

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

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS EDEMATOGÊNICAS
MEDIADAS PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS
CININAS NA PATA DE RATO**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

MARIA MARTHA CAMPOS
Florianópolis
1997

CAMPOS, Maria Martha. *Mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas mediadas pela ativação de receptores B₁ e B₂ para as cininas na pata de rato*. Florianópolis, 1997, 108f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 15/08/97

Estudo dos mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas das cininas na pata de rato. Os resultados mostram o envolvimento dos [receptores B₁ e B₂] no [edema de pata de rato] causado pelas [cininas]. Enquanto os receptores B₂ são [constitutivos], os receptores B₁ podem ser [induzidos] pela [dessensibilização] completa dos receptores B₂ ou pelo tratamento agudo dos animais com [LPS]. Além disso, doses sublimiáres de outros mediadores do processo inflamatório podem potencializar o edema de pata causado pela bradicinina, bem como o edema induzido pelo agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-bradicinina, em animais tratados com LPS. Desta forma, pode-se sugerir, que as cininas, através da interação com receptores B₁ e B₂, podem exercer um papel central na instalação e manutenção de processos inflamatórios].

[inflamação], [bradicinina], [des-Arg⁹-bradicinina], [glicocorticóides], [prostanóides], [citocinas]

**"MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS EDEMATOGÊNICAS
MEDIADAS PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS
CININAS NA PATA DE RATO"**

POR

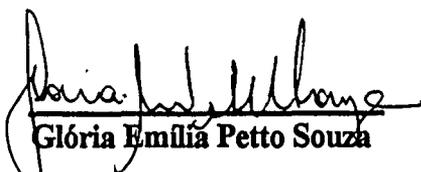
MARIA MARTHA CAMPOS

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

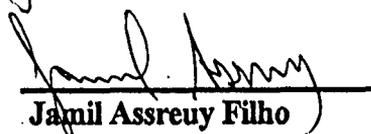
Banca Examinadora:


João Batista Calixto

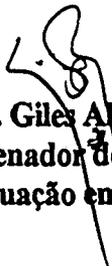
(FMC/UFSC-Orientador)


Glória Emília Petto Souza

(FCFRP/USP-Membro Titular)


Jamil Assreuy Filho

(FMC/UFSC-Membro Titular)


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

Florianópolis, agosto de 1997.

Disso podemos ter certeza, que a ciência, obdecendo à lei da humanidade, sempre trabalhará para estender as fronteiras da vida

Louis Pasteur, 1888

*À minha mãe, pelo apoio, incentivo e
dedicação durante toda minha vida*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Batista Calixto, pelo apoio e estímulo recebidos, e principalmente pela segurança e amizade transmitidos durante a realização de todo este trabalho.

A todos os professores do Departamento, em especial ao Dr. Giles Alexander Rae, Dra. Thereza C. L. Nogueira e Dra. Yara S. Medeiros.

A todos os funcionários do Departamento, principalmente a Maria Conceição de Rosa Ataíde, Patrícia Vianna Abreu e Rosana Maria Ostroski, pelo carinho e amizade.

Aos colegas e amigos do Curso de Pós-graduação, Gilboé, Irinéia, Josélia, Marcos, Rose, Rubens, Sandro e Tânia Pessati.

Aos amigos de iniciação científica, especialmente a Ana Paula, Karla, Rafael e Ricardo, pela amizade e companheirismo.

A todos os amigos do Departamento, principalmente a Alcíbia, Alessandra, Daniela, Monique e Tânia Saleh.

Especialmente a Adair R.S. Santos, Mariem El Sayah e Zulma R. Vaz pelo carinho e amizade dispensados.

Aos meus irmãos, em especial a Maria Léa e Alexandre, pela dedicação, apoio e por estarem sempre ao meu lado durante todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
Animais	20
Procedimentos experimentais	20
Medida do edema de pata	20
Análise da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação no edema de pata de rato	21
Influência da dessensibilização dos receptores B ₂ sobre a resposta edematogênica resultante da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação	22
Efeito da dessensibilização dos receptores B ₂ sobre o edema de pata induzido pelo agonista seletivo dos receptores B ₁ , a des-Arg ⁹ -BK.....	24
Influência do tratamento com endotoxina de <i>Escherichia coli</i> sobre o edema de pata de rato causado por agonistas dos receptores B ₁ e B ₂	25
Influência do tratamento com LPS sobre o edema de pata causado por outros mediadores da inflamação	26

Análise da interação entre a des-Arg ⁹ -BK e alguns mediadores da inflamação no edema de pata de animais tratados com LPS.....	27
Drogas.....	29
Análise estatística.....	30
RESULTADOS	31
Edema de pata induzido pela BK.....	31
Interação entre a BK e outros mediadores da inflamação.....	31
Influência da dessensibilização dos receptores B ₂ sobre a potencialização da resposta edematogênica à BK.....	36
Efeito da dessensibilização dos receptores B ₂ sobre o edema de pata induzido pela des-Arg ⁹ -BK.....	43
Efeito do tratamento agudo com LPS sobre o edema de pata de rato causado por agonistas seletivos dos receptores B ₁ e B ₂ para as cininas..	46
Interação entre a des-Arg ⁹ -BK e outros mediadores da inflamação em animais tratados com LPS.....	52
DISCUSSÃO	57
SUMMARY	77
RESUMO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Edema de pata de rato causado pela BK e pela des-Arg ⁹ -BK. Efeito de antagonistas seletivos dos receptores B ₁ e B ₂	33
FIGURA 2 - Edema de pata resultante da interação entre a BK e SP, PGI ₂ , PGE ₂ ou CGRP	34
FIGURA 3 - Edema de pata resultante da interação entre a BK e PAF, 5-HT ou histamina	35
FIGURA 4 - Influência da co-injeção do antagonista seletivo de receptores B ₂ , o Hoe 140 sobre o edema de pata resultante da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação	37
FIGURA 5 - Influência da co-injeção do antagonista seletivo de receptores B ₂ , o NPC 17731 sobre o edema de pata resultante da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação	38
FIGURA 6 - Dessensibilização dos receptores B ₂ induzida pela BK. Efeito da dessensibilização sobre o edema de pata causado por outros mediadores da inflamação	39
FIGURA 7 - Edema de pata resultante da interação entre a BK e PGE ₂ , PGI ₂ ou SP em animais dessensibilizados à BK	41

