré-incubação das preparações com indometacina ($1, 3$ e 10 nM) 30 min antes também promoveu redução progressiva do tônus das preparações (-64 ± 15 ; -144 ± 37 and $-371 \pm 43 \text{ mg}$, respectivamente). Na presença de concentrações maiores que 10 nM de indometacina, a BK (100 nM) ao invés de causar relaxamento, produziu intensa contração sustentada das preparações, efeito esse persistente e resistente às lavagens sucessivas das preparações (resultados não apresentados). Já a incubação simultânea de baixas concentrações de indometacina (1 nM) com L-NOARG ou L-NMMA (ambas $100 \mu\text{M}$) potencializou o efeito causado pela indometacina isoladamente, revertendo completamente a resposta relaxante da BK (100 nM) para uma contração (Figura 14).

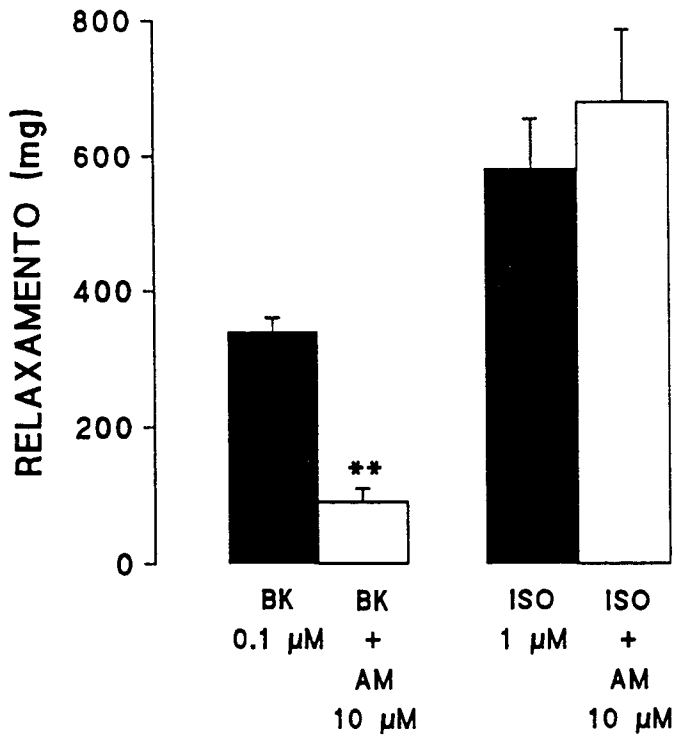


FIGURA 11 - Efeito do azul de metileno (AM, 10 μM) sobre os relaxamentos induzidos por bradicinina (BK, 100 nM) e isoproterenol (ISO, 1 μM) em segmentos com epitélio intacto de traquéia de cobaia. Cada coluna representa a média de 6-8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente do respectivo grupo controle ** P < 0,01.

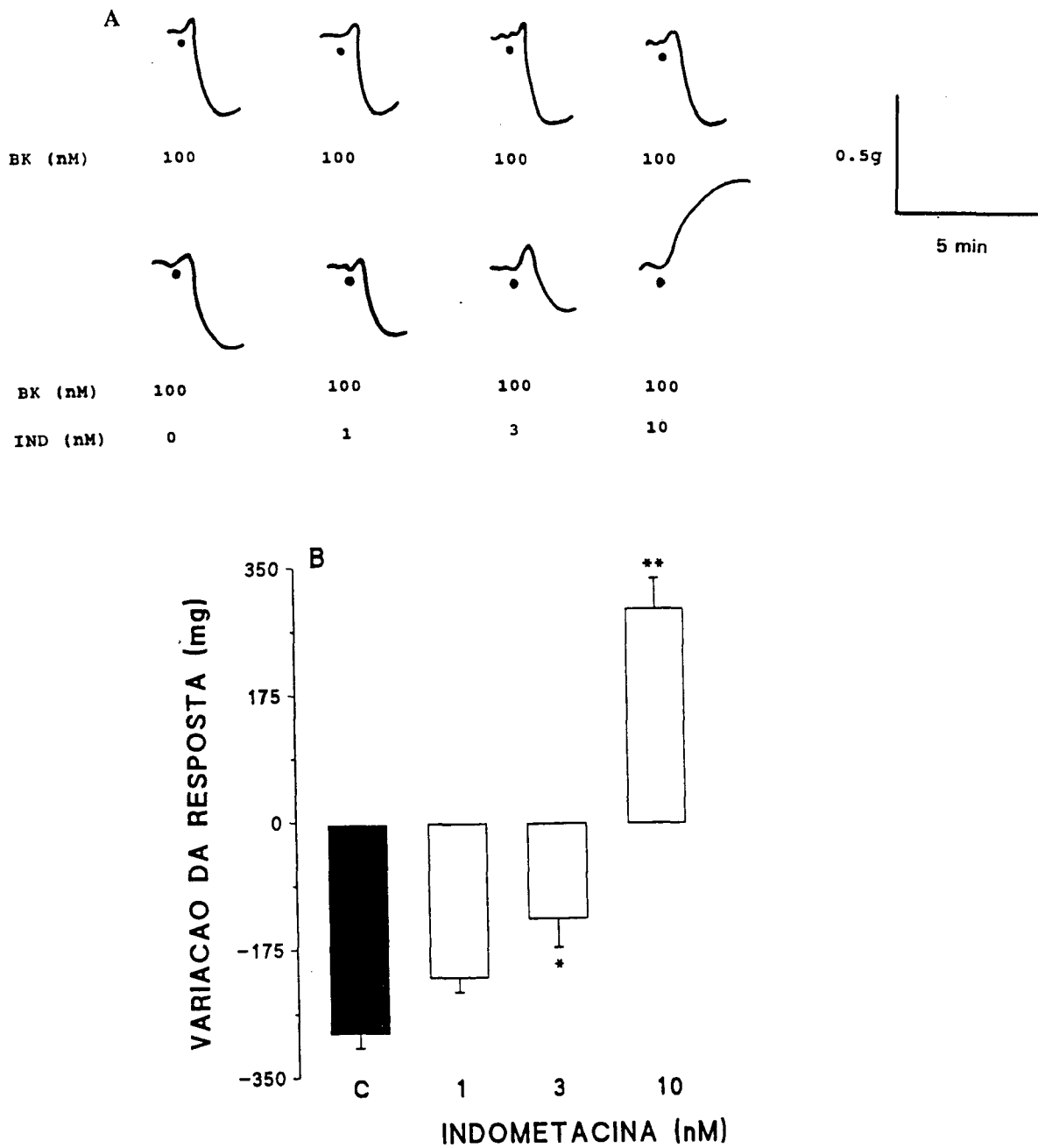


FIGURA 12 - (A) Registro isométrico típico mostrando o efeito relaxante causado pela bradicinina (BK, 100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio, sob tônus de 1 g na ausência ou na presença de indometacina (IND). (B) Efeito inibitório médio causado pela indometacina (IND) sobre os relaxamentos induzidos pela bradicinina (BK, 100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente do valor controle, ** $P < 0,01$. C indica resposta controle à BK.

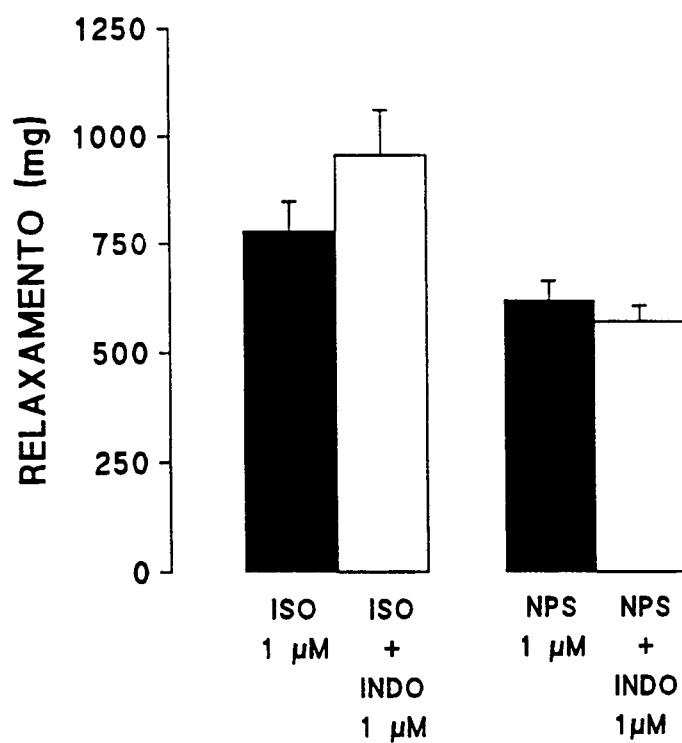


FIGURA 13 - Efeito da indometacina (INDO, 1 μM) sobre os relaxamentos induzidos pelo isoproterenol (1 μM) ou pelo nitroprussiato de sódio (1 μM) na traquéia de cobaia com epitélio e sob tensão de 1 g. Cada coluna representa a média de 4 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

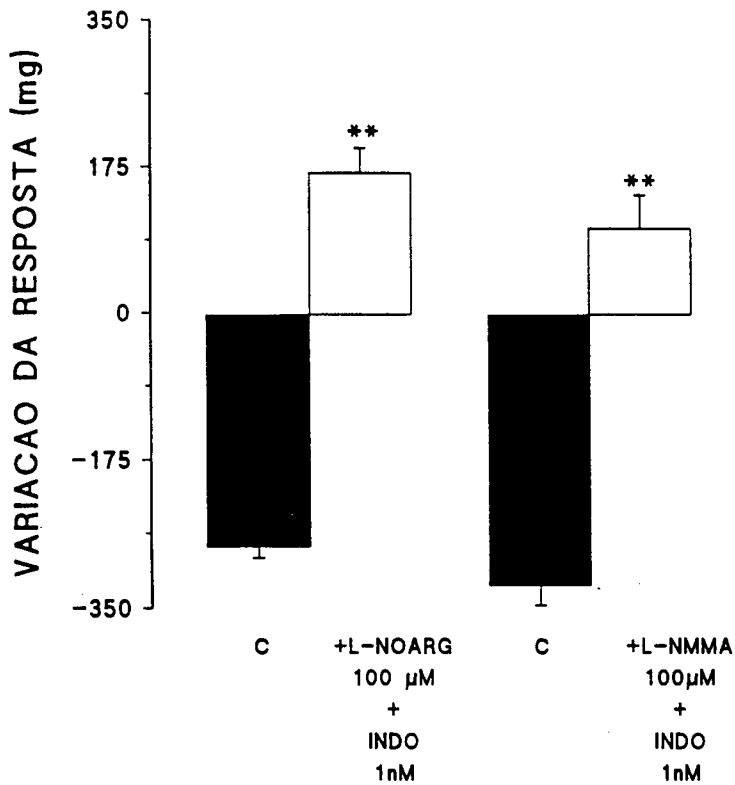


FIGURA 14 - Efeito da combinação de indometacina (INDO, 1 nM) com N^w-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 μM), ou N^G-metil-L-arginina (L-NMMA, 100 μM) sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio sob tônus 1 g. Cada coluna representa a média de 5 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Difere significativamente do grupo controle, ** P < 0,01. C representa a resposta relaxante controle à BK sem indometacina.

