

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANÁLISE DOS EFEITOS DE MEDICAMENTOS
ANTIASMÁTICOS, DA BRADICININA E DA SUBSTÂNCIA
P NO MODELO EXPERIMENTAL DA PLEURISIA EM
CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao
curso de Pós-graduação em
Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito
parcial à obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João
Batista Calixto

Co-orientadora: Profa. Yara
Santos Medeiros

TÂNIA SILVIA FRÖDE SALEH
Florianópolis
1996

SALEH, Tânia. Análise dos efeitos de medicamentos antiasmáticos, da bradicinina e da Substância P no modelo experimental da pleurisia em camundongos. Florianópolis, 1996. 156p. Dissertação (mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: João Batista Calixto

Defesa: 26/09/1996

A teofilina e o cromoglicato de sódio inibiram as fases imediata (4 h) e tardia (48 h) da reação inflamatória induzida pela [carragenina] no modelo da [pleurisia] em [camundongos], enquanto o salbutamol foi efetivo em inibir somente a primeira fase. A [Bradicinina], a [des-Arg⁹-BK] e a [substância P] promoveram processo inflamatório de forma dose-dependente. Neste modelo, o efeito da [Bradicinina] é mediado através da ativação do seu receptor B₂, havendo subsequentemente liberação de histamina, de óxido nítrico, de eicosanóides e de taquicinas, entre outros. A des-Arg⁹-Leu⁸-BK, nas doses estudadas, não foi efetiva em inibir o processo inflamatório induzido pela [bradicinina] ou pela [des-Arg⁹-BK]. A [substância P] induz reação inflamatória através da ativação de seus receptores NK₁ e NK₃. Nestas condições experimentais, é também evidente a participação da histamina, do óxido nítrico e da [bradicinina], entre outros. Neste trabalho são propostos diferentes protocolos experimentais que permitem estudar modelos de inflamação neurogênica induzidos pela [bradicinina], [Substância P] e pela [carragenina] que podem ser úteis no *screening* de novos medicamentos.

[carragenina], [pleurisia], [bradicinina], [des-Arg⁹-BK], [Substância P], [camundongos]

**"ANÁLISE DOS EFEITOS DE MEDICAMENTOS ANTIASMÁTICOS, DA
BRADICININA E DA SUBSTÂNCIA P NO MODELO EXPERIMENTAL DA
PLEURISIA EM CAMUNDONGOS"**

POR

TÂNIA SILVIA FRÖDE SALEH

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

Banca Examinadora:



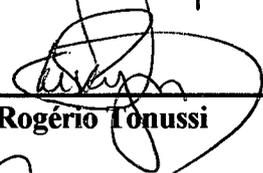
João Batista Calixto

(FMC/UFSC-Orientador)



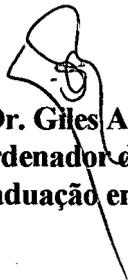
Maria da Graça M.O. Henriques

(FIOCRUZ/RJ-Membro Titular)



Carlos Rogério Tonussi

(FMC/UFSC-Membro Titular)


Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em farmacologia

Florianópolis, setembro de 1996.

EXISTIR É MOSTRAR QUE É
POSSÍVEL.

APRENDER É TORNAR POSSÍVEL A SI
MESMO.

PAULO COELHO

AS MARÉS OCEÂNICAS LEVANTAM
TODOS OS BARCOS. GRANDES E
PEQUENOS.

A MARÉ DO PROGRESSO SÓ LEVANTA
OS BARCOS BEM PILOTADOS.

A. DELFIN NETTO

O curso de pós-graduação em farmacologia de hoje, enriquecido pelas experiências, estudos e ensaios tem seu papel assegurado como da mais alta significação para a sociedade científica moderna, especialmente quando se vê, estruturada em bases científicas tão sólidas.

Era, portanto imperiosa a sua implementação na UFSC. Sob pena de graves prejuízos para a formação acadêmica dos futuros farmacologistas.

Neste contexto, quero congratular a Profa Yara Santos Medeiros, que com arrojo e grande visão da ciência, proporcionou a realização desta tese de mestrado.

Entenda-se em toda esta disposição, como o trabalho árduo, que como já sabemos para vencer a rotina e normas preestabelecidas é preciso sacudir-romper grilhões, nem sempre fáceis de realizar.

Éste é portanto, um dos méritos da Profa Yara Santos Medeiros, que não só soube orientar esta tese de mestrado, mas fê-la agigantar-se através de um trabalho arrojado, consistente e persistente.

Nestes dois anos e meio de convívio, aprendi a respeitá-la. Assim, agradeço a Professora Yara Santos Medeiros, pela orientação, empenho e amizade durante todo o curso e no presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares, em especial à minha mãe Gildacy' Fröde e irmã Regina Maria Fröde Machado Vieira pelo incentivo e dedicação.

Ao Professor Doutor João Batista Calixto, pelo incentivo e profissionalismo.

Aos Professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia.

Aos técnicos e funcionários da Coordenadoria, especialmente à Rosana Ostrosky, pela amizade, apoio e assessoria

Aos colegas de iniciação científica, e da pós-graduação, pela troca de informações, colaboração e companherismo.

ÍNDICE	PÁG.
LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO.....	14
1.1.1 Vias metabólicas do ácido araquidônico.....	14
1.1.2 Cininas.....	19
1.1.3 Óxido nítrico.....	22
1.1.4 Citocinas.....	24
1.1.5 Taquicinininas.....	27
1.2 INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA.....	31
1.2.1 Asma brônquica como exemplo de inflamação neurogênica	33
1.3 MODELOS DE INFLAMAÇÃO.....	43
2 OBJETIVOS.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 ANIMAIS.....	49
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	49
3.2.1 Indução da pleurisia.....	49
3.2.2 Determinação do exsudato.....	50
3.2.3 Contagem total e diferencial dos leucócitos.....	50
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	51
3.3.1 Análise dos efeitos de drogas antiasmáticas na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	51
3.3.2 Análise da resposta inflamatória induzida pela bradicinina e des-Arg ⁹ -BK na cavidade pleural de camundongos.....	53

3.3.3 <i>Análise da resposta inflamatória induzida pela substância P na cavidade pleural de camundongos.....</i>	56
3.4 DROGAS.....	59
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4 RESULTADOS.....	61
4.1 <i>Efeito de drogas antiasmáticas na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....</i>	61
4.2 <i>Análise da resposta inflamatória induzida pela bradicinina e pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de camundongos.....</i>	71
4.3 <i>Análise da resposta inflamatória induzida pela substância P na cavidade pleural de camundongos.....</i>	83
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÕES.....	126
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE ABREVIÇÕES

AA	- ácido araquidônico
aa	- aminoácido
AMPc	- monofosfato cíclico de 3',5'-adenosina
B ₁	- receptor das cininas tipo 1
B ₂	- receptor das cininas tipo 2
BK	- bradicinina
cav.	- intrapleurar
C3a	- componente do sistema complemento com atividade quimiotática e de anafilatoxina
C3b	- componente do sistema complemento com atividade de opsonização
C5a	- componente do sistema complemento com atividade quimiotática e de anafilatoxina
C5b	- componente do sistema complemento
C9	- componente do sistema complemento
CD11a/C11b	- moléculas de adesão, da família das integrinas, expressas em leucócitos
CD18	- moléculas de adesão, da família das integrinas, expressas em leucócitos
CGRP	- peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CK	- moléculas de adesão da família das quemocinas
COX	- ciclooxigenase
DE ₅₀	- dose efetiva necessária para obter 50% do efeito máximo
DI ₅₀	- dose necessária para inibir 50% do efeito máximo causado pelo agonista
CSF	- fator estimulante de colônia
e.p.m.	- erro padrão da média
EGF	- fator de crescimento epidérmico
ELAM 1	- molécula de adesão da família das integrinas
EX	- concentração de azul de Evans
FGF basic	- fator de crescimento básico do fibroblasto
FIG.	- figura
FL	- fosfolipase
FLMP	- formil-metionil-leucil-fenilalanina
GCSF	- fator estimulante de colônia de granulócitos
Gly	- glicina
GM-CSF	- fator estimulante de colônia de macrófagos/granulócitos
GMPc	- monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina
GRO- α	- atividade estimulante de crescimento de melanoma
h	- hora
HBEGF	- fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina
HETE	- hidroxieicosatetraenóico
HGF	- fator de crescimento de hepatócitos
HMWBCGF	- fator de crescimento de linfócitos B
HPETE	- hidroperoxieicosatetraenóico
ICAM	- molécula de adesão intercelular
IFN	- interferon
Ig	- Imunoglobulina
IL	- interleucina
i.p.	- intraperitoneal
i.v.	- endovenosa
Kg	- quilograma
LC	- limite de confiança
LIF	- fator inibitório da leucemia
LPS	- lipopolissacárides de membrana celular de bactérias gram-negativas
LT	- leucotrieno

LFA-1	- molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas
Leu	- leucina
Lys-BK	- calidina
min	- minuto
Mac-1	- molécula de adesão da família das integrinas
MBP	- proteína básica principal
MCP-1	- proteínas quimiotáticas de monócitos do tipo 1
McP-3	- proteínas quimiotáticas de monócitos do tipo 3
MGSA/GRO	- produto gênico relacionado à atividade e ao crescimento de melanoma
MCSF	- fator estimulante de colônia de macrófago
Met	- metionina
MIP-1 α	- proteína 1 α inflamatória de macrófago
MIP-1 β	- proteína 1 β inflamatória de macrófago
M ₁	- receptor muscarínico
M ₂	- receptor muscarínico
M ₃	- receptor muscarínico
NANC	- sistema não adrenérgico, não colinérgico
NGF	- fator de crescimento do nervo
NKA	- neurocinina A
NKB	- neurocinina B
NK ₁	- receptor taquicinérgico tipo 1
NK ₂	- receptor taquicinérgico tipo 2
NK ₃	- receptor taquicinérgico tipo 3
n ^o	- número
NO	- óxido nítrico
NO sintase	- óxido nítrico sintase
NT	- neutrófilos
OSM	- oncostatina M
PAF	- fator ativador de plaquetas
PAG.	- página
PDE	- fosfodiesterase
PDECGF	- fator de crescimento de células endoteliais derivadas de plaquetas
PDGF	- fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	- prostaglandina
PGI ₂	- prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
P150-95	- complexo de moléculas de adesão da família das integrinas
Phe	- fenilalanina
RANTES	- moléculas de adesão (<i>regulated on activation, normal T expressed, and secreted</i>)
SNC	- sistema nervoso central
SP	- substância P
TC	- total de células
TGF- β	- Fator de crescimento transformante β
TNF	- fator de necrose tumoral
TX	- tromboxano
VCAM	- molécula de adesão vascular
VEGF	- fator de crescimento endotelial vascular
VLA-4	- molécula de adesão (<i>very late antigens</i>)
VIP	- peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1 - Perfil temporal da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	62
Figura 2 - Efeito da teofilina na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	64
Figura 3 - Efeito da teofilina (50 mg/kg, i.p., 0,5-24 h antes) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	65
Figura 4 - Efeito do cromoglicato de sódio na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	67
Figura 5 - Efeito do cromoglicato de sódio (0,02 mg/cav., 0,5-24 h) antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	68
Figura 6 - Efeito do salbutamol na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	69
Figura 7 - Efeito do salbutamol (5 mg/kg, i.p., 0,5-24 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos.....	70
Figura 8 - Efeito de diferentes doses de bradicinina (5, 10, 20 e 40 nmol/cav.) e de des-Arg ⁹ -BK na cavidade pleural de camundongos, 4 h após a administração de cada agonista.....	72
Figura 9 - Perfil temporal da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol) em camundongos.....	73
Figura 10 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com HOE 140 e NPC 17731 administrados por diferentes vias, na pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos.....	75
Figura 11 - Efeito de diferentes doses do HOE 140 e do NPC 17731 administrados 30 min antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos.....	77

Figura 12 - Efeito do HOE 140 e do NPC 17731, administrados em diferentes períodos de tempo (0,5-8 h) antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav.,h).....	78
Figura 13 - Efeito da des-Arg ⁹ -Leu ⁸ -BK (0,1 e 3,0 nmol/cav.) administrada 30 min antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h).....	80
Figura 14 - Efeito de diferentes doses do FK 888 e do SR 48968 administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h).....	82
Figura 15 - Efeito de diferentes doses da substância P (10, 20 e 40 nmol) na cavidade pleural de camundongos.....	84
Figura 16 - Perfil temporal da pleurisia induzida pela substância P (20 nmol) na cavidade pleural de camundongos.....	85
Figura 17 - Efeito de diferentes doses do FK 888 e do SR 48968 na pleurisia induzida pela substância P (20 nmol/cav., 4 h).....	87
Figura 18 - Efeito de diferentes doses do HOE 140 e do NPC 17731, administrados 5 min antes da pleurisia induzida pela substância P (20 nmol/cav., 4 h).....	89
Figura 19 - Efeito do tratamento com Composto 48/80 (5 dias antes) na pleurisia induzida pela substância P (20 nmol/cav., 4 h) e pela histamina (1,0 µmol/cav., 1 h), em camundongos.....	90

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar no modelo da pleurisia em camundongos o efeito de drogas antiasmáticas, das cininas e da substância P (SP). Os parâmetros analisados foram a migração celular e o grau de exsudação.

Os resultados deste estudo demonstraram que:

1- No modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), que apresenta padrão bifásico da resposta inflamatória (fases precoce: 4 h e tardia: 48 h), as drogas antiasmáticas estudadas inibiram significativamente os parâmetros analisados. Nestas condições, a teofilina (1,0-50 mg/kg, i.p.), o cromoglicato de sódio (0,02-0,2 mg/cav.) e o salbutamol (0,05-50 mg/kg, i.p.) administrados 30 min antes da indução da pleurisia, inibiram significativamente tanto a migração celular quanto a exsudação da primeira fase da reação inflamatória. Este efeito inibitório foi de caráter prolongado, uma vez que o tratamento dos animais, 0,5-8 h antes da indução da pleurisia, com uma das drogas estudadas, causou uma redução significativa do processo inflamatório.

2- A segunda fase desta reação inflamatória (48 h) foi inibida significativamente pelo cromoglicato de sódio (0,02 mg/cav.) quando administrado 0,5-24 h antes da indução da pleurisia. De modo similar, a teofilina (50 mg/kg, i.p.), 0,5-4 h antes, inibiu a migração celular induzida pela carragenina (48 h) na

cavidade pleural. O salbutamol (5,0 mg/kg, i.p.), por sua vez, não modificou esta resposta tardia.

3- Em outra série de experimentos, a BK (5, 10 e 20 nmol/cav.) e a des-Arg⁹-BK (10, 20 e 40 nmol/cav.), 4 h após a aplicação de cada agonista na cavidade pleural, causaram migração celular, de forma dose-dependente, às custas do influxo de mononucleares. Os valores estimados das DE_{50s} para a BK e para a des-Arg⁹-BK foram de 3,2 (95% LC = 0,6-15,5) nmol/cav. e de 9,1 (1,2-66,8) nmol/cav., respectivamente. A análise do perfil temporal da reação inflamatória causada pela BK mostrou que o efeito inflamatório induzido por esta cinina é de caráter prolongado (até 72 h), sendo detectado 2 h após a sua administração e ocorrendo migração celular máxima 4 h após.

4- O efeito da BK (10 nmol/cav.) foi inibido, de forma dose-dependente, pelos antagonistas peptídicos do receptor B₂, HOE 140 e NPC 17731 (DI_{50s} = 0,028 (0,05-0,16) e 0,45 (0,28-0,73) pmol/cav., respectivamente. Nestas condições, a duração do efeito inibitório causado pelo HOE 140 (0,1 pmol/cav.) foi significativamente maior (até 8 h) em comparação com aquele observado para o NPC 17731 (1,0 pmol/cav., até 4 h). Nas doses testadas, o NPC 17731, administrado 30 min antes da BK, foi efetivo em inibir a migração celular pelas vias i.p., i.v. e intrapleural, enquanto o HOE 140 causou efeito inibitório apenas quando administrado pelas duas últimas vias. O antagonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-BK (0,10 e 3,0

nmol/cav.) não modificou a resposta inflamatória causada pelas cininas na cavidade pleural.

5- O tratamento prévio dos animais com o inibidor da ciclooxigenase (indometacina, 5 mg/kg, i.p.), da FLA₂, da NO-sintase induzida e da COX II (dexametasona, 0,5 mg/kg, i.p.), com o antagonista do receptor H₁ da histamina (terfenadina, 50 mg/kg, i.p.), ou com o inibidor da síntese de NO (L-NOARG, 1,0 pmol/cav.), também inibiu significativamente o influxo celular causado pela BK. Nestas condições experimentais e com o auxílio dos antagonistas dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃ das taquicininas também foi avaliada a participação destes mediadores na resposta inflamatória induzida pela BK. A potência do antagonista do receptor NK₁ (FK 888: 0,02-0,2 pmol/cav.) foi significativamente maior (DI₅₀ = 0,1, 0,02-0,5 pmol/cav.) em comparação com a obtida para o antagonista do receptor NK₃ (SR 142801: 0,1-100 nmol/cav., DI₅₀ = 21,5, 8,9-51,9 nmol/cav.) em antagonizar os efeitos da BK. Por sua vez, apenas doses elevadas (100 nmol/cav.) do antagonista do receptor NK₂ (SR 48968) das taquicininas foram efetivas em inibir o mesmo parâmetro.

6- Em estudos subseqüentes, utilizou-se protocolo experimental bastante similar ao descrito acima para estudar o efeito da SP (10, 20 e 40 nmol) na cavidade pleural de camundongos. Foi observado que esta taquicinina, 4 h após a sua administração, determinou aumento significativo da migração celular, de forma

dose-dependente ($DE_{50} = 14,2$ (10,7-19,1) nmol/cav., às custas de mononucleares. O aumento da migração celular foi observado no período de 2-24 h após a administração da SP na cavidade pleural, havendo paralelamente influxo de neutrófilos entre 2-48 h após. Os níveis de exsudato, embora discretos, foram significativos, sendo observados até 96 h após.

7- O antagonista do receptor NK_3 (SR 142801: 0,1-50 nmol/cav.) das taquicininas foi três vezes mais potente em inibir a migração celular em comparação com o antagonista do receptor NK_1 (FK 888: 100-200 nmol/cav., 5 min antes) ($DI_{50s} = 6,5$ (0,44-96) nmol/cav. e 19,3 (1,2-304 nmol/cav.), respectivamente). Nestas condições, a reação inflamatória causada pela SP (20 nmol/cav.) não foi inibida pelo antagonista do receptor NK_2 (SR 48968: 20 nmol/cav.) das taquicininas. Doses mais elevadas (100 nmol/cav.) deste último antagonista seguido da administração do agonista resultaram em morte de 100% dos animais.

8- A resposta inflamatória induzida pela SP (20 nmol/cav.) foi inibida, de forma dose-dependente, pelos antagonistas do receptor B_2 da BK, HOE 140 (0,01-0,1 pmol/cav.) e NPC 17731 (0,01-0,1 pmol/cav.) ($DI_{50s} = 0,03$ (0,013-8,0) pmol/cav. e 0,04 (0,018-0,087) pmol/cav., para a migração celular). Nestas condições, o antagonista do receptor B_1 , a des-Arg⁹-Leu⁸-BK (35 nmol/cav.) não modificou a reação inflamatória estudada. Além disso, a indometacina (5,0 mg/kg, i.p.), a L-NOARG (1,0 pmol/cav.), a dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), a terfenadina (50

mg/kg, i.p.) e o composto 48/80 (0,2 μ mol/cav., 5 dias antes) também inibiram significativamente os parâmetros estudados.

9- O tratamento prévio dos animais (30 min) com teofilina (50 mg/kg, i.p.) ou com salbutamol (50 mg/kg, i.p.) resultou em inibição significativa da reação inflamatória na cavidade pleural induzida tanto pela BK como pela SP. O cromoglicato de sódio (0,4 μ mol/cav.) foi efetivo apenas em inibir a migração celular induzida pela BK e a exsudação causada pela SP.

10- Os resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos com as drogas antiasmáticas confirmam estudos descritos em outros modelos de asma, sugerindo que os medicamentos estudados exibem propriedades antiinflamatórias.

11- Os nossos estudos sugerem ainda que a BK e a SP, além de promoverem a liberação uma da outra, utilizam simultaneamente vias celulares comuns de segundos mensageiros, resultando em aumento da liberação de histamina, de NO e de produtos da via do AA, entre outros, no sítio do processo inflamatório.

12- Finalmente, através do nosso trabalho são propostos diferentes protocolos experimentais que permitam estudar modelos de inflamação neurogênica induzidos pelas cininas e pela SP, além da pleurisia causada pela carragenina que podem

ser úteis para o estudo de drogas antiasmáticas com perfil antiinflamatório.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the effect of anti-asthmatic drugs and the pro-inflammatory mediators, kinins and substance P (SP) on a murine model of pleurisy. The analysed parameters were both cell migration and exudation levels into the pleural cavity.

The results of this study showed that:

1- In the pleurisy induced by carrageenan that presents a biphasic profile characterized by an early (4 h) and late (48 h) phases of the inflammatory reaction, the studied anti-asthmatic drugs significantly inhibited the analysed parameters. In this condition, theophylline (1.0-50.0 mg/kg, 1.p.), cromolyn (0.02-0,2 mg/cav.) and salbutamol (0.05-50.0 mg/kg, i.p.), administered 30 min before pleurisy induction, were effective in inhibiting both cell migration and exudation that occurred in the early (4 h) phase of the studied inflammatory reaction. These inhibitory effects induced by either theophylline, cromolyn or salbutamol were long-lasting, since pretreatment 0.5-8 h before pleurisy induction resulted in a significant decrease of the inflammatory indices.

2- The second phase of this inflammatory reaction (48 h) was significantly inhibited by cromolyn (0.02 mg/cav.) administered 0.5-24 h before pleurisy induction. In a similar manner, theophylline (50 mg/kg, i.p.) given 0.5-4 h before also inhibited both cell migration and exudation induced by carrageenan in the

pleural cavity. Under the same experimental conditions, salbutamol (5 mg/kg, i.p.) was not effective in inhibiting this late inflammatory response.

3- In other experiments, bradykinin (BK) (5, 10 and 20 nmol/cav.) and des-Arg⁹-BK (10, 20 and 40 nmol/cav.), 4 h after their administration, caused a dose-dependent increase of cell influx into the pleural cavity. The estimated values of the ED_{50s} for each agonist were 3.2 (95% CL = 0.6-15.5) and 9.1 (1.2-66.8) nmol/cav., respectively. Analyses of the time-course profile induced by BK (10 nmol/cav.) showed that cell influx peaked at 4 h (P < 0.01) and remained elevated for up 72 h (P < 0.01).

4- The antagonists of the B₂ BK receptor, HOE 140 (0.1-0.3 pmol/cav.) and NPC 17731 (0.1-1.0 pmol/cav.), given 30 min before pleurisy induction, fully inhibited BK (10 nmol/cav.) effects in a dose-dependent fashion with estimated values of ID_{50s} of 0.028 (0.05-0.16) and 0.45 (0.28-0.73) pmol/cav., respectively. In this condition, HOE 140 (0.1 pmol/cav.) inhibitory effects were longer-lasting (up to 8 h) than those caused by NPC 17731 (1.0 pmol/cav., up to 4 h). However, at the studied doses, NPC 17731 was effective in inhibiting BK effects when administered by intrapleural, i.v. or i.p. routes in contrast with HOE 140, which caused inhibition only when given by i.v. or by intrapleural routes. Des-Arg⁹-Leu⁸-BK, a B₁ selective

receptor antagonist, (0.1 and 3.0 nmol/cav., 30 min before) did not inhibit either BK or des-Arg⁹-BK effects.

5- Prior treatment (30 min) of the animals with indomethacin (an inhibitor of the cyclooxygenase, 5 mg/kg i.p.), terfenadine (histamine H₁ receptor antagonist, 50 mg/kg i.p.), dexamethasone (an inhibitor of FLA₂, induced NO-synthase, and of COX II, among others, 0.5 mg/kg i.p.) or L-NOARG (an inhibitor of NO synthesis, 1 pmol/cav.) significantly inhibited the recruitment of cells stimulated by BK (10 nmol, 4 h). BK effects were also inhibited by NK₁ (FK 888: 0.02-0.2 pmol/cav.) and NK₃ (SR 142801: 0.03-100 nmol/cav.) tachykinin receptor antagonists. The estimated ID₅₀ values for each antagonist were 0.1 (0.02-0.5) pmol/cav. and 21.5 (8.9-51.9) nmol/cav., respectively. At the same conditions, only higher doses of the putative NK₂ tachykinin receptor antagonist (SR 48968: 100 nmol/cav.) were effective in inhibiting cell migration.

6- In the next series of experiments, the inflammatory effects induced by SP (10, 20 and 40 nmol/cav.) in the experimental murine model of pleurisy were analysed. SP increased cell migration in a dose-dependent fashion due to an influx of mononuclear cells with estimated values of ED₅₀ of 14.2 (10.7-19.1) nmol/cav.. The enhancement of mononuclear cells was observed 2-48 h after SP administration into the pleural cavity. In parallel, neutrophil influx was also detected 2-48 h after pleurisy induction, whereas exudation, although significant, was not marked.

7- The NK₃ tachykinin receptor antagonist (SR 142801: 0.1-50.0 nmol/cav., 5 min before) was 3 times more potent in inhibiting the cell influx caused by SP in comparison to the NK₁ tachykinin receptor antagonist (FK 888, 100-200 nmol/cav.). The estimated values of ID_{50s} for each antagonist were 6.5 (0.44-96), and 19.3 (1.2-304) nmol/cav.), respectively. Under the same experimental conditions, the NK₂ tachykinin receptor antagonist (SR 48968: 20 nmol/cav.) was ineffective in inhibiting the inflammatory process induced by SP. In addition, the treatment of the animals with this later antagonist (100 nmol/cav.) followed by the administration of the agonist was associated with a 100% mortality ratio.

8- The inflammatory response induced by SP was also inhibited in a dose-dependent fashion by B₂ BK receptor antagonists like HOE 140 and NPC 17731, with estimated values of ID_{50s} of 0.03 (0.013-8.0) and 0.04 (0.018-0.087) pmol/cav., respectively. In this condition, the B₁ receptor antagonist (des-Arg⁹-Leu⁸-BK: 35 nmol/cav.) did not modify the studied inflammatory reaction. Furthermore, pretreatment (30 min) of the animals with indomethacin (5.0 mg/kg, i.p.), L-NOARG (1.0 pmol/cav.), terfenadine (50 mg/kg, i.p.) or the compound 48/80 (0.2 μmol/cav., 5 days before pleurisy induction by SP) was effective in inhibiting the same parameters.

9- The pretreatment (30 min) of the animals with theophylline (50 mg/kg, i.p.) and salbutamol (50 mg/kg, i.p.) caused a significant inhibition of the inflammatory process induced by both BK and SP in the pleural cavity of mice. Cromolyn (0.2 mg/cav.) was effective in inhibiting the cell influx induced by BK and the exudation caused by SP.

10- The data obtained with the anti-asthmatic drugs in the murine model of pleurisy induced by carrageenan confirm the results obtained in other experimental models of asthma in the literature suggesting that these drugs exert potent anti-inflammatory effects.

11- Our study clearly showed that BK and SP can be released by each other. Inasmuch, both agonists exert their pro-inflammatory effects by sharing the same second messengers systems as well as stimulating the release of other mediators like histamine, NO or products of arachidonic acid pathways.

12- At last, it is proposed different experimental protocols that permit the study of a model of neurogenic inflammation induced by both kinins and SP. Furthermore, the pleurisy induced by carrageenan provide an useful tool to study and to screen anti-asthmatic drugs with anti-inflammatory profile.

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos, cada um relacionado a um tipo de resposta tecidual. Além disso, podem ocorrer pequenas variações na expressão desta reação inflamatória dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou do órgão afetado e da coexistência de estados patológicos (Rocha e Silva, 1978; Sedgwick, e Willoughby, 1985). A resposta inflamatória é geralmente acompanhada dos seguintes sinais: calor, dor, rubor e tumor, descritos por Cornelius Celsus, no início da era cristã. A perda de função do tecido ou órgão lesado foi introduzida posteriormente como o quinto sinal cardeal por Virchow (citado em Rocha e Silva, 1978; Sedgwick e Willoughby, 1985).

Ao longo dos anos, vários mediadores do processo inflamatório foram identificados, entre eles citam-se: aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas, sistema complemento como por exemplo C3a, C5a-C5b-C9, componentes da coagulação e de fibrinólise (fibrino-peptídeos, produtos da degradação da fibrina, entre outros), metabólitos do ácido araquidônico (AA) como os produtos da via da ciclooxigenase (COX), incluindo endoperóxidos, prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX)) e da lipooxigenase (leucotrienos (LT)), ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico (HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (HETE), radicais livres derivados do oxigênio, fator agregante de plaquetas (PAF-acéter), óxido nítrico (NO) e citocinas (Cotran et al., 1991).

De modo didático, a resposta inflamatória é categorizada em três fases distintas, cada uma delas sendo mediada aparentemente por mecanismos diferentes. Assim, é inicialmente evidenciada uma fase aguda, de duração variável, onde ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas e posteriormente, ocorre regeneração tecidual ou fibrose. Cada uma destas fases estudadas pode ser dividida em vários subgrupos que são apresentados no esquema 1.

Na primeira fase da reação inflamatória, o aumento do fluxo sanguíneo na área lesada, devido à dilatação e engurgitamento dos capilares e arteríolas bem como do recrutamento adicional de outros vasos que normalmente estão hipofuncionantes, é responsável pelo eritema ou rubor da área comprometida, podendo haver também elevação da temperatura local (calor) (Rocha e Silva, 1978; Sedgwick e Willoughby, 1985). A vasodilatação se deve à ação de mediadores, a nível arteriolar e venular. É reconhecido que os mediadores liberados nesta fase são inúmeros, entre eles, citam-se as cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, C5a, prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$) e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP) (Hua, 1986; Haanen e Vermes, 1995). O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores, o que amplifica a resposta inflamatória.

REAÇÃO INFLAMATÓRIA



LESÃO TECIDUAL

(Produtos bacterianos, toxinas, complexos imunes, agressão física, citocinas)



QUIMIOTAXIA E ADESÃO CELULAR

PGD/PGE/PGF	-vasodilatação
5-HETE	-quimiotaxia
PAF (célula endotelial)	-quimiotaxia, aumento da permeabilidade, agregação leucocitária
IL-8 (monócitos)	-atração de granulócitos
Leucotrienos	-aumento da permeabilidade e edema
Ativação do Fator XII	-formação de cininas, coagulação e fibrinólise
Ativação do Sistema Complemento	-C5a (quimiotático), C3b (fagocitose)
C5a, TNF	-expressão das integrinas na superfície dos leucócitos: LFA-1, Mac-1, P150-95
IL-1, TNF	-expressão de moléculas de adesão na superfície das cél. endoteliais: ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1



Marginalização, Adesão, Migração e Acúmulo de Leucócitos



Granulócitos	-liberação de enzimas lisossomais, radicais livres do O ₂ , óxido nítrico.
Monócitos	-mobilização, ativação, transformação pelas citocinas (C5a, FMLP, IFN, IL-1, MCP-1, TGF-β, TNF).
Macrófagos	-quando ativados liberam proteases, collagenases, óxido nítrico, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas (CSFs, PDGF, FGF, TGF-β, IL-1, IL-8, TNF)
Células Epitelióides	-transformação induzida pelo INF-λ



APOPTOSE de células adjacentes e de granulócitos (estimulada pelo TNF_α, NO, suprimida por CSF, C5a), APOPTOSE de monócitos (estimulada pela IL-4, suprimida pela IL-1β, CSF, INF_λ, TNF_α)



RESOLUÇÃO INFLAMATÓRIA

Esquema 1- Fases do processo inflamatório: componentes celulares e bioquímicos. Vide texto e lista de abreviações para compreensão das siglas.

Como citado anteriormente, a segunda fase da resposta inflamatória é caracterizada pela migração de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da lesão. De um modo geral, denomina-se de quimiotaxia ao processo pelo qual as células leucocitárias são atraídas para o sítio do processo inflamatório. Estes fatores quimiotáticos são gerados tanto na corrente sanguínea quanto no sítio da lesão. Assim, o sistema complemento e as cininas são considerados importantes fatores quimiotáticos de origem plasmática (Burch et al., 1990; Abbas et al., 1991; Davies et al., 1994). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo. Entre os leucócitos, os neutrófilos possuem papel importante nesta fase da reação inflamatória.

Existem muitas revisões demonstrando que na vigência de certas reações inflamatórias ocorre a ativação do sistema complemento com liberação do fragmento C5a, que é quimiotático para neutrófilos (Macmillan e Foster, 1988; Yancey, 1989; Abbas et al., 1991a; Davies et al., 1994). Por exemplo, quando anticorpos específicos interagem com a superfície de um microorganismo patógeno, o complexo antígeno-anticorpo formado estimula a proteólise dos componentes da via clássica do sistema complemento. Através de reações bioquímicas e enzimáticas, proteínas precursoras são clivadas em fragmentos que, por sua vez, vão ativar outros componentes do sistema complemento. As principais proteínas deste sistema, que são liberadas no plasma e que participam da quimiotaxia são os

componentes C3a e C5a (Abbas et al., 1991a; Davies, et al., 1994). Outros eventos como a degranulação local de mastócitos e a indução da agregação plaquetária podem resultar na liberação de mediadores que são quimiotáticos para macrófagos e monócitos (Sibille e Reynolds, 1990). Entre os mediadores considerados quimiotáticos, citam-se: PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}, 5-HETE, cininas, fibrino-peptídeos, peptídeos liberados por neutrófilos e o leucotrieno B₄ (LTB₄), entre outros (Fontone, 1985; Beutler e Cerami, 1986; Haanen e Vermes, 1995).

Paralelamente, com a geração plasmática ou no sítio da lesão de fatores quimiotáticos juntamente com a vasodilatação local, ocorrem mudanças na distribuição dos componentes celulares em relação ao fluxo sanguíneo (Cotran et al., 1991). Nesta condição, os leucócitos, que normalmente circulam no centro da luz vascular, passam a ser detectados nas proximidades da parede do vaso, sendo este processo denominado de marginalização leucocitária. Além disso, a migração celular é facilitada pela expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de células (Bevilacqua, 1993). Estas moléculas são expressas por estímulos gerados no sítio do processo inflamatório e têm sido identificadas tanto em leucócitos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas como em células endoteliais (Bevilacqua, 1993). É reconhecido, atualmente, que os fatores quimiotáticos que estimulam tanto os leucócitos como as células endoteliais a expressar moléculas de adesão facilitam, em última análise, a adesividade entre estas células, processo este conhecido como *rolling* (Lasky e Rosen, 1992; Bevilacqua,

1993). A adesão posterior dos granulócitos à parede do endotélio facilita a migração destas células para o foco da lesão.

As moléculas de adesão são agrupadas em famílias com base em sua estrutura química e são classificadas em integrinas, selectinas, superfamília das imunoglobulinas do tipo carboidratos e adressinas vasculares, entre outras (Bevilacqua, 1993; Hellewell, 1993; Pilewski e Albelda, 1993).

As moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas têm estrutura molecular semelhante a das imunoglobulinas. Para a interação entre os leucócitos e o endotélio, os mais importantes membros desta família são as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e 2 (ICAM-2) e moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1) (Williams e Barclay, 1988; Frenette et al., 1996a e b) (tabela 1).

As moléculas de adesão da família das integrinas são importantes na interação entre as células ou entre estas com a matriz celular (Hellewell, 1993; Pilewski e Albelda, 1993). Todas as integrinas são heterodímeros identificados por suas frações α e β expressas na superfície da membrana celular, sendo conhecidas pelo menos quatorze subunidades α (1-8, E, L, M, J, X, 11b) e oito subunidades β . Diferentes combinações das subunidades α e β atuam como receptores de diferentes ligantes. Em relação às interações leucócito-endotélio, o componente mais importante são os VLA (very late antigen) constituída pelas cadeias $\alpha_4 \beta_1$ (Belivaqua, 1993; Hellewell,

Tabela 1 - Moléculas de adesão liberadas por células que participam do processo inflamatório.

MOLECULAS DE ADESÃO						
CÉLULAS	INTEGRINAS	SUPER DAS GLOBULINAS	FAMÍLIA IMUNO-	SELECTINAS	OUTRAS	
BASÓFILOS	p150*, gpIIa, Mac-1*	ICAM-3, PECAM-1	LFA-3,	LECAM-1		CD9, CD59, CD63, CR1, H-CAM-1, H-CAM-1
ENDOTÉLIO VASCULAR	vitronectina, gpIIa, 49F/104	CAM-105, ICAM-2, PECAM-1	ICAM-1, LFA-3,	ELAM-1, PADGEM		CD34, CD59, endoglina, L-VAP22, glicoproteína GPIIIB, SYNDECAM, VAP-1, PSGL-1
EOSINÓFILOS	VLA-4, Mac-1*, p150*, gpIIa	ICAM-3, PECAM-1, CD48	LFA-3,	LECAM-1		CD9, CD59, CD63, CR1, endoglina FCE-RII, H-CAM-1
FIBROBLASTOS	VLA-2, gpIIa					HCAM-1
LINFÓCITOS	VLA-2, VLA-4, VLA-5, LFA-1*, Mac-1*, LPAM- 1, gpIIa	LFA-2, CD4, CD8, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-3, CD48, NCAM, PECAM-1		LECAM-1		CD59, CD63, CR1, endoglina FCE- RII, H-CAM-1, L-VAP22
LINFÓCITOS B	VLA-3, p150*, vitronectina	gpIIa, BL-CAM, B7, B7-2	ICAM-3,			CD39, CD40, SYNDECAM
LINFÓCITOS ATIVADOS	T VLA-1, p150*,	ICAM-2, PECAM-1, CTLA-4, CD8, LFA-1	NCAM, CD28, CD4,			CD40, LIGANTE CD40
MACRÓFAGOS	LFA-1*, p150*, gpIIa	Mac-1*, ICAM-3, VCAM-1	ICAM-10,			
MASTÓCITOS	GP IIA, P150*	ICAM-3				
MONÓCITOS	VLA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6, LFA-1*, Mac- 1*, p150*, gpIIa, vitronectina	CD4, CD48, CAM- 105, ICAM-1, ICAM-3, LFA-3, B7-2		LECAM-1		CD59, CD63, endoglina, glicoproteína GPIIIB, H-CAM-1
NEUTRÓFILOS	LFA-1*, p150*, gpIIa	Mac-1*, ICAM-3, CAM-105, 1, CD48	LFA-3, PECAM-	LECAM-1		CD59, CD63, CR1, H-CAM-1
PLAQUETAS	VLA-2, VLA-4, VLA-5, p150*, glicoproteína gpIIa IIB-IIIA, VLA- 6, vitronectina	CAM-105, PECAM-1	PADGEM			CD9, CD63, glicoproteínas GPIIIB E GPIB-IX

* - P150, Mac-1 e LFA-1 = subtipos do complexo CD11/CD18. Vide texto e lista de abreviações para compreensão das siglas.

1993). A subfamília β_2 das integrinas, expressas exclusivamente nos leucócitos, são classicamente reconhecidas pelas siglas CD11a (α_1), CD11b (α_M), CD11c (α_x), as quais, são constituídas por cadeias α e estão associadas com a subunidade

β_2 (CD18) (tabela 1). Todo o complexo é conhecido genericamente por CD11/CD18. Subtipos deste complexo têm sido identificados em vários tipos celulares recebendo o nome de p150-95, LFA-1 ou Mac-1. Um defeito, de origem congênita, na subunidade β_2 , é responsável pela entidade patológica conhecida como deficiência da adesão leucocitária (Paller, et al., 1994; Shearer et al., 1994). Neutrófilos isolados destes pacientes mostram defeito na função de adesão, quimiotaxia e fagocitose (David, 1991). Outras integrinas são encontradas em outros tipos celulares e sua função primária é servir como receptor para matriz protéica extracelular como colágeno, laminina e a fibronectina (Belivacqua, 1993; Hellewell, 1993; Pilewski e Albelda, 1993).

Simultaneamente, no endotélio, às custas de estímulos gerados pela reação inflamatória, são também expressas moléculas de adesão, sendo as mais conhecidas as selectinas (Bevilacqua et al., 1991; Gahmberg et al., 1992; Lasky, 1992; Bevilacqua, 1993). São identificados pelo menos três subtipos diferentes de selectinas: E, L e P (Bevilacqua et al., 1991; Israels et al., 1992). A família das moléculas de selectinas do tipo E é expressa nas células endoteliais quando estimuladas por lipopolissacárides de membrana celular de bactérias gram-negativas (LPS) ou por citocinas do tipo TNF e IL-1. Já as moléculas do tipo P foram identificadas tanto em grânulos secretórios das plaquetas como no endotélio. Em poucos minutos, as P-selectinas são expressas no endotélio após estimulação pela histamina ou pela trombina, por elementos finais do sistema complemento e/ou pelo peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) (Bonfanti et al, 1989; Hattori et al., 1989; Patel et al., 1991). Como mostra a tabela 1, atualmente é descrito um grande número de moléculas de adesão que também são expressas em pequena quantidade em condições fisiológicas (Bevilacqua, 1993; Gahmberg et al., 1992). Sua importância tanto no processo inflamatório como nos mecanismos relacionados à propagação de neoplasias malignas tem despertado grande interesse nos últimos anos (Bevilacqua, 1993; Gahmberg et al., 1992).