5 - DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e também estendem os dados disponíveis na literatura, e indicam que a BK e análogos causaram potente resposta contrátil na traquéia isolada de cobaia quando os experimentos foram realizados na ausência, mas não na presença de epitélio. Quando comparado com outros agonistas conhecidos por induzir contração nas vias aéreas, a ordem de potência (CE_{50}) foi: endotelina-1 \geq U 46619 \geq tirosina⁸-BK \geq BK \geq lisil-BK \geq metionil-lisil-BK \geq substância P $>$ serotonina \geq histamina \geq carbacol $>$ Bay K 8644 \geq prostaglandina F_{2 α} . No entanto, as respostas máximas produzidas pela BK e análogos foram menores que as causadas pela endotelina-1, substância P, carbacol, histamina e U 46619. A ordem de potência dos análogos da BK testados, tirosina⁸-BK $>$ BK $>$ lisil-BK $>$ metionil-lisil-BK, está de acordo com a descrita em vários tecidos que contêm receptores B₂ (Regoli & Barabé, 1980; Hall, 1992; Farmer & Burch, 1991). Além disso, o agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, foi completamente inativo na traquéia de cobaia, confirmando assim as evidências que indicam a ausência dos receptores B₁ para as cininas nessa preparação. Esses resultados estão de acordo com vários estudos funcionais ou bioquímicos nos quais foi demonstrada a ausência do receptor B₁ na traquéia de cobaia (ver Introdução).

Ao contrário do observado na maioria dos tecidos que contêm receptores B₂, a incubação das preparações sem epitélio com o potente antagonista seletivo destes receptores, o HOE 140 (Hall, 1992), causou antagonismo tipicamente de natureza não-competitiva, ou seja deslocou para a direita a curva concentração-resposta à BK associado com marcada redução da resposta máxima. No entanto, o NPC 17761, outro potente antagonista seletivo dos receptores B₂ para a BK (Kyle & Burch, 1992; Burch *et al.*, 1993), não causou nenhuma redução da resposta máxima contrátil a esse peptídeo. Porém, tanto o HOE 140 como o NPC 17761 e o NPC 17731 inibiram

de maneira concentração-dependente a resposta contrátil causada pela BK (100 nM). No entanto, o HOE 140 foi cerca de 4 e 13 vezes mais potente que o NPC 17761 e o NPC 17731, respectivamente, enquanto que apenas o HOE 140 foi capaz de inibir completamente a resposta contrátil à BK. Estudos recentes descritos na literatura demonstraram que o HOE 140 foi capaz de antagonizar de maneira não-competitiva a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia sem epitélio (Field *et al.*, 1992; Rhaleb *et al.*, 1992). Trifilieff *et al.* (1993) demonstraram que o NPC 17761, quando testado em altas concentrações, antagonizou competitivamente a contração causada pela BK na traquéia de cobaia, efeito caracterizado por deslocamento paralelo à direita da curva concentração-resposta à BK sem causar contudo, alteração da sua resposta máxima, obtendo valor de pA_2 de 8,6. Contudo, tanto o HOE 140 como o NPC 17731 comportaram-se como antagonistas tipicamente não-competitivos em relação à resposta contrátil à BK nessa preparação (Trifilieff *et al.*, 1992; 1993). Além disso, esses autores observaram que o HOE 140 revelou propriedade agonista parcial na traquéia de cobaia, fenômeno não observado no presente estudo. As razões dessas discrepâncias entre nossos resultados e os descritos por Trifilieff *et al.* (1992) não estão claras, embora existam muitas diferenças quanto à metodologia usada nos dois estudos, o que poderia explicar, pelo menos em parte, essas variações. Estudos realizados pelo nosso grupo, bem como em outros laboratórios, indicam que o HOE 140 antagonizou, através de mecanismo competitivo simples e com alta afinidade, as respostas à BK em vários músculos lisos de diversas espécies animais com valores de pA_2 variando de 7,4 a 9,2 (Rhaleb *et al.*, 1992; Field *et al.*, 1992; Medeiros & Calixto, 1993). No entanto, alguns autores também encontraram antagonismo não-competitivo para o HOE 140 como os descritos na traquéia, no íleo, taenia coli de cobaia e veia jugular de coelho, (Griesbacher & Lembeck, 1992; Field *et al.*, 1992; Rhaleb *et al.*, 1992). Parte dessas discrepâncias podem ser explicadas pela duração do tempo de exposição do receptor ao antagonista. No entanto, estudos realizados com técnicas de Biologia

Molecular revelaram que para vários neurotransmissores, incluindo a substância P, as diferenças de potência observadas para os diversos antagonistas, parecem decorrer mais de pequenas variações na seqüência dos aminoácidos dos receptores, do que propriamente da existência de subtipos de receptores. Com base nesses resultados, o subtipo de receptor B₃ anteriormente proposto por Farmer *et al.* (1989) para a BK na traquéia de cobaia, com base em estudos funcionais e de radioligantes, poderia ser interpretado como sendo variação do receptor B₂ observada entre espécies, e não como um novo subtipo de receptor para a BK.

Os estudos recentes realizados com técnica de Biologia Molecular permitiram a clonagem dos receptores do tipo B₂ em tecidos de rato e de homem, que apresentam grande homologia entre si (cerca de 81%) e são bloqueados apenas pelos antagonistas seletivos de receptores B₂ (McEachern *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992). A comparação do perfil farmacológico dos receptores B₂ homólogos clonados das espécies humana e murina, indica que ambos os receptores ligam-se aos agonistas com similar afinidade. Recentemente, Hess *et al.* (1994) demonstraram que as diferenças de afinidade (de 60 a 80 vezes) observadas para alguns antagonistas da BK em inibir o receptor B₂ humano e murino, podem ser explicadas por pequenas variações observadas para esses receptores entre as espécies animais, não justificando, portanto, as sugestões com base nos estudos funcionais de subtipos de receptores B₂ para a BK.

Os estudos realizados com auxílio de radioligantes demonstraram que BK se liga com alta afinidade à membranas de traquéia de cobaia sem e com epitélio (Farmer *et al.*, 1989; Trifilieff *et al.*, 1992; 1993; Proud *et al.*, 1993). No entanto, dois sítios com alta e baixa afinidades foram descritos para a BK nas preparações com epitélio (Kd 40 e 180 pM) e apenas um sítio com alta afinidade nas preparações sem epitélio (Kd 55 pM) (Trifilieff *et al.*, 1992). Um fato interessante é que tanto o HOE 140 como o NPC 17761 ou o NPC 17731 foram capazes de deslocar a BK, na mesma ordem de potência observada no presente estudo, HOE 140 > NPC

17761 > NPC 17731 e com alta afinidade (K_i da ordem de 30 a 50 pM) a ligação da BK com seus receptores tanto em membranas de traquéia com ou sem epitélio, como em membranas obtidas de íleo de cobaia (Trifilieff *et al.*, 1992; 1993). Ao contrário, o agonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-BK não foi capaz de deslocar a BK do seus sítios de ligação.

Recentes estudos obtidos com radioligantes em células epiteliais traqueais demonstraram dois sítios de ligação para as cininas: um com alta (K_d de 0,44 nM) e outro com baixa afinidade (K_d de 10 nM) (Proud *et al.*, 1992). O HOE 140 deslocou de maneira concentração-dependente a BK marcada de ambos os sítios além de ter inibido a produção de PGE₂, que aparentemente parece estar associada com o sítio de baixa afinidade (Proud *et al.*, 1992). Esses resultados analisados em conjunto sugeriram que os receptores B_2 existentes para a BK na traquéia de cobaia são semelhantes aos observados em outros tecidos. A diferença entre os resultados obtidos com os estudos funcionais e aqueles descritos com o uso de técnicas de radioligantes pode ter várias explicações. A primeira e talvez a mais importante é que a resposta contrátil causada pela BK na traquéia isolada de cobaia sem epitélio é mediada indiretamente por liberação de um prostanóide derivado da via da ciclooxigenase o que, *per se*, poderia explicar o antagonismo não competitivo observado para o HOE 140 sobre a resposta contrátil à BK (ver, para maiores detalhes, Kenakin, 1984). Outra explicação plausível entre os estudos pelo método de radioligantes e os funcionais é a possibilidade da ocorrência de dessensibilização à BK, fenômeno que não ocorre nos estudos de "binding".

Os resultados obtidos no presente estudo também indicam que a resposta contrátil à BK na traquéia isolada de cobaia sem epitélio depende fundamentalmente da liberação de Ca²⁺ de depósitos intracelulares. Isso é fundamentado no fato de que a remoção de Ca²⁺ da solução nutriente com adição de EGTA ou pela incubação das preparações com nicardipina (uma diidropiridina bloqueadora seletiva de canais de Ca²⁺ do tipo L dependentes de voltagem), bem

como pelo cloreto de níquel (bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo T dependentes de voltagem) (Bertolino, 1992) não inibiram a resposta contrátil à BK. Esses resultados são também distintos de estudos semelhantes realizados para a BK no músculo circular de íleo de cobaia (Calixto & Medeiros, 1991), aorta e veia jugular de coelho (Calixto & Medeiros, 1992a), veia porta de rato (Campos & Calixto, 1994) que mostraram ser dependentes tanto do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular como da liberação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. No entanto, eles são semelhantes aos resultados descritos recentemente para a BK na vesícula biliar isolada de cobaia, que como a traquéia de cobaia depende exclusivamente da liberação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Silva *et al.*, 1993). De fato, as respostas contráteis à BK na traquéia de cobaia sem epitélio foram inibidas pela rianodina, alcalóide que interfere com a liberação de Ca^{2+} intracelular (Calixto & Medeiros, 1991b).

Está amplamente demonstrado que a interação de um hormônio ou um neurotransmissor com seus receptores de membrana estimula a fosfolipase C, clivando o fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, produzindo dois importantes segundos mensageiros, o IP_3 e o diacilglicerol. Enquanto o IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, o diacilglicerol estimula a proteína cinase C (PKC) aumentando sua afinidade ao Ca^{2+} (Streb *et al.*, 1983; Berridge, 1984; 1987). O diterpeno forbol éster, devido à sua grande lipossolubilidade é capaz de atravessar a membrana celular e, como o ligante endógeno diacilglicerol, pode ativar diretamente a PKC (Castagna *et al.*, 1982; Nishizuka, 1984; 1986) e desta forma é amplamente usado como ligante dessa enzima (Blumberg *et al.*, 1984; Stabel *et al.*, 1987). Assim, os ésteres do forbol vem sendo amplamente usados para a análise do papel da PKC em vários sistemas biológicos (Rasmussen *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o forbol éster, não causou, *per se*, nenhum efeito na traquéia de cobaia sem epitélio, mas inibiu significativamente a resposta contrátil à BK. Esses resultados sugerem, portanto, que a estimulação duradoura da PKC (60

minutos) com o forbol éster, foi capaz de desacoplar esta enzima, que possui participação no processo de contração sustentada da musculatura lisa (Rasmussen *et al.*, 1984), indicando sua participação também na resposta contrátil à BK. No entanto, apenas o H-7, mas não a estaurosporina, drogas conhecidas por inibir não especificamente a unidade catalítica da PKC (Hidaka & Kobayashi, 1992), foi efetivo em antagonizar a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia. As razões dessas discrepâncias não são conhecidas, mas vários fatores podem contribuir para essas variações. Primeiramente, os inibidores da PKC usados não são seletivos, podendo interferir com outras cinases (Wilkinson & Hallan, 1994; Ruegg & Burgess, 1990). Por outro lado, várias isoenzimas da PKC foram descritas, sendo algumas delas resistentes às ações inibitórias do forbol ("down regulation") ou aos antagonistas da PKC (Wilkinson & Hallan, 1994). Esses resultados indicam que a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia pode depender tanto da produção de IP_3 e liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Somlyo *et al.*, 1988; Marsh & Hill, 1992a; 1993, Yang *et al.*, 1994) como também da produção de diacilglicerol e ativação da PKC.

Foi recentemente demonstrado que a BK ou o forbol miristato estimulam a fosfolipase D em cultura primária de músculo liso traqueal de cobaia, onde a atividade fosfolipase D é independente dos produtos da ciclooxigenase e depende de influxo de Ca^{2+} (Pyne & Pyne, 1993a). A hidrólise de fosfatidilcolina pela fosfolipase C e fosfolipase D, foi sugerida como fonte alternativa de lipídios inositol para a produção sustentada de diacilglicerol e, deste modo, ativar a PKC. Entretanto, as espécies de diacilgliceróis geradas pela hidrólise de lipídios inositol e de fosfatidilcolina diferem substancialmente e podem ativar distintas isoformas de PKC (Pyne & Pyne, 1992; 1993a,b; Conricode *et al.*, 1992; Andrea & Walsh, 1992).

Nossos resultados mostram também que a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia foi inibida por altas concentrações de indometacina e de fenidona (inibidor não seletivo da ciclo

e lipoxigenase) (Carlson *et al.*, 1985), mas não foi afetada pelos antagonistas seletivos de leucotrieno D₄/E₄ o MK-571 ou o LY 171883 (Fleisch *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1989), indicando a participação de metabólitos derivados da ciclooxigenase mas não da lipoxigenase nas ações da BK na traquéia de cobaia. Resultados semelhantes foram descritos na literatura (Mizhari *et al.*, 1982b). Um fato interessante, é que a quinacrina (um bloqueador não seletivo da PLA₂) (Wallach & Brown, 1981), não foi capaz de inibir as ações da BK, sugerindo que a BK pode estar liberando prostanóides na traquéia de cobaia por mecanismos independentes da ativação da PLA₂ e clivagem do ácido araquidônico. No entanto, o(s) metabólito(s) da ciclooxigenase liberado(s) pela BK na traquéia de cobaia não parece ser o tromboxano A₂, considerando que tanto o dazoxiben, bloqueador da síntese de tromboxano A₂ (Randall *et al.*, 1981), como o antagonista seletivo do receptor desse prostanóide, o L 655,240 (Hall *et al.*, 1987), não inibiram a resposta contrátil à BK. Ao contrário, o dazoxiben potencializou significativamente a resposta contrátil à BK sugerindo assim que os metabólitos do ácido araquidônico convertidos em tromboxano A₂ nesse órgão poderia ser substrato destinado à produção de algum outro metabólito contracturante derivado da ciclooxigenase, possivelmente PGD₂ ou PGF_{2α}. Alternativamente poderia também aumentar a síntese de metabólitos derivados da lipoxigenase, que também contraem essa preparação.

Embora Inoue *et al.* (1991) tenham demonstrado que a resposta contrátil à BK na traquéia isolada de cobaia foi inibida pela tetrodotoxina, até a concentração de 0.3 μM, essa toxina causou apenas discreta, porém não significativa inibição das ações da BK. Permanece a ser melhor investigado se a resposta contrátil à BK na traquéia de cobaia é mediada pela liberação de outros mediadores via mecanismos neuronais. Embora a BK possa liberar várias substâncias como o PAF (Duncan *et al.*, 1990) e neuropetídeos, incluindo substância P, neurocinina A e B ou CGRP (Geppetti, 1993) nas vias aéreas, a resposta contrátil à BK na

traquéia de cobaia sem epitélio não foi afetada pela atropina, pirlamina, CP 96,345, WEB 2086, CGRP₈₋₃₇, indicando assim que sua resposta contrátil não parece ser mediada pela liberação de acetilcolina, histamina (via H₁), substância P (via NK-1), PAF ou CGRP, respectivamente. Além disso, nem a apamina nem a glibenclamida interferiram com a resposta contrátil à BK, descartando assim a participação dos canais de potássio modulados por Ca²⁺ ou por ATP.

Outro aspecto interessante investigado no presente estudo foi o fato de a BK e análogos causarem relaxamentos concentração-dependentes na traquéia de cobaia na presença, mas não na ausência de epitélio. Essas respostas relaxantes foram lentas e precedidas de pequena resposta contrátil transitória, que não foram proporcionais à concentração empregada. Ao contrário do que se observou na resposta contrátil, o relaxamento causado pela BK foi bem reproduzível, sem evidência de taquifilaxia. Diferentemente ao que foi observado para a resposta contrátil à BK, sua resposta relaxante nas preparações com epitélio foi inibida por concentrações muito baixas de indometacina (a partir de 10 nM), concentração cerca 100 a 500 vezes menores que as descritas como sendo necessárias para inibir a síntese de prostaglandinas (Vane, 1971). Além disso, tanto a nicardipina como a apamina (uma neurotoxina polipeptídica obtida do veneno de abelhas (Romey & Lazdunski, 1984)) bloquearam as respostas relaxantes causadas pela BK na traquéia de cobaia. Esses resultados sugerem que, ao contrário do que foi descrito para a sua resposta contrátil, o relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia com epitélio é dependente de influxo de Ca²⁺ extracelular através de canais de Ca²⁺ diidropiridina dependentes de voltagem do tipo L e envolve a ativação de canais de potássio de pequena condutância (canais SK_{Ca}) ativados por Ca²⁺ (para revisão ver: Edwards & Weston, 1993). Resultados semelhantes foram também observados para a BK em outros músculos lisos, incluindo o duodeno de rato, taenia coli de cobaia, bexiga de cobaia, íleo de cobaia, esfíncter esofágico de gambá e no fundo de estômago de rato (Hall e Morton, 1991; Maggi *et al.*, 1989; Carte *et al.*, 1986; Den Hertog

et al., 1988; Saha *et al.*, 1981; Calixto & Medeiros, 1993). Esses resultados sugerem portanto, que os canais de potássio regulados por Ca^{2+} possuem um papel relevante na modulação das ações relaxantes da BK nos sistemas gastrointestinal, urogenital e também no sistema respiratório.

Embora Folkerts *et al.* (1989) tenham descrito a atividade PLA_2 como fonte da geração de PGE_2 na traquéia de cobaia, nossos resultados sugerem que esta enzima parece não possuir influência sobre o relaxamento produzido pela BK nas preparações com epitélio. A incubação das preparações com quinacrina, não interferiu com as respostas relaxantes à BK, sugerindo que esta resposta, assim como sua resposta contrátil, independe da liberação de prostanóide liberado através da ativação da PLA_2 . Da mesma forma, a atropina, glibenclamida, tetrodotoxina, cloreto de níquel, antagonista do VIP ou o propranolol não interferiram com o relaxamento causado pela BK. Esses resultados excluem portanto, a participação dos canais de potássio modulados por ATP, canais de Ca^{2+} do tipo T ou a liberação de mediador por via neural incluindo o VIP nas ações relaxantes às cininas.

O uso de agonistas e antagonistas seletivos de receptores B_1 e B_2 para as cininas permitiu demonstrar que o relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia, a exemplo de sua resposta contrátil em preparações sem epitélio, é mediado por ativação de receptores B_2 . Essa afirmação está baseada nas seguintes evidências: 1) a ordem de potência observada: tirosina⁸-BK > lisil-BK > BK > metionil-lisil-BK; novamente é compatível com a presença de receptores B_2 ; 2) o agonista seletivo de receptor B_1 , a des-Arg⁹-BK não causou nenhum efeito relaxante; 3) os antagonistas seletivos dos receptores B_2 , mas não de receptores B_1 , inibiram de maneira concentração dependente o relaxamento causado pela BK, com a seguinte ordem de potência: HOE 140 > NPC 1761 > NPC 1731. Embora a ordem de potência para os antagonistas B_2 em inibir o relaxamento foi a mesma observada para a inibição da contração, o HOE 140, o NPC

17761 e o NPC 17731 foram cerca de 13, 4 e 2 vezes respectivamente, mais potentes em inibir o relaxamento que a contração à BK na traquéia de cobaia.

Para analisar a natureza da interação da BK com seus receptores foram realizados novos experimentos através da realização de curvas concentração-respostas completas de relaxamento à BK na traquéia de cobaia com epitélio na ausência ou na presença de diferentes concentrações dos antagonistas seletivos dos receptores B_2 , o HOE 140 e o NPC 17761, incubados 10 minutos antes da adição de BK. Como observado para a resposta contrátil, na presença desses antagonistas a curva concentração-resposta de relaxamento à BK foi deslocada à direita de maneira concentração-dependente associado com inibição da resposta máxima, caracterizando assim como antagonismo de natureza não competitiva. A interpretação para esses dados é a mesma já descrita anteriormente para a resposta contrátil, e pode ser explicada pelo fato do relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia ser dependente da presença do epitélio e da liberação de prostanóide, caracterizado como sendo a PGE_2 (Bramley *et al.*, 1990, Folkerts *et al.*, 1989).

A incubação da traquéia de cobaia com epitélio com a indometacina causou alterações semelhantes àquelas observadas após a remoção do epitélio, ou seja, queda do tônus e inversão da resposta à BK, de relaxamento para contração. Porém, os mesmos efeitos foram observados para a PGE_2 exógena, ou seja, relaxamento na presença e contração na ausência de epitélio (Duft *et al.*, 1992). Mais interessante ainda, a indometacina inibe as contrações induzidas pela BK na traquéia de cobaia sem epitélio ainda que em altas concentrações, fato que não ocorre com a contração induzida pela PGE_2 (Duft *et al.*, 1992). Os níveis de PGE_2 gerados sob condições basais na traquéia de cobaia foram significativamente aumentados após a estimulação com BK, tanto em tecido fresco (Bramley *et al.*, 1990) como também em células em cultura (Proud *et al.*, 1993;

Farmer *et al.*, 1991). O aumento da geração de PGE_2 mas não de PGI_2 induzido pela BK é epitélio-dependente (Bramley *et al.*, 1990), sendo que a remoção do epitélio não alterou os níveis de PGI_2 mas aboliu a liberação de PGE_2 (Bramley *et al.*, 1990).

Os efeitos observados para a BK e análogos ocorreram em concentrações a partir de 1 nM, concentração que determina aumento da produção de PGE_2 (Proud *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992). De certa maneira estas respostas funcionais são tempo-dependentes (White *et al.*, 1992) sendo necessária a ativação de algum mediador para a estabilização das respostas à BK, normalmente presente após 120 minutos de equilíbrio. Recentemente, O'Neill & Ford-Hutchinson (1993) descreveram através de experimentos com reação de cadeia polimerase em tecido pulmonar humano, a expressão do RNA_m da ciclooxigenase-2, sendo maior do que a expressão da ciclooxigenase-1. A expressão da ciclooxigenase-2 é altamente induzível e pode ser seletivamente aumentada pela exposição das células a mitógenos ou citocinas. Ao contrário, essas substâncias não afetaram os níveis do RNA_m da ciclooxigenase-1. Assim, a ciclooxigenase-2 poderia ser o fator responsável pela geração de PGE_2 na traquéia de cobaia pela exposição à BK. A interleucina 1 ou o fator de necrose tumoral são conhecidos por potencializar as respostas mediadas pela BK em vários tecidos, tanto por ações em nível de receptores da BK, como também através de mecanismos intracelulares (para revisão ver: Burch *et al.*, 1993). Recentemente, Amrani & Bronner (1994) demonstraram que o fator de necrose tumoral potencializou a liberação de Ca^{2+} intracelular causado pela BK em células de traquéia de cobaia em cultura. Esses resultados poderiam explicar a hiperreatividade das vias aéreas à BK em pacientes portadores de inflamações nas vias aéreas, como a asma brônquica.