Com base no exposto acima, é possível concluir que a resposta celular ao dano tecidual depende do tipo, da duração e da severidade da lesão, bem como do tipo de interação celular e o estado imunológico do hospedeiro (Cotran et al., 1991). As células que migram ou que são ativadas para o sítio do processo inflamatório são, portanto, responsáveis pela geração e manutenção dos mediadores inflamatórios. Por exemplo, a mobilização de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) para o sítio do processo inflamatório resulta na ativação destas células que, por sua vez, passam a sintetizar e liberar um grande número de agentes tipo produtos da via do AA e citocinas, entre outros (Wolfe e Horrocks, 1994).

Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) são ativamente fagocíticos e a energia para este processo é derivada da via glicolítica. A destruição de microorganismos suscetíveis pelos neutrófilos está intimamente associada ao processo de degranulação, onde ocorre a liberação de grânulos do fagossoma dessas células (Cramer, 1992). No citoplasma dos neutrófilos são identificados três tipos de grânulos, denominados de

primários, secundários e terciários (Cramer, 1992). Os grânulos primários contêm enzimas lisossomais hidrolíticas abundantes, grande quantidade de mieloperoxidase (matriz verde, responsável pela coloração do pus), de lisozima, elastase e de proteínas catiônicas. Já os grânulos secundários contêm lactoferrina e lisozima, enquanto o conteúdo dos terciários é ainda desconhecido, porém podem ser distinguidos pela presença de fosfatase ácida. Nos neutrófilos ativados e que migram para o local da lesão são identificados fagossomas que têm a facilidade de envolver o corpo estranho ou outra célula, ocorrendo posteriormente a fagocitose. Considerando que a capacidade fagocítica de destruição do neutrófilo depende da via glicolítica, eventos celulares subseqüentes envolvendo o consumo de oxigênio também conhecido como *burst* respiratório têm sido bastante estudados (Thelen et al., 1993). Os mecanismos pelos quais os neutrófilos lisam ou destroem o corpo estranho não são ainda totalmente conhecidos. No entanto, não há dúvidas que a geração de radicais livres é de fundamental importância nesta etapa da reação (Southorn e Powis, 1988).

De acordo com o tipo de reação inflamatória, além dos neutrófilos, outros leucócitos como os mononucleares podem migrar preferencialmente para o local da lesão (Sibille e Reynolds, 1990). Ao migrarem para o sítio do processo inflamatório, estas células são ativadas por produtos liberados principalmente pelos macrófagos e passam a sintetizar e liberar um grande número de agentes tipo citocinas e produtos da via do AA, além de outros mediadores. Eventos celulares subseqüentes

ocorrem, tais como aqueles descritos para os neutrófilos, envolvendo o consumo de oxigênio (*burst* respiratório) que é detectado em segundos após a interação entre um corpo estranho e estas células, resultando na geração de radicais livres (Southorn e Powis, 1988).

Outras células envolvidas neste processo são os eosinófilos. Estima-se que estas células têm uma vida média superior a dos neutrófilos (Kay e Corrigan, 1991; Bainton, 1992; Kita et al., 1995). Estas células, quando ativadas pelo PAF-acéter, por exemplo, liberam mediadores lipídicos bioativos e derivados do AA, entre outros, bem como das proteínas de Charcot Lyden, catiônica, básica principal (MBP) e peroxidase do eosinófilo (Bainton, 1992; Ferguson et al., 1995; Kita et al., 1995). Citocinas tipo fator estimulante de colônia de macrófagos e/ou de granulócitos (GM-CSF), IL-3 e IL-5 produzidas por linfócitos T e do tipo IL-1 e TNF derivadas de monócitos e macrófagos têm também importância reconhecida no processo de ativação destas células (Kita et al., 1995; Lukacs et al., 1995). Dependendo do tipo de processo inflamatório, a liberação excessiva destes produtos resulta em destruição tecidual importante como descrito, na asma brônquica (Shelhamer et al., 1995). O eosinófilo ativado pode ser distinguido dos inativos pela presença de vacúolos citoplasmáticos, que na microscopia eletrônica são denominados de grânulos hipodensos (David, 1991). Estas células ativadas liberam seus constituintes intracelulares. Os eosinófilos expressam receptor para o fragmento específico do tipo Fc para imunoglobulinas

(Ig) do tipo IgE e, portanto, são importantes efetores nas reações imunes, por exemplo, nas parasitoses por helmintos (David, 1991). Os eosinófilos também têm sido relacionados nas reações alérgicas e autoimunes (Shelhamer et al., 1995). É descrito que pacientes com atopia, asma, infecções helmínticas crônicas, síndrome hipereosinofílica idiopática ou portadores de certas neoplasias apresentam eosinófilos hipodensos no sangue periférico (Weller, 1993).

Também tem sido demonstrado que os macrófagos residentes ou monócitos participam ativamente do processo inflamatório (Cramer, 1992; Galli, 1993). Os macrófagos como os monócitos, originam-se da mesma célula progenitora na medula óssea ou a partir de outros tecidos (Cramer, 1992; Galli, 1993). Quando a diferenciação ocorre na medula óssea, provavelmente este macrófago será uma célula residente nos linfonodos, baço ou fígado, fazendo parte dos sistemas conhecidos como reticuloendotelial e fagocítico mononuclear, respectivamente. Neste papel, os macrófagos exercem a função de limpeza do organismo, removendo células sanguíneas defeituosas ou estimulando o sistema imunológico na defesa contra agentes estranhos. Quando a diferenciação celular dos macrófagos ocorre fora da medula óssea, estas células são morfológicamente distintas (menores e com pouco citoplasma) e são conhecidas como monócitos (Cramer, 1992; Galli, 1993). Os monócitos são recrutados para o sítio do processo inflamatório através de fatores quimiotáticos gerados localmente. Estas células também são recrutadas por proteínas catiônicas, liberadas dos grânulos

de neutrófilos. Como os neutrófilos, os macrófagos ativados fagocitam material estranho (Cramer, 1992). Além disso, os macrófagos possuem três diferenças em comparação com os neutrófilos: *i*) são capazes de divisão celular, importante na defesa do organismo, como no granuloma; *ii*) podem sobreviver no tecido por meses ou até anos e *iii*) secretam mediadores da inflamação (Nielsen et al, 1994; Stewart et al., 1994). De um modo geral, estas células quando ativadas têm a capacidade de realizar a fagocitose, são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos da circulação, bem como o desencadeamento de edema e de dor (Cunha et al., 1986; Cramer, 1992), entre outros. Além disso, os macrófagos ativados expressam a NO-sintase, a ciclooxygenase tipo II (COX-II) adquirindo a capacidade de sintetizar e liberar NO e prostanóides, além de diversas citocinas (Moncada e Higgs, 1993; Baumann, e Gauldie, 1994).

O quinto sinal da inflamação que equivale a perda da funcionabilidade, normalmente é efeito secundário da resposta inflamatória tecidual e da dor. O tecido inflamado causa inibição física dos movimentos através da dor por um mecanismo de *feedback* neural (Cunha et al., 1986; Cramer, 1992).

A dor que se associa à resposta inflamatória se deve à estimulação dos nociceptores locais por mediadores químicos tais como a bradicinina (BK) e a histamina (Dray e Bevan, 1993). Quimicamente, a transdução da dor envolve interações dos mediadores com receptores de membrana que são acoplados à canais iônicos e ou sistemas de segundos mensageiros resultando na mudança da excitabilidade da membrana celular. A resposta

algésica induzida por estes mediadores é potencializada por produtos da via do ácido araquidônico (PGE_2 , PGI_2 , PGD_2) e por aminas simpatomiméticas, possivelmente a dopamina liberada localmente. A produção de hiperalgésia também deve ser vista como um importante mecanismo que contribui para a regeneração e reparo tecidual (Andy et al., 1994). Além disso, vários produtos liberados no sítio da lesão inflamatória, entre eles, as citocinas como por exemplo: interleucinas (IL) do tipo IL-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN) e LPS estão envolvidos na regulação da resposta febril. As citocinas, exceto a IL-8, medeiam a resposta febril através da indução da síntese de PGE_2 em áreas específicas do hipotálamo (Dinarello et al., 1988; Dinarello et al., 1991).

1.1 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

Conforme citado anteriormente, a agressão endógena ou exógena desencadeia a resposta inflamatória, mas as substâncias químicas liberadas a medeiam e são responsáveis pela amplificação deste processo. A seguir são comentados alguns aspectos relevantes de diversos mediadores do processo inflamatório.

1.1.1 Vias metabólicas do ácido araquidônico

Produtos da via metabólica do AA também conhecidos como eicosanóides possuem papel relevante em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a homeostasia, inflamação e trombose. Os produtos derivados da via metabólica

do AA são considerados autacóides, ou seja, substâncias geradas localmente, que tem meia vida curta (segundos) e que exercem localmente os seus efeitos (Campbell e Halushka, 1996). Os eicosanóides compreendem quatro grupos de mediadores biológicos derivados do AA: PGs, TXs, LTs e produtos derivados de isoenzimas localizadas no citocromo P-450. O AA é um ácido graxo poliinsaturado encontrado na forma esterificada entre os fosfolipídeos da membrana celular e se origina diretamente de fontes alimentares ou da conversão, nos mamíferos, a partir do ácido graxo essencial, o ácido linoléico (Wolfe e Horrocks, 1994).

Através de estímulos físicos, mecânicos, químicos e/ou induzidos por diversos mediadores, o AA é liberado por diferentes fosfolipases (A, C, D) (Wolfe e Horrocks, 1994). As fosfolipases podem ser classificadas como dependentes ou independentes do ion cálcio. A via direta mais conhecida de liberação do AA envolve a participação da fosfolipase A₂ (FLA₂). A expressão da FLA₂ está codificada em dois genes distintos, sendo estas enzimas classificadas em secretórias e intracelulares (Wolfe e Horrocks, 1994).

Na célula, a enzima pode estar localizada na membrana celular ou no citosol como verificado em macrófagos RAW 264.7. Além disso, a atividade da FLA₂ é regulada por proteínas inibitórias e estimulatórias. No tecido de mamíferos, os antiinflamatórios esteroidais induzem a síntese de proteínas inibitórias da atividade da FLA₂ denominadas de lipocortinas (Wolfe e Horrocks, 1994). A atividade da FLA₂ pode também ser

ainda regulada por uma proteína G após estímulo por um mediador da inflamação. A dissociação da subunidade α do complexo $\beta\gamma$ da proteína G resulta na ativação da FLA₂. A regulação da ativação da FLC também envolve processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas cinases que facilitam a translocação desta enzima do citosol para a membrana celular. Múltiplas isoformas de FLC têm sido purificadas (Catt, 1995), sendo que algumas apresentam na sua estrutura molecular alto grau de homologia com proteínas do tipo tirosina cinases. É conhecido que a ativação da FLC resulta na formação de segundos mensageiros da via do trifosfato de inositol e do diacilglicerol, porém esta enzima também está envolvida na liberação do AA da membrana celular (Wolfe e Horrocks, 1994). Através de mecanismo bastante similar ao descrito anteriormente, a via metabólica da FLD irá também liberar o AA da membrana celular.

Seguindo-se a liberação do AA, de acordo com a disponibilidade enzimática celular, esta molécula servirá de substrato para a ação de enzimas tipo ciclooxigenase e/ou lipooxigenase.

AS PGs e os TXs são produtos da via metabólica do AA catalisada pela enzima COX. Na realidade, estes compostos constituem o produto final de uma seqüência de reações envolvendo enzimas específicas. São produzidos pela maioria das células do organismo e possuem uma grande diversidade de funções. Sob ação da COX, o AA dá origem ao endoperóxido de PGG₂, o qual posteriormente é convertido em PGH₂, ambos

compostos são altamente instáveis (Davies e MacIntyre, 1992; Campbell e Halushka, 1996). Na presença de tromboxano sintetase é gerado preferencialmente TXs, enquanto outras sintetases específicas dão origem aos diferentes grupos de prostaglandinas. Portanto, na presença de sintetases específicas (PGD sintetase, PGE sintetase, PGF sintetase, PGI sintetase, por exemplo) são gerados os diferentes prostanóides.

O TXA₂ é um potente agregante plaquetário e vasoconstritor produzido pelas plaquetas e outras células sanguíneas. Já a PGI₂, gerada predominantemente no endotélio vascular e outros tipos celulares, inibe a agregação plaquetária e é um potente vasodilatador. As principais ações das PGE₂ são o bloqueio da secreção de ácido clorídrico e estimulação da secreção de muco no estômago, vasodilatação e inibição da ativação de células no sítio do processo inflamatório, sendo também considerada um mediador da febre (Wolfe e Horrocks, 1994). A PGF_{2α} causa contração brônquica e uterina, enquanto as PGD₂ induzem a vasodilatação e a broncoconstrição. De forma geral, as prostaglandinas e tromboxanos agem na amplificação do processo inflamatório (Davies e MacIntyre, 1992; Wolfe e Horrocks, 1994).

Através de clonagem molecular, foram identificados dois tipos de ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, codificadas por genes distintos (Wolfe e Horrocks, 1994). O conhecimento dessas duas formas enzimáticas permitiu distinguir o papel fisiológico exercido pelas PGs e TXs, daquele observado em condições patológicas. Em condições fisiológicas, as PGs e TXs são

gerados através da via da COX-1, que é reconhecida como enzima do tipo constitutivo (Isakson et al., 1995). Por sua vez, em condições patológicas, através de estímulos induzidos predominantemente por citocinas e LPS, os macrófagos, as células endoteliais e os neutrófilos passam a expressar a COX-2 (enzima induzida) (Isakson et al., 1995). É reconhecido, hoje em dia, que alguns agentes antiinflamatórios não esteroidais utilizados na clínica exercem ação inibitória inespecífica sobre as duas enzimas, resultando nos efeitos colaterais do tipo epigastralgia, reativação da úlcera péptica e hemorragia gastrointestinal, entre outros (Isakson, et al., 1995).

A via da lipooxigenase envolve a conversão do AA em derivados hidroperóxidos (HPETE): 12-HPETE nas plaquetas e 5-HPETE e 15-HPETE nos leucócitos (Wolfe e Harrocks, 1994). O 5-HPETE pode sofrer peroxidação e se transformar em HETE, o qual é conhecido como agente quimiotático potente para neutrófilos. Os principais produtos metabólicos formados por esta via, nos mamíferos são LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 . É reconhecido que o LTB_4 é um agente quimiotático potente que promove agregação de leucócitos ao endotélio venular, enquanto o LTC_4 , o LTD_4 e o LTE_4 causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (Wolfe e Harrocks, 1994). Esses leucotrienos são sintetizados em diversos tipos celulares incluindo macrófagos e leucócitos (Campbell e Halushka, 1996; Wolfe e Harrocks, 1994).

1.1.2 Cininas

As cininas, a BK e a Lysyl-BK (Lys-BK: calidina), são oligopeptídeos formados endogenamente. As cininas são encontradas em insetos, répteis, anfíbios e mamíferos. Atuam principalmente como hormônios locais através de mecanismos autócrinos e parácrinos (Bathon e Proud, 1991; Farmer e Burch, 1992; Bhoola et al., 1992). São formadas em vários órgãos e podem ser detectadas em secreções (urina, saliva e suor, por exemplo), no fluido intersticial e no sangue.

Nas últimas décadas, os estudos e o conhecimento bioquímico do sistema calicreína-cininas têm aumentado drasticamente. Inúmeros estudos farmacológicos e bioquímicos têm demonstrado o envolvimento destas substâncias em processos fisiopatológicos, acompanhados de lesão tecidual ou de inflamação (Farmer e Burch, 1992; Dray e Perkins, 1993; Marceau, 1995).

As cininas são formadas a partir dos cininogênios, α_2 -globulinas de alto (626 aminoácidos (aa), 88 a 120 KD) e de baixo pesos moleculares (409 aa, 50 a 68 KD), ambas derivadas de um único gene (Hall, 1992; Margolius, 1995), por ação de cininogênases. O principal local de síntese dos cininogênios é o fígado.

A cininogenase mais conhecida é a calicreína (Carretero e Scicli, 1991; Bhoola et al., 1992; Carretero et al., 1993a, b). Existem dois tipos de calicreínas, a plasmática e a tecidual. A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula no sangue como um precursor inativo, é conhecida como pré-

calicreína. A ativação do sistema calicreínas se dá através de estimulação fisiopatológica como, por exemplo, trauma tecidual, anóxia, inflamação ou pH baixo (Bathon e Proud, 1991). No plasma, a conversão da pré-calicreína para calicreína é catalisada pelo fator Hageman (Fator XII da cascata de coagulação). Por sua vez, a calicreína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular liberando a BK. De forma geral, a calicreína plasmática não participam das reações de conversão do cininogênio de baixo peso molecular para formação da calidina. Estudos mostram que a calicreína tecidual libera a calidina dos cininogênios, tanto de alto como de baixo pesos moleculares (Bathon e Proud, 1991; Farmer e Burch, 1992).

Em humanos, a BK e a Lys-BK são as cininas que possuem papel fisiológico relevante. A BK exerce diversas ações, entre elas, cita-se a produção e a liberação de diversas substâncias químicas endógenas como prostanóides de diversos tipos celulares, citocinas (IL-1 e TNF de macrófagos), além do NO liberado das células endoteliais vasculares (Dray e Bevan, 1993).

Através de ensaios biológicos, Regoli e Barabé propuseram em 1980, a classificação de receptores da BK em B₁ e B₂. Essas evidências foram baseadas, inicialmente, em estudos utilizando agonistas e antagonistas seletivos das cininas disponíveis e foram confirmados, posteriormente, através de estudos de *binding* e de clonagem molecular (McErchern et al, 1991; Hess et al., 1992; Mencke et al., 1994; MacNeil et al., 1995).

A maioria das ações fisiológicas da BK são mediadas através da ativação de receptores do tipo B₂, pelo qual eventos intracelulares como as vias da FLC, gerando diacilglicerol e do trifosfato de inositol, e da FLA₂, produzindo PGs são ativados (Farmer e Burch, 1992). Estes receptores são constitutivos, amplamente distribuídos no organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC) de animais de várias espécies (Hall, 1992). A ativação dos receptores B₂ possui um papel significativo nos estágios iniciais da dor inflamatória e durante a inflamação aguda e crônica (Lembeck et al., 1992). Antagonistas do receptor B₂ da BK como o HOE 140 e NPC 17731, entre outros, são potentes em bloquear a hiperalgesia aguda, bem como diversos processos inflamatórios (Burch et al., 1990; Kyle et al., 1991).

Os receptores B₁ estão restritos a alguns tecidos, como por exemplo a musculatura lisa vascular (arterial e venosa de coelho), sendo que muitas vezes coexistem com os receptores B₂. Os receptores B₁ também foram identificados em culturas de distintos tipos de células e em diversos tecidos de ratos, camundongos, suínos, bovinos e humanos (Boschcvov et al, 1984; Deblois e Marceau, 1987; Hall, 1992; Marceau, 1995). A des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-BK são os agonistas seletivos do receptor B₁, sendo mais potentes que a BK (Marceau, 1995). Mais recentemente, a importância deste receptor, que seria induzido em vários estados patológicos, tem sido enfatizada, uma vez que parece ser pouco freqüente a ocorrência da sua forma constitutiva. Admite-se, com raras exceções, que o receptor B₁

seja induzido em condições patológicas, como por exemplo, durante a inflamação crônica, lesão tecidual e em estados de hiperalgesia (Dray e Perkins, 1993; Perkins e Kelly, 1993; Cruwys et al., 1994; Davis e Perkins, 1994a). Por exemplo, em ratos, a injeção de adjuvante de Freund completo na articulação do joelho resulta em hiperalgesia três dias após, o qual é inibida por antagonista do receptor B_1 (des-Arg⁹-Leu⁸-BK). Neste modelo, os sítios destes receptores ainda não são bem conhecidos, mas admite-se que eles possam ser induzidos em terminações nervosas sensoriais ou em outras células do processo inflamatório (Cruwys et al., 1994). Parece que a produção local de citocinas pode estar envolvida na expressão destes receptores durante a inflamação. Validando estes resultados, tem sido também demonstrado que a injeção intraplantar ou intra-articular de IL-1 induz hiperalgesia, que é exacerbada com a administração de des-Arg⁹-BK e atenuada pela des-Arg⁹-Leu⁸-BK (Dray e Bevan, 1993). A existência de subtipos de receptores B_1 descritos principalmente em estados patológicos tem sido sugerida por alguns (Farmer e Burch, 1992) e questionada por outros (Marceau, 1995).

1.1.3 Óxido Nítrico

Outro mediador do processo inflamatório é o NO. A demonstração em 1988, por Palmer et al., de que o NO gerado pelas células endoteliais vasculares era um dos fatores de relaxamento endotelial, resultou em grande avanço em diversas áreas da ciência básica (Moncada, 1992; Moncada e Palmer, 1992;

Billiar, 1995; Kerwin et al., 1995). Atualmente, o NO é também reconhecido como um importante mediador do processo inflamatório (Lowenstein et al., 1994; Billiar, 1995; Kerwin et al., 1995).

No endotélio vascular, o NO gerado a partir da reação de conversão da L-arginina para L-citrulina, sob ação da NO-sintase difunde-se para o citoplasma da célula da musculatura lisa vascular estimulando a guanilato-ciclase solúvel. O efeito biológico final desta seqüência de eventos é o relaxamento (Moncada, 1992; Moncada e Palmer, 1992). A geração de NO tem sido caracterizada em muitos outros tecidos, incluindo plaquetas, adrenal, hepatócitos, células de Kupffer e do pulmão, entre outras (Moncada e Palmer, 1992; Nussler e Billiar, 1993; Moncada e Higgs, 1993).

Da mesma forma que os produtos metabólicos da via da COX, atualmente é reconhecida a participação do NO tanto em estados fisiológicos como patológicos. Pelo menos três enzimas do tipo NO-sintase que têm alta homologia com a citocromo P-450 redutase têm sido reconhecidas e são expressas por genes distintos (Billiar, 1995; Kerwin et al., 1995). De forma semelhante à COX, a NO-sintase pode ser constitutiva ou induzida. A NO-sintase induzida expressa em macrófagos, monócitos, hepatócitos e condrócitos ativados, entre outros, está associada com processos inflamatórios e é responsável por muitos eventos nesta reação. Já a NO-sintase constitutiva foi caracterizada no endotélio vascular e em células nervosas. Um mecanismo pelo qual o NO pode exercer efeito inflamatório, é

através do aumento da produção de prostaglandinas (Salvemini, et al., 1993; Davidge et al., 1995). Foi demonstrado que inibidores da NO-sintase diminuem a produção de PGs bem como de nitratos em cultura de macrófagos de fígado (Stadler et al., 1993). Nestas condições, a NO-sintase aumenta a produção de PGs pela ativação direta da COX-2. Isto sugere que a produção local de NO no sítio da inflamação poderia amplificar a resposta inflamatória pelo aumento da atividade da COX-2 e subsequente incremento da produção de PGs. Tem sido também demonstrado que o NO apresenta atividade antimicrobiana bem como efeito citostático em células tumorais cultivadas com macrófagos ativados (Moncada e Higgs, 1993; Nusller e Billiar, 1993).

1.1.4 Citocinas

As citocinas, nome genérico de outro grupo de mediadores do processo inflamatório, são proteínas formadas em quase todas as células eucarióticas (Luger e Schwarz, 1995). Participam tanto do processo de hemostasia como também estão envolvidas em alguns estados patológicos. As citocinas agem via receptor específico na superfície celular, possuem múltiplas atividades, dentre elas, influenciar a expressão de seus próprios receptores e afetar a função celular via sinergismo, adição ou antagonismo (Oppenheim et al., 1991).

Fazem parte da família das citocinas as ILs, as quemocinas, os IFN, os TNF, fatores estimulantes de colônia (CSF) e fatores estimuladores ou inibidores do crescimento

(Luger e Schwarz, 1995). De um modo geral, todas as células sanguíneas envolvidas com o processo inflamatório adquirem a capacidade quando ativadas, de gerar um grande número de citocinas como mostra a tabela 2.

Pelo menos duas citocinas parecem ser importantes mediadores da inflamação: IL-1 e TNF. Ambas induzem o mesmo espectro de efeitos biológicos, em particular nas fases agudas da inflamação, além de agirem sinergicamente. As suas ações mais importantes na inflamação são os efeitos locais, como por exemplo sobre o endotélio vascular onde estimulam a síntese de moléculas de adesão e a expressão da NO-sintase induzida e da COX-2, além de induzir a produção de outros mediadores como o PAF-acéter. Tanto a IL-1 como o TNF são responsáveis pelas respostas sistêmicas da fase aguda do processo inflamatório associadas com infecção ou lesão, incluindo febre, proteínas hepáticas de fase aguda, a quimiotaxia de neutrófilos, a liberação de hormônio corticotrófico e de corticosteróides (Cotran et al., 1991). O TNF particularmente tem sido relacionado na fisiopatologia do choque séptico (Abbas et al., 1991b; Lukacs et al., 1995). Já as citocinas do grupo dos fatores de crescimento são importantes para estimular a proliferação de fibroblastos envolvidos no processo de reparação tecidual.

As quemocinas compreendem uma família de citocinas com ação quimiotática e pró-inflamatória caracterizada pela presença na sua molécula de quatro cisteínas. A ativação e

capacidade quimiotática das quemocinas do grupo C-C parecem desempenhar papel principal no acúmulo de mediadores no sítio do processo inflamatório, particularmente nas doenças alérgicas. Constituem exemplos deste grupo, as proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1 e MCP-3) e de basófilos. Entre os seus efeitos, cita-se a liberação de histamina pelos basófilos e mastócitos. As quemocinas do grupo RANTES (*regulated on activation, normal T expressed, and secreted*) são quimiotáticas para basófilos e eosinófilos. Outro membro deste grupo é a família C-X-C que exerce efeito quimiotático para neutrófilos e inclui a IL-8 e o produto gênico relacionado a

Tabela 2 - Citocinas liberadas por células que participam do processo inflamatório.

CÉLULAS	CITOCINAS
BASÓFILOS	IL-4, GMCSF, IL-5, TNF α , IL-3, MIP-1- α , MIP-1- β , IL-6, IL-1, IL-8, IL-1 α , TGF- β , IL-6, GMCSF, IL-3, TGF- α
EOSINÓFILOS	IL-1 α , TGF- β , IL-6, GMCSF, IL-3, TGF- α
LINFÓCITOS B	TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-4, IL-6, GM-CSF, IL-5, IFN- λ
LINFÓCITOS T ATIVADOS	TNF- β , IL-3., IL-6, IL-13, HMWBCGF, IL-4, MIP-1 α , RANTES, TNF- α , LIF, OSM, IFN- λ , IL-3, GMCSF, MCSE, TNF- α , TNF- β , TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-4, IL-6, GM-CSF, IL-5, IFN- λ , IFN- λ , IL-3, GMCSF, MCSE, TNF- α , TNF- β
MACRÓFAGOS	PDGF, TGF- β , IL-10, IL-12, MCSF, IL-1, GMCSF, GCSF, TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- α , HBEGF, FGF basic, TGF- α , GRO- α , MIP-1 α , VEGF, NGF, LIF, OSM, TNF- α , TNF- β , IFN- λ , IL-2
MASTÓCITOS	IL-4, GMCSF, IL-5, TNF- α , IL-3, MIP-1- α , MIP-1- β , IL-6, IL-1, IL-8, IL-1 α , TGF- β , IL-6, GMCSF, IL-3, TGF- α
NEUTRÓFILOS	IL-1 α , IL-1 β , GMCSF, MCSF, IL-6, IL-8, IL-1ra, IFN- α , GCSF, PAF, TNF- α , GRO- α
PLAQUETAS	PDGF, TGF- β , EGF, ,RANTES, IL-1,HGF, GRO- α , PDECGF

Vide texto e lista de abreviações para compreensão das siglas.

atividade e crescimento de melanoma (MGSA/GRO) (Luger e Schuwarz, 1995).

1.1.5 Taquicininas

As taquicininas constituem uma família de pequenos peptídeos que apresentam a mesma seqüência C-terminal: Phe-X-Gly-Leu-MetNH₂. São conhecidos três peptídeos desta família: a neurocinina A (NKA), a neurocinina B (NKB) e a substância P (SP). Este último peptídeo, por ter sido o primeiro a ser identificado, é o mais conhecido e também o mais estudado.

Estudos imuno-histológicos sugerem que a SP e a NKA estão localizadas em terminações nervosas sensoriais tanto do SNC como do periférico, dos tratos gastrintestinal e geniturinário, glândula adrenal, da pele, como dos sistemas músculo-esquelético, circulatório e respiratório (musculatura lisa e epitélio) (Lundberg e Saria, 1987). A SP e a NKA liberadas das terminações nervosas sensoriais induzem a uma variedade de respostas, incluindo o aumento da permeabilidade vascular (Otsuka e Yoshioka, 1993) e agem também como potentes indutores da secreção de muco. As taquicininas podem também mediar o funcionamento do sistema imunológico através da liberação de citocinas, agindo diretamente nos linfócitos.

As taquicininas, particularmente a SP, foram identificadas, em 1931, por Von Euler e Gaddum, em extratos de cérebro e intestino de equinos. Posteriormente, isolou-se este mesmo peptídeo em animais de outras espécies não pertencentes à família dos mamíferos. Em 1953, Lembeck propôs o possível papel

da SP como um neurotransmissor e mais tarde, Takahashi et al. (1974) propuseram a sua participação na inflamação neurogênica. Na década de setenta foi demonstrado que a SP é um neuropeptídeo distribuído tanto no SNC como no periférico (Hokfelt et al., 1975a, b).

Três receptores taquicinérgicos foram recentemente clonados. Estes receptores ultrapassam sete vezes a membrana celular e estão acoplados à proteína G. São denominados de NK₁, NK₂ e NK₃. Do ponto de vista farmacológico e bioquímico, a caracterização de receptores taquicinérgicos tem sido facilitada, mais recentemente, pelo surgimento de agonistas e antagonistas peptídicos e não peptídicos seletivos (Regoli, et al., 1987; Naaknish, 1991; Joos, et al., 1995; Patacchini e Maggi, 1995).

O receptor NK₁ foi identificado nos SNC e periférico de animais de várias espécies (Otsuka e Yoshioka, 1993). Em nível de sistema nervoso periférico, o receptor NK₁ medeia muitos eventos importantes como a vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, estimulação de secreções salivares e das vias aéreas e a contração da musculatura lisa (Ujiie et al., 1993).

O receptor NK₂ é encontrado principalmente no sistema nervoso periférico e especialmente na musculatura lisa dos tratos respiratório, gastrintestinal e urinário. Entre os efeitos taquicinérgicos, envolvendo os receptores do tipo NK₂, incluem a facilitação da liberação de transmissores e a excitação neuronal em vias nervosas eferentes de rato (Lee et

al., 1982), vias aéreas de coelho (Belvisi et al., 1994) e a estimulação de certas células como os macrófagos alveolares de cobaia (Brunelleschi et al., 1990). Estudos mostram que os receptores NK₂ também estão presentes no SNC, principalmente no núcleo talâmico, lâminas III e VI das regiões frontal do córtex e no hipotálamo (Hagan e Mclean, 1993).

Os receptores do tipo NK₃ têm sido demonstrados no SNC e trato gastrintestinal (Tsuchida et al., 1990). Resposta funcional aos seus agonistas seletivos tem sido detectada em preparações isoladas de musculaturas lisas circulares de íleo e de cólon de cobaia onde produzem contração e relaxamento através da liberação de vários mediadores (Laufer et al., 1986, 1988; Maggi et al., 1993b). Resposta contrátil aos agonistas seletivos deste receptor também foi descrita na musculatura lisa da veia porta (Mastrangelo et al., 1987) e no útero de rata (Barr et al., 1991). No SNC, os receptores NK₃ são encontrados em grande quantidade, coexistindo com os subtipos NK₁ e NK₂ (Tsuchida et al., 1990). No SNC, o receptor NK₃ foi identificado no córtex frontoparietal (lâminas IV e V), núcleos solitário e interpeduncular e área tegmental ventral. Na medula espinhal, os receptores NK₃ estão restritos à região do corno dorsal (Otsuka e Yoshioka, 1993).

Várias evidências têm mostrado que as taquicininas liberadas de terminais nervosos periféricos possuem papel importante na inflamação (Geppetti et al., 1995). Estudos mostram que a SP, quando injetada na pele humana produz calor, rubor, dor e inchaço. Na pele de rato, a SP induz vasodilatação

mediada por receptores do tipo NK₁ (Maggi, 1995). Em condições experimentais, foi demonstrado que a SP causa a vasodilatação, via mecanismo dependente do endotélio vascular. Além disso, tanto a SP como a estimulação nervosa na superfície dérmica, em ratos, induzem a um aumento da permeabilidade pós-capilar (Kowalski e Kaliner, 1988). No coelho, a aplicação local de SP na microvasculatura muscular esquelética promove vasodilatação, agregação plaquetária e de leucócitos (Öhlen et al., 1989). Este neurotransmissor também promove aumento da atividade fagocítica de macrófagos de suínos e da liberação de enzimas lisossomais, de ânions superóxidos e de metabólitos do AA (Hartung et al., 1986).

Antagonistas taquicinérgicos têm sido testados em vários modelos animais de inflamação, incluindo a asma brônquica e a hiperresponsividade brônquica (Sakamoto et al., 1993; Joos et al., 1995). Estudos realizados nas vias aéreas de diversos animais têm demonstrado a participação de receptores NK₁ e NK₂ na secreção de muco, fluido microvascular, vasodilatação e principalmente efeitos inibitórios em células inflamatórias (Frossard e Advenier, 1991; Maggi et al., 1993a; Maggi, 1995; Geppetti et al., 1995). Na broncoconstrição induzida pelas taquicininas em cobaia prevalecem os efeitos mediados pelo receptor do tipo NK₂ em relação ao NK₁ (Hirayama et al., 1993), enquanto que na exsudação em outros roedores predomina a ativação do NK₁ (Abelli et al., 1991; Sakamoto et al., 1993). Outros efeitos como o aumento da permeabilidade vascular da traquéia por salina hipertônica em ratos (Piedimonte et al.,

1993), broncoconstrição e tosse induzida experimentalmente pelo ácido cítrico predominam a ativação do receptor NK₂ (Satoch et al, 1992; Advenier et al., 1993).

1.2 INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA

Lewis, em 1937, definiu a inflamação neurogênica como sendo uma defesa endógena potente que ocorreria na fase recente da lesão tecidual. Este conceito é baseado em evidências de que a estimulação de pequenos neurônios aferentes produz sintomas similares àqueles presentes durante a inflamação como vasodilatação, edema, acúmulo e agregação plaquetária e ativação de células do tipo mastócitos (Lembeck e Holzer, 1979; Kowalski e Kaliner, 1988; Dimitriadou et al., 1992). Nesta condição, existe uma interação complexa entre as terminações nervosas e outros tipos celulares, alguns residentes, outros invasores, além de células do sistema imune.

Admite-se que as terminações nervosas sensoriais finas (fibras do tipo C e do tipo A δ) pode ser estimulada por diversos agentes flogísticos ou por substâncias químicas geradas pelo tecido agredido. A ativação destas terminações nervosas aferentes induz reflexo axonal e, posteriormente, liberação de neuropeptídeos como a SP, NKA e o CGRP (Geppetti et al., 1995). Esses neuropeptídeos, por sua vez, mudam a excitabilidade de terminais nervosos sensoriais e de fibras simpáticas pós-ganglionares. Eles também ativam células do sistema imune, alteram o fluxo sanguíneo e induzem a liberação de substâncias ativas através do extravasamento plasmático.

Atualmente, muitos tipos de inflamação neurogênica, os quais estão intimamente relacionados com a neurotransmissão, são reconhecidos, citando-se entre eles a enxaqueca, a asma brônquica e a rinite alérgica (Shelhamer et al., 1995). Nestas condições, além da reação vasomotora (calor e rubor, dilatação arteriolar) no local lesado, ocorre também uma inflamação crônica (Colpaert et al., 1983; Basbaum e Levine, 1991).

A inflamação neurogênica não pode ser vista como um processo isolado, mas incluído na seqüência de eventos da reação inflamatória e vias de reflexo neuronal (Donnerer et al., 1991; Donnerer e Amann, 1993). Portanto, a partir do conhecimento que a inflamação está freqüentemente associada com dor e hiperalgesia é fácil reconhecer que alguns dos neurotransmissores são capazes de ativar terminações nervosas nociceptivas direta ou indiretamente. Tem sido demonstrado experimentalmente que a administração sistêmica de taquicininas reproduz algumas dessas alterações. A vasodilatação induzida por estes peptídeos é observada primariamente em vênulas pós-capilares (Dimitriadou et al., 1992). Por sua vez, a estimulação elétrica do gânglio trigêmeo de rato, ao liberar taquicininas, induz o extravasamento plasmático e a degranulação de mastócitos. Ambos os efeitos são abolidos com o tratamento prévio com capsaicina (Markowitz et al., 1987). Além disso, a aspirina e a indometacina também bloqueiam o extravasamento plasmático mediado pelas taquicininas (Otsuka e Yoshioka, 1993). O conjunto destas evidências sugere a

participação de mediadores liberados das terminações nervosas no processo inflamatório.

1.2.1 Asma brônquica como exemplo de inflamação neurogênica

Conforme comentado anteriormente, a inflamação neurogênica pode ser considerada um componente importante nas doenças do trato respiratório. Sabe-se que a inflamação das vias aéreas, causando secreção excessiva e/ou obstrução, afetam uma proporção considerável da população. Estas doenças incluem: asma, bronquite, bronquiectasia, rinite e fibrose cística, entre outras.

A asma brônquica é uma doença inflamatória das vias aéreas, que determina uma obstrução significativa do fluxo aéreo. Estima-se nos países do Primeiro Mundo que a incidência desta doença seja em torno de 10% (Schlosberg et al., 1993). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento crescente da prevalência e severidade desta doença, o que é comprovado pelos altos índices de mortalidade nos anos oitenta (Burney, 1986; Fleming e Crombie, 1987; Crane et al., 1989; Spitzer et al., 1992). Nos Estados Unidos, é a principal causa de internação infantil (Meltzer et al., 1992). Estes dados têm preocupado as autoridades da saúde de diversos países e parece estar ocorrendo a despeito do aumento da prescrição de medicamentos para o seu tratamento, sugerindo que a terapia disponível não é ainda a mais adequada (Sociedade Torácica Britânica, 1990a, b; Consenso Internacional patrocinado pelo Instituto Nacional de Saúde: NIH, 1992).

De acordo com a Sociedade Torácica Britânica (1990a, b) e o Consenso Internacional sobre Asma Brônquica (NIH-USA, 1992), a asma brônquica é definida como uma doença inflamatória crônica e persistente das vias aéreas caracterizada por exacerbações expressas por tosse, sibilos, rigidez torácica e dificuldade respiratória, geralmente de caráter reversível, podendo apresentar diferentes graus de severidade e algumas vezes ser fatal. Na mesma publicação, o Instituto Nacional de Saúde Americano conceitua operacionalmente a asma brônquica como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, onde participam vários tipo celulares, incluindo mastócitos e eosinófilos. Associado, ocorre aumento da reatividade das vias aéreas. Este processo inflamatório ocorre mesmo nos casos considerados leves da doença.

A etiologia desta doença parece ser complexa, mas não se descarta a participação de fatores ambientais e/ou genéticos. Além da participação de células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, etc), outros fatores como mecanismos neurais colinérgicos, adrenérgicos, terminações nervosas do sistema não adrenérgico não colinérgico (sistema NANC) juntamente com a presença de uma disfunção ou lesão do epitélio brônquico parecem exercer papel importante na instalação e manutenção do processo inflamatório nas vias aéreas (Corrigan e Kay, 1992; Davies e Devalia, 1992; Sears, 1993). Assim, mediadores inflamatórios podem modular ou facilitar a liberação de neurotransmissores das vias aéreas por atuarem em nível de receptores pré-juncionais ou pós-sinápticos. Similarmente,

mecanismos neurais podem contribuir para a reação inflamatória na parede do vaso, sendo que o conceito de inflamação neurogênica que é descrito na pele e no trato gastrintestinal também pode ser transferido para o pulmão e brônquios (Dray e Bevan, 1993).

Vale ressaltar que o sistema nervoso NANC não é uma população isolada de fibras nervosas, sendo que esta forma de inervação esta localizada geralmente na mesma topografia dos sistemas nervosos colinérgicos e adrenérgicos, e seus efeitos são mediados pela liberação de co-transmissores dos nervos simpáticos e parassimpáticos. Pode ocorrer, portanto, aumento da broncoconstrição reflexa devido à estimulação de receptores sensoriais nas vias aéreas pelos mediadores do processo inflamatório. Neste sentido, tem sido demonstrado que vários mediadores tipo histamina, PGs e BK, entre outros, estimulam os receptores sensoriais das vias aéreas (Geppetti et al., 1995) e é possível que estes estímulos sejam amplificados na presença de disfunção ou de lesão epitelial. Desta forma, nestes pacientes é comum observar aumento da reatividade colinérgica devido à estimulação neural por TXs, PGD₂ e taquicininas que facilitam a liberação da acetilcolina das terminações nervosas pós-ganglionares das vias aéreas. A facilitação da transmissão neuronal pode também ocorrer em nível ganglionar, pois estas estruturas, no processo inflamatório, podem estar circundadas de células inflamatórias, ocorrendo o mesmo nos casos de sensibilização por antígeno.