A remoção do epitélio ou a incubação de indometacina, droga que é capaz de inibir tanto a ciclooxigenase-1 como a ciclooxigenase-2 (O'Neil & Ford-Hutchinson, 1993) inibiram a

produção de derivados contráteis das ciclooxigenases, causando assim, redução no tônus da traquéia de cobaia (Braunstein *et al.*, 1988). Estas observações sugerem, portanto, que os produtos derivados da ciclooxigenase podem modular o tônus da traquéia e desta forma podem ser importantes como moduladores das respostas induzidas por vários agonistas incluindo as cininas nesse tecido.

Uma variedade de fatores derivados do epitélio não relacionados com os prostanóides, ainda desconhecidos, foram propostos como sendo importantes para a modulação das respostas aos diversos mediadores no músculo liso das vias aéreas. Foi descrita a liberação de um fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF) (Vanhoutte, 1988) em resposta a antígenos, sugerindo que mediadores endogenamente liberados podem ativar a liberação do EpDRF (Bertrand & Tschirhart, 1993). Vários fatores podem contribuir na modulação do fator relaxante relacionado ao epitélio. Esses fatores podem estar relacionados direta ou indiretamente com a hiperreatividade do trato respiratório observada em várias patologias. Entre outros podem ser mencionados: a) a redução do limiar para a estimulação de fibras nervosas intra-epiteliais; b) maior exposição das células epiteliais ao antígeno; c) diminuição do(s) fator(es) de relaxamento derivado(s) do epitélio; d) liberação de fatores contracturantes epiteliais; e) diminuição das endopeptidases normalmente responsáveis pela inativação de vários peptídeos pró-inflamatórios, como a substância P e a própria BK; f) perda da barreira de difusão ao mediador (Bertrand & Tschirhart, 1993). As peptidases presentes no epitélio poderiam também afetar as respostas da BK na traquéia de cobaia e, sua redução bem como de substratos específicos para suas ações quando o epitélio é removido, poderiam contribuir para as alterações observadas nas respostas da BK.

Um dos resultados mais relevantes obtidos do presente estudo e que contribui para explicar os mecanismos envolvidos no relaxamento causado pela BK na traquéia de cobaia, foi

a demonstração, pela primeira vez, de que além de liberar metabólitos derivados da via da ciclooxigenase do ácido araquidônico, a BK promove liberação de NO ou de substância a ele relacionado, na traquéia de cobaia com epitélio. Esta substância, juntamente com a PGE₂, parecem ser as responsáveis pela resposta relaxante causada pela BK nesta preparação. Essas evidências estão substantiadas pelas seguintes observações: a) a incubação das preparações com L-NOARG ou com L-NMMA, inibidores seletivos da síntese de NO (para revisão ver: Moncada *et al.*, 1991) mas não com o D-enantiômero análogo da L-arginina, a D-NMMA, inibiram de maneira concentração-dependente os relaxamentos induzidos pela BK na traquéia de cobaia sem interferir, contudo, com os relaxamentos causados pelo isoproterenol ou pelo nitroprussiato de sódio; b) o efeito de ambos os inibidores da biossíntese de NO, a L-NOARG e o L-NMMA, foram revertidos de maneira estereo-específica pela adição de excesso de L-arginina, precursor de NO, mas não de D-arginina. Esse efeito foi específico para o relaxamento causado pela BK, pois os inibidores da síntese do NO não afetaram o relaxamento induzido pelo isoproterenol ou pelo nitroprussiato de sódio. Finalmente, a incubação das preparações com azul de metileno, droga que inibe a guanilato ciclase solúvel ativada pelo NO (Gruetter *et al.*, 1981), semelhante ao observado para a L-NOARG ou L-NMMA, produziu inibição qualitativamente similar sobre a resposta relaxante causada pela BK na traquéia de cobaia. Novamente, as ações do azul de metileno foram bastantes específicas em inibir o relaxamento causado pela BK, não interferindo com as respostas relaxantes causadas pelo isoproterenol. Estes resultados são consistentes com a noção de que a via da L-arginina-NO ou a liberação de substâncias semelhantes ao NO estão constitutivamente presentes nas células da traquéia de cobaia e parecem ser relevantes para o relaxamento epitélio-dependente causado pela BK nesta preparação. Resultados recentes descritos na literatura mostraram que as respostas vasodiladoras causadas pela BK em várias preparações vasculares *in vitro*, incluindo a artéria coronária de porco (Cowan & Cohen, 1991; Vials &

Burnstock, 1992), rim de rato (Fulton *et al.*, 1992), células endoteliais de porco (Boulanger *et al.*, 1990), microcirculação da pele de rato (Khalil & Helme, 1992), leito coronário de coelho (Lamontagne *et al.*, 1992), leitos mesentéricos de rato (Berguer *et al.*, 1993), coração isolado de cobaia (Kelm & Schrader, 1988); corpo cavernoso humano (Kimoto *et al.*, 1990), são mediadas em parte pela liberação de NO ou de substância a ele relacionada.

Um fato interessante observado foi que altas concentrações de L-arginina, precursor da síntese de NO, reverteram parcial, mas seletivamente as inibições causadas pela L-NOARG ou a L-NMMA, sugerindo que a BK pode produzir relaxamento dependente e independente da liberação de NO, provavelmente pela liberação de prostanóides, que juntamente com o NO, produz completo relaxamento da traquéia isolada de cobaia em resposta à BK. Entretanto, não pode ser totalmente descartada a possibilidade de a quantidade de L-arginina necessária para a síntese de NO na traquéia de cobaia durante o relaxamento induzido pela BK ser limitado pelo teor de substrato.

Outro aspecto interessante observado no presente estudo foi o fato de que baixas concentrações de indometacina foram capazes de inibir de maneira concentração-dependente o tônus bem como o relaxamento induzido pela BK na traquéia de cobaia com epitélio. Na concentração de 10 nM, a indometacina inibiu completamente a resposta relaxante à BK, passando esse peptídeo a causar uma contração tônica sustentada. Estes resultados confirmam evidências prévias da literatura, indicando que a liberação de produtos da ciclooxigenase derivados da via do ácido araquidônico pela BK na traquéia de cobaia com epitélio, possivelmente PGE₂ (Mizrahi *et al.*, 1982b; Bramley *et al.*, 1990; Calixto *et al.*, 1992), junto com a liberação de NO, parecem ser os responsáveis pelo relaxamento causada pela BK nessa preparação.

A combinação de baixa concentração de indometacina (1 nM), capaz de causar apenas uma pequena inibição do relaxamento induzido pela BK, com os inibidores da síntese de NO (L-NMMA ou L-NOARG), transformou a resposta à BK de relaxamento para contração tônica sustentada, efeito semelhante àquele observado após retirada do epitélio das preparações. Nestas condições o efeito inibitório causado pela indometacina sobre as ações da BK foi potencializado cerca de 10 vezes na presença de inibidores da síntese de NO. É interessante mencionar que ambos os inibidores da síntese de NO, mesmo quando empregados em altas concentrações (100 μ M), não foram capazes de prevenir completamente os relaxamentos induzidos pela BK na traquéia de cobaia. Esses resultados sugerem que a produção de NO poderia estar de alguma maneira relacionada com a ativação da via da ciclooxigenase do ácido araquidônico. Estudos recentes obtidos em macrófagos de camundongo estimulados com endotoxina de *Escherichia coli*, demonstraram que o NO aumenta a atividade de ambas as ciclooxigenases: a constitutiva (COX-1) e a induzida (COX-2), por mecanismos independentes da formação de GMP_c (Salvemini et al. 1993). Resultados semelhantes foram também recentemente observados por Franchi *et al.* (1994), indicando que o NO é capaz de estimular a síntese de vários prostanóides no útero de rata, incluindo a PGE₂ e, dessa maneira, é capaz de modular as contrações espontâneas desse tecido. Interessante, tanto o NO originado da via da L-arginina como ambas as ciclooxigenases poderiam propiciar a síntese de prostaglandinas nos processos inflamatórios. Esses resultados, portanto, podem explicar o fato de que baixas concentrações de indometacina serem capazes de abolir e até mesmo inverter a resposta relaxante da BK na traquéia de cobaia para uma contração sustentada, enquanto os inibidores da síntese de NO apenas inibem parcialmente o relaxamento da BK.

Entretanto, nossos resultados não permitem explicar a questão se NO e a PGE₂ são liberados simultaneamente ou independentemente em resposta à BK, ou se suas ações envolvem

diferentes mecanismos. Permanece por ser esclarecido se a BK libera NO também do músculo ou da cartilagem traqueal além das células epiteliais.

Resultados recentes sugerem que o NO ou compostos a ele relacionados podem atuar como neurotransmissores inibitórios em diversos tecidos dos trato gastrintestinal, pulmonar e urinário, bem como em vasos sanguíneos (ver para revisão: Rand, 1992). Diversas evidências sugerem também que o NO desempenha um papel relevante como neurotransmissor inibitório na traquéia *in vitro* (Li & Rand, 1990; Tucker *et al.*, 1990; Belvisi *et al.*, 1991; Kannan & Johnson, 1992; Filep *et al.*, 1993) e também *in vivo* (Nijkamp *et al.*, 1993). Recentemente, Fischer *et al.* (1993) demonstraram a presença de uma NO-sintase na inervação das vias aéreas baixas da cobaia. Entretanto, estudos histoquímicos ainda são necessários para confirmar se os nervos contendo NADP-diaforase estão presentes nas proximidades das células epiteliais e/ou das células musculares lisas. Assim, a origem do NO liberado pela BK na traquéia de cobaia permanece a ser esclarecida. Estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado a presença de NO-sintase em neurônios mioentéricos do trato gastrintestinal de mamíferos (Grider *et al.*, 1992). Recentes evidências também sugerem a presença de NO nas células musculares lisas. Assim, a maior parte da resposta relaxante causada pelo VIP no intestino é modulado pela liberação de NO das células musculares lisas (Grider *et al.*, 1992). No entanto, como demonstrado anteriormente, o antagonista seletivo do receptor do VIP não interferiu com o relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na traquéia de cobaia, sugerindo portanto, que esse peptídeo não parece estar envolvido no relaxamento causado pela BK neste tecido.

Em síntese, esses resultados forneceram evidências consistentes indicando que a via da L-arginina-NO ou uma substância a ele relacionada modula o relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na traquéia de cobaia. Além disso, foi também demonstrado que o relaxamento induzido pela BK nessa preparação é mediado pela ativação de receptores B₂ e que produtos da

ciclooxigenase derivados do ácido araquidônico, possivelmente PGE₂, também contribuem para a manifestação da resposta relaxante para a BK na traquéia de cobaia. A relevância fisiopatológica destes achados não está clara até o presente momento. Entretanto, é possível que a lesão de epitélio e, conseqüentemente, a ausência de resposta relaxante à BK nas inflamações das vias aéreas, poderia contribuir para o aumento da responsividade desses tecidos em algumas patologias, incluindo a asma brônquica.

RESUMO E CONCLUSÕES

1 - No presente estudo foram analisados alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes causadas pela BK e seus análogos na traquéia isolada de cobaia (TC) com ou sem epitélio.

2 - A BK e seus análogos causaram contrações concentração-dependentes na TC sem epitélio. A ordem de potência (CE_{50} , nM) foi: tirosina⁸-BK (31) > BK (40) > lisil-BK (56) > metionil-lisil-BK (77). Ao contrário, o antagonista seletivo de receptor B_1 , a des-Arg⁹-BK (1 μ M, DABK), foi inativo. Entretanto, a BK foi cerca de 6 vezes menos potente do que a endotelina-1 ou o U 46619, mas foi mais potente do que várias agonistas, incluindo a substância P, serotonina, carbacol, histamina, Bay K 8644 ou a prostaglandina $F_{2\alpha}$. Esses resultados indicam que a BK causa potente contração na TC sem epitélio através da ativação de receptores B_2 .