O reconhecimento formal do processo inflamatório como peça chave na fisiopatogenia desta doença reforçou nos últimos anos o

uso de antiinflamatórios como forma mais adequada de terapia dos casos classificados como moderados e severos. Paralelamente, a indústria farmacêutica foi estimulada a procurar novos medicamentos para o tratamento desta doença (Shrodin, 1993; Chanarin e Johnston, 1994).

Além da participação inequívoca de células inflamatórias, há varias evidências de que o controle neural das vias aéreas está comprometido na asma brônquica e que estas alterações certamente contribuem para a sua fisiopatogenia (Pretolani e Vargaftig, 1993). Os nervos autonômicos regulam muitos aspectos da função do trato respiratório e os neurotransmissores liberados influenciam o tônus muscular, secreção das vias aéreas, fluxo sanguíneo, permeabilidade microvascular, migração e liberação de células inflamatórias, entre outros.

É reconhecido de longa data que os nervos colinérgicos constituem a inervação predominante das vias aéreas. Pelo menos três tipos de receptores muscarínicos são reconhecidos farmacologicamente (M_1 , M_2 e M_3), embora cinco receptores já tenham sido clonados (Bonner, 1989). Estudos de auto-radiografia têm demonstrado que os receptores muscarínicos estão diferentemente distribuídos nas vias aéreas do homem. O receptor do tipo M_1 (excitatório) está presente no gânglio parassimpático e é inibido pela pirenzepina. A função destes receptores M_1 na regulação do tônus das vias aéreas não está determinada, mas parece ter importância na regulação lenta da transmissão ganglionar, enquanto o receptor nicotínico estaria mais envolvido na neurotransmissão rápida (Oates et al., 1988).

O receptor M_2 tem função de autoreceptor, tendo sido demonstrado nas terminações nervosas colinérgicas de brônquios humanos. Estes receptores pré-juncionais medeiam o fluxo de acetilcolina. Em indivíduos asmáticos parece haver uma disfunção destes auto-receptores. Os receptores M_2 podem ser destruídos por oxidantes ou produtos do processo inflamatório (Oates et al., 1988). Há evidências de que o vírus da influenza determina destruição do receptor M_2 (perda dos resíduos do ácido siálico) (Jacoby e Fryer, 1990). Este seria um mecanismo que contribuiria para a hiperreatividade brônquica após infecção viral das vias aéreas (Folkerts e Nijkamp, 1995). Na musculatura lisa brônquica estão localizados os receptores do tipo M_3 . Drogas anticolinérgicas tipo atropina e brometo de ipratropium bloqueiam tanto os receptores pré-juncionais como os da musculatura lisa brônquica e, portanto, determinam aumento da liberação de acetilcolina. Desta forma, apenas drogas seletivas para atuar em nível dos receptores M_1 e M_3 é que teriam potencial terapêutico.

É de longa data reconhecido o efeito benéfico dos agonistas β -adrenérgicos no alívio dos sintomas de broncoconstrição, sendo bastante razoável, em virtude disto, sugerir um defeito na função do receptor β -adrenérgico. Os mecanismos adrenérgicos envolvidos seriam nervos simpáticos, catecolaminas circulantes e receptores adrenérgicos do tipo α e β . Os nervos adrenérgicos, entretanto, não controlam diretamente a musculatura lisa brônquica, mas influenciam a neurotransmissão colinérgica via receptores pré-juncionais adrenérgicos α e β (Nelson, 1995).

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos no músculo liso brônquico é feita pela adrenalina liberada pela medula adrenal. Não há evidências experimentais, todavia, de que a neurotransmissão adrenérgica esteja alterada, mas é possível que a histamina e outros mediadores inflamatórios possam alterar a liberação de catecolaminas das terminações adrenérgicas, principalmente durante o exercício e estímulo com ar frio e seco (Barnes, 1989). Por sua vez, a possibilidade de alteração a nível do receptor β -adrenérgico na asma tem sido extensivamente investigada. Alguns estudos têm demonstrado que a musculatura lisa de indivíduos asmáticos não responde adequadamente ao isoproterenol, sugerindo um defeito em nível deste receptor. Esta alteração poderia resultar tanto de uma diminuição do número ou da sensibilidade de receptores β -adrenérgico como de um defeito no acoplamento ou nas vias bioquímicas que se seguem a ativação deste. Nos poucos estudos realizados com pacientes asmáticos verificou-se, porém, que a densidade e a sensibilidade destes receptores estavam normais (Holgate, 1986).

A única via neural relaxante das vias aéreas é exercida pelo sistema nervoso NANC através de seus neurotransmissores inibitórios como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o NO. Admite-se que a diminuição da síntese do NO resulta em resposta colinérgica exagerada, indicando que este neurotransmissor exerce um efeito inibitório (Jorens et al., 1993). Além disso, a metabolização do NO ou VIP pode ser acelerada pela presença de

radicais livres liberados das células inflamatórias, o que contribuiria para uma resposta colinérgica acentuada.

Outra possível anormalidade que não está descartada na asma brônquica é um aumento da atividade excitatória do sistema nervoso NANC, através da liberação de SP e NKA. Devido à perda da barreira epitelial, estas fibras podem ficar expostas na luz do brônquio, o que facilita a sua estimulação (Aalbers et al., 1993). Além disso, as taquicininas são degradadas predominantemente pela endopeptidase neutra que está localizada no epitélio. A disfunção ou lesão do epitélio, portanto, aumenta a resposta contrátil da musculatura lisa às taquicininas, contribuindo para o espasmo brônquico dos pacientes asmáticos. Há evidências de aumento da imunorreatividade à SP em biópsias obtidas de tecido do trato respiratório de pacientes asmáticos. Isto poderia resultar da inflamação crônica onde a produção de citocinas, tipo fatores de crescimento, seriam liberadas das células inflamatórias, resultando em proliferação das terminações nervosas sensoriais nas vias aéreas (Corrigan e Kay, 1992). Além disso, alternativamente, mediadores inflamatórios podem estimular o aumento da síntese e a liberação de taquicininas nos neurônios sensoriais. Estas evidências indicam que, através das terminações nervosas expostas pela lesão epitelial, haveria amplificação do processo inflamatório. Portanto, drogas que controlariam a inflamação neurogênica poderiam também contribuir para a terapêutica do paciente asmático (Chanarin e Johnston, 1994; Manzini, 1994).

Do ponto de vista clínico, a expressão do processo inflamatório nas vias aéreas é bastante variada. De um modo geral, em indivíduos asmáticos, a exposição aguda a um alérgeno é seguida do aumento imediato (10-15 min após) da resistência das vias aéreas, revertendo para o padrão normal dentro de 1 h. Este padrão de resposta é análogo ao observado nas reações pulmonares que ocorrem em animais sensibilizados e expostos ao antígeno (Herxheimer, 1952). Entretanto, uma observação mais detalhada e prolongada desta resposta aumentada das vias aéreas permite identificar três padrões de reatividade brônquica, os quais podem ser expressos ou detectados isoladamente ou combinados em um mesmo paciente. Inicialmente, observa-se uma resposta isolada aguda e transitória (10-15 min), seguida de outra de duração mais prolongada que é evidente após 1 a 3 h da exposição ao alérgeno ou apenas uma reação tardia (1-3 h) sem evidência da fase precoce (Herxheimer, 1952). A fase tardia de resposta ao alérgeno é distinta da precoce não apenas com base no tempo de duração e tipos de mecanismos envolvidos, mas é reconhecida clinicamente pela incapacidade de ser revertida por medicamentos broncodilatores tipo agonistas β_2 -adrenérgicos e responder de forma positiva ao tratamento com antiinflamatórios do grupo dos corticosteróides (Spitzer et al., 1992).

O efeito das drogas antiasmáticas para o tratamento destas fases serve para ilustrar as características distintas de cada uma na expressão do processo inflamatório. Assim, agonistas β_2 -adrenérgicos tipo salbutamol, fenoterol e terbutalina previnem o bronco-espasmo agudo, sem interferir na fase tardia (Cockcroft e

Murdock, 1986). Já o uso agudo de corticóide e de teofilina não interfere na primeira resposta, mas inibe completamente a segunda fase (Pauwels, 1989; Cresciolli et al., 1991; Breslin, 1993; Milgrom, 1993; Milgrom e Bender, 1993).

O termo hiperreatividade brônquica refere-se à resposta broncoconstritora exagerada que indivíduos asmáticos podem apresentar à inalação de diferentes agentes tipo carbacol ou histamina, por exemplo. Do ponto de vista clínico, a hiperreatividade é reconhecida através dos episódios de tosse, sibilos e dispnéia em resposta à exposição a poluentes aéreos, ar frio ou outras substâncias que são inaladas. O grau de hiperreatividade em geral se correlaciona diretamente com a severidade da doença e necessidade de um tratamento medicamentoso mais agressivo (Pueringer e Hunninghake, 1992). Medidas objetivas da hiperreatividade na clínica são feitas através da administração por via inalatória de antígenos conhecidos ou de histamina ou a metacolina (carbacol) (Hargreave et al. 1981), realizando-se medidas padronizadas do fluxo respiratório antes, durante e após o procedimento. Em indivíduos normais, a curva dose-resposta à acetilcolina ou metacolina é do tipo sigmóide; já em asmáticos, a curva está desviada à esquerda e não é auto-limitada.

Esforços têm sido feitos na tentativa de melhor estudar a asma brônquica, tendo em vista que não existem modelos adequados que reproduzam esta doença em animais de laboratório. Do ponto de vista experimental, a manifestação destas diferentes fases do processo inflamatório pode ser estudada em animais de

laboratório através da medida da resistência das vias aéreas ou do influxo de células inflamatórias para a luz brônquica pela técnica do lavado brônquico após exposição inalatória a diferentes compostos ou antígenos.

Com base nos conhecimentos acima, recentes trabalhos têm trazido novos conceitos a respeito do desencadeamento do processo inflamatório nas vias aéreas (Goldstein et al., 1994). Acredita-se que, certamente, a participação de citocinas, infecções virais e diversos mediadores inflamatórios tem um papel importante na modulação da inflamação aguda e crônica deste local (Shelhamer et al., 1995). Em decorrência destes estudos, tem sido demonstrado que a obstrução persistente das vias aéreas está intimamente associada à manutenção da inflamação (Shelhamer et al., 1995), o que resultou em mudanças drásticas na terapia desta doença nos últimos tempos.

Vale ressaltar que o uso de agonistas β_2 -adrenérgicos seletivos (salbutamol, terbutalina, fenoterol) tem sido incriminado no aumento da morbidade e mortalidade observados nos últimos anos desta doença. Vários autores têm chamado a atenção para o aumento da reatividade das vias aéreas durante o uso deste medicamento (Sears et al., 1990; Nelson et al., 1991, Pauwels, 1993), enquanto outros agentes antiinflamatórios, incluindo a teofilina, o corticóide e o cromoglicato de sódio tendem a atenuar ou inibir esta resposta (Schlosberg et al., 1993; Shrodin, 1993, Sullivan et al., 1994).

No futuro, o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à fisiopatogenia desta doença certamente

contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias capazes de agir em eventos específicos do processo inflamatório nas vias aéreas.

1.3 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Diversos modelos de inflamação, utilizando animais de diferentes espécies, têm sido utilizados para avaliar as drogas usadas no tratamento de doenças inflamatórias. Isto se deve ao fato que apesar da maioria das reações inflamatórias apresentar características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos específicos que reproduzam as suas características básicas. Desta forma é fácil compreender também porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado.

Esforços têm sido realizados no sentido de se identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide e retocolite ulcerativa, entre outros. Protocolos experimentais onde o processo inflamatório é induzido agudamente têm sido utilizados para estudos desta reação abordando, entre outros, a participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, além de possibilitar o *screening* de drogas com potencial antiinflamatório. Entre eles cita-se: pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (Sedgwick e Willoughby, 1989). No entanto, a limitação destas técnicas se deve tanto à dificuldade de

manipulação durante a indução inflamatória quanto a da quantificação dos parâmetros envolvidos (edema, número de células acumuladas no sítio inflamatório, extravasamento de proteínas, etc). Entre as espécies animais, o rato e o camundongo e mais recentemente o coelho têm sido utilizados para estudos farmacológicos do processo inflamatório. No entanto, uma análise bioquímica mais detalhada acerca dos mediadores envolvidos também é limitada pois, por exemplo, a grande maioria dos anticorpos disponíveis para fenotipagem de células, quantificação das citocinas e moléculas de adesão envolvidas foram desenvolvidas em camundongos.

Modelos da inflamação aguda como o teste do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos são úteis para identificar e caracterizar drogas antiinflamatórias esteróides e não esteróides, mas estes testes monitoram somente mudanças como edema e eritema, não permitindo observar alterações na celularidade. Em ratos, por exemplo, a potência de drogas antiinflamatórias não esteróides, no teste de edema de pata induzido pela carragenina tem boa correspondência no homem (Freireich et al., 1966).

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (Spector, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (Yamamoto et al., 1975; Sedgwick e Willoughby, 1989). Com o desenvolvimento deste modelo foi possível então fazer uma avaliação não só do extravasamento de líquido como da migração de células induzidos por diversos agentes flogísticos (De Brito, 1989). A técnica de pleurisia possui vantagens em

relação a do edema de pata, pois a partir da coleta do lavado na cavidade pleural é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. Além disso, uma grande variedade de substâncias têm sido testadas para avaliar possível atividade inflamatória nas vias aéreas de animais (Luz et al., 1993).

De um modo geral, a inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele. Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta ao mediador inflamatório, na drenagem linfática bem como nos tipos celulares envolvidos. Por exemplo: 5-hidroxitriptamina, BK e PGE_1 e PGE_2 , quando administradas isoladamente ou em combinação na cavidade pleural produzem pouca exsudação. Ao contrário, na pele, estes mediadores induzem rapidamente a formação de edema (Vinegar et al., 1976). Além disso, a cavidade pleural ocupa uma superfície relativamente grande. Admite-se que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, pode ocorrer acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudato. Os mediadores envolvidos

neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório (Doherty e Robinson, 1976; Glatt et al., 1979). Além disso, o tipo, a intensidade e a duração da inflamação produzida pela injeção de um agente flogístico dependerá da sua persistência na cavidade pleural e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima sobre a sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória e teste de drogas com potenciais flogísticos ou antiinflamatórios. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quantitativa e qualitativamente analisados.

2 OBJETIVOS

A proposta do presente trabalho foi analisar alguns aspectos da reação inflamatória, utilizando o modelo experimental da pleurisia em camundongos.

Os principais objetivos foram:

- 1-Analisar no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, o efeito de drogas comumente utilizadas no tratamento da asma brônquica como a teofilina, o cromoglicato de sódio e o salbutamol. Vale a pena ressaltar que embora a pleurisia induzida por este agente flogístico não preencha os critérios de um modelo experimental de asma brônquica, a resposta inflamatória desencadeada na cavidade pleural pela carragenina apresenta certas características descritas nesta doença. Como comentado anteriormente, em indivíduos asmáticos, a exposição inalatória a alergenos, à histamina ou à metacolina resulta em aumento da resistência das vias aéreas. Esta resposta que tem um padrão bifásico, também denominada de fases precoce e tardia, resulta do processo inflamatório que ocorre localmente. Neste contexto, a pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, apresenta também um padrão bifásico de resposta (precoce e tardia), onde participam diversos mediadores como a histamina, a BK, as PGs, o PAF-acéter e os leucotrienos, entre outros (Henriques, 1993).
- 2-Avaliar o efeito das cininas (BK e des-Arg⁹-BK) e da SP, mediadores relacionados à inflamação neurogênica, neste

modelo experimental. Para este fim, além da quantificação da resposta inflamatória (exsudato e migração celular), a caracterização de outros mediadores relacionados com as ações destes agentes e as suas possíveis vias de transdução intracelular foram estudadas. Para este fim, utilizaram-se drogas ou compostos que atuam tanto como antagonistas de receptor ou como inibidores de vias metabólicas intracelulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos com 2 meses de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18-25 g, fornecidos pelo biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas controlados e em gaiolas de plástico, com livre acesso à água e à comida.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Indução da pleurisia

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, cada animal foi tratado com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.) para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (Henriques et al., 1990; Henriques, 1993; Saleh et al., 1996).

No dia da indução da pleurisia, os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e 0,1 ml de solução fisiológica estéril (salina 0,9%) ou do agente flogístico (diluído em salina) foi administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal.

De acordo com cada protocolo experimental, após a administração do agente flogístico, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo com uma overdose de éter etílico. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45°, sendo feita uma incisão transversal da pele e dos músculos abdominais. Em seguida o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões

paralelas ao longo do esterno, os pulmões e ambas as cavidades pleurais foram expostos. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com 1,0 ml de solução salina tamponada (PBS-pH 7,6) e heparinizada (20 UI/ml). A seguir, o volume líquido na cavidade pleural foi coletado com o auxílio de pipetas automáticas.

3.2.2 Determinação do exsudato

Após a lavagem da cavidade pleural com solução salina tamponada e heparinizada, uma alíquota (500 μ l) do volume recolhido foi separada e congelada em freezer (-20°C) para posterior determinação dos níveis de azul de Evans. Amostras de um mesmo protocolo experimental foram descongeladas à temperatura ambiente e os níveis de azul de Evans foram determinados em espectrofotômetro (Campu-Espectro-Brasil) por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em $\mu\text{g/ml}$ com auxílio da equação da reta.

3.2.3 Contagem total e diferencial dos leucócitos

No dia dos experimentos, uma alíquota do lavado foi reservada para a contagem total celular. Para tal, uma pequena amostra (10 μ l) foi diluída em líquido de Türk (200 μ l). A leitura do número total de células foi feita com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico comum (aumento de 400

vezes). Uma outra alíquota (100 a 150 μ l) do volume coletado foi destinada à realização de esfregaços celulares. Após a secagem dos esfregaços, que foram feitos em câmara de Suta e à temperatura ambiente, estes foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa e a contagem diferencial celular (neutrófilos, eosinófilos e mononucleares) foi feita em microscopia ótica comum com auxílio de objetiva de imersão (aumento de oitocentos vezes), contando-se cem células por lâmina.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.3.1 Análise dos efeitos de drogas antiasmáticas na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

Em estudos preliminares, foi reproduzida a técnica de pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos conforme descrito por Henriques et al. (1990) e Henriques (1993). Com este objetivo, após a administração intrapleural de carragenina, diferentes grupos de animais foram sacrificados em diversos períodos de tempo (1-100 h) e os parâmetros descritos acima foram determinados. Após a análise temporal da resposta inflamatória causada pela carragenina na cavidade pleural de camundongos, foram escolhidos dois períodos de tempo para analisar o efeito de drogas antiasmáticas neste modelo experimental. Considerando que a resposta inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos é do tipo bifásica, com picos em 4 (fase precoce) e 48 h (fase tardia) após a indução da pleurisia, foram escolhidos esses dois tempos para análise do efeito das drogas estudadas:

Numa primeira série de experimentos, para avaliar os possíveis efeitos sobre a primeira fase (precoce) desta reação inflamatória, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses das drogas estudadas (teofilina, cromoglicato de sódio e salbutamol) que foram administradas em distintos intervalos de tempo (resultados não apresentados). Em estudos subseqüentes, os animais foram tratados (30 min antes) com teofilina (0,5-50 mg/kg, intraperitoneal-i.p.), cromoglicato de sódio (0,02-2,0 mg/cavidade pleural-cav.), salbutamol (0,05-50 mg/kg, i.p.), sendo os índices de inflamação analisados 4 h após a indução da pleurisia. Com o objetivo de avaliar também a duração do efeito inibitório das drogas antiasmáticas, nestas mesmas condições experimentais, foi escolhida uma dose das empregadas acima, a qual foi administrada em diferentes intervalos de tempo (0,5-24 h) antes da indução da pleurisia. Os parâmetros estudados foram analisados 4 h após a administração da carragenina.

O possível efeito inibitório induzido por um dos agentes acima citados também foi avaliado na segunda fase (tardia) desta resposta inflamatória, isto é, 48 horas após a indução da pleurisia. Para este fim, uma das doses analisadas, no protocolo anterior foi escolhida para tratamento prévio dos animais (30 min) antes da indução da pleurisia. Tanto a exsudação quanto a migração celular foram analisados 48 h após a injeção de carragenina. De maneira similar ao descrito para a primeira fase desta reação inflamatória, a dose empregada no protocolo descrito anteriormente foi também administrada em

diferentes intervalos de tempo (0,5-24 h) antes da indução da pleurisia para avaliação da duração do seu efeito inibitório sobre a fase tardia da inflamação deste modelo experimental.

3.3.2 Análise da resposta inflamatória induzida pela bradicinina e Des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de camundongos.

Levando-se em consideração que a BK induz processo inflamatório significativo na cavidade pleural de ratos (Pasquale, et al., 1991, Martins, et al., 1992), este mediador do processo inflamatório também foi estudado no modelo experimental da pleurisia em camundongos. Em estudos preliminares, diferentes doses de BK ou de des-Arg⁹-BK foram administradas na cavidade pleural de camundongos e os parâmetros estudados foram também analisados em diferentes períodos de tempo (resultados não apresentados). Com base nestes resultados, diferentes grupos de animais foram tratados com BK (5, 10, 20 e 40 nmol/cav.) ou des-Arg⁹-BK (10, 20 e 40 nmol/cav.) e a reação inflamatória estudada 4 h após. Com a finalidade de inibir a degradação das cininas, todos os animais foram tratados previamente com captopril (inibidor da cininase II, 5 mg/kg, i.p., 30 min) (Corrêa e Calixto, 1993). Para cada série de experimentos, além da determinação do grau de exsudação e da quantificação do número total e diferencial de células da cavidade pleural, também foram calculados os valores da DE₅₀; isto é, a dose necessária do agonista para causar 50% da migração máxima de leucócitos. Posteriormente, nas mesmas

condições experimentais, o perfil temporal (1-100 h) da reação inflamatória induzida pela BK (10 nmol/cav.) foi analisado.

Para caracterizar o (s) tipo (s) de receptor (es) para as cininas (B_1 e/ou B_2) neste modelo experimental, em outra série de estudos os animais foram tratados previamente (30 min) com antagonistas seletivos destes receptores e a pleurisia analisada 4 h após. Inicialmente, diferentes grupos de animais foram tratados (30 min antes) pelas vias intraperitoneal, intrapleural ou endovenosa com uma dose dos antagonistas peptídicos do receptor B_2 , HOE 140 ou NPC 17731. Após a análise do efeito induzido por esses antagonistas quando administrado por diferentes vias, optou-se pelo tratamento prévio (30 min) dos animais pela via intrapleural para avaliação do efeito de doses distintas destes compostos (0,01-1,0 pmol) na pleurisia induzida pela BK (10 nmol). Os índices de inflamação foram analisados 4 h após a indução da pleurisia. Como em algumas condições experimentais, a BK pode ser metabolizada para des-Arg⁹-BK, o possível efeito inibitório da des-Arg⁹-Leu⁸-BK, antagonista do receptor B_1 , na pleurisia induzida por ambas as cininas (BK: 10 nmol/cav. e des-Arg⁹-BK: 20 nmol/cav.) foi analisado utilizando-se este último protocolo. Sempre que possível, os efeitos inibitórios dos antagonistas foram expressos através da determinação da DI_{50} , isto é, a dose necessária para causar redução de 50% da migração celular máxima induzida pelo agonista.

A duração do efeito inibitório causado pelos antagonistas do receptor B_2 (HOE 140 e NPC 17731) neste modelo experimental

foi também indiretamente avaliada, tratando-se os animais com uma dose previamente determinada desses agentes, (0,5-8 h) antes da indução da pleurisia pela BK (10 nmol/cav.). Os parâmetros foram estudados 4 h após a administração do agente flogístico.

Como os efeitos biológicos da BK podem resultar tanto de uma ação direta deste agonista no sítio do processo inflamatório como também da liberação e/ou interação com outros mediadores (Burch et al., 1990), avaliou-se o efeito de diferentes agentes que participam e/ou interferem nesse mesmo processo como a indometacina (inibidor da ciclooxigenase, 5 mg/kg, i.p.), a terfenadina (antagonista do receptor H_1 da histamina, 50 mg/kg, i.p.), a dexametasona (inibidor da FLA_2 , da NO-sintase induzida e da COX II, entre outros, 0,5 mg/kg, i.p.) e a L-NOARG (inibidor da síntese de NO, 1,0 pmol/cav.).

Para determinar se os efeitos pró-inflamatórios da BK estão também relacionados com a ativação de fibras nervosas sensoriais do tipo C e conseqüente liberação de neurocininas, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (30 min) com antagonistas seletivos de receptores de taquicininas. Foram utilizados antagonistas do receptor NK_1 (FK 888: 0,02-0,2 pmol/cav.), NK_2 (SR 48968: 20 e 100 nmol/cav.) e NK_3 (SR 142801: 0,03-100 nmol/cav.) das taquicininas. Os parâmetros estudados foram analisados 4 h após a indução da pleurisia pela BK (20 nmol/cav.). Além disso, o efeito de drogas antiasmáticas como o cromoglicato de sódio (0,4 μ mol/cav.), a teofilina (50

mg/kg, i.p.) e o salbutamol (50 mg/kg, i.p.) também foi testado neste modelo experimental.

Todas as drogas utilizadas foram administradas 30 min antes da indução da pleurisia e os índices da inflamação analisados 4 h após. A escolha da dose, vias de administração e tempo de tratamento antes da indução da pleurisia foram baseados em dados da literatura e de experimentos preliminares em nosso laboratório.

3.3.3 Análise da resposta inflamatória induzida pela substância P na cavidade pleural de camundongos.

Apesar das taquicinininas estarem envolvidas na inflamação neurogênica (Maggi et al., 1993a; Maggi, 1995; Ricciardolo et al., 1994; Geppetti et al., 1995), os efeitos destes neurotransmissores no modelo da pleurisia não têm sido estudados. No protocolo experimental descrito abaixo optou-se pelo estudo de uma taquicininina - a substância P - neste modelo experimental, em camundongos.

Em estudos preliminares, diferentes doses de SP foram administradas na cavidade pleural de camundongos e os parâmetros estudados foram também analisados em diferentes períodos de tempo (resultados não apresentados). Com base nestes experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados com SP (10, 20 e 40 nmol/cav.) e a reação inflamatória estudada 4 h após. Além da determinação do grau de exsudação e da quantificação do número total e diferencial de células da cavidade pleural, foram também calculados os valores

da DE₅₀ para cada grupo de experimentos. Após a determinação da dose adequada da substância P capaz de induzir inflamação significativa, diferentes grupos de animais foram tratados com este agonista. Os parâmetros estudados foram analisados em diferentes períodos de tempo (1-100 h), com o objetivo de estudar a duração do efeito inflamatório induzido por este agonista na cavidade pleural de camundongos.

Para avaliar a participação de receptores das taquicinininas do tipo NK₁, NK₂ e/ou NK₃ neste modelo experimental, em outra série de experimentos os animais foram tratados (5 min antes) com antagonistas seletivos dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃ das taquicinininas. Em diferentes grupos, os animais foram tratados previamente com diferentes doses dos antagonistas dos receptores NK₁ (FK 888: 0,1-200 nmol/cav.), NK₂ (SR 48968: 20 e 100 nmol/cav.) ou NK₃ (SR 142801: 0,03-50 nmol/cav.) antagonistas dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃ das taquicinininas e a pleurisia analisada 4 h após a administração de SP.

A participação das cininas, mais especificamente a BK, da histamina, dos eicosanóides e do NO neste modelo experimental foi também estudada. Assim, em outros grupos de experimentos, os animais foram tratados (5 min antes) com diferentes doses de antagonistas do receptor B₂ da BK, HOE 140 (0,003-0,1 pmol/cav.) ou NPC 17731 (0,003-0,1 pmol/cav.) e os parâmetros de inflamação causado pela SP (20 nmol/cav.) foram analisados 4 h após.

Com o objetivo de avaliar a participação da histamina, os animais foram tratados previamente com Composto 48/80 ou

terfenadina. É reconhecido que o Composto 48/80 induz a degranulação de forma aguda e prolongada dos mastócitos, o que resulta na depleção dos estoques de histamina destas células (Donnerer e Aman, 1993; Takayama et al., 1994), enquanto a terfenadina é um antagonista de receptor H_1 deste agonista. Para a execução deste protocolo experimental, os animais foram tratados 5 dias antes com o Composto 48/80 (0,2 $\mu\text{mol/cav.}$), sendo a pleurisia induzida pela SP (20 nmol/cav., 4 h) e pela histamina (1,0 $\mu\text{mol/cav.}$, 1 h). Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos nos experimentos controle (índices de inflamação causado por ambos agonistas). Outro grupo de animais foi tratado previamente (30 min) com terfenadina (50 mg/kg, i.p.) e a pleurisia foi induzida pela SP (20 nmol/cav.) e os índices de inflamação foram analisados 4 h após.

Em outra série de experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados (30 min antes) com indometacina (inibidor da ciclooxigenase, 5,0 mg/kg, i.p.), L-NOARG (inibidor da via de síntese do NO, 1,0 pmol/cav.) e dexametasona (inibidor da FLA_2 , óxido nítrico induzida e ciclooxigenase II e outras, 0,5 mg/kg, i.p.). O efeito de drogas antiasmáticas tipo o cromoglicato de sódio (0,4 $\mu\text{mol/cav.}$), a teofilina (50 mg/kg, i.p.) e o salbutamol (50 mg/kg, i.p.) também foi avaliado neste modelo experimental.

3.4 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: bradicinina, carragenina lambda (grau IV), cromoglicato de sódio, composto 48/80 (condensação do produto da N-metil-p-metoxi-fenilalanina com formaldeído), dexametasona, histamina, indometacina, Nω-nitro-L-arginina benzil éster, salbutamol, teofilina, terfenadina (Sigma Chemical Co., USA), des-Arg⁹-bradicinina, des-Arg⁹-Leu⁸ bradicinina (Peninsula, USA), HOE 140 ({D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradicinina}) (Hoechst, Alemanha), NPC 17731 ({D-Arg⁰[Hyp³, D-HypE (transpropyl⁷) Oic⁸]-bradicinina}) (Scios Nova Pharmaceutical, USA), FK 888 ({(4R) -4- hydroxi -1- ([1- metil -1 H- indol- 3- il] carbonil) -L-N- benzil -N metil -3-2 (2-naftil) -L- alaninamida}) (Fugisawa, Japan), SR 48968 ({(S)-N- metil -N- [4 - acetilamino -4- fenilpiperidino -2- (3, 4- diclorofenil) butil] benzamida}), SR 142801 ({(S) - (N) - (1-(3-(1- benzoil-3-(3,4- diclorofenil) piperidina-3-il) propil)-4- fenil piperidina-4 il)- N-metilacetamida) (Sanofi Co., França), heparina (Liquemine[®], Roche, Brasil), azul de Evans e solução tampão fosfato (PBS - pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM (Merck, Brasil) e solução salina (0,9%) de diferentes fontes comerciais. Soluções estoques (1 mM) de FK 888, HOE 140 e SR 48968 foram preparadas previamente em etanol (100%), indometacina em solução de NaHCO₃ (5%) e as demais drogas em PBS. Todas as drogas foram previamente preparadas e mantidas em freezer (-20° C). No dia dos experimentos, quando necessário, diluições das drogas foram realizadas em salina estéril (0,9%) à temperatura

ambiente, à exceção da solução de teofilina que foi previamente aquecida a 37°C (5 min).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m., exceto para os valores da DE₅₀ ou DI₅₀) para cada grupo de experimentos. Estas últimas variáveis foram expressas através das suas médias geométricas acompanhadas pelos seus respectivos (95%) limites de confiança (LC). A DE₅₀ expressa a dose do agonista necessária para causar 50% do efeito máximo no influxo total de células, enquanto a DI₅₀ corresponde a dose do antagonista necessária para reduzir em 50% esta mesma variável em relação aos controles (tratados apenas com o agonista).

Os valores das DE₅₀ ou DI₅₀ foram calculados com o auxílio da análise de regressão, utilizando-se o método dos mínimos quadrados para experimentos individuais. Para padronização dos cálculos, nos experimentos com agonistas e/ou antagonistas, os valores individuais do número total de células foram subtraídos dos seus respectivos valores médios do grupo controle (animais tratados somente com salina). Diferenças entre grupos foram determinadas utilizando-se teste de análise de variância (ANOVA) e complementados quando necessário, pelo teste de Dunnett ou teste "t" de Student não pareado. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) ou menor foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito de drogas antiasmáticas na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

A figura 1 mostra o perfil temporal da resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos, conforme já previamente descrito por Henriques et al. (1990) e Henriques (1993). Como pode ser observado, a administração de carragenina na cavidade pleural de camundongos induz uma resposta bifásica com aumento significativo tanto do número total de células quanto da exsudação. Este padrão de resposta foi denominado de primeira (imediate) e segunda (tardia) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos. Observou-se que, neste modelo, a administração de carragenina na cavidade pleural promoveu um aumento gradual do número total de células ($TC \times 10^6$) às custas principalmente de neutrófilos ($NT \times 10^6$), cujo pico foi em torno de 4 h (tratados: $TC = 6,5 \pm 0,17$, $NT = 5,3 \pm 0,04$; controle: $TC = 1,3 \pm 0,05$, $NT = 0,05 \pm 0,01$) ($P < 0,01$), seguido de um decréscimo por volta de 5 h ($TC = 2,8 \pm 0,6$, $NT = 2,1 \pm 0,3$), retornando aos valores basais dentro de 24 h ($TC = 1,6 \pm 0,1$, $NT = 0,24 \pm 0,03$). Paralelamente, também foi observado aumento da exsudação, avaliada pelo extravasamento de azul de Evans (Ex, $\mu\text{g/ml}$) na cavidade pleural, com picos entre 4 e 5 h, (4 h = $7,7 \pm 0,05$, 5 h = $8,6 \pm 0,04$, controle = $0,025 \pm 0,01$) ($P < 0,01$), voltando aos valores basais 6 h após (Ex = $0,8 \pm 0,02$) da indução da pleurisia.

Em torno de 18-24 h após a indução da pleurisia pela carragenina, foi observado um aumento gradativo da exsudação ($P < 0,01$) na cavidade pleural de camundongos, o qual se seguiu também de aumento da migração celular (30 h). Como mostra a figura 1, os níveis máximos de exsudação e de migração celular desta segunda fase do processo inflamatório induzido pela

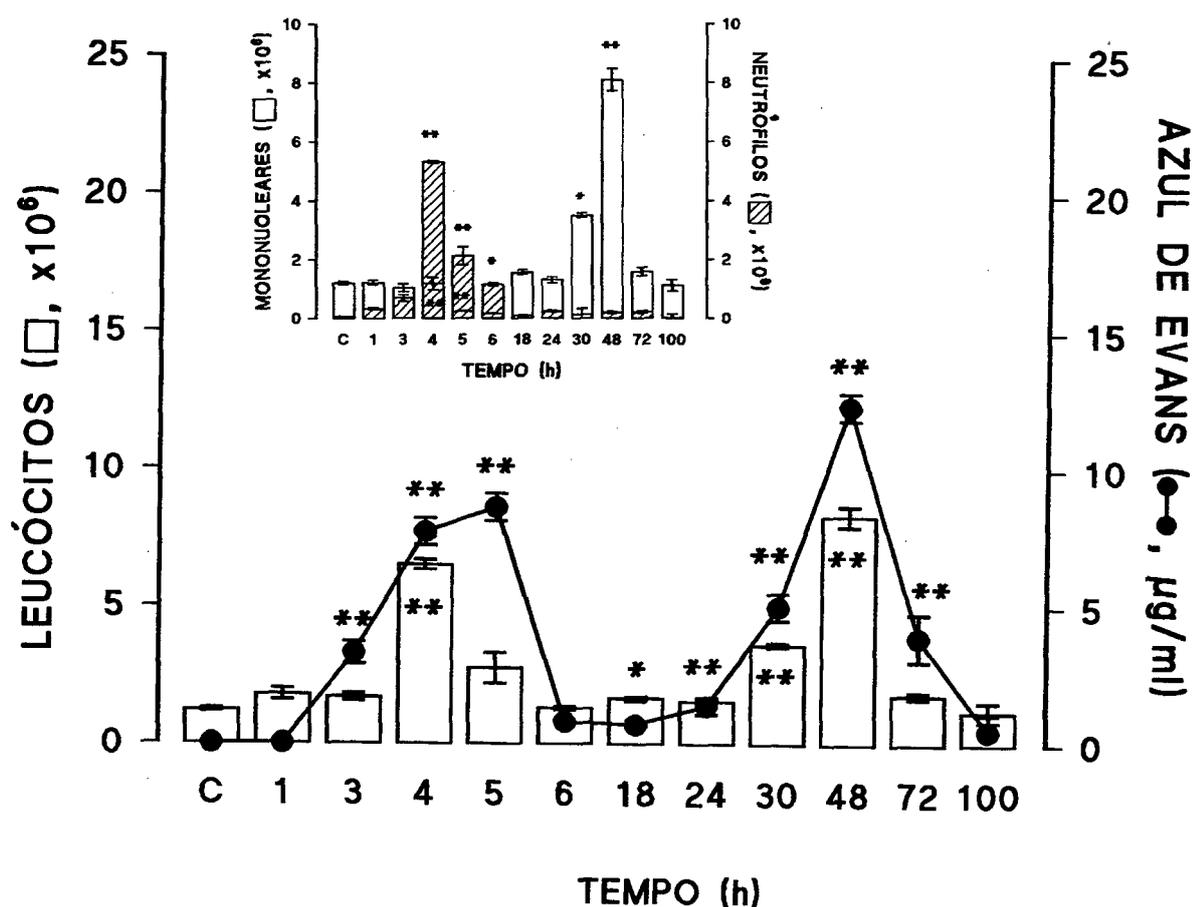


Figura 1- Perfil temporal da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. C = animais tratados com salina 0,9%. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o total de células e o exsudato em relação aos respectivos C. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas dos neutrófilos e dos mononucleares em relação aos respectivos C. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

carragenina ocorreram em torno de 48 h. Observou-se que o número total de células ($8,3 \pm 0,37$) não diferiu daquele observado na primeira fase da reação inflamatória (4 h), embora tenha ocorrido migração preferencial de mononucleares ($\times 10^6$) (tratados: $8,1 \pm 0,38$, controle: $1,2 \pm 0,05$) ($P < 0,01$). Todavia, o pico de exsudação que ocorreu 48 h após a indução da pleurisia (tratados = $12,3 \pm 0,01$, controle = $0,025 \pm 0,01$) foi significativamente maior que aquele observado na primeira fase do processo inflamatório (4 h) ($P < 0,01$).

A resolução completa da reação inflamatória foi observada 100 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

A figura 2A mostra o efeito de diferentes doses de teofilina (0,5-50,0 mg/kg, i.p.) administrada 30 min antes do agente flogístico, na primeira fase do processo inflamatório (4 h). Observou-se que a teofilina nas doses de 1 a 50 mg/kg causou inibição significativa, independente da dose, no influxo celular para a cavidade pleural. A dose de 0,5 mg/kg, i.p., desta droga não inibiu o processo inflamatório. Contudo, a teofilina nas doses de 0,5 a 50 mg/kg foi efetiva em inibir a exsudação causada pela carragenina na cavidade pleural ($P < 0,01$).

O tratamento prévio (0,5-24 h) dos animais com teofilina (5 mg/kg, i.p.) causou efeito inibitório tanto na migração celular como na exsudação da primeira fase da reação inflamatória induzida pela carragenina (Fig. 2B). Este efeito inibitório sobre os dois parâmetros analisados (migração celular e exsudação) não ocorreu simultaneamente. Como mostra

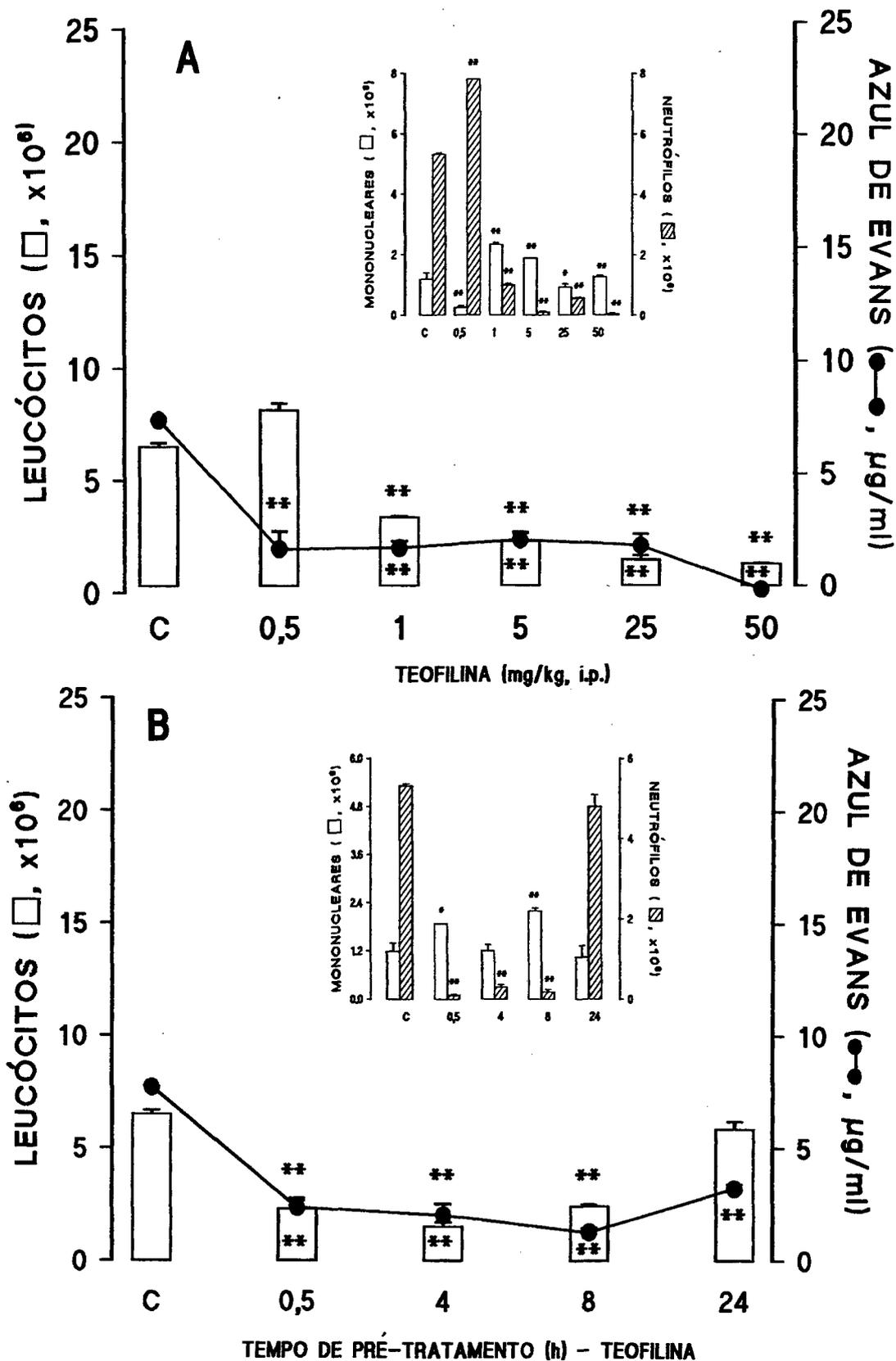


FIGURA 2- Efeito da teofilina na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A - Efeito de diferentes doses de teofilina (0,5-50 mg/kg, i.p.) administradas 30 min antes da pleurisia. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o total de células e o exsudato em relação aos respectivos C. B - Efeito da teofilina (5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5-24 h antes da pleurisia na mesma condição experimental. *Insets* mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * P < 0,05 e ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

a figura 2B, a teofilina inibiu significativamente e de forma duradoura (0,5-24 h) a exsudação na cavidade pleural causada pela carragenina. Em relação à migração celular, efeito inibitório significativo foi observado apenas quando os animais foram tratados 0,5 a 8 h antes da indução da pleurisia ($P < 0,01$). Esta mesma dose de teofilina não foi efetiva em bloquear o aumento do número total de leucócitos observado na segunda fase (48 h) da pleurisia, embora a exsudação tenha sido inibida

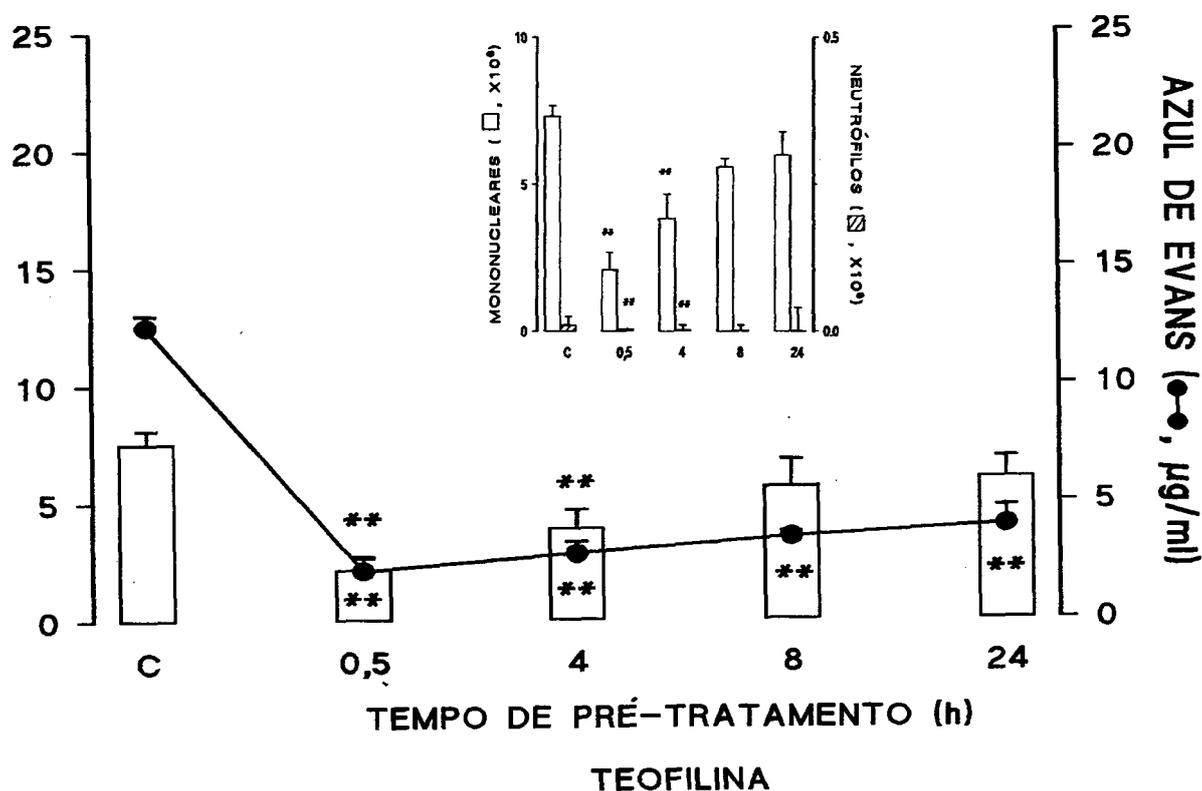


Figura 3- Efeito da teofilina (50 mg/kg, i.p., 0,5-24 h antes) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** $P < 0,01$. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

quando os animais foram tratados 0,5-24 horas antes da administração do agente flogístico ($P < 0,01$) (resultados não mostrados). Todavia, doses maiores de teofilina (50 mg/kg) administradas 0,5-24 h antes da indução da pleurisia inibiram significativamente o exsudato observado na segunda fase (48 h) do processo inflamatório ($P < 0,01$) (Fig. 3). No entanto, a migração celular foi inibida de forma significativa somente nos períodos de 0,5 a 4 h de tratamento prévio ($P < 0,01$).

A figura 4A mostra que o cromoglicato de sódio (0,02-0,2 mg/cav.) administrado 30 minutos antes da indução da pleurisia, foi efetivo em inibir significativamente a primeira fase (4 h) do processo inflamatório analisado ($P < 0,01$). Além disso, nas mesmas condições experimentais, o cromoglicato de sódio administrado previamente (0,5-24 h) determinou uma redução significativa da exsudação ($P < 0,01$) (Fig. 4B). A migração celular, todavia, foi inibida de forma significativa apenas quando os animais foram tratados no período de 0,5 a 8 h antes da indução da pleurisia ($P < 0,01$). Por outro lado, a mesma dose de cromoglicato de sódio (0,02 mg/cav.) foi também efetiva em inibir a segunda fase (48 h) do processo inflamatório induzido pela carragenina, na cavidade pleural de camundongos ($P < 0,01$) (Fig. 5).

O efeito da administração prévia do agonista β_2 -adrenérgico (salbutamol) sobre a primeira fase do processo inflamatório induzido pela carragenina, em camundongos, é mostrado nas figuras 6A e B. Tanto a exsudação quanto a migração celular foram significativamente inibidas,

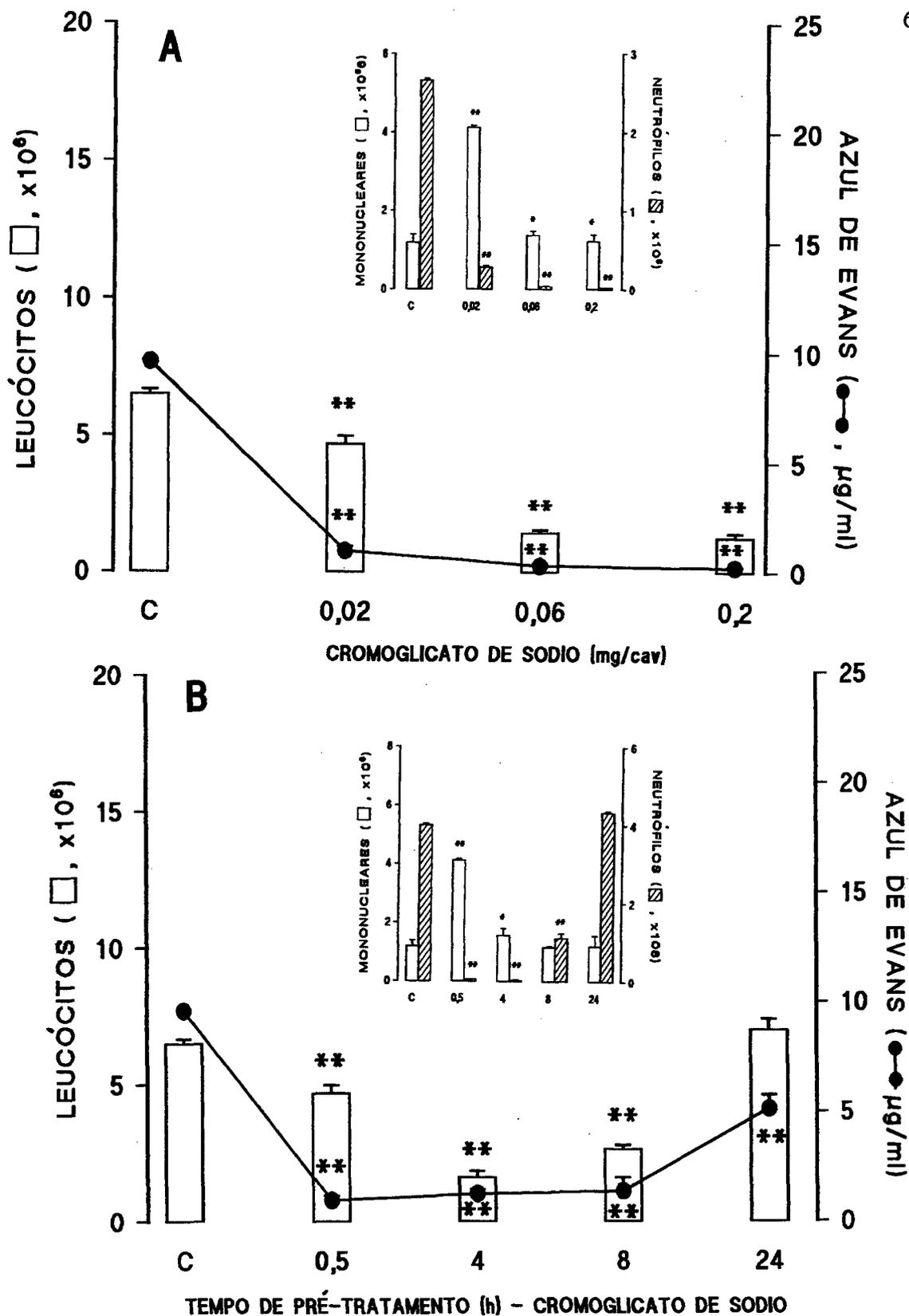


Figura 4- Efeito do cromoglicato de sódio na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A - Efeito de diferentes doses do cromoglicato de sódio (0,02-0,2 mg/cav.) administradas 30 min antes da pleurisia. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. B - Efeito do cromoglicato de sódio (0,02 mg/cav.) administrado 0,5-24 h antes da pleurisia na mesma condição experimental. Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. * P < 0,05 e ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

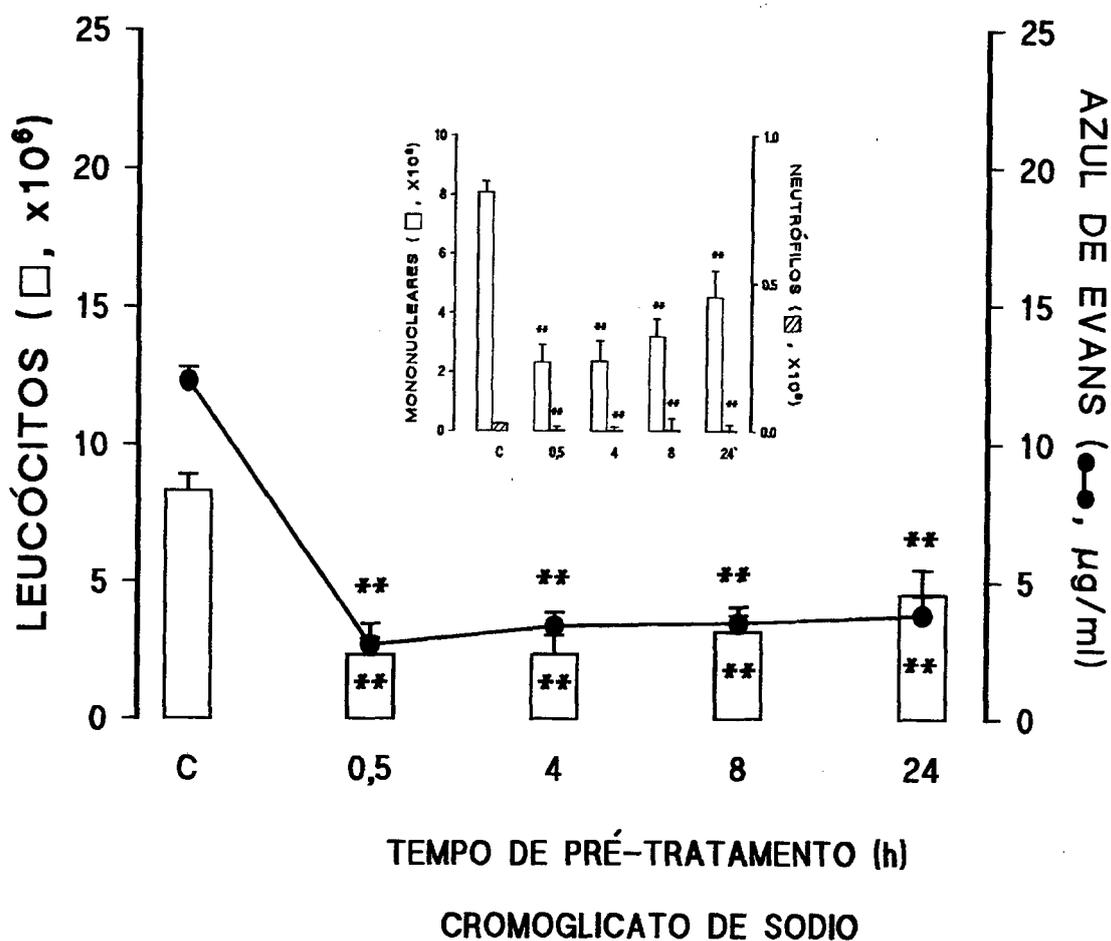


Figura 5- Efeito do cromoglicato de sódio (0,02 mg/cav., 0,5-24 h antes) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

independentemente da dose, quando os animais foram tratados previamente (30 min) com salbutamol nas doses de 0,05-50,0 mg/kg, i.p. (P < 0,01). Além disso, o agonista β_2 -adrenérgico (5 mg/kg, i.p.), quando administrado em diferentes períodos de tempo antes da indução da pleurisia, promoveu uma diminuição do influxo celular bem como da exsudação, apenas quando os animais foram tratados 0,5-8 h antes da indução da pleurisia (P < 0,01)

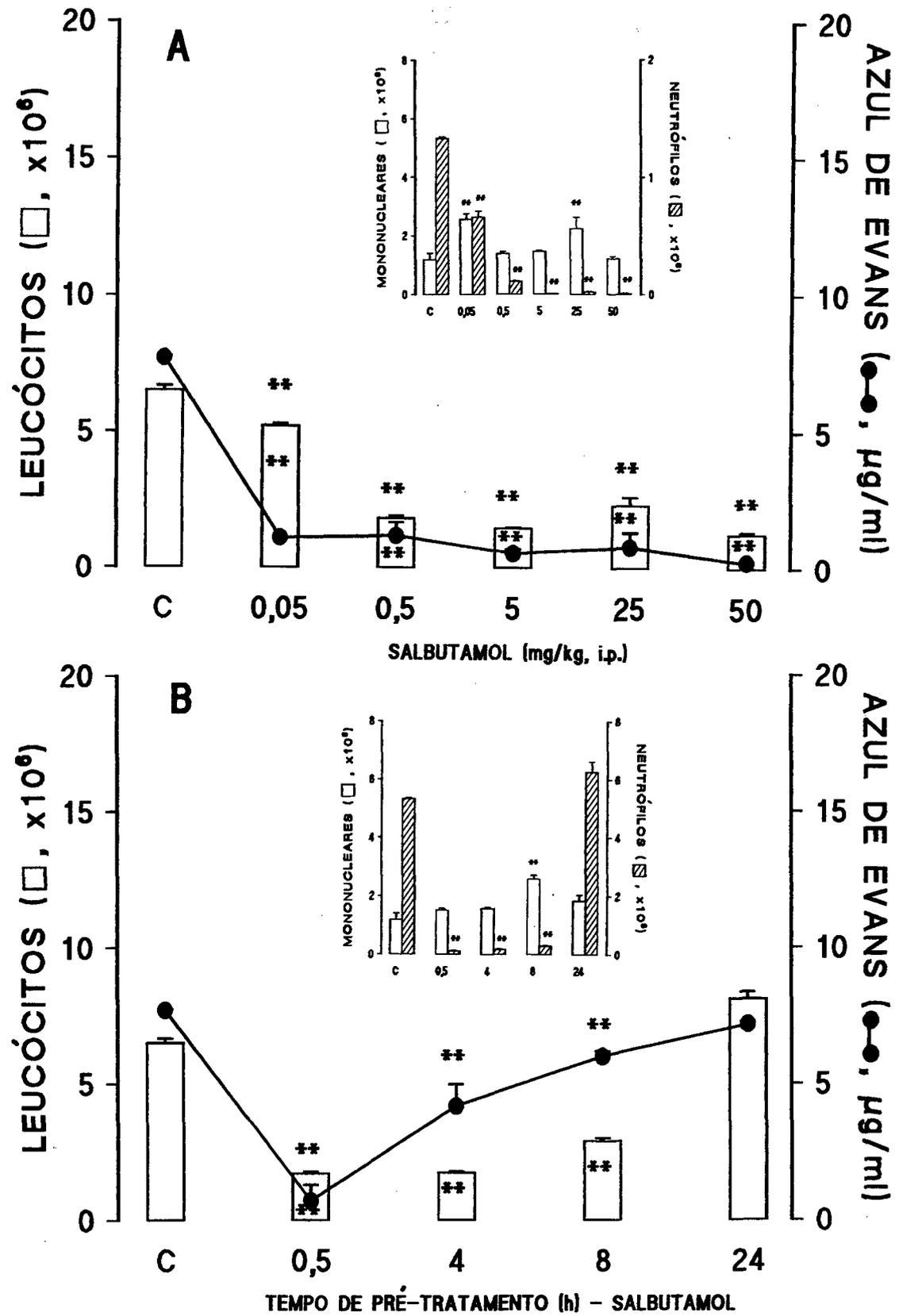


Figura 6- Efeito do salbutamol na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A - Efeito de diferentes doses de salbutamol (0,05-50 mg/kg, i.p.) administradas 30 min antes da pleurisia. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. B - Efeito do salbutamol (5 mg/kg, i.p.) administrado 0,5-24 h antes da pleurisia na mesma condição experimental. Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

(Fig. 6B). Nos períodos de tratamento prévio de 4-8 h observou-se, todavia, uma diminuição da exsudação de forma menos acentuada, associada paralelamente a uma inibição significativa da migração celular ($P < 0,01$). Nestas mesmas condições experimentais, o tratamento dos animais 24 h antes da indução da pleurisia com salbutamol (5 mg/kg, i.p.) não foi efetivo em inibir os parâmetros analisados ($P > 0,05$). Em relação à segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, (Fig.7) em camundongos, o tratamento prévio (0,5-24 h) dos

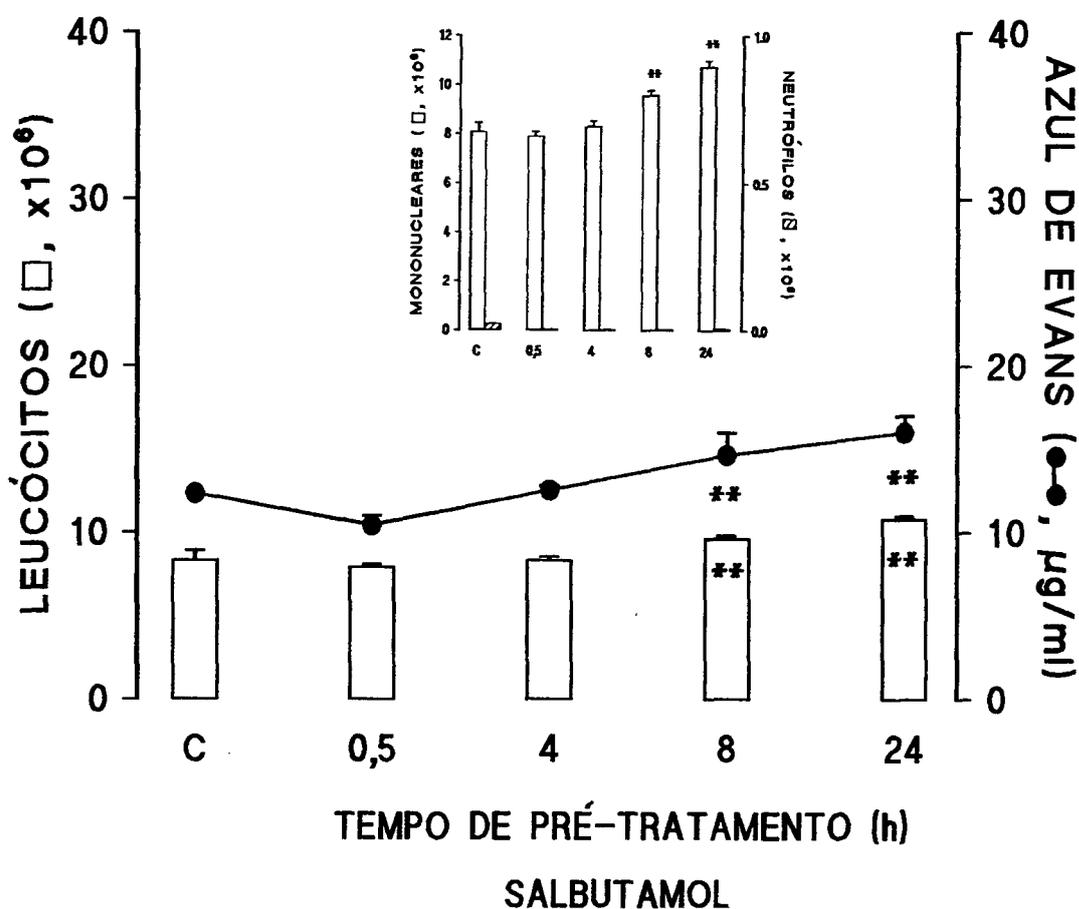


Figura 7- Efeito do salbutamol (5 mg/kg, i.p., 0,5-24 h antes) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com carragenina. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o total de células e o exsudato em relação aos respectivos C. ** $P < 0,01$. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

animais com salbutamol (5 mg/kg, i.p.) não resultou em inibição do processo inflamatório (Fig. 7). Vale comentar que, nestas mesmas condições experimentais, o agonista β_2 -adrenérgico utilizado determinou aumento tanto da exsudação como da migração celular ($P < 0,01$) (Fig. 7).

4.2 Análise das respostas inflamatórias induzidas pela bradicinina e pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de camundongos.

Ambas as cininas, BK (5, 10, 20 e 40 nmol) e des-Arg⁹-BK (10, 20 e 40 nmol), causaram aumento significativo da migração celular de forma dose-dependente, na cavidade pleural de camundongos 4 horas após a sua administração. O aumento do influxo celular foi associado com elevação discreta, porém significativa da exsudação (Fig. 8A e B). Como é demonstrado, o aumento da celularidade foi às custas de mononucleares. Ambas as cininas promoveram um pequeno aumento do influxo de neutrófilos ($P < 0,01$) independente da dose administrada. A BK foi três vezes mais potente em induzir o aumento do influxo celular em relação à des-Arg⁹-BK. Os valores médios estimados das DE_{50s} à BK e à des-Arg⁹-BK foram de 3,2 (95% LC = 0,6-15,5) nmol/cav. e de 9,1 (1,2-66,8) nmol/cav., respectivamente. O influxo máximo (média \pm e.p.m.) de celularidade induzido pela BK (40 nmol) (TC = $3,5 \pm 0,05 \times 10^6$) na cavidade pleural de camundongos não diferiu em comparação com aquele induzido pela des-Arg⁹-BK (40 nmol, TC = $2,6 \pm 0,07 \times 10^6$).

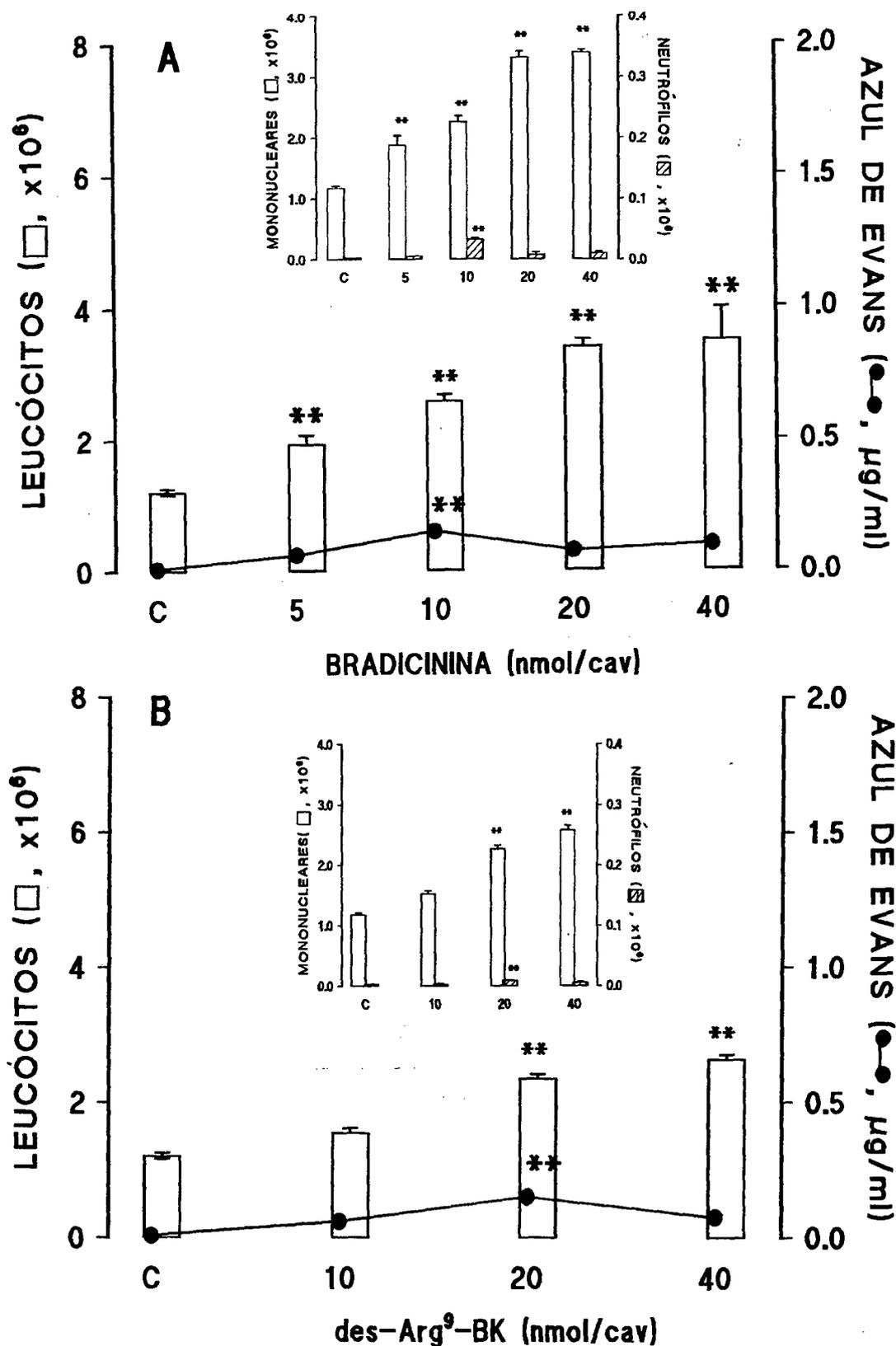


Figura 8- Efeito de diferentes doses de BK (A) (5, 10, 20 e 40 nmol/cav.) e de des-Arg⁹-BK (B) (10, 20 e 40 nmol/cav.) na cavidade pleural de camundongos, 4 h após a administração de cada agonista. C = animais tratados com salina 0,9%. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos controles. Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

A figura 9 mostra a magnitude e o perfil temporal da resposta inflamatória induzida pela BK (10 nmol) na cavidade pleural de camundongos. A BK causou aumento significativo da migração celular 4 h após a sua administração na cavidade pleural, às custas do influxo de mononucleares, permanecendo elevada até 72 h ($P < 0,05$), tendo sido também detectada discreta exsudação. É interessante ressaltar que influxo de neutrófilos foi também detectado 6 h após a administração da BK (10 nmol/cav.) (Fig. 9 - inset). Levando-se em consideração que

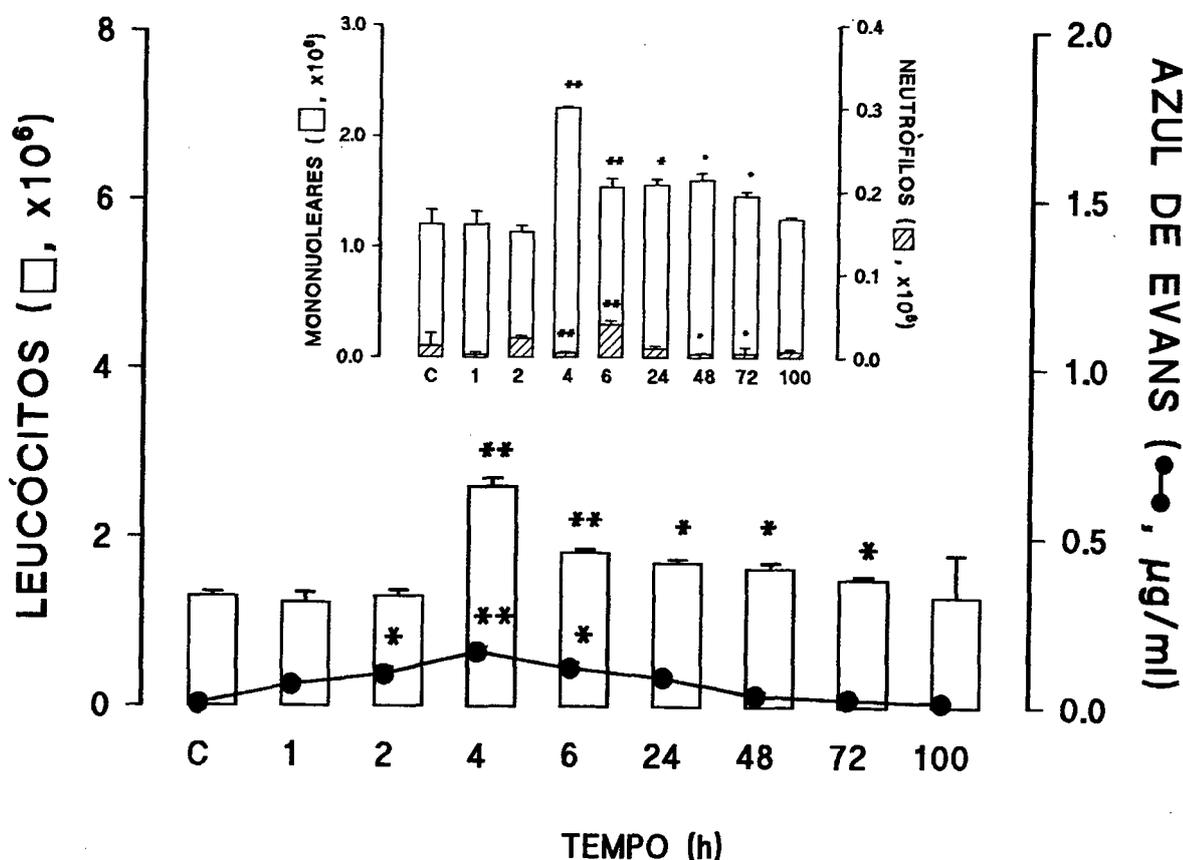


Figura 9- Perfil temporal da pleurisia induzida pela BK (10 nmol) em camundongos. C = animais tratados com salina 0,9%. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

o pico máximo de migração celular ocorreu 4 h após a administração do agonista, este tempo foi escolhido para estudo nos próximos experimentos. Nos protocolos a seguir, foi avaliado apenas a migração celular, uma vez que os níveis de exsudação, embora significativos, foram discretos.

As figuras 10A e B mostram o efeito do HOE 140 e NPC 17731, antagonistas do receptor B_2 da BK administrados por diferentes vias, 30 min antes da indução da pleurisia. Conforme mostra a figura 10A, HOE 140 apenas quando administrado diretamente na cavidade pleural (0,1 pmol) ou por via endovenosa (5,0 pmol/kg) foi efetivo em inibir a migração celular na cavidade pleural induzida pela BK ($P < 0,01$) (Fig. 10A). Nestas mesmas condições, a inibição média da celularidade foi da ordem de 70 e 100%, respectivamente. AO contrário, o tratamento prévio dos animais pela via intraperitoneal com HOE 140 (5,0 pmol/kg) não inibiu de forma significativa o influxo celular causado pela BK ($P > 0,05$). A figura 10B mostra que doses distintas de NPC 17731 (i.p. = 50 pmol/kg, cav. = 1,0 pmol, i.v. = 50 pmol/kg) promoveram inibição significativa da migração celular induzida pela BK (10 nmol/cav., 4 h), independente da via de administração ($P < 0,01$). A magnitude desta inibição foi de 100, 68 e 62%, respectivamente. Tanto o HOE 140 (0,01-0,3 pmol) como o NPC 17731 (0,1-1,0 pmol) inibiram a migração celular induzida pela BK (10 nmol, 4 h) para a cavidade pleural ($P < 0,01$) (Fig. 11A e B). HOE 140 (0,01-0,3 pmol) causou inibição, de forma dose-dependente, da migração celular e o valor estimado da DI_{50}

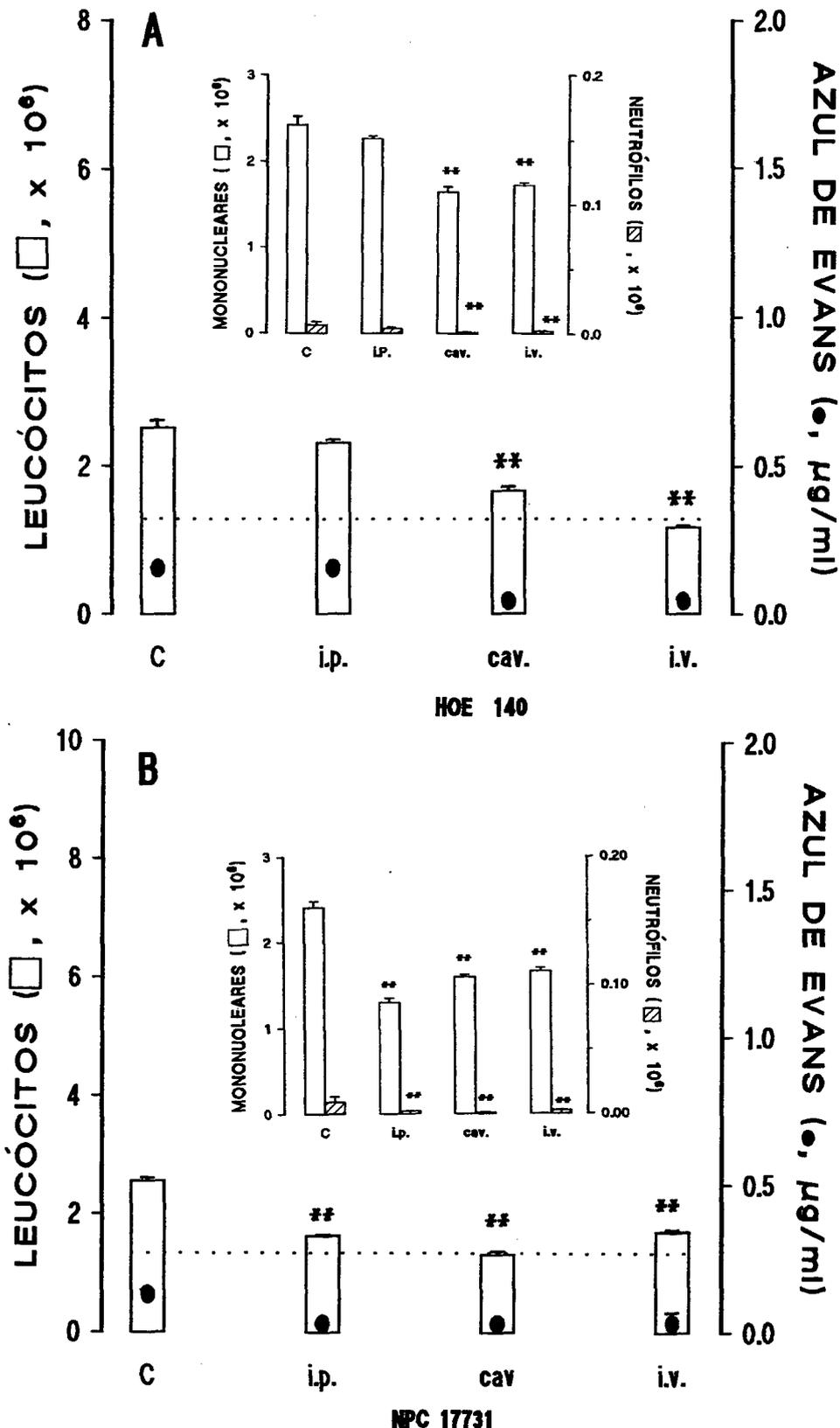


Figura 10- Efeito do tratamento prévio (30 min) com HOE 140 e NPC 17731, administrados por diferentes vias, na pleurisia induzida pela BK, em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com BK (10 nmol, 4 h), i.p. = intraperitoneal, cav. = intrapleurial, i.v. = endovenoso. A - Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com HOE 140: cav. (0,1 pmol), i.v. (5,0 pmol/kg), i.p. (5,0 pmol/kg) e B - Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com NPC 17731: cav. (1,0 pmol), i.v. (50 pmol/kg), i.p. (50 pmol/kg). *Insets* mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** $P < 0,01$. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

foi 0,028 (0,05-0,16) pmol/cav. Os valores médios de inibição máxima causada pelo HOE 140 (0,01-0,3 pmol) foram de 27, 56, 69, 89 e 89%, respectivamente (Fig. 11A). Nas doses de 0,1 e 0,3 pmol/cav. deste antagonista, o número de leucócitos na cavidade pleural não diferiu em comparação com o obtido em animais tratados somente com salina ($P > 0,05$). Em relação ao NPC 17731, as doses de 0,1 e 0,3 pmol reduziram de forma similar o influxo celular (27-32%) induzido pela BK (10 nmol/cav.). Na dose de 1,0 pmol/cav., este antagonista causou efeito inibitório significativo da migração celular da ordem de 98%. Os valores médios estimados da DI_{50} para este antagonista foram da ordem de 0,45 (0,28-0,73) pmol/cav. (Fig 11A e B).

A figura 12A mostra o perfil temporal do efeito inibitório causado pelo HOE 140 (0,1 pmol/cav.) administrado 0,5-8 h antes da indução da pleurisia pela BK (10 nmol/cav., 4 h). A duração do efeito inibitório causado por este antagonista foi prolongada, uma vez que redução significativa da migração celular foi observada até 8 h de tratamento antes da indução da pleurisia. Nos períodos de 0,5 a 4 h de tratamento prévio com este antagonista, os valores médios do número total de células (média \pm e.p.m. $\times 10^6$: 0,5 h = $1,3 \pm 0,1$; 4 h = $1,4 \pm 0,03$), não diferiram daqueles obtidos nos animais tratados apenas com salina ($1,3 \pm 0,08$). Já o NPC 17731 (1,0 pmol/cav.) promoveu efeito inibitório somente quando administrado 0,5-4 h antes da indução da pleurisia. No entanto, o tratamento prévio 8 h com este mesmo antagonista aumentou o influxo celular de forma significativa ($TC \times 10^6 = 3,3 \pm 0,2$) ($P < 0,01$) (Fig. 12B), às custas de mononucleares.