3 - Ao contrário, a BK e análogos causaram relaxamento concentração-dependente na TC com epitélio mantida sob tônus espontâneo ou contraída pelo carbacol. A ordem de potência (CE_{50} , nM) foi: tirosina⁸-BK (5,8) > lisil-BK (18) > BK (21) > metionil-lisil-BK (30). A DABK (1 μ M) foi inativa. Tais resultados indicam que o relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na TC também é mediado através da ativação de receptores B_2 .

4 - A contração induzida pela BK na TC sem epitélio foi significativamente inibida pelo forbol éster (1 μ M), H-7 (30 μ M), indometacina (1 μ M) ou pela fenidona (30 μ M), mas não foi afetada pela nicardipina (1 μ M) ou na presença de solução livre de cálcio mais EGTA. Esses achados

sugerem que a contração causada por BK na TC é mediada indiretamente e depende da liberação de metabólitos do ácido araquidônico derivados tanto da ciclooxigenase, e requer liberação de cálcio de depósitos intracelulares e depende da ativação da proteína cinase C.

5 - O relaxamento epitélio-dependente causado pela BK na TC com epitélio, por sua vez, foi inibido pela apamina (0,3 μ M), nicardipina (1 μ M) e por baixa concentração de indometacina (10 nM). Esses dados sugerem que o relaxamento causado pela BK na TC depende da liberação de metabólito da ciclooxigenase derivado do ácido araquidônico, possivelmente PGE₂, e requer mobilização de cálcio extracelular por ativação de canais de cálcio do tipo L, dependentes de voltagem, sendo esse efeito modulado pelos canais de K⁺ ativados por Ca²⁺.

6 - Confirmando nossas evidências prévias, a incubação das preparações com antagonistas seletivos dos receptores B₂, incluindo o HOE 140, NPC 17731 e o NPC 17761 (0,1 a 1000 nM) causou inibição concentração-dependente das respostas relaxantes ou contracturantes causadas pela BK na TC. A ordem de potência encontrada foi: HOE 140 > NPC 17761 > NPC 17731 contra ambas as respostas à BK. Porém, os antagonistas da BK foram mais potentes em antagonizar o relaxamento que a contração induzido pela BK. Além disso, o HOE 140 e o NPC 17761 (0,1 a 10 nM) causaram antagonismo tipicamente não competitivo em relação às respostas contráteis ou relaxantes mediadas pela BK (0,01 a 1000 nM) na TC, caracterizadas por deslocamento à direita da curva concentração-resposta associado com redução da resposta máxima.

7 - Os relaxamentos causados pela BK (100 nM) em segmentos de TC sob tônus espontâneo foram inibidos de forma concentração-dependente pela L-NOARG ou a L-NMMA (1 a 100 μM), dois inibidores seletivos da síntese de óxido nítrico, com valores de CI_{50} e de relaxamento máximo de 9 e 7 μM e 80 ± 7 e $67 \pm 7\%$, respectivamente. A inibição do relaxamento induzido por BK causado pela L-NOARG ou a L-NMMA foi parcialmente revertido pela adição ao banho de L-arginina, porém não foi alterada pela D-arginina (1 mM). O D-enantiômero da L-NMMA, o D-NMMA (100 μM) foi completamente inativo em inibir o relaxamento causado pela BK. A inibição causada tanto pela L-NOARG quanto pela L-NMMA, foi específica para BK, considerando que ambos os inibidores do NO não afetaram o relaxamento causado pela isoproterenol ou pelo nitroprussiato de sódio. Da mesma forma que a L-NOARG ou a L-NMMA, o azul de metileno (10 μM), um agente que inibe a ativação da guanilato-ciclase ativada pelo NO, inibiu também significativamente o relaxamento induzido pela BK na TC com epitélio, sem interferir com o relaxamento causado pelo isoproterenol.

8 - A incubação das preparações com baixas concentrações de indometacina (0,3 a 10 nM), inibiu de modo concentração-dependente o relaxamento induzido pela BK, com CI_{50} de 2,6 nM. No entanto, a indometacina, mesmo em altas concentrações, não interferiu com o relaxamento causado pelo isoproterenol ou pelo nitroprussiato de sódio. Além disso, a adição ao banho de indometacina (1 nM) associado com a L-NOARG ou L-NMMA (100 μM) modificou a resposta das preparações traqueais à BK (100 nM), revertendo completamente o relaxamento à BK para uma contração tônica sustentada.

9 - Esses resultados sugerem que o relaxamento causado pela BK na TC com epitélio é mediado pela ativação de receptores B_2 e pela liberação de NO (ou de substâncias relacionadas ao NO) e de um prostanóide, possivelmente a prostaglandina E_2 .

Parte desses resultados foi publicada no *British Journal of Pharmacology* 111: 83-88, 1994.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1- This study was designed to investigate some of the mechanisms underlying bradykinin (BK) and related kinins-mediated contraction or relaxation responses in epithelium-denuded and epithelium-intact strips of guinea pig trachea (GPT) "in vitro".

2- BK and related kinins caused concentration-dependent contractions of GPT without epithelium. The rank order of potency (EC_{50} , nM) was: tyrosina⁸-BK (31) > BK (40) > lysyl-BK (56) > methionyl-lysyl-BK (77). The selective B₁ receptor agonist, des-Arg⁹-BK (DABK) up to 1 μ M, was inactive. However, BK was about 6 fold less potent than endothelin-1 or U 46619, but was more potent than several agonist in inducing contractions in GPT, including substance P, serotonin, carbachol, histamine, Bay K 8644 or prostaglandin F_{2 α} . These findings are consistent with the view that BK causes a potent contraction of epithelium-free GPT, via activation of B₂ receptors.

3- In contrast, BK and related kinins caused graded relaxation in epithelium-intact strips of GPT under spontaneous or carbachol-induced tone. The relative rank order of potency (EC_{50} , nM) was: tyrosine⁸-BK (5.8) > lysyl-BK (18) > BK (21) > methionyl-lysyl-BK (30). DABK up to 1 μ M had no effect, indicating that BK-induced relaxation in epithelium-intact strips of GPT is mediated through activation of B₂ receptors.

4- BK-induced contraction in GPT was significantly prevented by phorbol ester (1 μ M), H-7 (30 μ M), indomethacin (1 μ M) or by phenidone (30 μ M), but was not affected by nicardipine (1 μ M)

4- BK-induced contraction in GPT was significantly prevented by phorbol ester (1 μM), H-7 (30 μM), indomethacin (1 μM) or by phenidone (30 μM), but was not affected by nicardipine (1 μM) or in presence of calcium-free solution plus EGTA. These findings suggest that BK-mediated contraction in GPT seems to be indirectly mediated by release of both cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites derived from arachidonic acid pathway, requires release of intracellular calcium sources and activation of protein kinase C-dependent mechanisms.

5- In contrast, BK-induced relaxation in epithelium-intact strips of GPT was attenuated by apamin (0.3 μM), nicardipine (1 μM) and by a very low concentration of indomethacin (10 nM). These data suggest that BK-mediated relaxation in GPT depends on the release of a cyclo-oxygenase pathway metabolite from arachidonic acid, possible PGE_2 , and requires mobilization of extracellular calcium via activation of voltage sensitive L-type calcium channels. This effect is modulated by K^+ activated calcium channels.

6- Confirming our previous evidence, the selective B_2 receptor antagonists, HOE 140, NPC 17731 and NPC 17761 (0.1 to 1000 nM), caused concentration-dependent inhibition of BK (100 nM)-induced contraction or relaxation responses in GPT. The rank order of potency was: HOE 140 > NPC 1761 > NPC 17731 against both BK responses. All BK antagonists were more potent in antagonizing BK-induced relaxation than contraction. However, HOE 140 and NPC 17761 (0.1 to 30 nM) caused a non-competitive antagonism against BK (0.01 to 1000 nM)-mediated contraction or relaxation responses in GPT, characterized by a shift to the right of the BK concentration-response curve associated with a progressive depression of the maximal responses.

7- Relaxations induced by BK (100 nM) in GPT strips under spontaneous tone were inhibited in a concentration-dependent manner by L-NOARG or L-NMMA (1 to 100 μ M), two inhibitors of nitric oxide (NO) synthase, with IC_{50} values and maximal inhibition of 9 and 7 μ M and 80 ± 7 and 67 ± 7 %, respectively. The inhibition of BK-induced relaxation caused by L-NOARG and L-NMMA was partially reversed by addition of excess of L-arginine but not D-arginine (1 mM). The D-NMMA, the D-enantiomer of L-NMMA, up to 100 μ M, failed to inhibit BK-induced relaxation. The inhibition caused by both L-NOARG or L-NMMA was specific for BK, as both NO inhibitors did not affect the relaxation caused by isoprenaline and sodium nitroprusside in GPT. Like L-NOARG and L-NMMA, methylene blue (10 μ M), an agent that inhibits the activation of soluble guanylate cyclase by NO, also significantly inhibited BK-induced relaxation, leaving response to isoprenaline unaffected.

8- Incubation of GPT with very low concentrations of indomethacin (0.3 to 10 nM), concentration-dependently inhibited BK-mediated relaxation, with IC_{50} of 2.6 nM, without affecting isoprenaline and sodium nitroprusside-mediated relaxation. In addition, a combination of a very low concentration of indomethacin (1 nM) and either L-NOARG or L-NMMA (100 μ M) changed the response of tracheal preparations to BK (100 nM) from a relaxation to a sustained contraction.

9- These findings indicate that BK-mediated relaxation in epithelium-intact strips of GPT is mediated via activation of B_2 receptors and release of both NO or a NO-related substance and a prostanoid, probably prostaglandin E_2 .

Part of these results have been published in the British Journal of Pharmacology 111: 83 - 88, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K., WATANABE, N.; KUMAGAI, N.; MOURI, T.; SEKI, T. & OSHINAGA, K. Circulating plasma kinin in patients with bronchial asthma. *Experientia*, **23**: 626-627, 1967.
- AMRANI, Y. & BRONNER, C. Tumor necrosis factor alpha potentiates the increase in cytosolic free calcium induced by bradykinin in guinea-pig trachea smooth muscle cells. *Life Sci.*, **316**: 1489-1494, 1993.
- ANDREA, J. E. & WALSH, M. P. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension*, **20**: 585-595, 1992.
- BALLIGAND, J. -L., KELLY, R. A., MARSDEN, P. A., SMITH, T. W. & MICHEL, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 347-351, 1993.
- BARNES, P. J. Bradykinin and asthma. *Thorax*. **47**: 979-983, 1992.
- BARNETT, K.; JACOBY, D. B.; NADE, J. A. & LAZARUS, S. C. The effects of epithelial cell supernatant on contractions of isolated canine tracheal smooth muscle. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **138**: 780-783, 1988.

- BAUMGARTEN, C. R.; NICHOLS, R. C.; NACLÉRIO, R. M.; LICHTENSTEIN, L. M.; NORMAM, P. S. & PROUD, D. Plasma kallikrein during experimentally-induced allergic rhinitis: role in kinin formation and contribution to TAME-esterase activity in nasal secretions. *J. Immunol.*, **137**: 977-82, 1986.
- BELVISI, M. G.; STRETTON, D. & BARNES, P. J. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, **198**: 219-221, 1991.
- BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.*, **220**: 345-360, 1984.
- BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 159-193, 1987.
- BERTOLINO, M. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**: 399-421, 1992.
- BERTRAND, C. & TSCHIRHART, E. Epithelial factors: modulation of the airway smooth muscle tone. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **7**: 261-273, 1993.
- BEWLEY, J.; BHOOLA, K. D.; CROTHERS, D. M. & CINGI, M. I. Biphasic responses of the isolated guinea-pig tracheal muscle strip to kallidin and bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, **92**, 597 P, 1987.