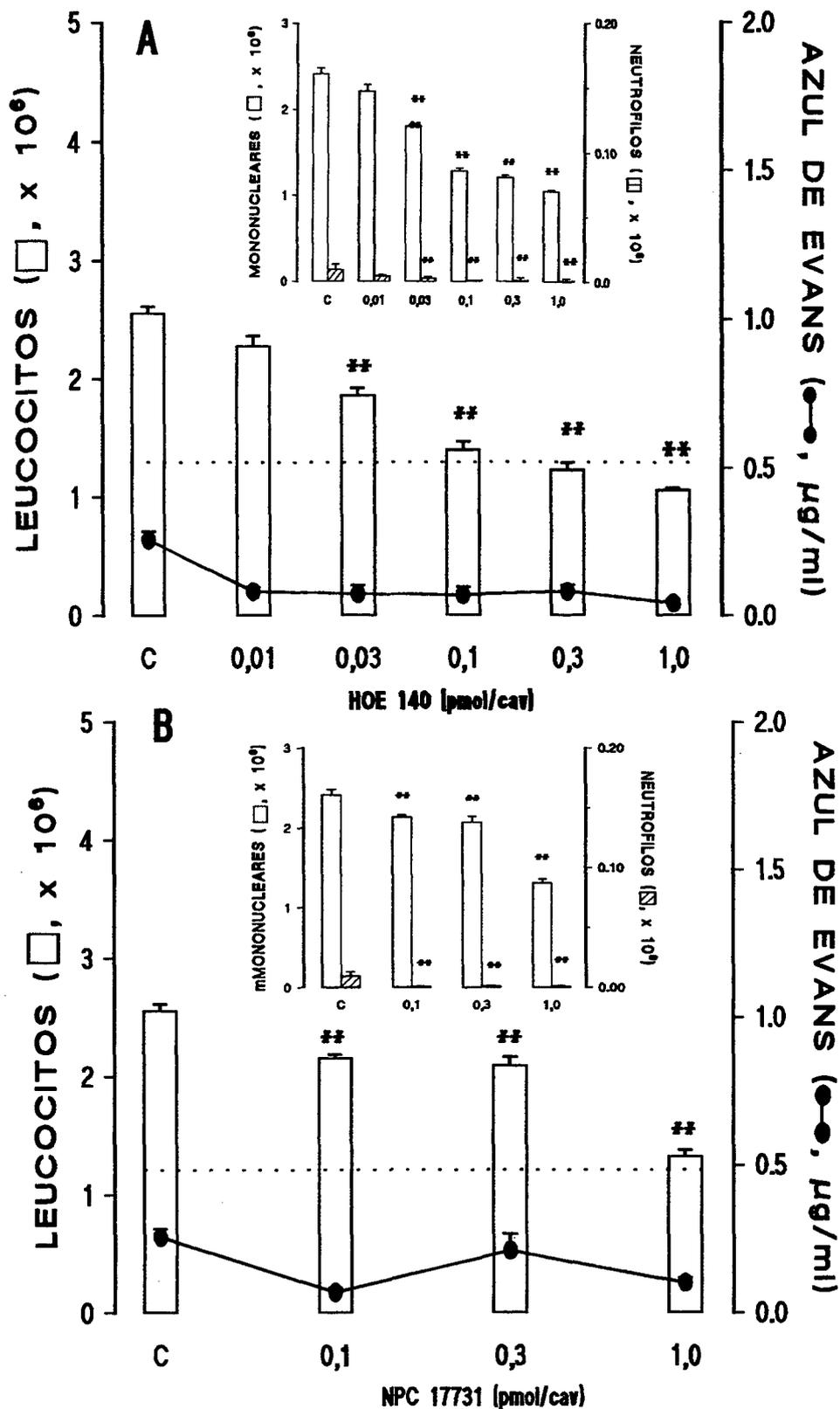


Figura 11- Efeito de diferentes doses do HOE 140 (A) e do NPC 17731 (B), administrados 30 min antes da pleurisia pela BK (10 nmol/cav., 4 h) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com BK. Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com HOE 140 (0,01-1,0 pmol/cav.) e com NPC 17731 (0,1-1,0 pmol/cav.). Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

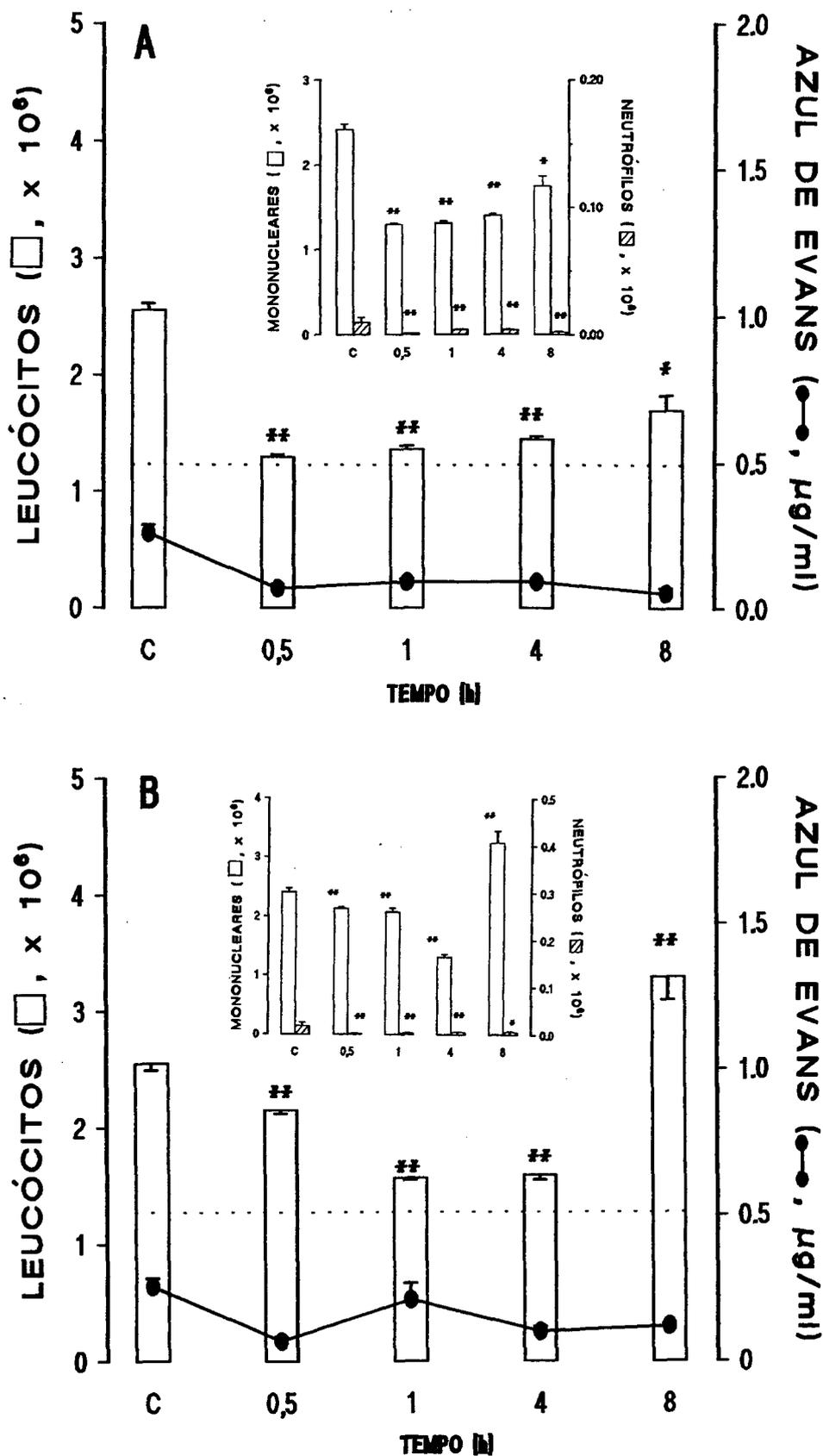


Figura 12- Efeito do HOE 140 (A) e do NPC 17731 (B), administrados em diferentes períodos de tempo (0,5-8 h) na pleurisia induzida pela BK (10 nmol/cav., 4 h). C = respostas obtidas de animais tratados com BK. Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com HOE 140 (0,1 pmol/cav.) e com NPC 17731 (1,0 pmol/cav.). *Insets* mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * P < 0,05 e ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

A administração intrapleural de des-Arg⁹-Leu⁸-BK (0,1 e 3,0 nmol), antagonista de receptor B₁ da BK, 30 min antes da pleurisia induzida pela BK (10 nmol/cav., 4 h) ou pela des-Arg⁹-BK (20 nmol/cav., 4 h) não modificou o influxo celular causado por estes agonistas (Fig. 13 A e B). Nenhum efeito foi também observado quando as mesmas doses deste antagonista foram administradas 5 min antes da indução da pleurisia por estes agonistas (resultados não mostrados).

A tabela 3 mostra que o tratamento prévio (30 min) dos

Tabela 3 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com diferentes drogas na pleurisia induzida pela bradicinina.

GRUPO	DOSES	LEUCÓCITOS x 10 ⁶	NEUTRÓFILOS x 10 ⁶	MONONUCLEARES x 10 ⁶
Controle ^a	-	2,50±0,03	0,20±0,02	2,30±0,10
Indometacina ^b	5,0 mg/kg	1,40±0,05**	0,10±0,02**	1,30±0,15**
Terfenadina ^b	50 mg/kg	1,0±0,04**	0,20±0,03	0,80±0,24**
Dexametasona ^b	0,5 mg/kg	1,0±0,04**	0,10±0,10**	0,90±0,03**
L-NOARG ^c	1,0 pmol	1,40±0,05**	0,10±0,10**	1,30±0,05**
Cromoglicato de sódio ^c	0,4 µmol	1,60±0,18**	0,30±0,10	1,30±0,10**
Teofilina ^b	50 mg/kg	1,50±0,09**	0,10±0,02**	1,40±0,01**
Salbutamol ^b	50 mg/kg	1,0±0,05**	0,40±0,01**	0,70±0,02**
SR 48968 ^c	20 nmol	2,75±0,20*	0,17±0,03	2,58±0,18*
	100 nmol	1,57±0,05**	0,11±0,01	1,46±0,05**

Em todos os animais foi injetado BK (10 nmol/cav.) e os parâmetros analisados 4 h após. Os valores apresentados representam as médias ± s.e.m. de n = 6-10 animais por grupo, a - somente animais tratados com BK, b - animais tratados pela via i.p., c - drogas administradas pela via intrapleural. Diferenças estatísticas são indicadas por asteriscos. * P < 0,05, ** P < 0,01.

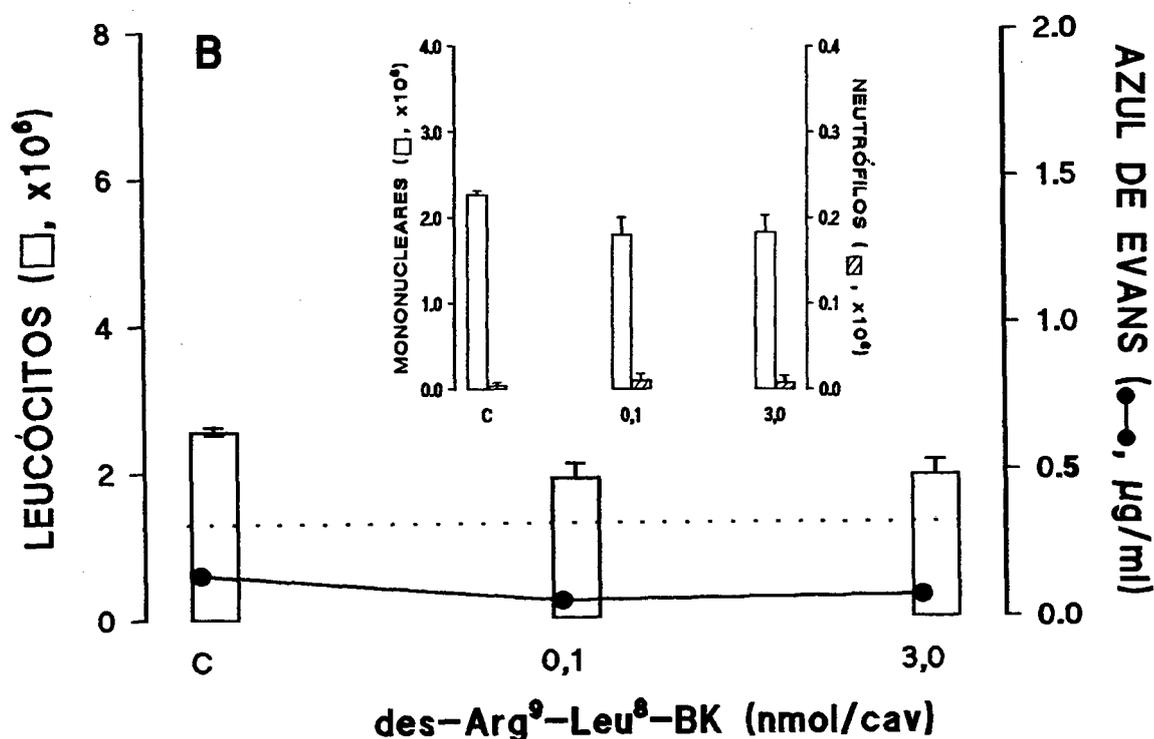
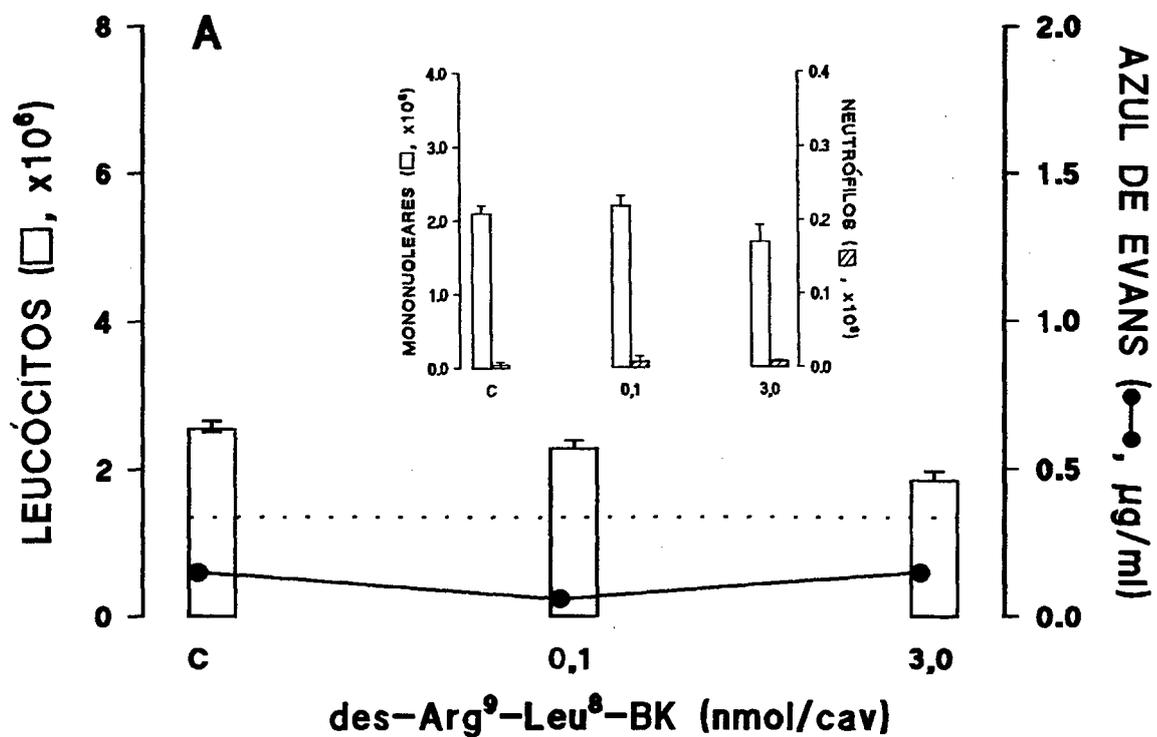


Figura 13- Efeito da des-Arg⁹-Leu⁸-BK (0,1 e 3,0 nmol/cav.) administradas 30 min antes da pleurisia pela BK (10 nmol/cav., 4 h) (A) ou des-Arg⁹-BK (20 nmol/cav., 4 h) (B) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com BK ou des-Arg⁹-BK. Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

animais com indometacina, terfenadina, dexametasona e L-NOArg inibiram significativamente a migração de mononucleares induzida pela BK (10 nmol, 4 h) na cavidade pleural de camundongos. Nestas condições, o tratamento prévio dos animais com estas drogas resultou em normalização dos leucócitos na cavidade pleural. Além disso, a teofilina, cromoglicato de sódio e salbutamol também inibiram significativamente a migração celular induzida pela BK (10 nmol/cav., 4 h) ($P < 0,01$) (tabela 3).

A administração de antagonistas de receptor das taquicininas do tipo NK_1 (FK 888: 0,02-0,2 pmol/cav.) (Fig. 14A) e NK_3 (SR 142801: 0,1-100 nmol/cav.) (Fig. 14B) 30 min antes da pleurisia induzida pela BK (10 nmol/cav., 4 h) causou inibição significativa da migração celular ($P < 0,05$) ($DI_{50} = 0,1$ (0,02-0,5) pmol/cav. e 21,5 (8,9-51,9) nmol/cav., respectivamente). A dose de 0,03 nmol/cav. do antagonista SR 142801 não foi efetiva em inibir o mesmo parâmetro (Fig. 14). Como mostra a tabela 3, a administração de antagonista do receptor NK_2 das taquicininas (SR 48968) nas doses de 20 e 100 nmol/cav. causou efeitos distintos. A dose de 20 nmol/cav., seguida da administração da BK, resultou em aumento da migração celular para a cavidade pleural ($P < 0,01$), enquanto 100 nmol/cav. deste antagonista causou inibição significativa deste mesmo parâmetro (tabela 3). Nesta última dose, a execução do protocolo experimental foi limitada devido os efeitos tóxicos deste antagonista que causou inclusive morte de 3 de 8 animais estudados. É interessante ressaltar ainda que nas doses de 50

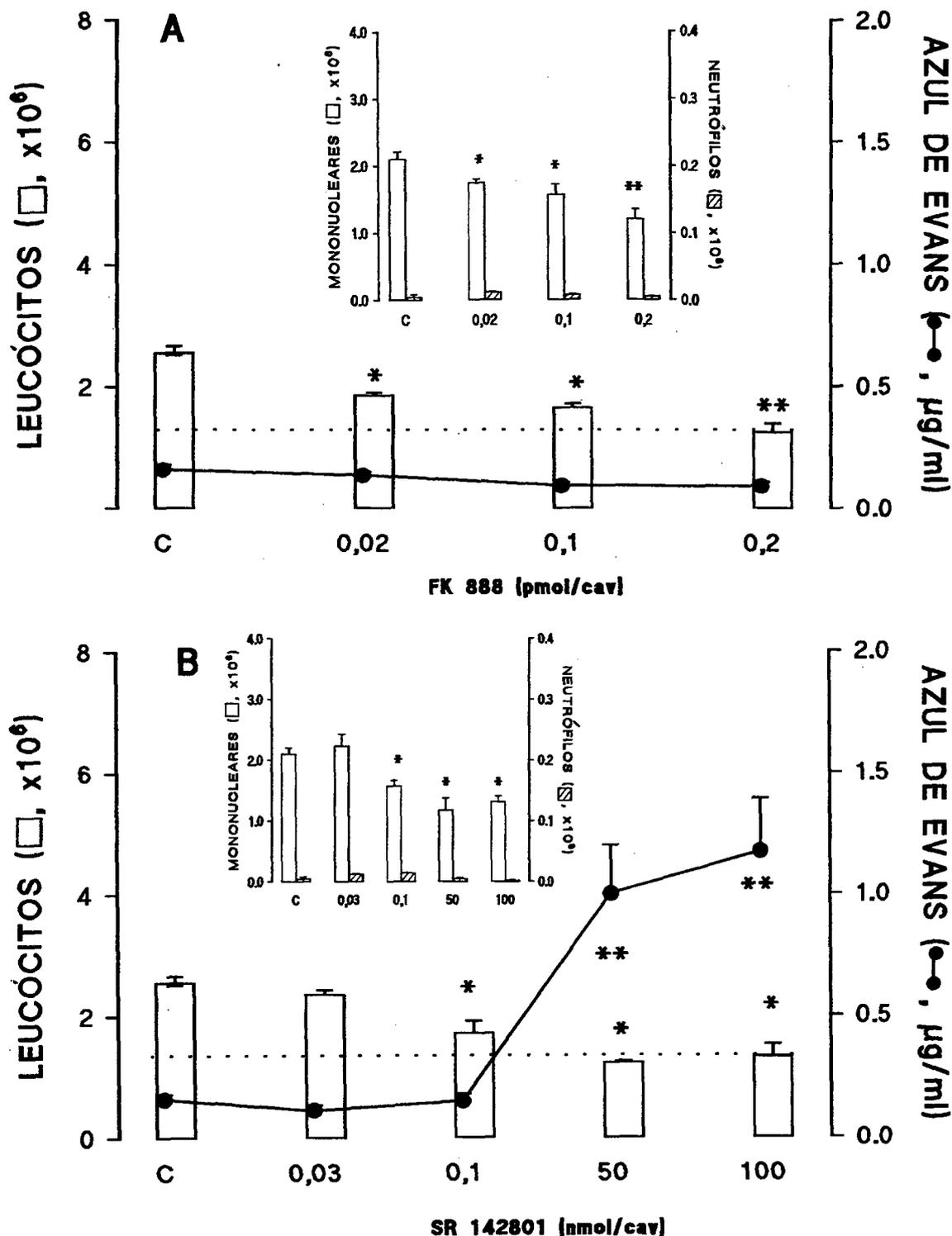


Figura 14- Efeito de diferentes doses do FK 888 (A) e do SR 142801 (B) administrados 30 min antes da pleurisia pela BK (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com BK (10 nmol). Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com FK 888 (0,02-0,2 pmol/cav.) e com SR 142801 (0,03-100 nmol/cav.). Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * P < 0,05 e ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

nmol/cav., este antagonista causou efeito inibitório da mesma magnitude que a obtida com 100 nmol/cav. (n = 3, resultados não mostrados).

Tanto a administração de antagonistas de cininas (HOE 140 e NPC 17731) como os antagonistas das taquicininas (FK 888, SR 48968 e SR 142801), quando administrados isoladamente promoveu, aumento significativo da migração celular ($P < 0,01$) (resultados não mostrados). Além disso, altas doses do antagonista NK_3 das taquicininas (SR 142801: 50 e 100 nmol/cav.) também promoveram aumento significativo da exsudação ($P < 0,01$) (Fig. 14B).

4.3 Análise da resposta inflamatória induzida pela substância P na cavidade pleural de camundongos.

A figura 15 mostra o efeito de diferentes doses da SP (10, 20 e 40 nmol) administradas na cavidade pleural de camundongos. Como pode ser observado, a SP causou aumento da migração celular de forma dose-dependente às custas de mononucleares, enquanto que o exsudato, embora significativo, foi reduzido ($P < 0,01$). Nestas condições experimentais, apenas a dose de 20 nmol/cav. de SP determinou também um aumento discreto, mas significativo do número de neutrófilos ($P < 0,01$). Migração celular e exsudação máximas (média \pm e.p.m.) foram observadas 4 h após a administração de SP (40 nmol) na cavidade pleural ($TC \times 10^6 = 3,1 \pm 0,1$, $EX = 0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$), sendo significativamente maior em comparação com o

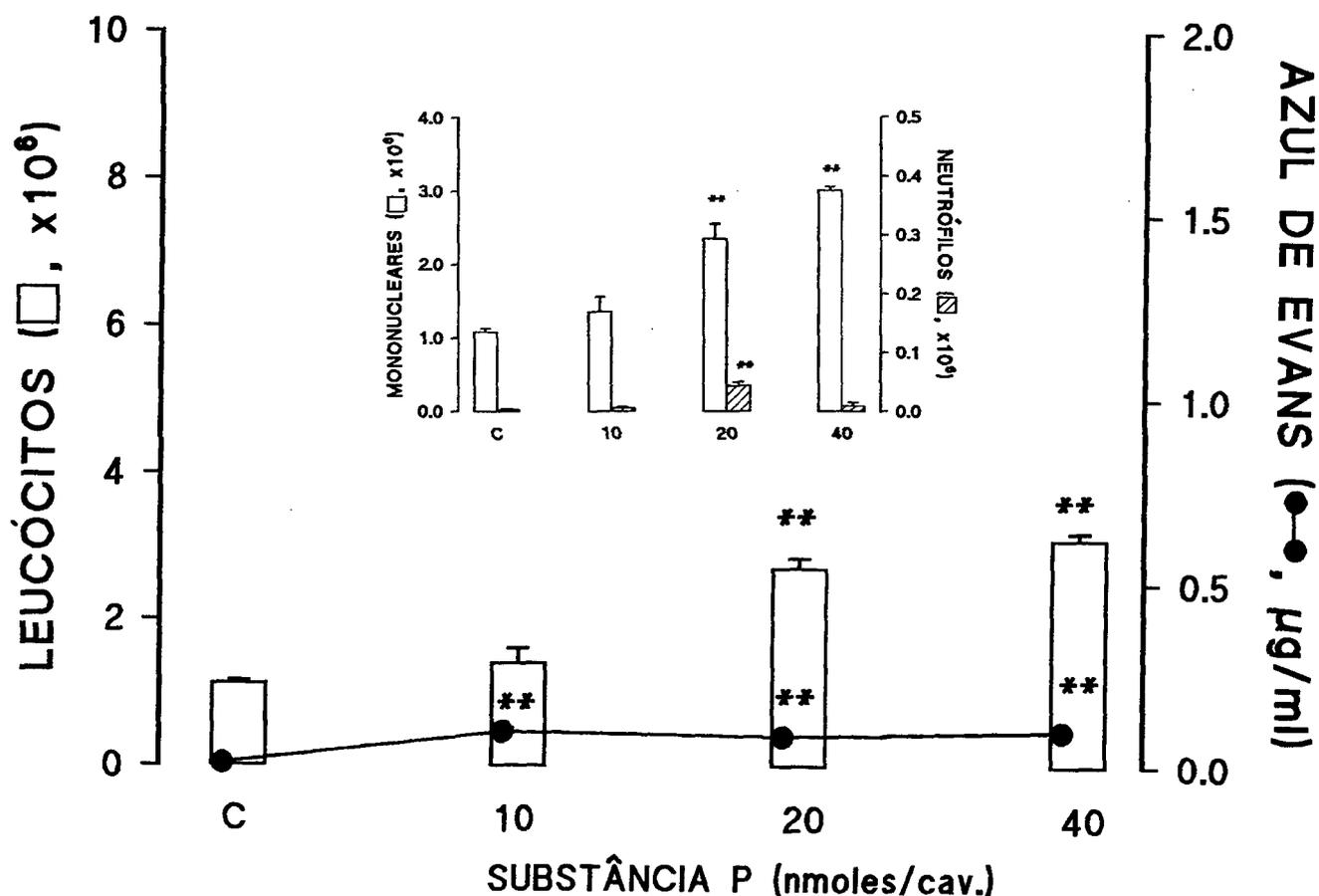


Figura 15- Efeito de diferentes doses da SP (10, 20 e 40 nmol) na cavidade pleural de camundongos. C = animais tratados com solução salina 0,9%. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

grupo tratado apenas com solução salina (TC x 10⁶ = 1,3 ± 0,04, EX = 0,025 ± 0,1 µg/ml) (P < 0,01). Os valores médios da DE₅₀ para este agonista foram 14,2 (95% LC = 10,7-19,1) nmol/cav.. Com base nestes resultados, nos experimentos subseqüentes foi escolhida a dose de 20 nmol/cav. para estudo da pleurisia mediada por este agente.

O perfil temporal da resposta inflamatória induzida pela SP (20 nmol) na cavidade pleural de camundongos (1-100 h) é mostrado na figura 16. A SP (20 nmol) causou aumento

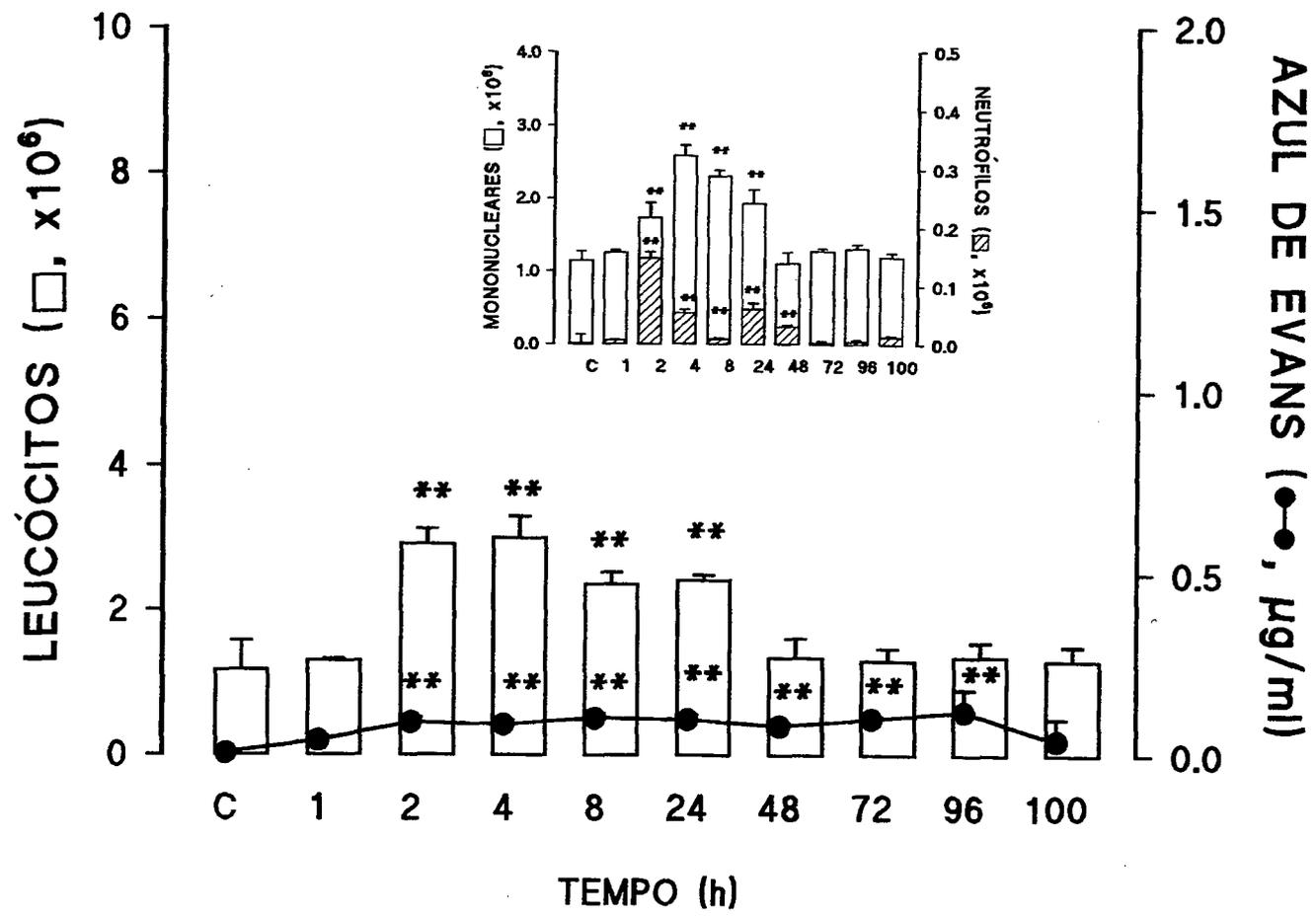


Figura 16- Perfil temporal da pleurisia induzida pela SP (20 nmol) na cavidade pleural de camundongos. C = animais tratados com solução salina 0,9%. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas entre o exsudato e o total de células em relação aos respectivos C. ** P < 0,01. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

significativo da migração celular (2-24 h) após sua administração na cavidade pleural, às custas do influxo de mononucleares (P < 0,01). Foi também observado, de modo associado aumento da migração de neutrófilos no período de 2-48 h após a indução da pleurisia (P < 0,01). A exsudação, avaliada através dos níveis de azul de Evans na cavidade pleural, foi pequena, porém significativa em relação ao grupo controle, sendo detectada até 96 h de observação (P < 0,01).

Levando-se em conta que o pico de migração celular (mononucleares) ocorreu entre 2 e 24 h após a administração do agonista, escolheu-se o tempo de 4 h para estudo nos próximos experimentos.

As Figuras 17A, B e C mostram o efeito dos antagonistas de receptor NK_1 (FK 888: 0,1-200 nmol/cav.), NK_2 (SR 48968: 20 e 100 nmol/cav.) e NK_3 (SR 142801: 0,03-50 nmol/cav.) das taquicininas, administrados 5 min antes da pleurisia induzida pela SP (20 nmol). FK 888 foi efetivo em inibir apenas a migração celular ($DI_{50} = 19,3$ (1,2-304) nmol/cav.), ($P < 0,01$), sendo que houve um aumento significativo da exsudação em todas as doses testadas do antagonista ($P < 0,01$) (Fig. 17A). Já o tratamento prévio dos animais com SR 48968 (20 nmol/cav.) não foi efetivo em inibir este processo inflamatório (Fig. 17B). Nestas condições, foi observado aumento significativo da migração celular, às custas de mononucleares ($P < 0,01$). É interessante ressaltar que doses mais elevadas de SR 48968 (100 nmol/cav., 5 min antes) seguida da administração do agonista (20 nmol/cav.) resultou em morte de 100% dos animais. Além disso, doses isoladas de FK 888 (0,1 nmol/cav.) e SR 48968 (20-100 nmol/cav.) causaram *per se* aumento da migração celular e da exsudação na cavidade pleural de camundongos ($P < 0,01$) (resultados não apresentados). A administração de SR 142801 (0,1-50,0 nmol/cav., 5 min antes) promoveu inibição significativa do influxo celular ($DI_{50} = 6,5$ (0,44-96) nmol/cav.), ($P < 0,01$) (Fig. 17C). Entretanto, este antagonista na dose de 50 nmol/cav. determinou aumento significativo da exsudação ($P < 0,01$).

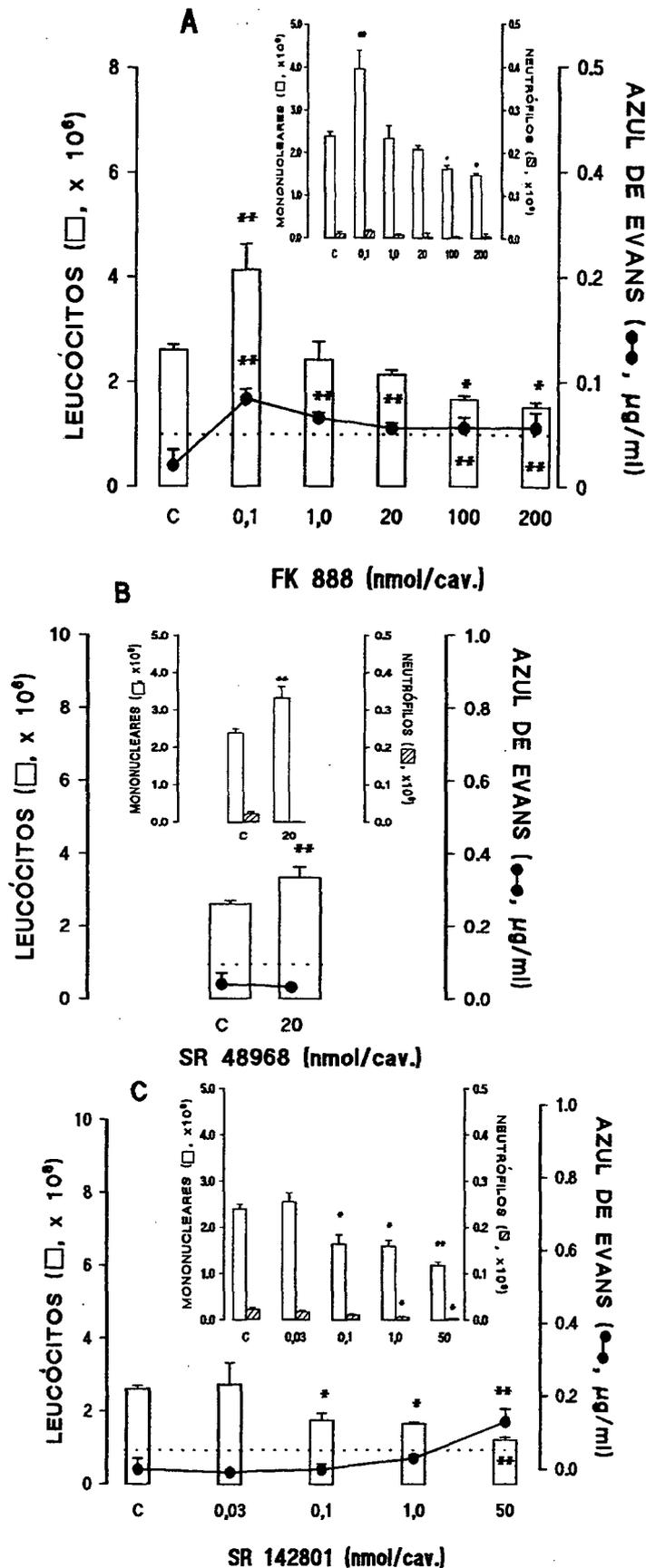


Figura 17- Efeito de diferentes doses do FK 888 (A), do SR 48968 (B) e do SR 142801 (C) na pleurisia induzida pela SP (20 nmol) em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados apenas com SP. Os asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas do exsudato e da migração celular em relação aos respectivos C. Cada antagonista foi administrado 5 min antes da indução da pleurisia. Insets mostram o nº de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * P < 0,05 e ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do nº total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas

Os antagonistas do receptor B₂ da BK, HOE 140 (0,01-0,1 pmol/cav.) e NPC 17731 (0,01-0,1 pmol/cav.), administrados 5 min antes, inibiram de forma dose-dependente tanto a migração celular como o exsudato induzidos pela SP (P < 0,05), com DI₅₀ de 0,03 (0,013-8,0) pmol/cav. e 0,04 (0,018-0,087) pmol/cav., respectivamente (Fig. 18A e B).

Além disso, o tratamento prévio dos animais (5 dias antes) com o composto 48/80 - 0,2 µmol/cav.) resultou em diminuição significativa da migração celular induzida pela SP (20 nmol/cav.). Nas mesmas condições experimentais, a migração celular induzida pela histamina (1,0 µmol/cav., 1 h) também foi significativamente reduzida (Fig. 19).

A tabela 4 mostra que a administração de indometacina, terfenadina, dexametasona e L-NOARG, 30 minutos antes da pleurisia induzida pela SP (20 nmol/ cav.), foi efetiva em inibir a migração celular na cavidade pleural 4 h após a administração do agente flogístico estudado. Da mesma forma, o tratamento prévio (30 min) dos animais com teofilina ou salbutamol inibiu significativamente a migração celular induzida pela SP (P < 0,01). Nas mesmas condições experimentais, o tratamento dos animais com des-Arg⁹-Leu⁸-BK não modificou os efeitos pró-inflamatórios da SP na cavidade pleural, enquanto o cromoglicato de sódio inibiu apenas a exsudação (tabela 4).

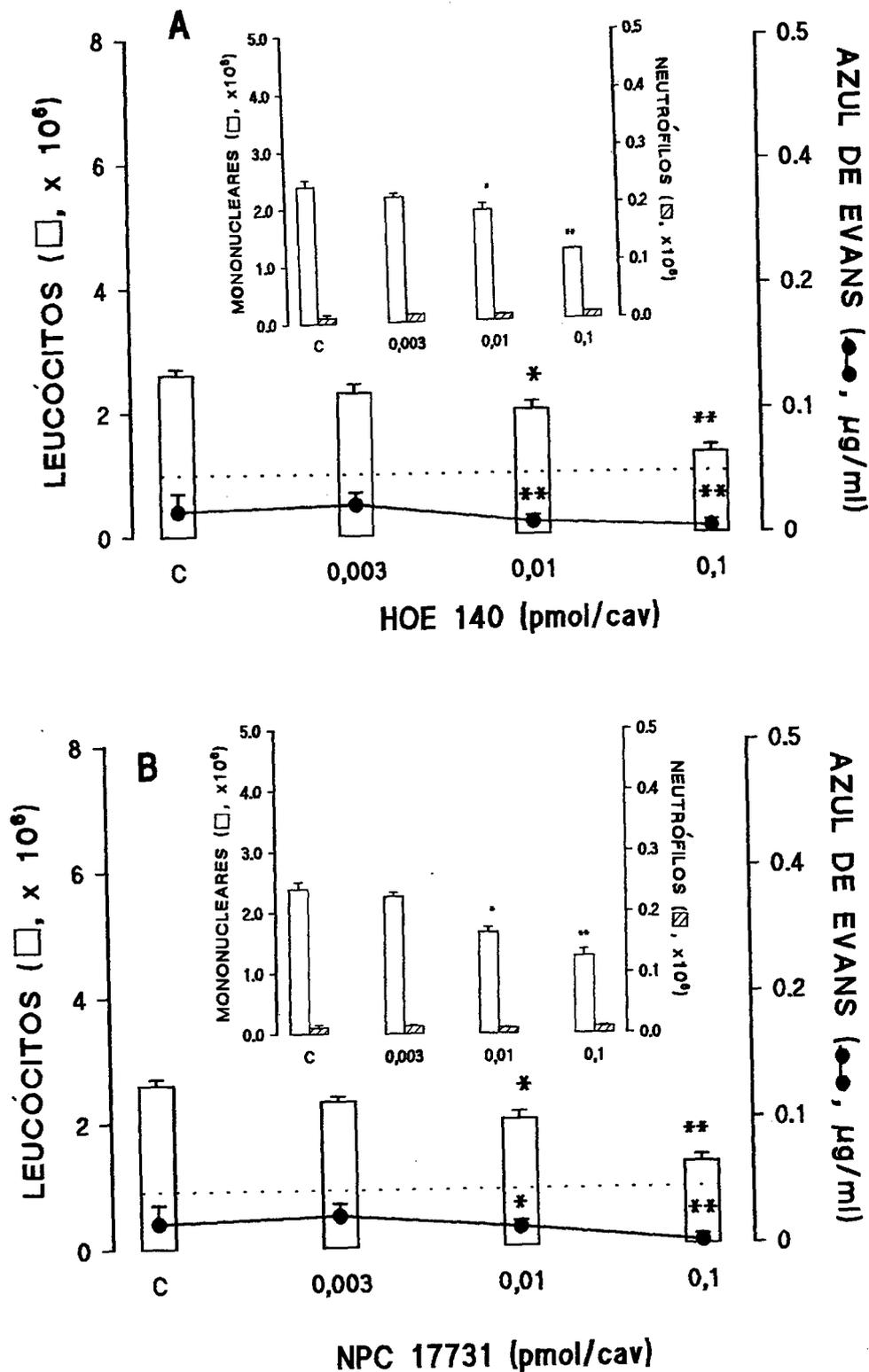


Figura 18- Efeito de diferentes doses do HOE 140 (A) e do NPC 17731 (B), administrados 5 min antes da pleurisia pela SP (20 nmol/cav., 4 h), em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com SP. Concentrações médias do total de células e do exsudato obtidos dos grupos C e tratados com HOE 140 (0,003-0,1 pmol/cav.) e com NPC 17731 (0,003-0,1 pmol/cav.). Insets mostram o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. * P < 0,05 ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

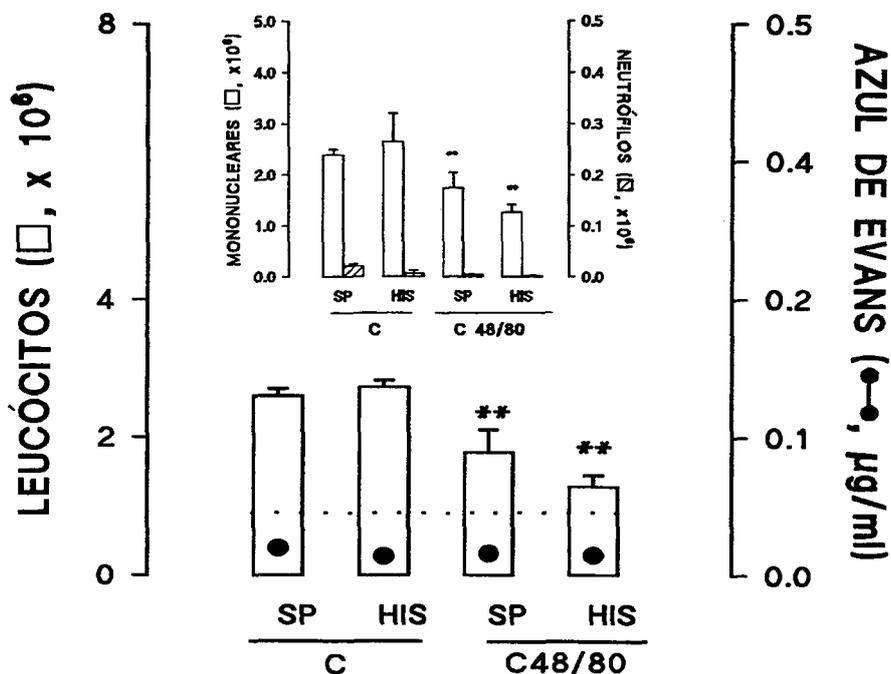


Figura 19- Efeito do tratamento com C48/80 (0,2 $\mu\text{mol/cav.}$, 5 dias antes) na pleurisia induzida pela SP (20 nmol/cav., 4 h) e histamina (1,0 $\mu\text{mol/cav.}$, 1 h), em camundongos. C = respostas obtidas de animais tratados com SP ou histamina. Inset mostra o n^o de mononucleares e de neutrófilos. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais e as barras verticais o e.p.m. ** P < 0,01. As linhas tracejadas indicam os valores médios do n^o total de células obtidos de animais injetados com salina. Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

Tabela 4- Efeito do tratamento prévio (30 min) com diferentes drogas na pleurisia induzida pela substância P.

GRUPO	DOSES	LEUCÓCITOS x 10 ⁶	NEUTRÓFILOS x 10 ⁶	MONONUCLEARES x 10 ⁶	EXSUDATO µg/ml
Controle ^a	-	2,71±0,30	0,35±0,05	2,35±0,14	0,40±0,05
des-Arg ^y -Leu ^v -BK ^c	35 nmol	2,40±0,14	0,08±0,02	2,32±0,01	0,46±0,05
Terfenadina ^b	50 mg/kg	1,52±0,20**	0,50±0,10**	1,02 ±0,20**	0,05±0,10**
Indometacina ^b	5,0 mg/kg	1,56±0,06**	0,85±0,20**	0,71±0,11**	0,20±0,17**
Dexametasona ^b	0,5mg/kg	1,60±0,70**	0,05±0,60**	1,55±0,70**	0,05±0,60**
L-NOARG ^c	1,0 pmol	1,22±0,80**	0,03±0,30**	1,19 ±0,10**	0,03±0,30**
Cromoglicato de sódio ^c	0,4 μmol	2,80±0,20	0,20±0,07	2,40±0,30	0,27±0,07*
Teofilina ^b	50 mg/kg	1,06±0,03**	0,02±0,04**	1,04±0,03**	0,02±0,04**
Salbutamol ^b	50 mg/kg	1,25±0,09**	0,04±0,07**	1,21±0,10**	0,04±0,07**

Em todos os animais foi injetado SP (20 nmol/cav.) e os parâmetros analisados 4 h após. Os valores apresentados representam as médias \pm s.e.m. n = 6-10 animais por grupo. Todas as drogas foram administradas 30 min antes da injeção da pleurisia, exceto des-Arg⁹-Leu⁸-BK (5 min), a - somente animais tratados com SP, b - animais tratados pela via i.p., c - drogas administradas pela via intrapleural. Diferenças estatísticas são indicadas por asteriscos. * P < 0,05, ** P < 0,01.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo de ação e os alvos celulares dos agentes terapêuticos comumente utilizados no tratamento da asma brônquica têm sido melhor estudados nos últimos anos. A aquisição destes conhecimentos ocorreu paralelamente com a introdução de novos conceitos sobre o processo inflamatório. Em relação às drogas antiasmáticas que foram testadas no nosso protocolo experimental, os resultados mostram claramente que a teofilina, o cromoglicato de sódio e o salbutamol possuem um efeito antiinflamatório. Em relação à inflamação de origem neurogênica, o protocolo experimental utilizado permitiu avaliar a participação das cininas e da SP. Nestas condições experimentais, foi possível estudar os tipos de receptores envolvidos, além de sugerir que tanto a BK como a SP promoveram liberação de outros mediadores, o que contribuiu significativamente para a manutenção e ampliação do processo inflamatório. Além disso, os resultados deste modelo experimental indicam que as cininas são capazes de liberar taquicininas e vice-versa, preenchendo os critérios de processo inflamatório de origem neurogênica.

Apesar do nosso protocolo experimental não ser representativo de um modelo animal de asma brônquica, os resultados obtidos com os medicamentos antiasmáticos estudados são relevantes, uma vez que poucos estudos analisaram seus possíveis efeitos terapêuticos em ensaios pré-clínicos não relacionados diretamente com esta doença (Yukawa et al., 1989; Schrier et al., 1990; Svenjo, 1990). Em nosso estudo, a

análise do perfil antiinflamatório da teofilina mostra que esta droga exerce um efeito prolongado quando administrada até 8 h antes da indução da pleurisia, inibindo tanto o exsudato quanto a migração celular. No entanto, o tratamento dos animais 24 h antes da indução da pleurisia pela carragenina foi efetivo em inibir apenas a exsudação. Em relação à segunda fase (48 h) do processo inflamatório induzido pela carragenina, o tratamento prévio com teofilina, 0,5-4 h antes, resultou em inibição significativa da exsudação e da migração celular. Este efeito foi observado apenas quando se empregou a dose de 50,0 mg/kg, i.p., sendo que a administração de 5 mg/kg, i.p. (0,5-4 h, antes) não foi efetiva em inibir a migração celular, embora tenha havido uma inibição significativa dos valores médios do exsudato (resultados não mostrados). O conjunto destes resultados sugere a possibilidade da participação de diferentes mediadores nas duas fases do processo inflamatório conforme já proposto por Henriques (1993) e/ou diferenças no metabolismo desta droga (Nicholas et al., 1993).

Várias hipóteses poderiam ser sugeridas em relação às possíveis propriedades antiinflamatórias da teofilina. Atualmente, existem várias evidências que sustentam o papel antiinflamatório deste medicamento no tratamento da asma brônquica (Milgrom e Bender, 1993; Becker e Bierman, 1994; Sullivan et al., 1994). É interessante ressaltar que o efeito antiinflamatório da teofilina foi observado tanto em estudos clínicos (Sullivan et al., 1994) como experimentais (Banner e Page, 1995; Raeburn et al., 1994). Esses modelos têm sido

utilizados para estudar não só o efeito de drogas comumente utilizadas na clínica, como também de novos agentes antiasmáticos, a fim de prevenir o acúmulo de células no sítio inflamatório. Por exemplo, em modelos de inflamação e de hiperresponsividade brônquica induzidas por alérgenos, nas vias aéreas de ratos e cobaias, foi demonstrado que as xantinas são capazes de inibir estes dois parâmetros (Pauwels, 1987; Manzini et al., 1993). Além disso, drogas antiasmáticas com perfil terapêutico semelhante ao da teofilina foram também efetivas em inibir a resposta alérgica em coelhos (Ali et al., 1992).

Em estudos clínicos, foi demonstrado que a teofilina inibe a liberação da histamina, *in vitro*, em células obtidas do lavado nasal de pacientes com rinite alérgica, sendo efetiva em diminuir a exsudação observada nesta doença (Naclerio et al., 1986). Além disso, esta xantina também é capaz de inibir, *in vitro*, o *burst* respiratório de células alveolares (Aubier e Barnes, 1995) e aumentar o número de linfócitos T supressores humanos (Shohat et al., 1983; Fink et al., 1987; Milgrom, 1991). O conjunto destes resultados permite, portanto, sugerir que a teofilina possui atividades antiinflamatória e imunomodulatória (Ward et al., 1993; Jaffar et al., 1994).

No nosso estudo, conforme citado anteriormente, a reação inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos resulta da participação de diversos mediadores e tipos celulares (Henriques, 1993). Portanto, é possível especular que a teofilina não esteja atuando de forma seletiva no processo inflamatório, mas em uma via comum compartilhada

por vários tipos de mediadores e/ou células. Com base nestes resultados e outros da literatura (Cooper et al., 1985; Fink et al., 1987; Aubier e Barnes, 1995; Banner e Page, 1995), é possível que os mecanismos clássicos de ação propostos para esta droga tipo inibição do monofosfato cíclico de 3', 5'-adenosina (AMPC) ou do monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc) (Milgrom, 1993), antagonismo dos receptores purinérgicos e bloqueio do influxo de cálcio (Torphy e Udem, 1991) não sejam exclusivamente os únicos responsáveis por este efeito antiinflamatório.

Admite-se que o mecanismo da atividade antiinflamatória da teofilina seja complexo. No entanto, não está descartado que este efeito resulte da sua capacidade em inibir a atividade de enzimas regulatórias do AMPC e/ou GMPc, as fosfodiesterases. Estas últimas constituem uma grande família de isoenzimas denominadas genericamente de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos, codificadas em genes distintos e que diferem quanto as suas características físicas e cinéticas, preferência por substratos, distribuição tecidual e sensibilidade a diversos inibidores seletivos (Beavo e Reifsnnyder, 1990; Conti et al., 1991; Nicholson et al., 1991; Torphy e Livi, 1993).

Atualmente, são conhecidas pelo menos sete diferentes famílias de fosfodiesterases: I - PDE dependente de cálcio/calmodulina, II - estimuladas pelo GMPc; III - inibidas pelo GMPc, IV - específicas para metabolizar o AMPC, V - específicas para metabolizar o GMPc, VI - específicas para

metabolizar o GMPc da retina, VII - com alta especificidade e relativa afinidade para o AMPc (Underwood et al., 1994).

Diversos estudos têm demonstrado que a isoenzima PDE predominante nas células inflamatórias é a PDE do tipo IV (Giembycz, 1992), tendo sido reconhecida sua importância nos fenômenos de migração e de ativação dos eosinófilos (Yukawa et al., 1989). A PDE do tipo III, identificada inicialmente nas plaquetas, é também encontrada em linfócitos e que em conjunto com a PDE tipo IV (Robicsek et al., 1991) são responsáveis pela regulação dos níveis do AMPc nestas células (tipo T) em humanos (Schudt et al., 1992). Desta forma, tem também sido postulado que as xantinas ou os inibidores específicos das PDE III e IV podem exercer ações diversas em células-alvo através da inibição da ativação i) do eosinófilo, ii) das células precursoras deste polimorfonuclear e iii) de outros tipos celulares como os linfócitos ou mastócitos, os quais liberam mediadores que promovem a quimiotaxia de eosinófilos. Levando em consideração que os eosinófilos são as células inflamatórias predominantes nas vias aéreas de pacientes asmáticos (Wardlaw e Kay, 1987) e com base nos estudos citados acima, drogas inibidoras das PDE III e IV, efetivas em inibir o recrutamento de eosinófilos em modelos experimentais, poderiam alterar a adesão e a migração destas células do endotélio para o tecido intersticial e daí para o trato respiratório. Além disso, o endotélio pode também representar um alvo importante para a ação destas drogas, tendo em vista ser rico em PDE tipo IV (Lugnier e Schini, 1990).

Outros estudos mostram que os inibidores das PDEs são capazes de inibir também a expressão de moléculas de adesão específicas, bem como a permeabilidade da célula endotelial *in vivo* (Seiburt et al., 1992; Suttorp et al., 1993). Deste modo, a interação do eosinófilo com a célula endotelial estaria comprometida. Além disso, estas drogas são também efetivas em inibir a liberação do TNF α de monócitos (Maschler e Christensen, 1991) e a exsudação induzida pelo PAF nas vias aéreas de cobaias (Raeburn e Karlsson, 1992). Estudos feitos por Sanjar et al. (1990) demonstraram que a administração crônica de teofilina ou de uma mistura de inibidores das PDEs tipo III e IV resultou em inibição das ações do PAF e do acúmulo de eosinófilos na cavidade pulmonar de cobaias.

Dentro deste contexto, a teofilina é considerada um inibidor inespecífico das PDEs. Isto porque não há evidências da seletividade deste medicamento para qualquer isoforma desta enzima, porém ainda permanece a possibilidade que haja outros subtipos de PDEs ainda não identificados e que seriam mais sensíveis à teofilina. Esta hipótese não está descartada, uma vez que algumas destas isoenzimas poderiam ser expressas (induzidas) apenas durante o processo inflamatório nas vias aéreas de asmáticos, justificando a maior sensibilidade da teofilina na inibição de células inflamatórias (Aubier e Barnes, 1995).

Admite-se, atualmente, que a inibição da PDE não seja a única explicação para justificar os efeitos antiinflamatórios da teofilina e é possível que outros mecanismos de ação sejam

encontrados no futuro. Entretanto, este efeito terapêutico exercido pela teofilina despertou o interesse na compreensão da participação desta família de enzimas em diversas doenças. Assim, atualmente, é reconhecido que o AMPc é um importante regulador de uma variedade de funções nos linfócitos (Coffey, 1988). Tem sido demonstrado que agentes capazes de elevar os níveis do AMPc em linfócitos, como descrito para as xantinas, possuem propriedades imunossupressoras. Vários grupos têm demonstrado que estes agentes são capazes de inibir as células precursoras dos linfócitos (Novogrodsky et al., 1979; Robicsek et al., 1991), além da sua proliferação (Mary et al., 1987) e sua ativação (Bourne et al., 1973; Coffey, 1988; Kammer, 1988; Lingk et al., 1990; Meskinin et al., 1992; Schudt et al., 1992).

Outros estudos têm também demonstrado anormalidades da função imunológica em pacientes com dermatite atópica. Por exemplo, um dos estudos demonstrou que nestes pacientes há liberação excessiva de histamina pelos basófilos (Butler et al., 1983), além da síntese elevada da IgE pelas células mononucleares (Cooper et al., 1985). Tem sido sugerido que estas alterações poderiam resultar de um defeito no sistema regulatório dos nucleotídeos cíclicos. Além disso, há evidências sugerindo que a atividade hidrolítica do AMPc, em linfócitos, esteja aumentada em pacientes com doenças alérgicas (Grewe et al., 1982), devido ao aumento da atividade da PDE do tipo AMPc específica (Butler et al., 1983; Holden et al., 1986; Sawai et al., 1995). Foi também observado que leucócitos de

pacientes atópicos possuem alta sensibilidade para os inibidores da PDE tipo IV (Giustina et al., 1984).

Embora nossos resultados estejam de acordo com a literatura, vale ressaltar a necessidade de estudos futuros para o esclarecimento do mecanismo de ação da teofilina no modelo experimental empregado. Os nossos resultados, embora não permitam explorar o mecanismo de ação desta droga, apóiam as evidências que a mesma exerce efeito antiinflamatório, mesmo quando utilizada de forma aguda. Nestas condições, a constatação que a duração do seu efeito é prolongada, permite sugerir que o desenvolvimento de drogas mais seletivas deste grupo de medicamentos permitirá que seja oferecida uma terapêutica mais apropriada para os pacientes portadores de asma brônquica e/ou rinite alérgica e com menos efeitos colaterais.

Outro medicamento utilizado no tratamento da asma brônquica, da rinite e da conjuntivite alérgicas e que foi empregado no nosso protocolo experimental foi o cromoglicato de sódio. Esta droga, administrada diretamente na cavidade pleural, inibiu tanto a migração celular como o exsudato nas duas fases (precoce e tardia) do processo inflamatório induzido pela carragenina em camundongos. Embora não seja possível comparar a magnitude do efeito antiinflamatório entre a teofilina e o cromoglicato de sódio neste modelo experimental, vale a pena comentar que o tratamento prévio dos animais com este último medicamento resultou em inibição mais prolongada, pois foi efetivo em inibir a segunda fase do processo

inflamatório, mesmo quando administrado 24 h antes do agente flogístico.

Vários estudos pré-clínicos têm demonstrado o efeito antiinflamatório do cromoglicato de sódio e de drogas similares como o nedocromil *in vivo*. Por exemplo, em cobaias sensibilizadas com ovalbumina, o tratamento com cromoglicato de sódio inibiu tanto a obstrução das vias aéreas quanto a migração celular quando os animais foram expostos novamente ao antígeno, por via inalatória (Tarayre et al., 1991). Em coelhos submetidos à inalação por *Ascaris suum*, a administração prévia do cromoglicato de sódio, por via inalatória, atenuou tanto os efeitos broncoconstritores imediato e tardio, bem como o aumento do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (Abraham et al., 1988). Todavia, apesar dos conceitos acerca da fisiopatologia das doenças inflamatórias como a asma brônquica terem mudado radicalmente nos últimos anos, não se dispõe de resultados clínicos recentes, do tipo multicêntrico, com este medicamento. Entretanto, o seu efeito antiinflamatório, embora não tenha sido ainda totalmente esclarecido, é amplamente reconhecido.

Durante muitos anos, prevaleceu a hipótese que os efeitos terapêuticos do cromoglicato de sódio resultavam exclusivamente de suas ações sobre a membrana celular dos mastócitos. Vários estudos realizados nas décadas de setenta e oitenta demonstraram que este medicamento atua na membrana celular dos mastócitos, estabilizando-a e protegendo-a contra reações do tipo antígeno-anticorpo, que ao liberarem mediadores químicos

destas células, são capazes de induzir o broncoespasmo (Spataro e Bosmann, 1976; Mazurek et al., 1980). Várias hipóteses foram levantadas para explicar o efeito estabilizador do cromoglicato de sódio na membrana dos mastócitos. Por exemplo, em cultura de basófilos de ratos foi sugerido que o cromoglicato de sódio agiria em um receptor específico da membrana dos mastócitos, inibindo a liberação de histamina, na presença de cálcio (Spataro e Bosmann, 1976). Este receptor foi posteriormente identificado por Mazurek et al. (1980) como sendo uma proteína dependente de cálcio para a sua ativação e que é bloqueada por este medicamento (Mazurek et al., 1980, 1982). Outra hipótese aventada é que o cromoglicato de sódio seria capaz de prevenir o influxo de cálcio, para o compartimento intracelular, o qual parece ser necessário para iniciar a degranulação dos mastócitos, através de estímulos tipo reação antígeno-anticorpo.

Estudos mais recentes, todavia, têm demonstrado um efeito direto do cromoglicato de sódio em diversas células inflamatórias do trato respiratório, além dos mastócitos. Nestas condições, é descrito que o cromoglicato de sódio exerceria seus efeitos através de diferentes mecanismos, incluindo, entre outros, a inibição *i)* da quimiotaxia de neutrófilos e de macrófagos alveolares humanos após estimulação com IgE (Tsicopoulos et al., 1988), *ii)* da citotoxicidade-dependente de anticorpos e mediada por eosinófilos em humanos (Rand et al., 1988), *iii)* da degranulação de basófilos induzida por IgG₄ (Becauvais et al., 1989) e *iv)* da degranulação de

eosinófilos de pacientes asmáticos (Palczynski et al., 1989), portadores da síndrome hipereosinofílica (Spry et al., 1986) ou que apresentam concentrações séricas elevadas destas células (Sher e Wadee, 1981). Foi também descrito que o cromoglicato de sódio seria capaz de aumentar a sobrevivência das plaquetas de pacientes asmáticos e atópicos (Tunon-De-Lara et al., 1992), além de também inibir a liberação de mediadores dos mastócitos através de mecanismo relacionados com a ativação de proteínas cinases da via do GMPc (Wells e Mann, 1983; Foreman e Pearce, 1985).

Diante das evidências inequívocas de que esta droga exerce um efeito antiinflamatório, não se pode descartar a possibilidade que o cromoglicato de sódio atue em uma ou várias etapas da inflamação neurogênica conforme proposto por Holian et al. (1991). Neste sentido, o cromoglicato de sódio foi efetivo em reduzir a inflamação neurogênica, *in vivo* em traquéia de rato após estimulação do nervo vago e com capsaicina em traquéias de rato (Norris et al., 1990) e de cobaia (Erjefalt e Persson, 1986), respectivamente. Esta droga também foi capaz de inibir a atividade de fibras aferentes tipo C estimuladas com capsaicina, em pulmão de caninos (Dixon et al., 1980), além de atenuar o broncoespasmo induzido pela neurocinina A em ratos (Joos et al., 1988). Além disso, tem sido demonstrado que esta droga exerce efeito indireto na contração da musculatura lisa, amenizando a resposta contrátil induzida por diversos mediadores, incluindo histamina,

serotonina, acetilcolina, BK e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Kitamura et al., 1984; Myers et al., 1986).

Um fator limitante do uso do cromoglicato de sódio é que este medicamento exerce seus efeitos apenas no local onde é administrado. Isto se deve ao fato que esta droga é um composto polar, pouco lipossolúvel, mas solúvel em meio ácido (Berstein e Bestein, 1993). Sua absorção e eliminação por diferentes vias de administração como, por exemplo, a endovenosa, a oral, a inalatória, a nasal e a ocular, têm sido muito estudadas (Berstein e Berstein, 1993).

O conjunto dos dados da literatura acima descritos e os resultados do nosso trabalho, confirmam que o cromoglicato de sódio apresenta propriedades antiinflamatórias. Levando-se em consideração que o seu efeito antiinflamatório como o da teofilina, parece ser seletivo para determinados tipos e locais de inflamação, uma possível ação inibitória no processo inflamatório de origem neurogênica é a hipótese mais aceita atualmente. No futuro, estudos com este medicamento ou com seus análogos permitirão avaliar melhor o seu mecanismo de ação.

Em relação ao salbutamol, este medicamento também apresentou perfil antiinflamatório no modelo experimental utilizado. Todavia, ao contrário da teofilina e do cromoglicato de sódio, o agonista β_2 -adrenérgico estudado não foi efetivo em inibir a fase tardia da reação inflamatória induzida pela carragenina, no modelo experimental estudado. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde é demonstrado que

agonistas β_2 -adrenérgicos, incluindo o salbutamol, são capazes de inibir somente a primeira fase (4 h) da reação inflamatória, em modelos de indução de aumento da resistência das vias aéreas provocada pela administração de alérgenos, em humanos (Pacheco et al., 1992; Yamada et al., 1992; Church et al., 1993).

Os efeitos dos agonistas que interagem com os receptores β -adrenérgicos são mediados pelo segundo mensageiro - o AMPc. É postulado que o agonista, no caso, o salbutamol, ligar-se-ia de forma reversível ao receptor β -adrenérgico, não sendo descartada uma possível interação também com sítios da enzima adenilato-ciclase na superfície da membrana celular (Lefkowitz et al., 1981; Catt, 1995). Quando este receptor é ocupado pelo agonista, ocorre simultaneamente ativação do sistema da proteína G. Em seguida, a adenilatociclase é ativada, catalisando a formação do AMPc que por sua vez, desencadeia uma série de eventos fisiológicos (Napier e Cresse, 1995). Na vias aéreas, a maioria dos agonistas β_2 -adrenérgicos, como o salbutamol interagem com receptores localizados na membrana celular das células musculares, dos mastócitos e das fibras nervosas simpáticas de localização pré-sináptica (Ahrens e Smith, 1984).

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que além da broncodilatação, os agonistas β_2 -adrenérgicos também exercem efeitos antiinflamatórios (Church e Hiroi, 1987; Fuller et al., 1988; Howarth et al., 1985; Yukawa et al., 1990; Tokuyama et al., 1991). Estudos *in vitro* têm demonstrado que os agonistas

β_2 -adrenérgicos são efetivos em inibir a degranulação dos mastócitos (Church e Hiroi, 1987). Conseqüentemente à inibição destas células, ocorre paralelamente o bloqueio da liberação de heparina e da histamina no sítio do processo inflamatório. Admite-se que a heparina liberada dos mastócitos, ao interagir com a proteína básica principal liberada pelos eosinófilos, atenuaria, em parte, os efeitos deletérios desta última. Além disso, é sugerido que o aumento da concentração de heparina no sítio do processo inflamatório seria capaz de impedir a formação da fibrose subepitelial e da hiperplasia da musculatura lisa das vias aéreas que ocorre em pacientes asmáticos (Page, 1991). Com base nestes estudos, têm sido hipotetizado que o uso regular dos agonistas β_2 -adrenérgicos poderia facilitar o desenvolvimento de fibrose subepitelial e da hiperplasia da musculatura lisa observados em pacientes asmáticos, contribuindo assim para a obstrução irreversível das vias aéreas (Page, 1991). Além disso, teoricamente, a administração regular de agonistas β_2 -adrenérgicos poderia favorecer a manutenção da inflamação através do bloqueio das ações antiinflamatórias dos mastócitos descritos acima, ou mesmo através do seu efeito broncodilatador, facilitando a exposição das vias aéreas a uma grande quantidade de alérgenos (Page, 1992). Nestas condições, a exposição prolongada das vias aéreas ao alérgeno, facilitada pelo uso do broncodilatador (agonista β_2 -adrenérgico), promoveria um aumento da severidade

da segunda fase da resposta inflamatória observada em determinados grupos de asmáticos.

Vale ressaltar, todavia, que embora os agentes β_2 -adrenérgicos possam exercer efeito inibitório sobre a resposta inflamatória aguda, às custas de suas ações sobre os mastócitos, há poucas evidências sobre o seu papel na inflamação crônica e na hiperreatividade brônquica, induzidas por células do tipo macrófagos (Fuller et al., 1988), eosinófilos (Yukawa et al., 1990) ou linfócitos T (Kraan et al., 1985; Kerrebijn et al., 1987).

Com base nos conhecimentos acima e com a identificação através de estudos epidemiológicos do aumento crescente da morbidade e mortalidade em portadores de asma brônquica (Scheinin et al., 1987; Crane et al., 1989a, b; Flatt et al., 1990; Sears et al., em 1990; Spitzer et al., 1992; Anderson et al., 1994; Suissa et al., 1994a, b; Pearce et al., 1995), foi sugerido que o uso regular de agonistas β_2 -adrenérgicos poderia estar relacionado com estas complicações. Já com a introdução do isoproterenol, agonista β -adrenérgico inespecífico no mercado terapêutico, foi constatado o aparecimento de casos severos de asma que foram rotulados de refratários (Van Metre, 1969). Verificou-se também que paralelamente ao aumento do uso do isoproterenol no tratamento da asma, nas décadas de quarenta e cinquenta, houve também um incremento significativo dos índices de mortalidade por esta doença em países como a Nova Zelândia e a Inglaterra (Beasley et al., 1991). Nos anos

sessenta, a mesma correlação foi observada em outros países (Alemanha, Austrália, Canadá, Estados Unidos), com a introdução no mercado de preparações de agonistas β_2 -adrenérgicos na forma de aerossol (*spray*) (Pearce et al., 1995). Na década de setenta, um segundo surto de mortalidade foi observado na Nova Zelândia (Pearce et al., 1995). Novamente, evidências epidemiológicas sugeriram que este fato estava associado ao uso do fenoterol, um broncodilatador β_2 -adrenérgico.

Em 1990, o trabalho de Sears et al. causou grande impacto na comunidade científica internacional. Estes autores avaliaram os efeitos da terapia com fenoterol, na forma de aerossol, através de metodologia do tipo duplo-cega, randomizada e cruzada. A pesquisa foi realizada em oitenta e nove pacientes que receberam, durante vinte e quatro semanas, terapia com agonista β_2 -adrenérgico ou placebo, ambos por via inalatória. Vários parâmetros foram avaliados, incluindo entre outros, os sintomas diurnos e noturnos, frequência do tratamento com broncodilatadores à noite e de crises diurnas e/ou noturnas, valores de volume expiratório forçado obtidos em resposta à metacolina, além do uso de corticóide. Os investigadores concluíram que o tratamento regular por via inalatória, com altas doses de drogas simpatomiméticas do tipo β_2 , disponíveis para tratamento sob a forma de *spray*, foi a principal causa do aumento do índice de mortalidade observada nos pacientes asmáticos estudados. Várias outras investigações foram feitas, posteriormente, a fim de avaliar a possível associação entre o

uso de agonistas β_2 -adrenérgicos e o índice de mortalidade induzido por esta doença (Spitzer et al., 1992; Suissa et al., 1994a, b; Anderson et al., 1994). Embora os resultados destes estudos tenham confirmado as observações feitas por Sears et al. (1990), não foi possível determinar, nestes estudos se estes efeitos estão associados ao tipo (fenoterol), ao grupo (agonista β_2 -adrenérgico) ou à dose administrada do medicamento empregado. Vale a pena ressaltar, entretanto, que embora estes resultados tenham demonstrado uma correlação positiva entre o índice de mortalidade e o uso dos agonistas β_2 -adrenérgicos, por via inalatória, em portadores de asma brônquica, até o presente momento este assunto é considerado polêmico e controverso (Spitzer et al., 1992; Anderson et al., 1994; Suissa et al., 1994a, b).

Com base nos resultados do nosso trabalho não é possível concluir de forma definitiva se o uso agudo do salbutamol é capaz de modificar o padrão da segunda fase do processo inflamatório na cavidade pleural de camundongos. As evidências acerca do agravamento do processo inflamatório na asma induzidas pelos agonistas β_2 -adrenérgicos, revisados anteriormente, todavia são bastante significativas e o nosso modelo constitui uma ferramenta útil para avaliar estes possíveis efeitos. Além disso, é provável que os efeitos inibitórios desta droga na primeira fase da reação inflamatória resulte de suas ações a nível dos mastócitos conforme proposto por Page (1991). Estudos complementares deverão ser feitos para

avaliar se o aumento tanto da migração celular quanto da exsudação observados na segunda fase da reação inflamatória causada pela carragenina em animais tratados previamente com salbutamol contribuem para amplificação, manutenção e agravamento desta resposta inflamatória tardia.

Outra etapa do nosso protocolo experimental foi avaliar o efeito das cininas, no modelo experimental da pleurisia, em camundongos. Os efeitos pró-inflamatórios das cininas são conhecidos de longa data (Greaves e Shuster, 1967; Melmon et al., 1967; Janasi et al., 1969; Zeitlin e Smith, 1973; Jezdinsky e Halek, 1974; Hamberg et al., 1978; Clark, 1979; Marceau et al., 1983; Sharma et al., 1983; Christiansen et al., 1987; Barnes et al., 1988). A participação do sistema cininas-calicreínas é bem conhecida nos modelos clássicos da inflamação causados pela carragenina (Katori et al., 1979; Uchida et al., 1983) como o edema de pata (Jezdinsky e Halek, 1974) e a pleurisia em ratos. Além disso, tem sido relatado, por exemplo, que a BK é capaz de induzir tanto a migração celular quanto a exsudação (Damas et al., 1990; Hall e Geppetti, 1995). Em 1991, Pasquale et al. demonstraram que a BK, de forma dose-dependente, causou acúmulo de células na cavidade pleural de ratos. Neste modelo experimental, esta cinina inicialmente causou um aumento da migração de polimorfonucleares (6 h), seguido de elevação das concentrações de eosinófilos (24 h) na cavidade pleural de ratos.

Deve ser ressaltado que estudos mais criteriosos analisando a importância das cininas em processos fisiológicos

e patológicos só foram possíveis de serem realizados a partir de meados da década de oitenta com o desenvolvimento dos antagonistas peptídicos para o receptor B₂. A primeira geração dos antagonistas peptídicos do receptor B₂, apesar de serem significativamente seletivos, têm o inconveniente de apresentar meia vida curta (Griesbacher e Lembeck, 1987; Griesbacher et al., 1989), propriedades agonísticas residuais e de induzir a degranulação inespecífica de mastócitos (Rhaleb et al., 1991). Recentemente, com o desenvolvimento dos antagonistas da segunda geração como o HOE 140 e o NPC 17731, que possuem uma meia vida mais prolongada (maior que 6 h) e maior potência que os anteriores, a participação das cininas nestes processos pode ser melhor estudada (Wirth et al., 1991; Kyle et al., 1991). Além disso, estes antagonistas são quase que isentos de propriedades agonísticas e não causam degranulação dos mastócitos (Lembeck et al., 1991; 1992). Paralelamente, nesse período, os conhecimentos dos efeitos pró-inflamatórios e algésicos das cininas via ativação do receptor B₁ foram também significativamente ampliados. Dentro deste contexto e conforme já comentado anteriormente, tem sido demonstrado que o receptor B₁ para as cininas pode ser do tipo constitutivo ou induzido. A expressão deste último tipo de receptor foi identificada em diferentes modelos de inflamação crônica, exercendo também função de nociceptor (Perkins e Kelly, 1993; Davis e Perkins, 1994;).

No modelo experimental utilizado no nosso estudo, tanto a BK como a des-Arg⁹-BK causaram aumento da migração de

leucócitos, às custas de mononucleares, de forma dose-dependente. Nestas condições, não foi observado aumento significativo do exsudato. Uma avaliação mais detalhada do perfil temporal de uma das cininas, a BK, mostrou que o aumento da migração celular já era observado 2 h após sua administração, ocorrendo o pico máximo em torno de 4 h, permanecendo elevado até 72 h. Embora, não seja possível comparar estes resultados com aqueles obtidos por Pasquale et al. (1991), ambos os modelos experimentais mostram que a BK é capaz de induzir aumento da migração celular de forma prolongada. Com base nestes resultados (presente estudo e de Pasquale et al., 1991) é possível que diferenças entre animais de várias espécies e/ou nos modelos experimentais resultem no recrutamento de diferentes tipos celulares bem como da liberação de diversos mediadores químicos (Paeglow et al., 1995). Vale ressaltar ainda que apesar dos efeitos inflamatórios induzidos pela BK e pela des-Arg⁹-BK serem de menor magnitude quando comparados com aqueles produzidos por agentes inespecíficos tipo carragenina e zimozan (De Brito, 1989), os nossos resultados fornecem evidências adicionais que as cininas são capazes de iniciar e de manter o processo inflamatório.

Os antagonistas estudados do receptor B₂ da BK, o HOE 140 e o NPC 17731, foram efetivos em bloquear, de forma dose-dependente, a reação inflamatória induzida pela BK, indicando que este receptor está envolvido neste modelo de inflamação. Já a administração prévia do antagonista do receptor B₁ (des-Arg⁹-

Leu⁸-BK), nas doses testadas, não causou inibição do processo inflamatório induzido por ambas as cininas, a BK e a des-Arg⁹-BK. Nas condições estudadas, não foi possível descartar a participação do receptor B₁, sendo necessário outros estudos complementares.

Estes resultados acima confirmam estudos realizados por outros autores em modelos de inflamação aguda induzida pela BK, onde foram descritos que a migração celular, a exsudação e a dor resultam da ativação de receptores do tipo B₂ (Damas et al., 1990; Farmer e Burch, 1992; Hall, 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Davis e Perkins, 1994a,b). Neste sentido, foi demonstrado que diversos antagonistas peptídicos do receptor B₂ da BK foram efetivos em reduzir os índices de inflamação induzidos pela carragenina nos modelos de edema de pata e da pleurisia (Burch et al., 1990). Além disso, os antagonistas peptídicos do receptor B₂ também apresentaram propriedades analgésicas quando analisados nos modelos de dor provocada pela administração de cristais de uratos, de formalina ou de ácido acético (Steranka e Burch, 1991; Boohla et al., 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Campos et al., 1996).

Com a finalidade de estudar o perfil inibitório do HOE 140 e do NPC 17731, administrados por diferentes vias (endovenosa, intraperitoneal e intrapleural), diversos grupos de experimentos foram realizados, utilizando o protocolo na pleurisia induzida pela BK. Verificou-se que o efeito inibitório sobre a migração celular induzida por estes antagonistas parece estar relacionado com a dose e via de

administração empregada. O NPC 17731 causou inibição significativa da migração celular quando administrado pelas vias i.p. (50 pmol/kg), i.v. (50 pmol/kg) e intrapleural (1,0 pmol/cav.). Entretanto, o HOE 140 somente foi efetivo em inibir os mesmos parâmetros apenas quando administrado pelas últimas duas vias (i.v.: 5,0 pmol/kg; cavidade pleural: 0,1 pmol/cav.). Embora as diferenças nas doses dos antagonistas, bem como nas vias de administração utilizadas não permitam comparações entre os protocolos, estes resultados mostram que ambos são efetivos em inibir a migração celular, quando administrados por via i.v. ou diretamente na cavidade pleural. Além disso, o efeito do HOE 140 (0,1 pmol/cav.) foi mais prolongado, em comparação com o NPC 17731 (1,0 pmol/cav.), sendo observada inibição significativa da migração celular induzida pela BK quando o primeiro antagonista foi administrado até 8 h antes da indução da pleurisia. Estes dados confirmam estudos prévios realizados por Kyle et al. (1991) e Wirth et al. (1991) sobre a duração do efeito inibitório apresentado por estes antagonistas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estes resultados são relevantes uma vez que é proposto que estes agentes têm potencial terapêutico (Wirth et al., 1991).

Apesar de vários estudos na literatura demonstrarem que antagonistas do receptor B₂ inibem os efeitos hiperalgésicos ou pró-inflamatórios induzidos pela BK, poucos empregaram pelo menos três doses destes antagonistas, permitindo estimar os valores médios da DI₅₀. Em relação ao HOE 140, a maioria dos trabalhos, tem utilizado somente uma dose, variando de pmol

(Wirth et al., 1993; Davis e Perkins, 1994b) até μmol (Bertrand et al., 1993; Petho et al., 1994; Ricciardolo et al., 1994), administrados localmente ou por quilograma de peso corporal. Utilizando esta metodologia, Wirth et al. (1993) demonstraram que o HOE 140 foi significativamente mais potente em inibir a broncoconstrição induzida pela BK, em cobaias, quando utilizado por via i.v. ($\text{DI}_{50} = 13,4 \text{ pmol/kg}$) em comparação com os resultados obtidos quando este mesmo antagonista foi administrado por via inalatória ($\text{ID}_{50} = 1,34 \text{ nmol/kg}$). Além disso, Campos e Calixto (1995) demonstraram que as potências inibitórias tanto do HOE 140 como do NPC 17731 no edema de pata induzido pela BK que foi administrada em associação com outros mediadores, variou entre 0,7 e 1,5 nmol/sítio, respectivamente.

Os resultados do nosso trabalho mostram que as potências dos antagonistas estudados do receptor B_2 da BK quando administrados diretamente na cavidade pleural foram muito mais altas (pmol/cav.) que as descritas na literatura. Os valores das potências inibitórias de ambos os antagonistas, além de serem diferentes, foram mais potentes em comparação com aqueles obtidos em outros protocolos experimentais (Wirth et al., 1993; Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1996).