BHOOLA, K. D.; COLLIER, O. J.; SCHACHTER, M. & SHORLEY, P. G. Action of some peptides on bronchial muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **19**: 190-197, 1962.

BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D. & WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews.*, **144**: 1-80, 1992.

BLUMBERG, P.M.; JAKEN, S.; K"ONING, B.; SHARKEY, N.A.; LEACH, K.L.; JENG, A.Y. & YEH, E. Mechanism of action of the phorbol ester tumor promoters: specific receptors for lipophilic ligands. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 933-940, 1984.

BOULANGER, C.; SCHINI, V. B.; MONCADA, S. & VANHOUTTE, P. M. Stimulation of cyclic GMP production in cultured endothelial cells of the pig by bradykinin, adenosine diphosphate, calcium ionophore A23183 and nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 152-156, 1990.

BRAMLEY, A. M.; SAMHOUN, M. N. & PIPER, P. J. Effect of a bradykinin BK₂ antagonist on the responses of intact and rubbed guinea-pig trachea *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 786P, 1989.

BRAMLEY, A. M.; SAMHOUN, M. N. & PIPER, P. J. The role of the epithelium in modulating the responses of guinea-pig trachea induced by bradykinin *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 762-766, 1990.

- BRAUNSTEIN, G. LABAT; C.; BRUNELLESCHI, S.; BENVENISTE, J.; MARSAC, J. & BFINK, C. Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea-pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E₂ production. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 300-308, 1988.
- BUGA, G. M., GOLD, M. E., WOOD, K. S., CHAUDHURI, G. & IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **161**: 61-72, 1989.
- BURCH, R. M.; FARMER, S. G. & STERANKA, L. R. Bradykinin receptor antagonists. *Medicinal Research Reviews.*, **10**: 237-269, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J. & STORMENN, T.M. *Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors*, (ed by Burch RM), Austin, R.G. Landes Co., 1993.
- BURKE-WOLIN, T.; MATSUI, K.; WOLIN, M. S.; GURTNER, G. H. Epithelium dependent nitric oxide production by bovine airways. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **145**: A400, 1992.
- CALIXTO, J. B. & MEDEIROS, Y. S. Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin-insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**: 659-665, 1991a.

- CALIXTO, J. B. & MEDEIROS, Y. S. Análise dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil para a bradicinina na musculatura lisa não vascular "in vitro". *IX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, Caxambu, Ago., p.491, 1991b.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; BELLA CRUZ, A. & MEDEIROS, Y. S. Effect of compound from *Mandevilla velutina* on bradykinin-mediated contractile and relaxant responses of the isolated guinea-pig trachea. *Agents and Actions*, **36**:222-229, 1992.
- CALIXTO, J. B. & MEDEIROS, Y. S. Bradykinin-induced biphasic response in the rat isolated stomach fundus: functional evidence for a novel bradykinin receptor. *Life Sci.*, **50**, PL47, 1992.
- CALIXTO, J. B. & MEDEIROS, Y. S. The mechanisms underlying bradykinin and Des-Arg⁹-Bradykinin-induced biphasic responses in the isolated rat stomach fundus. *KININ 93*, São Paulo, Oct., p.17-22, 1993.
- CAMPOS, A. H. & CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: Mediation by B₁ and B₂ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (in press).
- CARLSON, R. P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J. & LEWIS, A. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents and Actions*, **17**: 197-204, 1985.

- CARTER, C. D.; HALL, J. M.; McCABE, D. V.; MORTON, I. K. M. & SCHACHTER, M. Biphasic actions of bradykinin in the guinea-pig *taenia caeci* preparation. *Br. J. Pharmacol.*, **90**: 137P, 1986.
- CASTAGNA, M.; TAKAZ, Y.; AKAZ, K.; KAIBUCHI, SANO; K., KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium activated phospholipid dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**: 7847-7851, 1992.
- CHOUDRY, N. B.; FULLER, R. W. & PRIDE, N. B. Sensitivity of the human cough reflex: effect of inflammatory mediators prostaglandin E₂, bradykinin and histamine. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**: 137-141, 1989.
- COWAN, C. L. & COHEN, R. A. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and-independent responses. *Am. J. Physiol.*, **261**: H830-H835, 1991.
- CHRISTIANSEN, S. C.; PROUD, D. & COCHRANE C. G. Detection of tissue kallikrein in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic subjects. *J. Clin. Invest.* **79**:188-197, 1987.
- CHRISTIANSEN, S. C.; PROUD, D.; SARNOFFS, R. B.; JUERGENS, U., COCHRANE, C. G. & ZURAN, B. L.. Elevation of tissue kallikrein and kinin in the airways of asthmatic subjects after endobronchial allergen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**:900-5, 1992.

- CONRICODE, K. M.; BREWER, K. A. & EXTON, J. H. Activation of phospholipase D by protein kinase C. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **267**: 7199-7202, 1992.
- DEN HERTOOG, A. D.; NELEMANS, A. & VAN DEN AKKER, J. The multiple action of bradykinin on smooth muscle of the guinea-pig *taenia caeci*. *Eur. J. Pharmacol.*, **151**: 357-363, 1988.
- DIXON, C. M. S.; FULLER, R. W. & BARNES, P. J. The effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril, on bronchial responses to inhaled histamine and bradykinin in asthmatic subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**:91-93, 1987.
- DUFT, S.; WILKENS, J. H.; BECKER, A.; MACHMÜLER, C.; ILG, S. & FROLICH, J. C. Intraluminal PGE₂ contracts epithelium-denuded guinea-pig trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**: A401, 1992.
- DUSSER, D. J.; NADEL, J. A.; SOKIZAWA, K.; GRAF, P. D. & BORSON, D. B. Neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme inhibitors potentiate kinin-induced contraction of ferret trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**:531-536, 1988.
- EDWARDS, G. & WESTON, A. Ion channels and their associated currents: Thoughts on a standardized nomenclature. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**: 433-434, 1993.

FARMER, S. G. & BURCH, R. M. The pharmacology of bradykinin receptors. In **Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research**. Ed. by Burch, R. M., Marcel Dekker, Inc, New York, p. 1-31, 1991.

FARMER, S. G. & BURCH, R. M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**: 511-36, 1992.

FARMER, S. G. Role of kinins in airway diseases. *Immunopharmacol.*, **22**:1-20, 1991a.

FARMER, S. G. Airway pharmacological bradykinin. In: *Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research*. Ed. by Burch, R.M., Marcel Dekker Inc., New York, p.213- 236, 1991b.

FARMER, S. G.; HAY, D. W. P.; RAEBURN, D. & FEDAN, J. S. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. *Br. J. Pharmacol.*, **92**: 231-236, 1987.

FARMER, S. G.; BURCH, R. M.; MEEKER, S. A. & WILKINS, D. E. Evidence for a pulmonary B₂ bradykinin receptor. *Molecular Pharmacol.* **36**:001-008, 1989.

FARMER, S. G.; ENSOR, J. E. & BURCH; R. M. Evidence that cultured airway smooth muscle cells contain bradykinin B₂ and B₃ receptors. *Am. J. Respir. Cell. Biol.*, **4**: 273- 277, 1991a.

- FARMER, S. G.; BURCH, R. M.; KYLE, D. J.; MARTIN, J. A.; MEEKER, S.N. & TOGO, J. D-Arg[Hyp³-Thi⁵-D-Tic⁷-Tic⁸]-bradykinin, a potent antagonist of smooth muscle BK₂ receptors and BK₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 785-787, 1991b.
- FEDAN, J. S. & FRAZER, D. G. Influence of epithelium on the reactivity of guinea pig isolated, perfused trachea to bronchoactive drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 741- 750, 1992.
- FIEDLER, F. Enzymology of glandular kallikreins. In: *Bradykinin, Kallidin, and kallikrein*, ed. by E. G. Erdös, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 103-161, 1979.
- FIELD, J. L.; HALL, J. M. & MORTON, I. K. M. Bradykinin receptors in the guinea-pig taenia caeci are similar to proposed BK₃ receptors in the guinea-pig trachea and are blocked by HOE 140. *Br. J. Pharmacol.*, **105**: 293-296, 1992.
- FILEP, J. G.; BATTISTINI, B. & SIROIS, P. Induction by endothelin-1 of epithelium-dependent relaxation of guinea-pig trachea *in vitro*: role for nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **109**: 637-644, 1993.
- FISCHER, A.; MUNDEL, P.; MAYER, B.; PREISLER, U.; PHILIPPIN, B. & KUMMER, W. Nitric oxide synthase in guinea-pig lower airway innervation. *Neuroscience Let.*, **149**: 157-160, 1993.

- FLAVAHAN, N. A.; AARHUS, L. L.; RIMELE, T. J. & VANHOUTTE, P. M. The respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.*, **58**: 834-838, 1988.
- FLEISH, J. H.; DOWELL, A. R. & MARSHALL, W. S. LY171883 and newer leukotriene receptor antagonists: a quest for novel therapeutic agents. In: Leukotrienes and prostanoids in health and disease. ZOR, U., NAOR, Z., DANON A. (eds), *New Trends Lipid Mediators*, **3**: 72-76, 1989.
- FLEMING, W. W.; WESTPHALL, D. P.; DE LA LANDE, I. S. & JELLET, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**: 339-345, 1972.
- FOLKERTS, G.; ENGELS, F. & NIJKAMP, F. P. Endotoxin-induced hyperreactivity of the guinea-pig isolated trachea coincides with decreased prostaglandin E₂ production by the epithelial layer. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 388-394, 1989.
- FRANCHI, A. M.; CHAUD, M.; RETTORI, V.; SUBURO, A.; MACCANM, S. M. & GIMENO, M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 539-543, 1994.
- FROSSARD, N.; STRETTON, C. D. & BARNES, B. J. Modulation of bradykinin responses in airway smooth muscle by the epithelial enzymes. *Agents Actions*, **31**: 204-209, 1990.

- FULLER, P. J. & FUNDER, J. W. The cellular physiology of glandular kallikrein. *Kidney Int.*, **29**: 953-964, 1986.
- FULLER, R. W.; DIXON, C. M. S.; CUSS, F. M. C. & BARNES, P.J. Bradykinin- induced bronchoconstriction in humans: mode of action. *Am. Rev. Resp. Dis.* **135**: 176- 180, 1987.
- FULLER, R. W. Cough associated with angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Hum. Hypertension.* **3**: 159-161, 1989.
- FULTON, D.; McGIFE, J. C. & QUILLEY, J. Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 722- 725, 1992.
- GASTON, B.; DRAZEN, J. M.; JANSEN, A.; SUGARBAKER, D. A.; LOSCALZO, J. & STAMLER, J. S. Relaxation of human airways *in vitro* by S-nitrosothiols. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**: A384, 1992.
- GEPPETTI, P. Sensory neuropeptide release by bradykinin; mechanisms and pathophysiological implications. *Regulatory Peptides*, **47**, 1-23, 1993.
- GIBSON, A., MIRZAZADEH, S., HOBBS, A. J. & MOORE, P. K. L-N^G-monomethyl arginine and L-N^G-nitro arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 602-606, 1990.