A constatação no nosso estudo que a migração celular induzida pela BK para a cavidade pleural foi inibida por outras drogas, além dos antagonistas dos receptores B_2 , confirma que os efeitos desta cinina são em parte mediados através da liberação de outros agonistas. Estudos têm demonstrado que,

dependendo do tipo celular ou do tecido, as cininas podem estimular a liberação de produtos derivados da via do AA, histamina, taquicininas e NO, entre outros (Hall, 1992; Burch et al., 1993; Geppetti et al., 1995). Isto resulta, em parte, do fato que a estimulação dos receptores B₂ da BK pode ativar diversos sistemas de segundos mensageiros (Burch et al., 1993; Burch e Kyle, 1992). Em nosso trabalho, agentes que classicamente são capazes de inibir algumas das etapas das vias metabólicas do AA como a ciclooxigenase e a FLA₂, da síntese do NO ou de antagonizarem receptores do tipo H₁ da histamina ou do receptor NK₁ e NK₃ das taquicininas, foram efetivos em inibir o efeito inflamatório induzido pela BK.

É interessante destacar que entre as drogas que inibiram o aumento da migração celular induzida pela BK estão os antagonistas de receptor para as taquicininas. Neste modelo, os antagonistas dos receptores NK₁ e NK₃ das taquicininas inibiram, de forma dose-dependente, o efeito inflamatório causado pela BK. Entretanto, o antagonista do receptor NK₁ das taquicininas (FK 888) foi significativamente mais potente em inibir os efeitos inflamatórios induzidos pela BK em comparação com o receptor NK₃ (SR 142801). A participação de mecanismos mediados através do receptor NK₂ neste processo parece ser menos provável, tendo em vista que somente altas doses (100 nmol/cav.) do antagonista (SR 48968) foram eficazes em inibir a migração celular induzida pela BK. Estes resultados sugerem que neste modelo experimental, a BK é capaz de induzir a liberação de taquicininas das fibras nervosas sensoriais conforme

proposto por Ricciardolo et al. (1994), sendo seus efeitos exercidos preferencialmente através da ativação de receptor NK_1 .

Os resultados acima descritos indicam, portanto, que o efeito inflamatório induzido pela BK na cavidade pleural de camundongos é, pelo menos em parte, dependente da liberação de outros mediadores, confirmando evidências obtidas em outros modelos (Burch e Axelrod, 1987; Burch e DeHaas, 1990; Burch e Kyle, 1992; Geppetti et al., 1995). Estes efeitos resultam provavelmente da ativação de diferentes tipos celulares da cavidade pleural, incluindo fibras nervosas sensoriais, mastócitos, macrófagos, células endoteliais e leucócitos, entre outros.

A participação de mecanismos mediados pelo receptor B_1 da BK em modelos de inflamação e de dor crônica tem sido demonstrada (Corrêa e Calixto, 1993; Cruwys et al., 1994; Campos et al., 1996). É proposto que as citocinas como a IL-1 e o IFN estimulariam a expressão destes receptores (Dray et al., 1994). Nossos dados indicam que a des-Arg⁹-BK, embora menos potente que a BK, também foi capaz de induzir a migração celular 4 h após sua administração na cavidade pleural de camundongos. Este efeito, todavia, não foi inibido, nas doses testadas pelo antagonista do receptor B_1 (des-Arg⁹-Leu⁸-BK), administrado 5 e 30 min antes da indução da pleurisia. Levando-se em consideração que foi demonstrada a presença dos dois tipos de receptores B_1 (constitutivo e induzido), em

camundongos, através de estudos funcionais (Maas et al., 1995) e bioquímicos (Pesquero et al., 1996), não se pode descartar a participação de ambos neste modelo experimental. No entanto, não foi possível concluir, a partir da análise dos nossos resultados, se os efeitos induzidos pela des-Arg⁹-BK resultam da ativação do receptor B₁ (constitutivo e/ou induzido). Esta hipótese é interessante e outros protocolos experimentais mais detalhados deveriam ser realizados com o emprego de antagonistas seletivos mais potentes para melhor avaliar a possível participação do receptor B₁. Todavia, vale lembrar que os antagonistas atualmente disponíveis do receptor B₁ não são capazes de discriminar as formas constitutiva e induzida deste receptor.

Considerando ainda que a BK pode ser metabolizada para des-Arg⁹-BK no sítio do processo inflamatório, é possível hipotetizar que esta última poderia promover a ativação de receptor B₁ da BK. Entretanto, é pouco provável que este fato esteja ocorrendo, uma vez que tanto o HOE 140 como o NPC 17731, administrados 30 min antes, inibiram completamente a migração celular observada 4 h após a indução da pleurisia. Além disso, a análise das potências de ambas as cininas sobre a resposta inflamatória estudada na cavidade pleural indica que, pelo menos no início desta reação, os eventos mediados através da BK via ativação do receptor B₂ são mais significativos em comparação com aqueles causados pela des-Arg⁹-BK.

A análise conjunta destes resultados permite concluir que a resposta inflamatória induzida pela BK neste modelo

experimental é mediada através da ativação do receptor B₂. Todavia, ensaios bioquímicos para validar estes estudos neste modelo experimental são necessários para melhor entendimento do papel das cininas nas reações inflamatórias.

Em estudos subseqüentes, na pleurisia induzida pela SP, verificou-se que esta taquicinina, de forma dose-dependente, promoveu o recrutamento de células do tipo mononucleares associada com um discreto, mas significativo aumento da exsudação. Paralelamente, também foi observado aumento de células do tipo polimorfonucleares (neutrófilos), sendo que a migração destas células não ocorreu de forma dose-dependente. Tanto a exsudação como a migração celular foram de caráter prolongado (até 96 e 24 h, respectivamente). Nestas condições, o aumento da migração celular foi observado até 24 h após a indução da pleurisia, enquanto a exsudação, apesar de discreta, permaneceu elevada até 96 h após.

É interessante comentar que tem sido descrito na literatura que as taquicininas podem influenciar a atividade de leucócitos (Frossard e Advenier, 1991; Maggi et al., 1993a, b; Geppetti et al., 1995) e conseqüentemente a liberação de diversos mediadores. A maioria dos estudos, contudo, têm avaliado apenas os efeitos tipo vasodilatação e exsudação induzidos pela SP (Frossard e Advenier, 1991; Maggi et al., 1993a, b; Geppetti et al., 1995). Nestas condições, o efeito promovido pela SP é mediado primariamente através da ativação do receptor taquicinérgico do tipo NK₁ (Abelli et al., 1991; Sakamoto et al., 1993). Nosso modelo experimental permitiu

avaliar o número total e diferencial de leucócitos que migram para o sítio inflamatório, além de quantificar o exsudato. Assim, verificou-se que a SP promoveu aumento mais significativo da migração celular em comparação com aquele observado em relação aos níveis exsudação. Em concordância com estes resultados têm sido descrito na literatura que tanto a SP como a NKA, além de causarem exsudação e produção de muco nas vias aéreas de pacientes asmáticos, também estimulam a migração de células tipo linfócitos, monócitos e macrófagos para o sítio do processo inflamatório (Frossard e Advenier, 1991; Maggi et al., 1993a, b; Maggi, 1995).

A participação dos diferentes tipos de receptores descritos para as taquicinininas também foi estudada, neste modelo experimental, através do uso de antagonistas seletivos. Em nossos experimentos, observou-se que tanto a migração celular como a exsudação foram inibidas por antagonistas dos receptores NK_1 e NK_3 das taquicinininas. Verificou-se que a potência do antagonista do receptor NK_3 (SR 142801) foi três vezes maior em comparação com aquela obtida para o antagonista NK_1 (FK 888). Neste modelo experimental, o antagonista do receptor NK_2 , nas doses testadas, ao ser administrado antes da SP, causou aumento da migração celular. Além disso, conforme referido no item Resultados (presente trabalho), o uso de doses elevadas deste antagonista, seguido da administração de SP causou a morte de 100% dos animais testados.

Com base nestes resultados e naqueles relatados na literatura, entretanto, não foi possível concluir de forma definitiva sobre os tipos de receptores taquicinérgicos envolvidos neste processo inflamatório. Uma análise cuidadosa dos nossos dados descritos acima permite aventar uma série de possibilidades. Ao se levar em consideração que o tratamento dos animais com o antagonista utilizado do receptor NK_2 (SR 48968, 20 nmol/cav.) seguido da administração da SP, resultou em aumento da migração celular, não se pode descartar a possibilidade que este efeito decorra de uma ação inespecífica deste agente. Um fato que corrobora esta hipótese, no nosso modelo experimental, foi a constatação que o tratamento isolado dos animais com este antagonista resultou em um aumento significativo tanto da migração celular como da exsudação na cavidade pleural. Resultados semelhantes também foram obtidos com os antagonistas testado do receptor NK_1 (FK 888) e NK_3 (SR 142801). Além disso, paralelamente à inibição da migração celular induzida pela SP ocorreu também aumento da exsudação nos animais tratados previamente com ambos os antagonistas. É provável, portanto, que estes antagonistas estejam agindo em diferentes tipos celulares através de mecanismos distintos. Esses resultados sugerem ainda que estes compostos *per se* apresentam também propriedades agonísticas. Em decorrência destes fatos, não se pode descartar a possibilidade destes resultados refletirem ações citotóxicas destes antagonistas, mediadas através de diferentes vias e/ou mecanismos ainda desconhecidos.

Outro fato que deve ser levado em consideração e que tem sido também descrito é que os valores das potências dos antagonistas dos receptores taquicinérgicos variam consideravelmente em função dos diferentes modelos animais empregados. Neste contexto, Aramori et al. (1994) realizaram experimentos utilizando a linhagem celular tipo CSO-7 de rim de macacos que foi transfectada com material gênico que codifica o receptor NK_1 humano e de rato, respectivamente. Os autores verificaram que a potência do FK 888 foi trezentas e vinte vezes maior em deslocar a ligação da SP com o receptor NK_1 humano em comparação com os resultados obtidos em células que expressavam o mesmo receptor do rato. Utilizando a mesma metodologia, Chung et al. (1994) expressaram em células da linhagem CHO, o receptor NK_3 humano e do rato, respectivamente. Foi constatado que a potência do SR 48968, antagonista do receptor NK_2 , foi trinta e cinco vezes maior em antagonizar a ligação da NKB em células que expressavam o receptor NK_3 do rato ($DI_{50} = 10$ nM) em comparação com aquelas de origem humana ($DI_{50} = 350$ nM). Portanto, no nosso modelo experimental serão necessários estudos mais detalhados, utilizando outros antagonistas taquicinérgicos para se obter evidências mais conclusivas sobre o(s) tipo(s) de receptor(es) taquicinérgico(s) envolvido(s).

Nossos dados ainda mostram que, em nosso modelo experimental, a SP promove a liberação de BK. Esta afirmação é baseada no fato que o HOE 140 e o NPC 17731, antagonistas seletivos do receptor B_2 da BK, promoveram inibição

significativa e de forma dose-dependente do processo inflamatório induzido pela SP. Neste sentido tem sido demonstrado que a exsudação induzida pela BK é, em parte, mediada através da liberação de taquicininas de fibras nervosas sensoriais (Ricciardolo et al., 1994; Yoshihara et al., 1995). Portanto, nossos resultados e aqueles relatados na literatura (Dray e Bevan, 1993; Ricciardolo et al., 1994) evidenciam que existe uma ligação importante entre as taquicininas e as cininas na inflamação neurogênica, uma vez que estes dois mediadores podem promover a liberação um do outro.

Os resultados obtidos com o composto 48/80 e a terfenadina, no nosso modelo experimental, também permitiu concluir que as taquicininas são capazes de liberar histamina. O tratamento prévio dos animais com o composto 48/80 causou inibição significativa da migração celular causada pela SP, mas não alterou o nível da exsudação induzida por esta taquicininina. Estudos realizados por Donnerer e Aman (1993) demonstram que a histamina liberada pelas taquicininas contribui para aumentar a permeabilidade vascular descrita na inflamação neurogênica. Neste sentido, também tem sido descrito que a SP causa a liberação de histamina e de serotonina tanto de mastócitos isolados do peritônio, como do lavado broncoalveolar de ratos (Mousli et al., 1989; Joos et al., 1993). Tem sido também relatado que em animais previamente tratados com o composto 48/80, a broncoconstrição e os níveis de diversos mediadores, dosados no lavado broncoalveolar, promovidos pela NKA ou pela SP foram significativamente atenuados (Otsuka e Yoshioka,

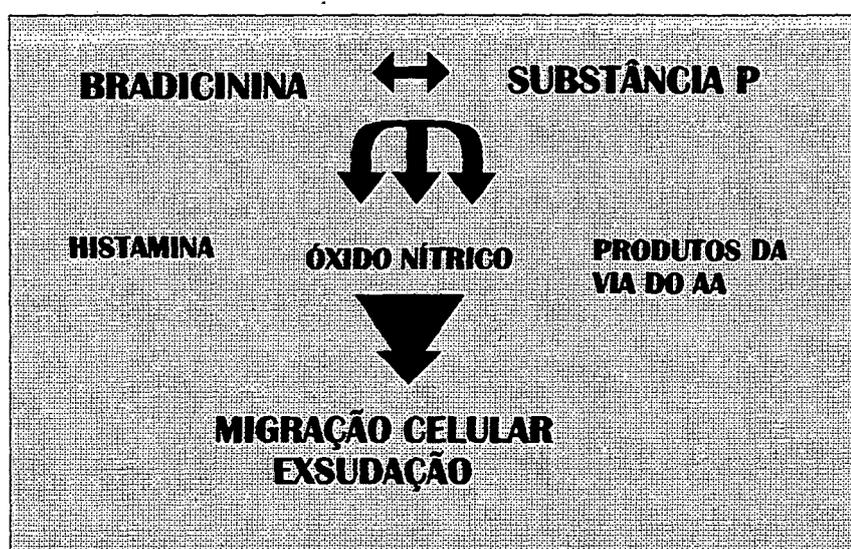
1993). A constatação que a terfenadina, um antagonista do receptor H_1 da histamina, causou diminuição significativa tanto da migração celular como da exsudação induzida pela SP validou, em parte, os resultados obtidos nos animais tratados com o composto 48/80. O conjunto destes resultados permite sugerir que a histamina é liberada pela SP neste modelo experimental e que os efeitos de ambos mediadores sobre a migração celular parecem ser mais significativos em comparação com a exsudação.

Além das cininas e da histamina, nossos estudos também mostram que outros mediadores inflamatórios são também liberados pelas taquicininas. Nossos resultados demonstram que a SP também promove a síntese tanto de óxido nítrico como dos produtos da via do ácido araquidônico, uma vez que a indometacina, a dexametasona e a L-NOARG inibiram significativamente o processo inflamatório induzido pela SP. Novamente, estes resultados confirmam relatos de outros trabalhos da literatura (Maggi et al., 1993a, b; Dray et al., 1994; Naguyen et al., 1995). Sabe-se que a liberação de neuropeptídeos, particularmente a SP, a NKA e o CGRP de fibras nervosas sensoriais são capazes de ativar outras células que participam do processo inflamatório e de induzirem a liberação de substâncias ativas que promovem o extravasamento plasmático (Dray et al., 1994). Assim, em condições inflamatórias, a SP promoveria a ativação de fibras nervosas simpáticas, promovendo a liberação de noradrenalina, de neuropeptídeo Y e de purinas, além da síntese de prostaglandinas, entre outros (Dray e Bevan, 1993). Além disso estudos realizados por Naguyen et al.

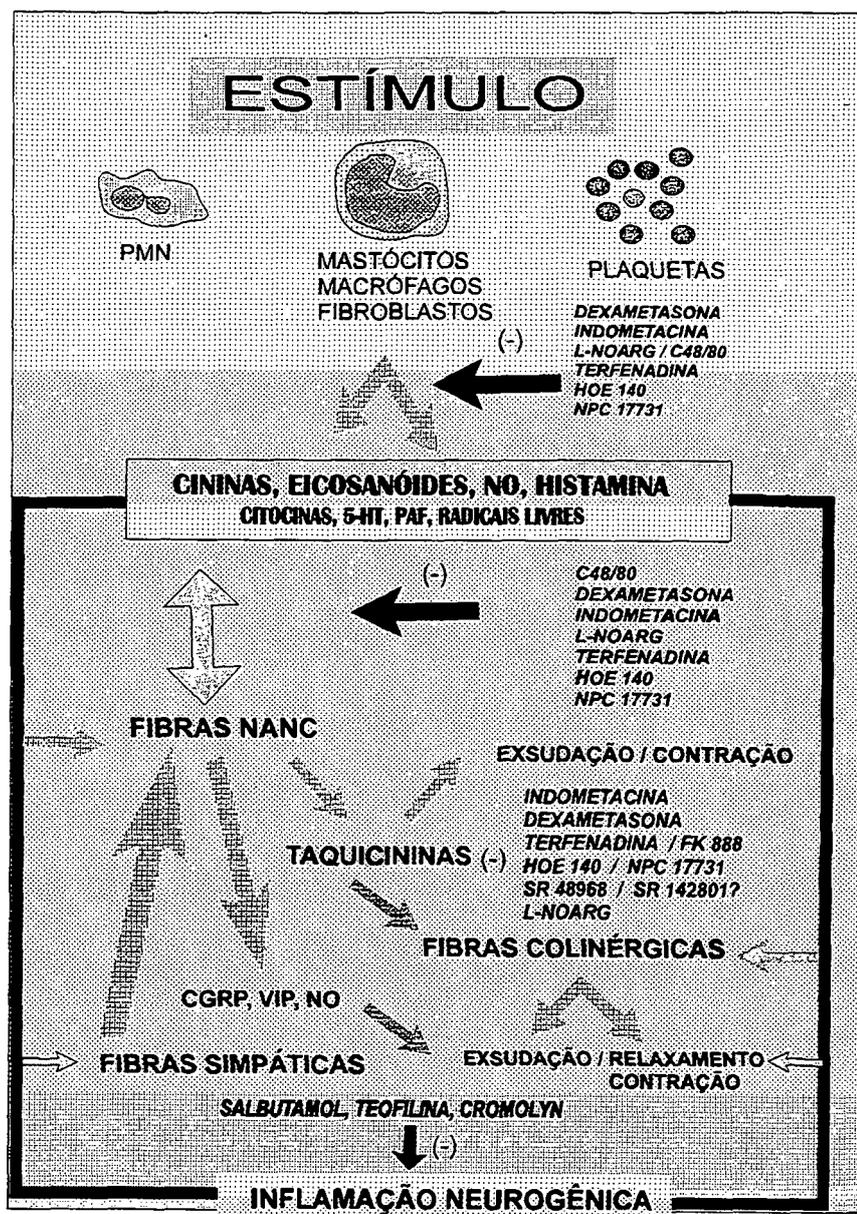
(1995) demonstraram que um dos mecanismos de aumento da permeabilidade mediado pela SP está relacionado com o aumento da produção de NO pela células endoteliais.

Tendo em vista o que foi anteriormente comentado, neste trabalho os resultados obtidos nos diferentes grupos de experimentos com as drogas antiasmáticas, as cininas e a SP, no modelo experimental da pleurisia em camundongos, são relevantes e contribuem significativamente para ampliar os conhecimentos na área da pesquisa da inflamação neurogênica. Devido à complexidade que envolve o processo inflamatório, todavia, não é possível determinar em que etapa ou fase preferencial desta reação (esquema 1) estariam atuando as diversas drogas testadas.

Com base nos resultados deste estudo e os acima citados da literatura é possível, todavia, especular em que provável etapa do processo inflamatório as cininas e a SP poderiam estar agindo (esquemas 2 e 3). Conforme comentado anteriormente, a



Esquema 2- Interação entre a BK, a SP e os mediadores comuns liberados por ambas, no modelo de inflamação neurogênica.



Esquema 3- Prováveis locais de atuação das drogas estudadas no modelo de inflamação neurogênica induzida pela carragenina, cininas ou SP. PMN = polimorfonucleares, 5-HT = serotonina, cromolyn = cromoglicato de sódio,. Para compreensão de outras siglas, consultar lista de abreviações.

indução do processo inflamatório resulta na liberação de um grande número de mediadores, cuja seqüência e hierarquia dentro deste evento são bastantes variadas. Os nossos resultados

demonstram que a BK e a SP, além de promoverem a liberação uma da outra, utilizam simultaneamente vias celulares comuns de segundos mensageiros, resultando em aumento das concentrações de histamina, de NO e de produtos da via do AA, entre outros, no sítio do processo inflamatório (esquema 2). Por sua vez, embora as propriedades antiinflamatórias do salbutamol, teofilina e do cromoglicato de sódio tenham sido demonstradas no modelo da pleurisia induzida tanto pela carragenina, pela BK como pela SP, estes efeitos parecem resultar de ações inespecíficas destes agentes, ainda em parte desconhecidas e que estariam atuando possivelmente em várias etapas do processo inflamatório (esquema 3). Além disso, o perfil antiinflamatório apresentado por estas drogas antiasmáticas indica que as mesmas constituem uma opção alternativa para estudo e/ou tratamento da inflamação neurogênica.

(Este trabalho foi, em parte, publicado na revista British Journal of Pharmacology, 118: 811-819, 1996).

6 CONCLUSÕES

1) Os resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos indicam que: *i*) a teofilina e o cromoglicato de sódio foram capazes de inibir tanto a fases imediata (4 h) como tardia (48 h) da reação inflamatória, *ii*) o salbutamol foi efetivo em inibir apenas a primeira fase e *iii*) o efeito inibitório da teofilina, do cromoglicato de sódio e do salbutamol foi prolongado. Estes achados confirmam outros resultados descritos em outros modelos da asma, sugerindo que os agentes antiasmáticos estudados apresentam propriedades antiinflamatórias.

2) A BK e a des-Arg⁹-BK causaram aumento significativo da migração celular e da exsudação na cavidade pleural de camundongos. Os efeitos induzidos pela BK são mediados pela ativação do receptor B₂ da BK na migração celular e resulta na liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo produtos derivados da via do AA, histamina, NO e taquicininas, entre outros.

3) A SP induziu reação inflamatória prolongada na cavidade pleural de camundongos caracterizada por aumento da exsudação e da migração celular. Com base nos resultados obtidos, há evidências do envolvimento tanto dos receptores do tipo NK₃ como NK₁, nesta resposta inflamatória. Além disso, os efeitos pró-inflamatórios desta taquicinina

também estão relacionados com a liberação de outros mediadores do processo inflamatório como cininas, histamina, NO e produtos da via do AA, entre outros.

4) É possível concluir também que, neste modelo experimental, as cininas são capazes de liberar taquicininas e vice-versa, indicando que o processo inflamatório na cavidade pleural é do tipo neurogênico.

5) Através do nosso trabalho são propostos diferentes protocolos experimentais que permitem estudar modelos de inflamação neurogênica induzidos pelas cininas e pela SP, além da pleurisia causada pela carragenina que pode ser útil para o estudo de drogas antiasmáticas com perfil antiinflamatório.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERS, R.; SMITH, M.; TIMENS, W. Immunohistology in bronchial asthma. *Respir. Med.*, **87B**: 13-21, 1993.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. The complement system. In: *Cellular and Molecular Immunology*. Eds. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J., p. 260-281, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991a.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. (Eds). Cytokines. In: *Cellular and Molecular Immunology*. Eds. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J., p. 226-242, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991b.
- ABELLI, L.; MAGGI, C.A.; ROVERO, P.; DEL BIANCO, E.; REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; GIACHETTI, A. Effect of synthetic tachykinin analogues on airway microvascular leakage in rats and guinea-pigs: evidence for the involvement of NK-1 receptors. *J. Aut. Pharmacol.*, **11**: 267-275, 1991.
- ABRAHAM, W.M.; SIELCZAK, M.W.; WANNER, A. Cellular markers of inflammation in the airways of allergic sheep with and without allergen-induced late responses. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **138**: 1565-1571, 1988.
- ADVENIER, C.; GIRARD, V.; NALINE, E.; VILAIN, P.; EMONDS-ALT, X. Antitussive effects of SR 48968, a non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **250**: 169-171, 1993.
- AHRENS, R.C.; SMITH, G.C. Albuterol: an adrenergic agent for use in the treatment of the asthma: pharmacology, pharmacokinetics and clinical use. *Pharmacotherapy*, **4**: 105-121, 1984.
- ALI, S. MUSTAFA, S.J.; METZGER, W.J. Modification of allergen-induced airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness in the allergic rabbit by theophylline aerosol. *Agents Actions*, **37**: 165-173, 1992.
- ANDERSON, G.P.; LINDÉN, A.; RABET, K.F. Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting? *Eur. Respir. J.*, **7**: 569-578, 1994.
- ANDY, D.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 190-197, 1994.
- ARAMORI, I.; MORIKAWA, N.; ZENKOH, J.; O'DONNELL, N.; IWAMI, M.; KOJO, H.; NOTSU, Y.; OKUHARA, M.; OSNI, S.; NAKANISHI, S. Subtype and species-selectivity of a tachykinin receptor

- antagonist, FK 888, for cloned rat and human tachykinin receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **269**: 277-281, 1994.
- AUBIER, M.; BARNES, P.J. Theophylline and phosphodiesterase inhibitors. *Eur. Resp. J.*, **8**: 347-348, 1995.
- BAAR, A.J.; WATSON, S.P.; LOREZ BERNAE, A.; NIMMO, A.J. The presence of NK-3 tachykinin receptors on rat uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, **203**: 287-290, 1991.
- BAINTON, D.F. Development biology of neutrophils and eosinophils. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Eds. Gallin, J.I., Goldstein, I.M.; Snyderman, R., p. 303-324, New York: Raven Press Ltda, 1992.
- BANNER, K.H.; PAGE, C.P. Acute versus chronic administration of phosphodiesterase inhibitors on allergen-induced pulmonary cell influx in sensitized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 93-98, 1995.
- BARNES, P.J.; PAGE, C.P.; CHUNG, K.F. Inflammatory mediators in the asthma. *Pharmacol. Rev.*, **40**: 49-84, 1988.
- BARNES, P.J. A new approach to the treatment of asthma. *New Engl. J. Med.*, **321**: 1517-1527, 1989.
- BASBAUM, A.I.; LEVINE, J.D. The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**: 647-651, 1991.
- BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**: 129-162, 1991.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*, **15**: 74-80, 1994.
- BEASLEY, R.; PEARCE, N.; CRANE, J.; WINDOM, H.; BURGESS, C. Asthma mortality and inhaled β -agonist therapy. *Aust. NZ. Med. J.*, **21**: 753-763, 1991.
- BEAVO, J.A.; REIFSNYDER, D.H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**: 150-155, 1990.
- BECAUVAIS, F.; HEIBLOT, C.; BENEVISTE, J. Effect of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on anti-IgE-induced and anti-IgG₄-induced basophil degranulation. *Drugs*, **37**: 4-8, 1989.

- BECKER, J.W.; BIERMAN, C.W. Prophylactic anti-asthma drugs. In: *Drugs in the Lung*. Eds. Page, C.P.; Metzger, W.J., p. 221-257, New York: Raven Press, Ltda, 1994.
- BELIVACQUA, M.; BUTCHER, E.; FURIE, B.; GALLATIN, M.; GIMBRONE, M.; HARLAN, J.; KISHIMOTO, K.; LASKY, L.; MCEVER, R.; PAULSON, J.; ROSEN, S.; SEED, B.; SPRINGER, T.; STOOLMAN, L.; TEDDER, T.; VARKI, A.; WAGNER, D.; WEISSMAN, I.; ZIMMERMAN, G. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, **67**: 233, 1991.
- BELIVACQUA, M.P. Endothelial-Leucocyte adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.*, **11**: 767-804, 1993.
- BELVISI, M.G.; PATACCHINI, R.; BARNES, P.J.; MAGGI, C.A. Facilitatory effects of selective agonists for tachykinin receptors on cholinergic neurotransmission: evidence for species differences. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 793-800, 1994.
- BERNSTEIN, J.A.; BERNSTEIN, I.L. Cromolyn and nedocromil. *Immunol. Allergy Clin. North Amer.*, **13**: 891-902, 1993.
- BERTRAND, C.; NEDEL, J.A.; YAMAWAKI, I.; GEPPETTI, P. Role of kinins in the vascular extravasation evoked by antigen and mediated by tachykinins in guinea-pig trachea. *J. Immunol.*, **151**: 4902-4907, 1993.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of same biological coin. *Nature*, **320**: 584-588, 1986.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins, kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 1-80, 1992.
- BILLIAR, T.R. Nitric Oxide. Novel Biology with Clinical Relevance. *Ann. Surgery*, **221**: 339-349, 1995.
- BONFANTI, R.; FURIE, B.C.; FURIE, B.; WAGNER, D.D. PADGEM (GMP 140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**: 1109-1112, 1989.
- BONNER, T.I. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosc.*, **12**: 148-151, 1989.
- BOSCHCVOV, P.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B.; SHIMUTA, S.I. Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for diphasic effect in the rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **83**: 591-600, 1984.

- BOURNE, H.R.; LICHTENSTEIN, L.M.; HENNEY, C.S. Effects of cholera toxin on *in vitro* models of immediated and delayed hypersensitivity: further evidence for the role of cAMP. *J. Clin. Invest.*, **52**: 691-697, 1973.
- BRESLIN, A.B. New development in anti-asthmatic drugs. *Med. J. Australia*, **158**: 779-811, 1993.
- BRITISH THORACIC SOCIETY, RESEARCH UNITY OF THE ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS OF LONDON, KING'S FUND CENTRE, NATIONAL ASTHMA CAMPAIGN. Guidelines for the management of asthma in adults: I-chronic persistent asthma. *Br. Med. J.*, **301**: 651-653, 1990a.
- BRITISH THORACIC SOCIETY, RESEARCH UNITY OF THE ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS OF LONDON, KING'S FUND CENTRE, NATIONAL ASTHMA CAMPAIGN. Guidelines for the management of asthma in adults: II-Acute severe asthma. *Br. Med. J.*, **301**: 797-800, 1990b.
- BRUNELLESCHI, S.; VANNI, L.; LEDDA, F.; GIOTTI, A.; MAGGI, C.A.; FANTOZZI, R. Tackykinins activate guinea-pig alveolar macrophages. *Life Sci. Pharmacol.*, **51**: 177-181, 1990.
- BURCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**: 6374-6378, 1987.
- BURCH, R.M.; DEHAAS, C. A bradykinin antagonist inhibits carragenin edema in rats. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.*, **342**: 189-193, 1990.
- BURCH, R.M.; FARMER, S.G.; STERANKA, L. Bradykinin receptor antagonists. *Med. Res. Rev.*, **10**: 237-269, 1990.
- BURCH, R.; KYLE, D.J. Recent development in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.*, **50**: 829-838, 1992.
- BURCH, R.M., KYLE, D.J.; STOREMENN, J.M. Transduction of bradykinin signals. In: *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*. Eds. Burch R.M., p. 107-112, Austin: Landes Co, 1993.
- BURNEY P.G.J.. Asthma mortality in England and Wales: evidence for a further increase, 1974-1984. *Lancet*, **2**: 323-326, 1986.
- BUTLER, J.; CHAN, S.C.; STEVENS, S.; HANIFIN, J.M. Increased histamine release associated with elevated cAMP phosphodiesterase activity in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**: 490-497, 1983.

- CAMPBELL, W.B.; HALUSHKA, P.V. Lipid-derived autacoids. Eicosanoids and Platelet-activating. In: **The Pharmacological Basic of the Therapeutics**. Eds. Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W., p. 601-616, New York: McGraw-Hill, 1996.
- CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, **117**: 1-6, 1996.
- CARRETERO, O.A.; SCICLI, A.G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine and paracrine) in hypertension. **Hypertension**, **18**: 158-169, 1991.
- CARRETERO, O.A.; SCICLI, A.G.; PILEWSKI, J.; ALBELDA, S.M. Adhesion molecules in the lung. **Am. Rev. Resp. Dis.** **148**: 531-537, 1993a.
- CARRETERO, O.A.; CARBINI, L.A.; SCICLI, A.G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I General description, nomenclature and the mouse gene family. **J. Hypertens.**, **11**: 693-697, 1993b.
- CATT, K.J. Molecular mechanisms of hormone action: control of target cell function by peptide and catecholamine hormones. In: **Endocrinology and Metabolism**. Eds. Felig, P.; Baxter, J.D.; Frohman, p. 91-167, New York: McGraw-Hill, 1995.
- CHANARIN, N.; JOHNSTON S.L. Leukotrienes as a target in asthma therapy. **Drugs**, **47**: 12-24, 1994.
- CHRISTIANSEN, S.C.; PROUD, D.; COCHRANE, C.G. Detection of tissue kalikrein in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic subjects. **J. Clin. Invest.**, **79**: 188-197, 1987.
- CHUNG, F.Z.; WU, L.H.; VARTANIAN, M.A.; WATLING, K.J.; GUARD, S.; WOODRUFF, G.N.; OXENDER, D.L. The non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonist SR 48968 interacts with human, but not rat, cloned tachykinin NK₃ receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **198**: 967-972, 1994.
- CHURCH, M.K.; HIRÓI, J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. **Br. J. Pharmacol.**, **90**: 421-429, 1987.

- CHURCH, M.K., HUTSON, P.A.; HOLGATE, S.T. Nedocromil sodium blocks the early and late phases of allergen challenge in a guinea pig model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **92**: 177-182, 1993.
- CLARK, W.G. Kinins and the peripheral and central nervous systems. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Erdos, E.G., p. 312-356, New, York: Springer-Verlag, 1979.
- COCKCROFT, D.W.; MURDOCK, K.Y. Protective effect of inhaled albuterol, cromolyn, beclometasone and placebo on allergen-induced early asthmatic response (EAR), late asthmatic response (LAR) and allergen-induced increase in bronchial responsiveness to inhaled histamine. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **77**: 122A, 1986.
- COFFEY, R.A. Intracellular events during lymphocyte activation. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Ed. Bray, M.A.; Morley, J., p. 83-138, New York: Springer-Verlag, 1988.
- COLPAERT, F.C.; DONNERER, J.; LEMBERCK, F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissue in rats with adjuvant arthritis. *Life Sci.* **32**: 1827-1834, 1983.
- CONTI, M.; JIN, S.L.C.; MONACO, L.; REPASKE, D.R.; SWINNEN, J.V. Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 562-568, 1991.
- COOPER, K.D.; KANG, K.F.; CHAN, S.C.; HANIFIN, J.M. Phosphodiesterase inhibition of RO 20-1724 reduces hyper-IgE synthesis by atopic dermatitis cells *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.*, **84**: 477-482, 1985.
- CORREA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 193-198, 1993.
- CORRIGAN, C.J.; KAY, A.B. Role of T-lymphocytes and lymphokines. *Br. Med. Bul.*, **48**: 72-84, 1992.
- COTRAN, R.I.; KUMAR, Z.; ROBBINS, S.L. Inflamação e Reparo. In: *Robbins Patologia Estrutural e funcional*. Eds. COTRAN, R.I.; KUMAR, Z.; ROBBINS, S.L., p. 33-72, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1991.
- CRAMER, E.B. Cell Biology of phagocyte migration from the bone marrow, out of the bloodstream, and across organ epithelia. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical*

- Correlates.** Eds. Gallin, J.I.; Goldstein, I.M.; Snyderman, R., p. 341-349, New York: Raven Press, Ltda, 1992.
- CRANE J.; FLATT, A.; JACKSON, R. Prescribed fenoterol and death from asthma in New Zeland, 1981-1983: case control study. *Lancet*, 1: 917-922, 1989a.
- CRANE, J.; BURGESS, C.; BEASLEY, R. Cardiovascular and hypokalemic effects of inhaled salbutamol, fenoterol, and isoprenalline. *Thorax*, 44: 136-140, 1989b.
- CRESCIOLLI, S.; SPINAZZI, A.; PLEBANI, M.; POZZANI, M.; MAPP, C.E.; BOSCHETTO, P.; FABRI, L.M. Theophylline inhibits early and late asthmatic reactions induced by allergens in asthmatic subjects. *Ann. Allergy*, 66: 245-251, 1991.
- CRUWYS, S.C.; GARRETT, N.E.; PERKINS, M.N.; BLAKE, D.R.; KIDD, B.L. The role of bradykinin B₁ receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. *Br. J. Pharmacol.*, 113: 940-944, 1994.
- CUNHA, F.Q.; SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Macrophages stimulate with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an "in vitro" demonstration. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 19: 775, 1986.
- DAMAS, J., BURDON, V., REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 418-422, 1990.
- DAVID, H.B. Células Inflamatórias: estrutura e função. In: *Imunologia Básica*. Eds. Stites, D.P.; Terr, A.I., p. 107-118, Rio de Janeiro: Prentice/Hall do Brasil, 1991.
- DAVIDGE, S.T.; BAKER, P.N.; MCLAUGHLIN, M.K.; ROBERTS, J.M. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ. Res.*, 77: 274-283, 1995.
- DAVIES, R.J.; DEVALIA, M. Epithelial cells. *Br. Med. Bul.*, 48: 85-96, 1992.
- DAVIES, P.; MACINTYRE, E. Prostaglandins and inflammation. In: *Basic Principles and Clinical Correlates*. Eds. Gallin, J.I.; Goldstein, I.M.; Snyderman, R., p. 123-138, New York: Raven Press Ltda, 1992.
- DAVIES, A.; SIMMONS, D.I.; HALE, G.; HARRISON, R.A.; TIGHE, H.; LACHMANN, P.J.; WALDMANN, H. The complement system in

- humoral immunity. In: *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Eds. Janeway, C.A.; Travers, P., p. 8-22, New York: Garland Publishing Inc., 1994.
- DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. Induction of B₁ receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacol.*, **33**: 127-133, 1994a.
- DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 63-68, 1994b.
- DE BRITO, F.D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. Ed. A.A.R. Liss., p. 173-228, Dagenham: Rhone Poulenc LTD, 1989.
- DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. The ability of des-Arg⁹-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired in vitro incubation. *Eur. J. Pharmacol.*, **142**: 141-144, 1987.
- DIMITRIADOU, V.; BUZZI, M.G.; THEOHARIDESS, T.C.; MOSKOWITZ, M.A. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience*, **48**: 187-203, 1992.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev. Infec. Dis.*, **10**: 168-189, 1988.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* **562**: 199-206, 1991.
- DIXON, M.; JACKSON, D.M.; RICHARDS, I.M. The action of sodium cromoglycate on C fibre endings in the dog lung. *Br. J. Pharmacol.*, **3**: 1180-184, 1980.
- DOHERTY, N.S.; ROBSON, B.V. Some biological and pharmacological properties of inflammatory exsudates. *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**: 859-864, 1976.
- DONNERER, J., AMANN, R.; Lembeck, F. Neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat paw following chemical sympathectomy. *Neuroscience*, **45**: 761-765, 1991.

- DONNERER, J.; AMANN, R. The inhibition of neurogenic inflammation. *Gen. Pharmacol.*, **24**: 519-529, 1993.
- DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hiperalgesia: highliting the team effort. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**: 287-290, 1993.
- DRAY, A.; PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Neurosci.*, **16**: 99-104, 1993.
- DRAY, A., URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**: 190-197, 1994.
- ERJEFALT, I.; PERSSON, C.G.A. Anti-asthma drugs attenuate inflammatory leakage of plasma into airway lumen. *Acta Physiol. Scand.*, **128**: 653-654, 1986.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**: 511-536, 1992.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists. In: *Basic and Clinical Research*. Eds. Ronald, M.; Burch, R.M., p.1-31, New York: Marcel Decker, 1993.
- FERGUSON, A.C.; VAUGHAN, R.; BROWN, H.; CURTIS, C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**: 23-28, 1995.
- FINK, G.; MITTELMAN, M.; SHOCHAT, B.; SPITZER, S.A. Theophylline induced alterations in cellular immunity in asthmatic patients. *Clin. Allergy*, **17**: 313-316, 1987.
- FLATT, A.; CRANE, J.; PURDIE, G.; KWONG, T.; BEASLEY, R.; BURGESS, C. The cardiovascular effects of β -adrenergic agonist drugs administered by nebulization. *Postgrad. Med.*, **66**: 98-101, 1990.
- FLEMING, D.M.; CROMBIE, D. Prevalence of asthma and hay fever in England and Wales. *Br. Med. J.*, **294**: 279-283, 1987.
- FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. Virus-induced hyperresponsiveness. *Am. Resp. Crit. Care Med.*, **151**: 1666-1674, 1995.
- FONTONE, J.C. Mechanisms of chemotactic factors stimulation of polymorphonuclear leucocytes modulation by prostaglandins. In: *Inflammatory Mediators*. Eds. HIGGS, G.A.; WILLIAMS, T.J., p. 127-148, New York: Macmillan, 1985.