- GILLESPIE, J. S. & SHENG, H. Influence of haemoglobin and erythrocytes on the effects of EDRF, a smooth muscle inhibitory factor, and nitric oxide on vascular and nonvascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 1151-6, 1988.
- GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S.; JIN, J. V. & MAKHLOUF, G. M. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am. J. Physiol.*, **262**: G25, G774-G778, 1992.
- GRIESBACHER, T. & LEMBECK, F. Analysis of the antagonistic actions of HOE 140 and other novel bradykinin analogues on the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **11**: 393-398, 1992.
- GRUETTER, C. A.; GRUETTER, D. Y.; LYON, J. E.; KADOWITZ, P. J. & IGNARRO, L. J. Relationship between cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by gliveril trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**:181-186, 1981.
- GUSTAFSSON, L. E.; LEONE, A. M.; PERSSON, M. G.; WIKLUND, N. P. & MONCADA, S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**(2):852-7, 1991.

- HALL, R.A.; GILLARD, J.; GUINDON, Y.; LETTS, G.; CHAMPION, E.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; FORTIN, R.; JONES, T. R.; LORD, A.; MORTON, H. E.; ROKACH, J.; YOAKIM, C. Pharmacology of L-655,240 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-5-fluoro-3-methyl-indol-2-yl]2,2-dimethylpropanoic acid), a potent, selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **135**: 193-201, 1987.
- HALL, J. M. & MORTON, I. K. M. Bradykinin B₂ receptor evoked K⁺ permeability increase mediates relaxation in the rat duodenum. *Eur. J. Pharmacol.*, **193**:231-238, 1991.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**:131-190, 1992.
- HASHIMOTO, S., KIGOSHI, S. & MURAMATSU, I. Nitric oxide-dependent and -independent neurogenic relaxation of isolated dog urethra. *Eur. J. Pharmacol.*, **231**: 209-214, 1993.
- HAUGE, A. LUNDE, P. K. M. & WAALER, B. A. The effect of bradykinin, kallidin and eledoisin upon the pulmonary vascular bed of an isolated blood-perfused rabbit lung preparation. *Acta Physiol. Scand.* **66**:269-277. 1966.
- HESS, J. F.; BORKOWSKI, J. A.; MACNEIL, T.; STONESIFER, G. Y.; FRAHER, J.; STRADER, C. D. & RANSOM, R. W. Differential pharmacology of cloned human and mouse B-2 bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1-8, 1994.
- HIBBS, J. B. J.; TAINTOR, R. R. & VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role of L- arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.*, **235**:473-6, 1987.
- HIDAKA, H. & KOBAYASHI, R. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**:377-397, 1992.

- ICHINOSE, M.; BELVISI, M. G. & BARNES, P. J. Bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pig *in vivo*: role of neural mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**:1207-2, 1990.
- IGNARRO, L. I.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. & CHAUDURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**:9265-9269, 1987.
- INOUE, H., AIZAWA, H., IKEDA, T. & SHIGEMATSU, N. Possible role of local reflexes in bradykinin-induced smooth muscle contraction in guinea-pig trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **143**: A361, 1991.
- ITO, Y., SUZUKI, H., AIZAWA, H., HIROSE, T. & HAKODA, H. Pre-junctional inhibitory action of prostaglandin E₂ on excitatory neuro-effector transmission in the human bronchus. *Prostaglandins*. **39**(6):639-655, 1990.
- JIN, L. S., SEEDS, E., PAGE, P. & SCHACHTER, M. Inhibition of BK-induced bronchoconstriction in the guinea pig by a synthetic B₂ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **97**: 598-602, 1989.
- JONES, T. R., ZAMBONI, R., BELLEY, M., CHAMPION, L., CHARETTE, L., FORD-HUTCHINSON, A. W., FRENETTE, R., GAUTHIER, J-Y., LEGER, S., MASSON, P., McFARLANE, C. S., PIECHUTA, H., ROKACH, J., WILLIAMS, H., YOUNG, R. N., DEHAVEN, R. N. & PONG, S.S. (1989) Pharmacology of L-600, 711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D₄ receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**: 17-28.

- KANNAN, M. S. & JOHNSON, D. E. Nitric oxide mediators the neural nonadrenergic, noncholinergic relaxation of pig tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **262**:L511-L514, 1992.
- KAPLAN, A. P. & SILVERBERG, M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood*, **70**: 1-16, 1987.
- KAUFMAN, M. P., COLERIDGE, H. M., COLERIDGE, J. C. G. & BAKER, D. G. Bradykinin stimulates afferent vagal C-fibres in intrapulmonary airways of dogs. *J. Appl. Physiol.* **48**: 511-7, 1980.
- KELM, M. & SCHRADER, J. Nitric oxide release from the isolated guinea-pig heart. *Eur. J. Pharmacol.*, **155**:317-321, 1988.
- KENAKIN, T. P. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol. Rev.*, **36**: 165, 1984
- LEMBECK, F.T.; GRIESBACHER, M.; ECKEHART, S.; HENKE, G.; BREIPOHL & KNOLLE, J. New, long-acting potent bradykinin antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 297, 1991.
- KIMOTO, Y., KESSLER, R. & CONSTANTINO, C. E. Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J. of Urology.*, **144**:1015-1017, 1990.
- KHALIL, Z. & HELME, R. D. The quantitative contribution of nitric oxide and sensory nerves to bradykinin-induced inflammation in rat skin microvasculature. *Brain Res.*, **589**:102-108, 1992.

- KNUDSEN, M. A. & TOTTRUP, A. A possible role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea-pig taenia coli. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 837-841, 1992.
- KONTOS, H. A., WEI, E. P., POVISHOCK, J. T. & CHRISTMAN, C. W. Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilatation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ. Res.*, **55**: 295-303, 1984.
- KOTLIKOFF, M. I. Potassium channels in airway smooth muscle: a tale of two channels. *Pharmac. Ther.*, **58**:1-12, 1993.
- KYLE, D.J.; MARTIN, J.A.; FARMER, S.G. & BURCH, R.M. Design and conformational analysis of several highly potent bradykinin receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, **34**, 1230-1233, 1991a.
- KYLE, D.J.; MARTIN J.A.; BURCH, R.M.; CARTER, J.P.; LU, S.; MEEKER, S.; PROSSER, J.C.; SULLIVAN, J.P.; TOGO, J.; NORONHA-BLOB, L.; SINSKO, J.A.; WALTERS, R.F.; WHALEY, L.W. & HINER, R.N. Probing the bradykinin receptor: mapping the geometric topography using ethers of hydroxyproline in novel peptides. *J. Med. Chem.*, **34**, 2649-2653, 1991b.
- KYLE, D. J. & BURCH, R. M. Recent advances toward novel bradykinin antagonists. *Drugs of Future*, **17**:305-312, 1992.
- KYLE, D. J. & BURCH, R. M. A survey of bradykinin receptors and their antagonists. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2**:2-20, 1993.

- LAITINEN, L. A., HEINO, M., LAITINEN, A. & HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **131**:599-606, 1985.
- LAMONTAGNE, D., KNIG, A., BASSENGE, E. & BUSSE, R. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**:652-657, 1990.
- LEFEBVRE, R. A., BAERT, E. & BARBIER, A. J. Influence of N^G-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.*, **106**: 173-179, 1992.
- LEIKAUF, G. D., UEKI, I. F., NADEL, J. A. & WIDDICOMBE, J. H. BK stimulates Cl⁻ secretion and prostaglandin E₂ release by canine tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **248**:F48-55, 1985.
- LI, C. G. & RAND, M. J. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **102**:91-94, 1991.
- LUNDBERG, J. M. & SARIA, A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature*, **302**:251-253, 1983.
- MAGGI, C. A., PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P., GEPPETTI, P., CECCONI, R., GUILIANI, S. & MELI, A. Multiple mechanisms in the motor responses of the guinea-pig isolated urinary bladder to bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: 619-629, 1989.

- MAK, J. C. W. & BARNES, P. J. Autoradiographic visualization of bradykinin receptors in human and guinea-pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* **194**:37-43, 1991.
- MANZINI, S., CONTI, S., MAGGI, C. A. *et al.*- Regional differences in the motor and inflammatory response to capsaicin in guinea-pig airways: correlation with content and release of substance P-like immunoreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**:936-941, 1989
- MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D. & GIROUD, G. P. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation, *Gen. Pharmacol.* **14**, p. 209-241., 1983
- MARCEAU, F. & REGOLI, D. Kinin receptors of the B₁ type and their antagonists. *In: Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research.* ed. Burch RM, Marcel Dekker Inc., New York, p. 33-49., 1991
- MARSH, K. A. & HILL, S. J. Bradykinin B₂ receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in bovine cultured tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:443-447, 1992a.
- MARSH, K. A. & HILL, S. J. Characteristics of bovine tracheal smooth muscle cells during agonist-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilisation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**:A371, 1992b.
- MARSH, K. A. & HILL, S. J. Bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium ion mobilisation in cultured bovine tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **105**:66P, 1992c.
- MARSH, K. A. & HILL, S. J. Characteristics of the bradykinin induced increase in intracellular calcium ion concentration of single cultured bovine tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 60P, 1993.

- MASON, A. J., EVANS, B. A., COX, D. R., SHIRE, J. & RICHARDS, R.I. Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biological active peptides. *Nature*, **303**: 300-307, 1983.
- McEACHERN, A. E., SHELTON, E.R. & SHAKTA, S. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7724-7728, 1991.
- McWAN, J. R., CHOUDRY, N. B. & FULLER, R. W. The effect of sulindac on the abnormal cough reflex associated with dry cough. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**:161-4, 1990.
- MEDEIROS, Y.S. & CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the biphasic responses to bradykinin in circular muscle from guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* **241**: 157-163, 1993.
- MIZRAHI, J., COUTURE, R., CARAMKAS, S. & REGOLI, D. Pharmacological effects of peptides on tracheal muscle. *Pharmacology*, **25**:39-50, 1982.
- MOLIMARD, M. & ADVENIER, C. Effect of frusemide on bradykinin- and capsaicin-induced contraction of the guinea-pig trachea. *Eur. Respir. J.*, **6**: 434-439, 1993.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiological, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**:109-142, 1991.
- MOORE, P. K., AL-SWAYEH, O. A., CHONG, N. W. S., EVANS, R. A. & GIBSON, A. L-N^G-nitroarginine (L-NOARG, a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, **99**:408-412, 1990.

- MÜLSCH, A. & BUSSE, R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **340**: 767-770, 1990.
- MUNAKATA, M., MASAKY, Y., SAKUMA, I., UKITA, H., OTSUKA, Y., HOMMA, Y. & KAWAKAMI, Y. Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide. *J. Appl. Physiol.*, **69**:665-70, 1990.
- NACLÉRIO, R. M., PROUD, D., LICHTENSTEIN, L. M., KAGEY-SOBOTKA, A., HENDLEY, J. O., SORRENTINO, J. & GWALTNEY, J. M. Kinins are generated during experimental rhinovirus colds. *J. Infect. Dis.* **157**: 133-142, 1988.
- NEWBALL, H. H., KEISER, H. R. & PISANO, J. J. Bradykinin and human airways. *Resp. Physiol.* **24**:139-146, 1975.
- NIJKAMP, F. P. & FOLKERTS, G. Reversal of arachidonic acid-induced guinea-pig tracheal relaxation into contraction after epithelium removal. *Eur. J. Pharmacol.*, **131**:315-316, 1987.
- NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**: 693-698, 1984.
- NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**: 305, 1986.
- O'NEILL, G. P. & FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS*, Vol.330, **2**:156-160, 1993.
- PALMER, R. M. J., FERRIDGE, A. G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**:524-526, 1987.