- FOREMAN, J.C.; PEARCE, F.L. Cromolyn. In: **Allergy Principles and Practice**. Eds. Middleton E., Reed, C.E., Ellis, E.F., p. 271-280, St Louis: Mosby, 1985.
- FREIREICH, E.J.; GEHAN, E.A.; RALL, D.P.; SCHIMIDT, L.H. Quantitative comparison of toxicity of cancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. **Cancer Chemother. Resp.**, **50**: 219-244, 1966.
- FRENETTI, P.S.; WAGNER, D.D. Molecular medicine adhesion molecules - part I. **New Eng. J. Med.**, **334**: 1526-1529, 1996.
- FRENETTI, P.S.; WAGNER, D.D. Adhesion molecules - part II: blood vessels and blood cells. **New Eng. J. Med.**, **335**: 143-145, 1996.
- FROSSARD, N.; ADVENIER, C. Tachykinin receptors and the airway. **Life Sci.**, **49**: 1941-1953, 1991.
- FULLER, R.W.; O'MALLEY, G.; BAKER, A.J.; MACDERMOT, J. Human alveolar macrophage activation: inhibition by forskolin but not by beta-adrenoceptor stimulation or by phosphodiesterase inhibition. **Pulm. Pharmacol.**, **1**: 101-106, 1988.
- GAHMBERG, C.G.; NORTAMO, P.; LI, R.; VALMU, L. Leukocytes cell adhesion proteins: from molecular dissection to clinical applications. **Trends Mol. Med.**, **24**: 329-335, 1992.
- GALLI, S.J. New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, **328**: 257-265, 1993.
- GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; RICCIARDOLO, M.L.; NADEL, J.A. New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. **Can. J. Pharmacol.**, **73**: 843-847, 1995.
- GIEMBYCZ, M.A. Could isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors render bronchodilator therapy redundant in the treatment of bronchial asthma? **Biochem. Pharmacol.**, **43**: 2041-2051, 1992.
- GIUSTINA, T.A.; CHAN, S.C.; BAKER, J.W.; HANIFIN, J.M. The leucocyte sensitivity to PDE inhibitors in the atopic dermatitis: tachyphylaxis after theophylline therapy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **84**: 252-257, 1984.
- GLATT, M.; DIEPPE, P.; WILLOUGHBY, D.A. Crystal-induced inflammation, enzyme release and the effects of drugs in the pleural space. **J. Rheumatol.**, **6**: 251-258, 1979.
- GOLDSTEIN, R.; PAUL, W.; METCAFE, D.; BUSSE, W.W.; REECE, E.R. Asthma. **Ann. Intern. Med.**, **121**: 698-708, 1994.

- GREAVES, M.; SHUSTER, S. Responses of skin blood vessels to bradykinin, histamine and 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol.*, **193**: 255-267, 1967.
- GREWE, S.; CHAN, S.C.; HANIFIN, J.M. Elevated leukocyte cyclic AMP-phosphodiesterase in atopic disease: a possible mechanism for cyclic AMP-agonist hyporesponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **70**: 452-457, 1982.
- GRIESBACHER, T.; LEMBECK, F. Effect of bradykinin antagonists on bradykinin-induced plasma extravasation, venoconstriction, prostaglandin E₂ release, nociceptor stimulation and contraction of the iris sphincter muscle in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.*, **92**: 330-340, 1987.
- GRIESBACHER, T., LEMBECK, F.; SARIA, A. Effect of the bradykinin antagonist B 4310 on smooth muscle and blood pressure in the rat, and its enzymatic degradation. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 531-538, 1989.
- HAANEN, C.; VERMES, I. (Eds). Apoptosis and inflammation. In: *Mediators of inflammation*. Eds. HAANEN, C.; VERMES, I., p. 4: 5-15, Oxford, London: Rapid Communications of Oxford Ltda, 1995.
- HAGAN, R.M.; MCLEAN, S. Vineyard peptide conference bears fruit. *Trends Pharmac. Sci.*, **14**: 315-318, 1993.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190, 1992.
- HALL, J.M.; GEPPETTI, P. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem. Int.*, **26**: 17-21, 1995.
- HAMBERG, U.; VAHTERA, E.; MOILANEN, L. Functionally active alpha₂-macroglobulin and kinin release in synovial fluids of rheumatoid arthritis. *Agents Actions*, **8**: 50-56, 1978.
- HARGREAVE, F.E. RYAN, A.; THOMPSON, N.C. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **68**, 347-340, 1981.
- HARTUNG, H.P.; WOLTERS, K.; TOYKA, K.V. Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea-pig macrophages. *J. Immunol.*, **136**: 3856-3863, 1986.
- HATTORI, R.; HAMILTON, K.K.; FUGATE, R.D.; MCEVER, R.P.; SIMS, P.J. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to

- the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP 140. *J. Biol. Chem.*, **264**: 7768-7771, 1989.
- HELLEWEL, P.G. Cell adhesion molecules and potencial for pharmacological intervention in lung inflammation. *Pulm. Pharmacol.*, **6**: 109-118, 1993.
- HENRIQUES, M.G.; WEG, V.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M..R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFTIG, B.B. Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 164-168, 1990.
- HENRIQUES, M.G. Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos. Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz, p. 1-181, Rio de Janeiro, Brasil. Tese de doutorado, 1993.
- HERXHEIMER, H. The late bronchial reaction in induced asthma. *Int. Arch. Allergy*, **3**: 323-328, 1952.
- HESS,, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; YONG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 260-268, 1992.
- HIRAYAMA, Y.; LEI, Y.H.; BARNES, P.J.; ROGERS, D.F. Effects of two novel tachykinin antagonists, FK 224 and FK 888, on neurogenic airway plasma exsudation, bronchoconstriction and systemic hypotension in guinea pigs *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 844-851, 1993.
- HOKFELT, T.; KELLERTH, J.O.; NILSSON, G.; PERNOW, B. Substance P: localization in the central nervous system and some primary sensory neurons. *Science*, **190**: 889-890, 1975a.
- HOKFELT, T.; KELLERTH, J.O.; NILSSON, G.; PERNOW, B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of SP in cat primary sensory neurons. *Brain Res.*, **100**: 235-252, 1975b.
- HOLDEN, C.A., CHAN, C.S.; HANIFIN, J.M. Monocyte localization of elevated cAMP phosphodiesterase activity in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **87**: 372-376, 1986.
- HOLGATE, S.T. The pathophysiology of bronchial asthma and targets for its drug treatment. *Agents Actions*, **18**: 281-287, 1986.
- HOLIAN, A., HAMILTON, R.; SCHEULE, R.K. Mechanistic aspects of cromolyn sodium action on the alveolar

- macrophage: inhibition of stimulation by soluble agonists. *Agents Actions*, **33**: 318-325, 1991.
- HOWARTH, P.H.; DURHAM, S.R.; LEE, T.H.; KAY, A.B.; CHURCH, M.K.; HOLGATE, S.T. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **132**: 986-992, 1985.
- HUA, X.Y. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand*, **551**: 1-44, 1986.
- INTERNATIONAL ASTHMA MANAGEMENT PROJECT. *International Consensus Report on Diagnosis and Treatment of Asthma*. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Publication. Bethesda: National Institutes of Health, p. 1-72, 1992.
- ISAKSON, P.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J.; SALVEMINI, D.; LEE, L.; NEEDLEMAN, P. Discovery of a better aspirin. *Inflamm. Dis. Res.*, **23**: 49-53, 1995.
- ISRAELS, S.J.; GERRARD, J.M.; JACQUES, Y.V.; MCNICOL, A.; CHAM, B.; NISHIBORI, M.; BAINTON, D.F. Platelet dense granule membranes contain both granulophsin and P-selectin (GMP-140). *Blood*, **80**: 143-152, 1992.
- JACOBY, D.B.; FRYER, A.D. Abnormalities in neural control of smooth muscle in virus-infected airways. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**: 393-395, 1990.
- JAFFAR, Z.; SULLIVAN, P.; PAGE, C.; COSTELLO, J. Modulation of T-lymphocyte activity in atopic asthmatic by low dose theophylline therapy. *Eur. Respir. J.*, **7**: 160S, 1994.
- JASANI, M.K.; KATORI, M.; LEWIS, G.P. Intracellular enzymes and kinin enzymes in synovial fluid in joint diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, **28**: 497-512, 1969.
- JEZDINSKY, J.; HALEK, J. The effects of some analgesic and neuroleptics upon the reflexive and effective components of the formaldehyde-and bradykinin-induced nociceptive reactions in rats. *Activ. Nerv. Sup.*, **16**: 226-228, 1974.
- JOOS, G.F.; PAUWELS, R.A.; VAN DER STRAETEN, M.E. The mechanisms of tachykinin-induced bronchoconstriction in the rat. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **137**: 349-356, 1988.
- JOOS, G.F.; PAUWELS, R.A. The *in vivo* effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: 922-926, 1993.

- JOOS, G.F.; KIPS, J.C.; PELEMAN, R.A.; PAUWELS, R.A. Tackykinin antagonists and the airways. *Arch. Int. Pharm. Ther.*, **329**: 205-220, 1995.
- JORENS, P.G.; VERMEIRE, P.A.; HERMAN, A.G. L-arginine-dependent nitric oxide synthase a new metabolic pathway in the lung airways. *Eur. Respir. J.*, **6**: 258-266, 1993.
- KAMMER, G.M. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase. A pathway and regulation of the immune response. *Immunology Today*, **9**: 222-229, 1988.
- KATORI, M., UCHIDA, J., OH-ISHI, S., HARADA, J., UENO, A.; TANAKA, K. Involvement of plasma kinin system in the rat pleurisy induced by carrageenin. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.*, **2**: 217-120, 1979.
- KAY, A.B.; CORRIGAN, C.J. Eosinophils and neutrophils. *Br. Med. Bol.*, **48**: 51-64, 1991.
- KERREBIJN, K.F.; VON ESSEN ZANDVLIET, E.E.M.; NEIJENS, H.J. Effect of long-term treatment with inhaled corticosteroids and beta-agonists on the bronchial responsiveness in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **79**: 653-659, 1987.
- KERWIN, J.F.; LANCASTER, J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J. Medicinal Chemistry*, **38**: 4342-4362, 1995.
- KITA, H.; ABU-GHAZALEH, R.I.; SUR, S.; GLEICH, G.J. Eosinophil major basic protein induces degranulation and production by human eosinophils. *J. Immunol.*, **154**: 4749-4758, 1995.
- KITAMURA, S.; ISHIHARA, Y.; JAKALEN, F. Effect of disodium cromoglycate of bronchoactive agents in guinea pig tracheal strips. *Arzneimittelforschung*, **34**: 1002-1004, 1984.
- KOWASLSKI, M.; KALINER, M.A. Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. *J. Immunol.*, **140**: 3905-3911, 1988.
- KRAAN, J.; KOETER, G.H.; VAN DER MARK, T.W.; SLUITER, H.J.; DE VRIES, K. Changes in bronchial hyperreactivity induced by four weeks of treatment with antiasthmatic drugs in patients with allergic asthma: a comparison between budesonide and terbutaline. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **76**: 628-636, 1985.
- KYLE, D.J., MARTIN, J.A., BURCH, R.M., CARTER, J.P., LU, S., MEEKER, S., PROSSER, J.C., SULLIVAN, J.P., TOGO, S.,

- NORONHA-BLOB, L., SUNSKO, J.A., WALTERS, R.F., WAHLEY; L.W., HINER, R.N. Probing the bradykinin receptor: mapping the bradykinin receptor: mapping the geometric topography using ethers of hydroxyproline in novel peptides. *J. Med. Chem.*, **34**: 2649-2653, 1991.
- LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, **258**:964-969, 1992.
- LASKY, L.A.; ROSEN, S.D. The selectins carbohydrate-binding adhesion molecules of the immune system. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Eds. Gallin, J.I.; Goldstein, I.M.; Snyderman, R., p. 407-419, New York: Raven Press, Ltda, 1992.
- LAUFER, R.; GILON, C.; CHOREV, M.; SELINGER, Z. Characterization of a neurokinin B receptor site in rat brain using a highly selective radioligand. *J. Biol. Chem.*, **261**: 10257-10263, 1986.
- LAUFER, R.; GILON, C.; CHOREV, M.; SELINGER, Z. Desensitization with a selective agonist discriminates between multiple tachykinin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**: 639-643, 1988.
- LEE, C.M.; IVERSEN, L.L.; HANLEY, M.R.; SANBERG, B.E.B. The possible existence of multiple receptors for Substance P. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmac.*, **318**: 281-288, 1982.
- LEFKOWITZ, R.J.; DE LEAN, A.; HOFFMANN, B.B.; STADEL, J.M.; KENT, R.; MICHEL, T.; LIMBIRD, L. Molecular pharmacology of adenylate cyclase coupled- and β -adrenergic receptors. *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, **14**: 145-161, 1981.
- LEMBECK, F. Zur frage der zentralen ubertragung afferenter impulse III. Mitteilung. Das vorkommen und die bedeutung der Substanz P in den dorsalen wurzeln des ruckenmarks. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **219**: 197-213, 1953.
- LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmac.*, **310**: 175-183, 1979.
- LEMBECK, F., GRIESBACHER, T., ECKHARDT, M., HENKE, S., BREIPOHE, G.; KNOLLE, J. New, long-lasting, potent bradykinin antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 297-304, 1991.

- LEMBECK, F.; GRIESBACHER, T.; LEGAT, F.J. Lack of significant effects of HOE 140 and other novel bradykinin antagonists in vitro and in vivo. **Agents Actions**, **38**: 414-422, 1992.
- LEWIS, T. The nocifensor system of nerves and its reactions. **Br. Med. J.**, **194**: 431-435, 1937.
- LINGK, D.S.; CHAN, M.A.; GELFAND, E.W. Increased cyclic adenosine monophosphate levels block progression but not initiation of human T cell proliferation. **J. Immunol.**, **45**: 449-455, 1990.
- LOWENSTEIN, C.J.; DINERMAN, J.C.; SNYDER, S.H. Nitric Oxide: a physiologic messenger. **Ann. Inter. Med.**, **120**: 227-237, 1994.
- LUGER, T.A.; SCHUWARZ, T. The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. **Allergy**, **50**: 292-302, 1995.
- LUGNIER, C.; SCHINI, V.B. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic cells. **Biochem. Pharmacol.**, **39**: 75-84, 1990.
- LUKACS, N.W.; STRIETER, R.M.; CHENSUE, S.W.; WIDMER, M.; KUNKEL, S.L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. **J. Immunol.**, **154**: 5411-5417, 1995.
- LUNDBERG, J.M.; SARIA, A. Polypeptide-containing neurons in airway smooth muscle. **Ann. Rev. Physiol.**, **49**: 557-572, 1987.
- LUZ, G.P.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Análise do lavado brônquico obtido de ratos normais e sensibilizados pela ovoalbumina. **XI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, MG, Brasil, 1993.
- MAAS, J.; RAE, G.A.; HUIDOBRO-TORO, J.P.; CALIXTO, J.B. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 1471-1477, 1995.
- MACMILLAN, R.M.; FOSTER, S.J. Leukotriene B₄ and inflammatory disease. **Agents Actions**, **24**: 114-119, 1988.
- MACNEIL, T.; BIERILO, K.K.; MENKE, J.G.; HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of rabbit bradykinin B₁ receptor. **Bioch. Biophys. Acta.**, **1264**: 223-228, 1995.

- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, **13**: 23-93, 1993a.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; MEINI, S.; GIULIANI, S. Nitric oxide is the mediator of tachykinin NK₃ receptor-induced relaxation in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **240**: 45-50, 1993b.
- MAGGI, C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.*, **26**: 911-944, 1995.
- MANZINI, S.; PERRETTI, F.; ALBELLI, L.; EVANGELISTA, S.; SEEDS, E.A.M.; PAGE, C.P. Isbufylline, a new xantine derivative, inhibits airways hyperresponsiveness and airways inflammation in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, **249**: 251-257, 1993.
- MANZINI, S. Antagonists of NK₂ tachykinin receptors as a potential new class of antibronchospastic agents. *Gen. Pharmacol.*, **25**: 1-6, 1994.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J.P. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.*, **14**: 209-229, 1983.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptor: a review. *Immunopharmacol.*, **30**: 1-26, 1995.
- MARGOLIUS, H.S. Kallikreins and kinins. *Hypertension*, **26**: 221-229, 1995.
- MARKOWITZ, S.; SAITO, K.; MOSKOWITZ, M.A. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J. Neurosci.*, **7**: 4129-4136, 1987.
- MARTINS, A.M.; PASQUALE, C.P.; BOZZA, P.T.; SILVA, M.R.; FARIA NETO, H.C.C.; CORDEIRO, R.S.B. Homologous tachyphylaxis to bradykinin and its interference with allergic pleurisy in actively sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **220**: 55-61, 1992.
- MARY, D.; AUSSEL, C.; FERRUA, B.; FEHLMANN, M. Regulation of interleukin 2 synthesis by cAMP in human T cells. *J. Immunol.*, **139**: 1179-1184, 1987.
- MASCHLER, H.; CHRISTENSEN, S.B. *International Patent Applications*: novel derivatives of phenylcycloalkanes and-cycloalkenes. *WO.*, **91**: 15451-15456, 1991.

- MASTRANGELO, D.; MATHISON, R.; HUGGEL, H.G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RHALEB, N.E.; DRAPEAU, G.; ROVERO, P.; REGOLI, D. The rat isolated portal vein: a preparation sensitive to neurokinins, particularly neurokinin B. *Eur. J. Pharmacol.*, **134**: 321-326, 1987.
- MAZUREK, N.; BERGER, G.; PECHT, I. A binding site on mast cells and basophils for the anti-allergic drug cromolyn. *Nature*: **286**: 722-723, 1980.
- MAZUREK, N.; BASKIN, P.; PECHT, I. Isolation of a basophilic membrane protein binding the anti-allergic drug cromolyn. *EMBO J.*, **1**: 585-590, 1982.
- MCEACHERN, A.E.; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKA, J.; ALDRICH, R.W.; JARNAGIN, K. Expression cloning of rat B₂ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 7724-7728, 1991.
- MELMON, K.L.; WEBSTER, M.E.; GOLDFINGER, S.E.; SEEGMILLER, J.E. The presence of a kinin in inflammatory synovial effusion from arthritides of varying etiologies. *Art. Rheum.*, **10**: 13-20, 1967.
- MELTZER, E.O.; ORGEL, H.A.; ELLIS, E.F.; EIGEN, H.N.; HEMSTREET, M.P.B. Long-term comparison of three combinations of albuterol, theophylline, and beclomethasone in children with chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**: 2-11, 1992.
- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSON, R.W.; STRADER, C.D.; LNEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21583-21586, 1994.
- MESKINI, N.; HOSNI, M.; NEMOZ, G.; LAGARDE, M.; PRIGNET, A.F. Early increase in lymphocyte cycle nucleotide phosphodiesterase activity upon mitogenic activation of human peripheral blood mononuclear cells. *J. Cel. Physiol.*, **150**: 140-148, 1992.
- MILGROM, H. Asthma-something old, something new....*Postgrad. Med. J.* **67**, S13-S19, 1991.
- MILGROM, H. Theophylline. *Immunol. Allergy Clin. North. Am.*, **13**: 819-838, 1993.
- MILGROM, H.; BENDER, B. Current issues in the use of theophylline. *Resp. Dis.*, **147**: 533-539, 1993.

- MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.*, **145**: 201-227, 1992.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. The L-arginine: nitric oxide pathway. In: *Int. Soc. Appl. Cardiovasc. Biol.* Eds. Zilla, P.; Fasol, R.; Callow, A., p. 139-151, Switzerland: S. Karger Basel, 1992.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. Mechanisms of disease. *New Engl. Med.* **329**: 2002-2010, 1993.
- MOUSLI, M. BRONER, C.; BUEB, J.L.; TSCHIRHART, E.; GIES, J.P.; LANDRY, Y. Activation of rat peritoneal mast cells by Substance P and mastoparan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **250**: 329-335, 1989.
- MYERS, D.J.; BIGBY, B.G.; BOUSHEY, H.A. The inhibition of sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects by cromolyn is dose dependent. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **133**: 1150-1153, 1986.
- NAAKNISHI, S. Mammalian tackykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.*, **14**: 123-136, 1991.
- NACLERIO, R.M., BARTENFELDER, D., PROUD, D; TOGIAS, A.G.; MEYERS, D.A.; KAGEY-SOBOTKA, A.; NORMAN, P.S.; LICHTENSTEIN, L.M. Theophylline reduces histamine release during pollen induced rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **78**: 874-876, 1986.
- NAGUYEN, L.S.; VILLABLANCA, A.C.; RUTLEDGE, J.C. Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathway. *Am. J. Physiol*, **268**: 1060-1068, 1995.
- NAPIER, F.E.; CREESE, B. Theophylline. *Med. J. Australia*, **162**: 548-550, 1995.
- NELSON, S.H.; SZEFLER, S.J.; MARTIN, R.J. Regular inhaled beta-adrenergic agonists in the treatment of bronchial asthma: beneficial or detrimental? *Am. Rev. Resp. Dis.*, **144**: 249-250, 1991.
- NELSON, H.S. β -adrenergic bronchodilators. *New Engl. J. Med.*, **333**: 499-506, 1995.
- NICHOLAS, H., BLACK, P., COUCH, R., KENNEDY, J.; BRIANT, R. Theophylline target concentration in severe airway obstruction 10 or 20 mg/L? *Clin. Pharmacocinet.*, **25**: 495-505, 1993.
- NICHOLSON, C.D.; CHALLISS, R.A.J.; SHAHID, M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of

- selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**: 19-27, 1991.
- NIELSEN, B.W.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; KASAHAA, T. Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. *Immunol. Ser.*, **60**: 131-142, 1994.
- NORRIS, A.A.; LEESON, M.L.; JACKSON, D.M.; HOLROYDE, M.C. Modulation on neurogenic inflammation in rat trachea. *Pulm. Pharmac.*, **3**: 180-184, 1990.
- NOVOGRODSKY, A.; RUBIN, A.L.; STENZEL, K.H. Selective suppression by adherent cells, prostaglandin, and cyclic AMP analogues of blastogenesis induced by different mitogens. *J. Immunol.*, **122**: 1-7, 1979.
- NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leuk. Biol.*, **54**: 171-178, 1993.
- OATES, J.A.; WOOD, A.J.J.; GROSS, N.J. Ipratropium Bromide. *New Eng. J. Med.*, **319**: 486-494, 1988.
- ÖHLÉN, A.; THURESON-KLEIN, Å.; LINDBOM, L.; PERSON, M.G.; HEDQVIST, P. Substance P activates leukocytes and platelets in rabbit microvessels. *Blood Vessels*, **26**: 84-94, 1989.
- OPPENHEIM, J.J.; FRANCIS, W.R.; CONNIE FALTYNEU. Citocinas. In: *Imunologia Básica*. Eds. Stites, D.P.; Terr, A.I., p. 61-77, Rio de Janeiro: Prentice/Hall do Brasil, 1991.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter function of mammalian Tachykinins. *Am. Soc. Physiol. Rev.*, **73**: 229-307, 1993.
- PACHECO, Y., HOSNI, R., CHABANNES, B., GORMAND, F., MOLIERE, P., GROSCLAUDE, M., PIPERNO, D., LAGARDE, M.; PERRIN-FOYOLLE, M. Leukotriene B₄ level in stimulated blood neutrophils and alveolar macrophages from healthy and asthmatic patients. Effect of beta-2-agonist therapy. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**: 732- 739, 1992.
- PAEGLOW, I., WERNER, H., VIETINGHOFF; WARTNER, V. Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. *Inflamm. Res.*, **44**: 306-310, 1995.
- PAGE, C.P. One explanation of the asthma paradox: inhibition of natural anti-inflammatory mechanism by beta-2-agonists. *Lancet*, **337**: 717-20, 1991.
- PAGE, C. Asthma as a chronic disease and the implications for future therapy. *Ann. Allergy*, **69**: 251-260, 1992.

- PALCZYNSKI, C.; GORSKI, P.; GRZEGOCZYK, J. (1989). Effect of disodium cromoglycate on deuterium oxide-induced degranulation of human eosinophils in allergic asthmatic patients *in vitro*. *Arch Immunol. Ther. Exp.*, **37**: 157-160, 1989.
- PALLER, A.S.; NANDA, V.; SPATES, C.; O'GORMAN, M. Leukocytes adhesion deficiency: recurrent childhood skin infections. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **31**: 316-319, 1994.
- PALMER, R.M.J.; ASTHON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**: 664-666, 1988.
- PASQUALE, C.P.; MARTINS, M.A.; BOZZA, P.T.; SILVA, P.M.R.; FARIA NETO, H.C.C.; PIRES, A.L.A.; CORDEIRO, R.S.B. Bradykinin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity. *Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **95**: 244-247, 1991.
- PATACCCHINI, R.; MAGGI, C.A. Tachykinin receptors and receptors subtypes. *Arch. Intern. Pharmacod. Ther.*, **329**: 161-183, 1995.
- PATEL, K.D.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCEVER, R.P.; MELNTYRE, T.M. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP 140 and bind neutrophils. *J. Cell Biol.*, **112**: 749-759, 1991.
- PAUWELS, R. The effect of theophylline on airway inflammation. *Chest*, **92**: 32S-37S, 1987.
- PAUWELS, R. The clinical use of B-receptor agonists; for and against. *Life Sci.*, **52**: 2171-2179, 1993.
- PEARCE, N.; BEASLEY, R.; CRANE, J.; BURGESS, C.; JACKSON, R. End of the New Zealand asthma mortality epidemic. *Lancet*, **345**: 41-44, 1995.
- PERKINS, M.R.; KELLY, D. Induction of B₁ receptors *in vivo* in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1441-1444, 1993.
- PETHO, G., JOCI, C.M.; HOLZER, P. Role of bradykinin in the hyperaemia following acid challenge of the rat gastric mucosa. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1036-1042, 1994.
- PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; OLIVEIRA, S.M.; ROSCHER, A.A.; METZER, R.; GANTEN, D.; BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁

- receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**: 219, 225, 1996.
- PIEDIMONTE, G.; BERTRAND, C.; GEPPETTI, P.; SNIDER, R.M.; DESAI, M.C.; NADEL, J.A. A new NK₁ receptor antagonist (CP-99.994) prevents the increase in tracheal vascular permeability produced by hypertonic saline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**: 270-273, 1993.
- PILEWSKI, J.; ALBELDA, S.M. Adhesion molecules in the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: 531-537, 1993.
- PRETOLANI, M.; VARGAFTIG, B. From lung hypersensitivity to bronchial hyperreactivity. *Biochem. Pharmacol.*, **45**: 791-800, 1993.
- PRICE, A.H.; CLISSOLD, S.P. Salbutamol in the 1980s. A Reappraisal of its Clinical Efficacy. In: *Drugs*. Eds. PRICE, A.H.; CLISSOLD, S.P., p. 77-121, Auckland, New Zealand: Adis Press Ltd, 1989.
- PUERINGER, R.J.; HUNNINGHAKAE, G.W. Inflammation and airway reactivity in asthma. *Am. J. Med.*, **92**: 6A-32S, 1992.
- RAEBURN, D.; KARLSSON, J.A. Comparison of the effects of isozyme selective phosphodiesterase inhibitors and theophylline on PAF-induced plasma leak in the guinea pig airways *in vivo*. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **145**: 162A, 1992.
- RAEBURN, D., UNDERWOOD, S., LEWIS, S., WOODMAN, V., BATTRAM, C., TOMKINSON, A., SHARMA, S., JORDAM, R., SOUNESS, J., WEBBER, S.; KARLSSON, J. Anti-inflammatory and bronchodilator properties of RP 73401, a novel and selective phosphodiesterase type IV inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 1423-1431, 1994.
- RAND, T.H.; LOPEZ, A.F.; GAMBLE, J.R.; VADAS, M.A. Nedocromil sodium and cromolyn (sodium cromoglicate) selectively inhibit antibody-dependent granulocyte-mediated cytotoxicity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **87**: 151-158, 1988.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; DÓRLEANS-JUSTE, P. Pharmacological receptors for Substance P and neurokinins. *Life Sci.*, **40**: 109-117, 1987.
- RHALEB, N.E., TÉLÉMAQUE, S., ROUISSI, N., DION, S., JUKIC, D., DRAPEAU, G.; REGOLI, D. Structure-activity studies of

- bradykinin and related peptide B₂-receptor antagonists. *Hypertension*, **17**: 107-115, 1991.
- RICCIARDOLO, F.M.; NADEL, J.A.; GRAF, P.D.; BERTRAND, C.; YOSHIHARA, S.; GEPETTI, P. Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 508-512, 1994.
- ROBICSEK, S.A.; BLANCHARD, D.K.; DJEU, J.Y.; KRZANOWSKI, J.J.; SZENTIVANYI, A.; POLSON, J.B. Multiple high affinity cAMP-phosphodiesterases in human T-lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **42**: 869-877, 1991.
- ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Eds. Vane, J.R.; Ferreira S.H., p. 6-25, New York: Springer-Verlag, 1978.
- SAKAMOTO, T.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Effect of CP-96,345, a non-peptide NK₁ receptor antagonist, against substance P, bradykinin and allergen-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **231**: 31-38, 1993.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Brit. J. Pharmacol.*, **118**: 811-819, 1996.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 7240-7244, 1993.
- SANJAR, S.; AOKI, S.; KRISTERSSON, A.; SMITH, D.; MORLEY, J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: The effect of anti-asthma drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 679-689, 1990.
- SATOH, H.; LOU, Y. P.; LEE, L.Y.; LUNDBERG, J.M. Inhibitory effects of capsaicin and the NK₁ antagonist on bronchoconstriction evoked by sensory nerve stimulation in guinea-pigs. *Acta Physiol. Scand.*, **146**: 535-536, 1992.
- SAWAI, T.; IKAI, K.; UEHARA, M. Elevated cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase activity in peripheral blood mononuclear leucocytes from children with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, **132**: 22-24, 1995.
- SCHEININ, M.; KOULU, M.; LAURIKAINEN, E.; ALLONEN, H. Hypokalemia and other non-bronchial effects of inhaled fenoterol and salbutamol: A placebo-controlled dose-

- response study in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 645-653, 1987.
- SCHLOSBERG, M.; LIU, M.C.; BOCHNER, B.S. Pathophysiology of asthma. *Immunol. Allergy Clin North Amer.*, **13**: 721-743, 1993.
- SCHRIER, D.J., LESCH, M.E., WRIGHT, C.D.; GILBERTSEN, R.S. The anti-inflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenin-induced pleural inflammatory response in rats. *J. Immunol.*, **145**: 1874-1879, 1990.
- SCHUDT, C.; TENOR, H.; WENDEL, A.; RABE, K.; LOOS, U.; MALLMANN, P., SZAMEL, M.; RESCH, K. Effect of selective phosphodiesterase (PDE) inhibitors on activation of human macrophages and lymphocytes. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.*, **345**: R69, 1992.
- SEARS, M.R.; TAYLOR, D.R.; PRINT, C.G.; LAKE, D.C.; QUINGQUING, L.; FLANNERY, E.M.; YATES, D. M.; LUCAS, M. K.; HERBISON, G.P. Regular inhaled β agonist treatment in bronchial asthma. *Lancet*, **336**: 1391-1396, 1990.
- SEARS, M.R. The definition and diagnosis of asthma. *Allergy*, **48**: 12-16, 1993.
- SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: *Handbook of inflammation*. Eds. Bonta, I.L., Bray, M.A.; Parnham, M.J., p. 27-47, New York: Elsevier, 1985.
- SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Eds. Dale, M. M.; Foreman, J.C., p. 253-261, Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1989.
- SEIBURT, A.F.; THOMPSON, W.J.; TAYLOR, A.; WILBORN, W.H.; BARNARD, J.; HAYNES, J. Reversal of increased microvascular permeability associated with ischaemia-reperfusion: role for cAMP. *J. Appl. Physiol.*, **72**: 389-395, 1992.
- SHARMA, J.N.; ZEITHLIN, I.J.; DEODHAR, S.D.; BUCHANAN, W.W. Detection of kallikrein-like activity in inflamed synovial tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **262**: 279-286, 1983.
- SHEARER, W.; PAUL, M.E.; SMITH, C.W.; HUSTON, D.P. Laboratory assessment of immune deficiency disorders. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **14**: 265-297, 1994.
- SHELHAMER, J.H.; LEVINE, S.J. WU, T.; JACOBY, D.B.; KALINER, M.A.; RENNARD, S.I. Airway Inflammation. *Ann. Int. Med.*, **123**: 288-304, 1995.

- SHER, R.; WADEE, A.A. Eosinophil degranulation: monitoring by interference contrast microscopy. *Inflammation*, **5**: 37-53, 1981.
- SHOHAT, B.; VOLOVITZ, B.; VARSANO, I. Induction of supressor T-cells in asthmatic children by theophylline treatment. *Clin. Allergy*, **13**: 487-493, 1983.
- SHRODIN, M.S. Pharmacotherapy for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Inter. Med.*, **153**: 814-826, 1993.
- SIBILILE, Y.; REYNOLDS, H. Macrophages and polimorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **141**: 471-501, 1990.
- SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in Medicine. I- Chemical Nature and Biology Reactions. *Clin. Proc.*, **63**: 381-389, 1988.
- SPATARO, A.C.; BOSMANN, H.B. Mechanisms of actions of dissodium cromoglycate-mast cell calcium ion influx after a histamin releasing stimulus. *Biochem. Pharmac.*, **25**: 505-510, 1976.
- SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J. Pathol. Bact.*, **72**: 367-380, 1956.
- SPITZER, W.O.; SUISSA, S; ERNST, P. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. *New Engl. J. Med.*, **326**: 501-506, 1992.
- SPRY, C.J.F.; KUMARASWAMI, V.; TAI, P.C. The effect of nedocromil sodium on secretion from human eosinophils. *Eur. J. Resp. Dis.*, **69**: 241-243, 1986.
- STADLER, J.; HARBRECHT, B.G.; DI SILVIO, M.; CURRAN, R.D.; JORDAN, M.L.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T.R. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of ciclooxygenase products and interleucin-6 by rat kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.*, **53**: 165-172, 1993.
- STERANKA, L.R.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pain and in inflammation, In: *Bradykinin Antagonists: Basic Clinical Research*. Ed. Burch, R.M., p. 171-189, New York: Marcel Decker, 1991.
- STEWART, C.C.; DIEDY, M.C.; STEWART, S.J. The proliferation and differentiation of macrophages. *Immunol. Ser.*, **60**: 3-27, 1994.
- SUISSA, S.; ERNST, P.; BOIVIN, J.F.; HORWITZ, R.I.; HABBICK, B.; COCKROFT, D.; BLAIS, L.; MCNUTT, M.; BUIST, A.S.;

- SPITZER, W.O. A cohort analysis of excess mortality in asthma and the use of inhaled beta-agonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **149**: 604-610, 1994a.
- SUISSA, S.; BLAIS, L.; ERNST, P. Patterns of increasing beta-agonist use and the risk of fatal or near-fatal asthma. *Eur. Respir. J.*, **7**: 1602-1609, 1994b.
- SULLIVAN, P.; BEKIN, S.; JAFFAR, L.; PAGE, C.; JEFFERY, P.; COSTELO, J. Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atonic asthma. *Lancet*, **1**: 1006-1008, 1994.
- SUTTORP, N.; WEBER, U.; WELSCH, T.; SCHUDT, C. Role of phosphodiesterase in the regulation of endothelial permeability *in vitro*. *J. Clinical Invest.*, **91**: 1421-1428, 1993.
- SVENJO, E. The hamster cheek pouch as a model in microcirculation research. *Eur. Resp. J.*, **12**: (suppl.) 595-600, 1990.
- TAKAHASHI, T.; KONOSHI, S.; POWELL, D.; LEEMAN, S.E.; OTSUKA, M. Identification of the motoneuron-depolarizing peptide in bovine dorsal root as hypothalamic Substance P. *Brain Res.*, **73**: 59-69, 1974.
- TAKAYAMA, I.; FUJII, Y.; OHNO, S.; FUJINO, M. Morphological study of rat mast cells stimulated with compound 48/80 at different temperatures. *Histochemistry*, **102**: 83-87, 1994.
- TARAYRE, J. P., ALIAGA, M., BARBERA, M., TISSEYRE, N., VIEU, S.; TISNE-VERSAILLES, J. Pharmacological modulation of a model of bronchial inflammation after aerosol induced active anaphylactic shock in conscious guinea pigs. *J. Immunopharmacol.*, **13**: 349-356, 1991.
- THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.*, **73**: 797-821, 1993.
- TOKUYAMA, K.; LÖTVALL, J.O.; LÓDAHL, C.G.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Inhaled formoterol inhibits histamine-induced airflow obstruction and airway microvascular leakage. *Eur. J. Pharmacol.*, **193**: 35-39, 1991.
- TORPHY, T. J.; UNDEM, B.J. Phosphodiesterase inhibitors: new opportunities for the treatment of asthma. *Thorax*, **46**: 512-523, 1991.
- TORPHY, T.J.; LIVI, G.P. Phosphodiesterase isozymes in airways. In: *Pharmacology of the Respiratory Tract: Experimental and Clinical Research*, Ed. Chung, K.F.; Barnes, P.J., p. 177-222, New York: Marcel Dekker, 1993.

- TSICOPOULOS, A.; LASSALE, P.; JOSEPH, M.; TONNELL, A.B.; THOREL, T.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, A. Effect of disodium cromoglycate on the inflammatory cells bearing the Fc epsilon receptor type II (Fc'RII). *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**: 227-236, 1988.
- TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; YOKOTA, Y.; NAKANISHI, S. Tissue distribution and quantitation of mRNAs for the three rat tachykinin receptors. *Eur. J. Biochem.*, **193**: 751-757, 1990.
- TUNON-DE-LARA, J.M.; RIO, P.; MARTHAN, R. The effect of sodium cromoglycate on platelets: an *in vivo* and *in vitro* approach. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **89**: 994-1000, 1992.
- UCHIDA, Y., TANAKA, K., HARADA, A., VENO, A.; KATORI, M. Activation of kallikrein-kinin system and its significant role in pleural fluid accumulation of rat carrageenin-induced pleurisy, *Inflammation.*, **7**: 121-125, 1983.
- UJIIE, Y.; SEKIZAWA, K.; AIKAWA, T.; SASAKI, H. Evidence for SP as an endogenous substance causing cough in guinea-pigs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: 1628-1632, 1993.
- UNDERWOOD, D.C.; KOTZER, C.J.; BOCHNOWICZ, S.; OSBORN, R.R.; LUTTMANN, M.A.; HAY, D.W.P.; TORPHY, T.J. Comparison of phosphodiesterase III, IV and dual III/IV inhibitors on bronchospasm and pulmonary eosinophil influx in guinea pigs. The *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **1**: 250-259, 1994.
- VAN METRE, T.E. Adverse effects of inhalation of excessive amounts of nebulised isoproterenol in status asthmaticus. *J. Allergy*, **43**: 101-113, 1969.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fed. Proc.*, **41**: 2588-2595, 1976.
- VON EULER, U.S.; GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.*, **72**: 74-86, 1931.
- WARD, A.J.M.; MCKENNIFF, M.; EVANS, J.M.; PAGE, C.P.; COSTELLO, J.F. Theophylline. An immunomodulatory role in asthma? *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**: 518-523, 1993.
- WARDLAW, A.J.; KAY, A.B. The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy*, **42**: 321-335, 1987.
- WELLER, P.F. Síndromes eosinofílicas. In: *Cecil Tratado de Medicina Interna*. Eds. Wyngaarden, J.B.; Smith, L.H.; Bennete, J.C., p. 983-985, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A., 1993.

- WELLS, E.; MANN, J. Phosphorylation of a mast cell protein in response to treatment with anti-allergic compounds. Implication for the mode of action of sodium cromoglicate. *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 837-842, 1983.
- WILLIAMS, A.F.; BARCLAY, A.N. The immunoglobulin supergene family-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.*, **6**: 381-405, 1988.
- WIRTH, K., HOCK, F. J., ALBUS, U., LINZ, W., ALPERMANN, H.G., ANAGNOSTOPOULOS, H., HENKE, S., BREIPOHL, G., KÖNING, W., KNOLLE, J.; SCHÖLKENS, B.A. HOE 140, a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 774-778, 1991.
- WIRTH, K.J., GEHRING, D.; SCHÖLKENS, B.A. Effect of HOE 140 on bradykinin-induced bronchoconstriction anesthetized guinea pigs. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: 702-706, 1993.
- WOLFE, S.L.; HORROCKS, L.A. Eicosanoids. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Eds. Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P.B., et al., p. 475-498, New York: Raven Press Ltd, 1994.
- YAMADA, N., KADOWASKI, S.; UMEZU, S. Development of an animal model of late asthmatic response in guinea pigs and effects of anti-asthmatic drugs. *Prostaglandins*, **43**: 507-521, 1992.
- YAMAMOTO, S.; DUNN, C.J.; CAPASSO, F.; DEPORTER, D.A.; WILLOUGHBY, D.A.; HUSKISSON, E.C. Quantitative studies on cell-mediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. *J. Pathol.*, **117**: 65-73, 1975.
- YANCEY, K.B. Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies. *Clin. Exp. Immunol.*, **71**: 207-210, 1989.
- YOSHIHARA, S.; CHAN, B.; YAMAWAKI, I.; GEPPETTI, P.; RICCIARDOLO, F.L.; MASSION, P.P.; NADEL, J.A. Plasma extravasation in the rat trachea induced by cold air is mediated by tachykinin release from sensory nerves. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **151**: 1011-1017, 1995.
- YUKAWA, T., KROEGEL, C., CHANEZ, P., DENT, G., UKENA, D., CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Effect of theophylline and adenosine on eosinophil function. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **140**: 327-333, 1989.

- YUKAWA, T.; UKENA, D.; KROEGEL, C.; CHANEZ, P.; DENT, G.;
CHUNG, K.F.; BARNES, P.J. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **141**: 1446-
1452, 1990.
- ZEITLIN, I.J.; SMITH, A.M. Mobilization of tissue kalikrein
in inflammatory disease of the colon. *Gut*, **14**:133-138,
1973.