- PAYAN, D. G. Neuropeptides and inflammation: The role of substance P. *Annu. Rev. Med.*, **40**:341-352, 1989.
- POLOSA, R. & HOLGATE, S. T. Comparative airway response to inhaled bradykinin, kallidin and [des-arg⁹]Bradykinin in normal and asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **142**:1367-1371, 1990.
- PROUD, D., NACLÉRIO, R. M., GWALTNEY, J. M. & HENDLEY, J. O. Kinins are generated in nasal secretions during natural rhinovirus colds. *J. Infect. Dis.* **161**:120-123, 1990.
- PROUD, D. & KAPLAN, A. P. Kinin formation: Mechanisms and role in inflammatory disorders. *Ann. Rev. Immunol.* **6**: 49-83, 1988.
- PROUD, D., REYNOLDS, C. J., BROOMFIELD, J., GOLDMAN, D. W. & BATHON, J. M. Bradykinin effects in guinea-pig tracheal epithelial cells are mediated through a B₂ kinin receptor and can be inhibited by the selective antagonist HOE 140. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**:1124-1131, 1993.
- PROUD, D., TOGIAS, A., NACLÉRIO, R. M., CRUSH, S. A., NORMAN, P.S. & LICHTENSTEIN, L. M. Kinins are generated *in vivo* following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J. Clin. Invest.* **72**:1678-1685, 1983.
- PROUD, D., TOGIAS, A., NACLÉRIO, R. M. CRUSH, J. A., NORMAN, P. S. & LICHTENSTEIN, L. M. Kinins are generated *in vivo* following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J. Clin. Invest.*, **72**:1678-1685, 1983.

- PYNE, S. & PYNE, N. J. Bradykinin stimulates phospholipase D in primary cultures of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Biochem. Pharmacol.* **45(3)**:593-603, 1993a.
- PYNE, S. & PYNE, N. J. Differential effects of B₂ receptor antagonists upon bradykinin-stimulated phospholipase C and D in guinea-pig cultured tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **110**:477-481, 1993b.
- QIAN, Y., EDMONDS-ALT, X. & ADVENIER, C. Effects of capsaicin, (±)-CP-96,345 and SR 48968 on the bradykinin-induced airways microvascular leakage in guinea-pigs. *Pulmonary Pharmacol.*, **6**:63-67, 1993.
- RAEBURN, D., HAY, D. W. P., MUCCITELLI, R. M. & FEDAN, J. S. The development of tone in the smooth muscle of the guinea-pig isolated tracheal preparations may be influenced by prostanoids from the adjacent airway cartilage. *Prostaglandins.*, **33**:651-661, 1987.
- RAND, M. J. Nitrergic transmission: nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Exp. Physiol. Pharmacol.*, **19**:147-169, 1992.
- RANDALL, M. J., PARRY, M. J., HAWKESWOOD, E., CROSS, P. E. & DICKINSON, R. P. UK-37,248, a novel, selective thromboxane synthetase inhibitor with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity. *Thromb. Res.* **23**: 145-162. 1981.
- RASMUSSEN, H., FORDER, J., KOJIMA, I. & SCRIABINE, I.: TPA-induced contraction of isolated rabbit vascular smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**: 776-784, 1984.

- RASMUSSEN, H., TAKUWA, Y. and PARK, S.: Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **1**: 177-185, 1987.
- RAY, N. J., JONES, A. J. & KEEN, P. Evidence that GABA_B receptors can modulate release of substance P from capsaicin-sensitivity neurons in rat trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **97**:562P, 1989.
- REGOLI, D. & BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**:1-16, 1980.
- REGOLI, D., RHALEB, N. -E., DION, S. & DRAPEAU, G. New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B₂ receptor characterization. *Trends. Pharmac. Sci.* **11**:156-161, 1990.
- RHALEB, N. -E., DION, S., D'ORLÉANS-JUSTE, P., DRAPEAU, G., REGOLI, D. & BROWNE, R. G. Bradykinin antagonism: differentiation between peptide antagonists and inflammatory agents. *Eur. J. Pharmac.* **151**:275-279. 1988.
- RHALEB, N. -E., ROUISSI, N., DRAPEAU, G., JUKIC, D. & REGOLI, D. Characterization of bradykinin receptors in peripheral organs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**:938-943, 1990.
- RHALEB, N. -E., ROUISSI, N., JUKIC, D., REGOLI, D., HENKE, S., BREIPOHL, G. & KNOLLE, J. Pharmacological characterization of a new highly potent B₂ receptor antagonist (HOE 140: D- Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradykinin). *Eur. J. Pharmacol.*, **210**:115-120, 1992.
- ROBERTS, R.A. & GULLICK, W.J. Bradykinin receptors undergo ligand-induced desensitization. *Biochemistry*, **29**: 1975-1979, 1990.

- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T. & ROSENFELD, G. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* **156**: 261-273, 1949.
- ROGERS, D. F., DIJK, S. & BARNES, P. J. Bradykinin-induced plasma exudation in guinea-pig airways: involvement of platelet-activating factor. *Br. J. Pharmacol.* **101**:739-745, 1990.
- ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**:669-674, 1984.
- RUEGG, U.T. & BURGUESS, G.M. Staurosporine K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinase C. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 776-784, 1989.
- SAHA, J. K., SENGUPTA, J. N. SCHMID-ANTOMARCH, H. & LAZDUNSKI, M. Apamin: a specific toxin study a class of Ca^{++} -dependent K^+ channels. *J. Physiol. (Paris)*, **259**: 265-273, 1981.
- SAKAMOTO, T., ELWOOD, W., BARNES, P. J. & CHUNG, K. F. Effect of HOE 140, a new bradykinin receptor antagonist, on bradykinin- and platelet-activating factor- induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in guinea-pig. *Eur. J. Pharmac.* **213**: 367-373. 1992.

- SALVEMINI, D., MASINI, E., ANGGARD, E., MANNAIONI, P. F. & VANE, J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**:596-601, 1990.
- SALVEMINI, D. MISKO, T. P., MASFERRER, J. L., SEIBERT, K., CURRIE, M. G. & NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 7240-7244, 1993.
- SARIA, A., MARTLING, C. -R., YAN, Z., THEODORSSON-NORHEIM, E. GAMSE, R., LUNDBERG, J. M. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin , histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**:1330- 1335, 1988.
- SCHINI, V. B., BOULANGER, C., REGOLI, D. & VANHOUTTE, P. M. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B₂ kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**:581-585, 1990.
- SEIDAH, W. G., LADENHEIM, R., MBIKAY, M., HAMELIN, J., LUTFALLA, G., ROUGEON, F., LAZURE, C. & CHRÉTIEN, M. The cDNA structure of the rat plasma kallikrein. *DNA*, **8**:563-574, 1989.

- SILVA, A. M., CABRINI, D. A. & CALIXTO, J. B. Characterization of the response induced by bradykinin in the isolated guinea pig gallbladder. *KININ 93*, São Paulo, Oct., 65P, 1993.
- SMITH, J. J., McCANN, J. D., & WELSH, M. J. Bradykinin stimulates airway epithelial Cl⁻ secretion via two second messenger pathways. *Am. J. Physiol.* **258**:L369-77, 1990.
- STERANKA, L. R. MANNING, D. C., DEHAAS, C. J. FERKANY, J. W., BOROSKY, S. A., CONNOR, J. R., VAVREK, R. J., STEWART, J. M. & SNYDER, S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonist have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:3245- 3249, 1989.
- STABEL, S., RODRIGUES-PENA A., YOUNG, S., ROZENGURT, E. & PARKER, P.J. Quantitation of protein kinase C by immunoblot-expression in different cell lines and response to phorbol ester. *J. Cell. Physiol.* **130**: 111-117, 1987.
- STEWART, J. M. & VAVREK, R. J. Kinin antagonists: Design and activities. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**(Suppl. 6):S69-S74, 1990.
- STREB H., IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J. and I. SCHULZ, I.: Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol,1,4,5-trisphosphate. *Nature* (Lond). 306: 67-69, 1983.

TAMAOKI, J., KOBAYASHI, K., TAKAI, N., CHIYOTANI, A., KANEMURA, T. & TAKIZAWA, T. Effect of bradykinin on airway ciliary motility and its modulation by endopeptidase. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **140**:430-435, 1989.

TRIFILIEFF, A. HADDAD, E.-B., LANDRY, Y., GIES, J. -P. Evidence to two high affinity bradykinin binding sites in the guinea-pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* **207**:129-134, 1991.

TRIFILIEFF, A., DA SILVA, A., LANDRY, Y. & GIES, J. -P. Effect of HOE 140, a new B₂ noncompetitive antagonist, on guinea-pig tracheal bradykinin receptors. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **262**: 1377-1382, 1992.

TRIFILIEFF, A., AMRANI, Y., LANDRY, Y. & GIES, J. -P. Comparative action of new highly potent bradykinin receptor antagonists in the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **239**:227-229, 1993.

TUCKER, J. F., BRANE, S. R., CHARALAMBONS, L., HOBBS, A. J. & GIBSON, A.. L-N^G-nitroarginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **100**:663-664, 1990.

VANHOUTTE, P. M. Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**:S24-S30, 1988.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, **231**: 232-235, 1971.

VIDYASAGAR, C., RANDAL, A. S., EDWARD, J. K. & MURLAR, C. G. Lung peptidases, including carboxypeptidase, modulate airway reactivity to intravenous bradykinin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991.

VIALS, A. & BURNSTOCK, G.. Effects of nitric oxide synthase inhibitors, L-N^G-nitroarginine and L-N^G-nitroarginine methyl ester, on responses to vasodilators of the guinea-pig coronary vasculature. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:604-609, 1992.

WAALER, B. A. The effect of bradykinin in an isolated perfused dog lung preparation. *J. Physiol.* **157**: 475-483. 1961.

WALLACH, D. P. & BROWN, V. J. R. Studies on the arachidonic acid cascade-I. Inhibition of phospholipase A₂ *in vitro* and *in vivo* by several novel series of inhibitor compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 1315-1324, 1981.

WANG, Z., YU, M., ROBINSON, N. E., BROADSTONE, R. V., LEBLANC, P. H. & DERKSEN, F. J. Exogenous but not endogenous prostaglandin E₂ modulates pony tracheal smooth muscle contractions. *Pulmonary Pharmacol.*, **5**: 225-231, 1992.

WEBSTER, M. E. Kallikreins in glandular tissues. In: Bradykinin, kallidin, and kallikrein, ed. by E. G. Erdös, Springer-Verlag, Berlin, p. 131-135, 1970.

- WHITE, S. R., SIGRIST, K. S. & SPAETHE, S. M. Topographic distribution of prostaglandin secretion caused by bradykinin in canine tracheal epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **6**:375-381, 1992.
- WIEMER, G. & WIRTH, K.. Production of cyclic GMP via activation of B₁ and B₂ kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**:729-733, 1992.
- WILKINSON, S. E. & HALLAM, T. J. Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated?. *TIPS*, **15**: 53-57, 1994.
- WOLSING, D.H. & ROSENBAUM, J. S. Bradykinin-stimulated inositol phosphate production in NG108-15 cells is mediated by a small population of binding sites which rapidly desensitize. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**: 621-633, 1991.
- WOLSING, D.H. & ROSENBAUM, J. S. The mechanism for the rapid desensitization in bradykinin-stimulated inositol monophosphate production in NG108-15 cells involves interaction of a single receptor with multiple signaling pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**: 253-261, 1993.
- YANG, C. M., HSIA, H. C., CHOU, S. P., ONG, R. HSIEH, J. T. & LUO, S. F. Bradykinin-stimulated phosphoinositide metabolism in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacology*, **111**: 21-28, 1994.