FIGURA 8 - Efeito do tratamento com dexametasona sobre o edema de pata resultante da interação entre BK e PGE ₂ ou PGI ₂ em animais dessensibilizados à BK	42
FIGURA 9 - Influência da associação de SP ou PGE ₂ com BK sobre o processo de dessensibilização induzido pela BK	44
FIGURA 10 - Influência da dessensibilização induzida pela BK sobre o edema de pata causado pelo agonista seletivo de receptores B ₁ , des-Arg ⁹ -BK. Efeito do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores B ₁ , des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK e da dexametasona.....	45
FIGURA 11 - Influência do tratamento agudo com LPS sobre o edema de pata causado por agonistas B ₁ e B ₂ para as cininas	47
FIGURA 12 - Influência do pré-tratamento dos animais com LPS de rato sobre o edema de pata causado por outros mediadores da inflamação ...	48
FIGURA 13 - Edema de pata causado pela des-Arg ⁹ -BK em animais tratados com LPS. Influência da co-injeção de antagonistas seletivos dos receptores B ₁ e B ₂	50
FIGURA 14 - Efeito do tratamento com indometacina ou cicloheximida sobre o edema de pata causado pela des-Arg ⁹ -BK em animais tratados com LPS.....	51

FIGURA 15 - Edema de pata resultante da interação entre a des-Arg ⁹ -BK e SP, PGI ₂ , PGE ₂ ou CGRP em animais tratados com LPS.....	54
FIGURA 16 - Edema de pata resultante da interação entre a des-Arg ⁹ -BK e PAF, 5-HT ou histamina em animais tratados com LPS.....	55
FIGURA 17 - Influência da co-injeção do antagonista seletivo de receptores B ₁ , des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK sobre o edema de pata resultante da interação entre a des-Arg ⁹ -BK e outros mediadores da inflamação em animais tratados com LPS.....	56

INTRODUÇÃO

A bradicinina e as outras cininas a ela relacionadas constituem uma família de peptídeos com um grande número de efeitos biológicos que incluem a participação no controle da pressão arterial, aumento da permeabilidade vascular, dilatação venular, broncoconstrição, asma, angiogênese, indução de dor e hiperalgesia. Além disso, parecem estar envolvidas em várias doenças de origem inflamatória (Lewis et al., 1970; Garcia Leme, 1978; Regoli e Barabé, 1980; Burch et al., 1992; Farmer e Burch, 1991; Bhoola et al., 1992; Hall, 1992).

A história das cininas teve início em 1909, quando Abelous e Bardier, dois cirurgiões franceses, demonstraram que a injeção endovenosa de frações extraídas da urina humana causava hipotensão em cães anestesiados. Quase vinte anos depois, a substância hipotensiva encontrada na urina foi caracterizada e denominada de caliceína (Kraut et al., 1930). Foi só em 1949 que Rocha e Silva et al. relataram que a incubação de tripsina ou do veneno extraído da *Bothrops jararaca*, com uma pseudoglobulina bovina, resultava na formação de uma substância que produzia contração do íleo de cobaia. A resposta contrátil observada se desenvolvia lentamente quando comparada com a resposta induzida por histamina, sugerindo que o fenômeno era decorrente da ação de uma nova substância, a qual foi chamada de bradicinina (BK). Alguns anos mais tarde, Boissonas et al. (1960) determinaram a

seqüência correta da BK e sintetizaram o nonapeptídeo. Com o advento da BK sintética foram iniciados vários estudos para caracterizar as ações biológicas deste peptídeo. Os primeiros estudos realizados demonstraram que a BK produzia contração de várias preparações musculares lisas, e causava vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor (Lewis et al., 1964; para revisão ver: Regoli e Barabé, 1980).

As vias bioquímicas envolvidas na síntese e degradação das cininas compreendem mecanismos bem estabelecidos (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992). As cininas são formadas em resposta a estímulos fisiológicos, ou durante o processo inflamatório, a partir de precursores chamados cininogênios, que podem ser α -globulinas de alto (120 KDa) ou de baixo peso molecular (66 KDa), através da ação de enzimas denominadas de cininogenases. O grupo mais importante de cininogenases é representado pelas calicreínas, um grupo de proteases que podem ser encontradas no sangue (calicreína plasmática) ou na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual). Enquanto as calicreínas plasmáticas são codificadas por um único gene, as calicreínas teciduais formam um grupo de proteases codificadas por uma família de vários genes (Beaubien et al., 1991; Murray et al., 1990). A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula na corrente sanguínea em uma forma inativa, denominada de pré-calicreína (fator de Fletcher). A pré-calicreína é

rapidamente convertida em caliceína em um processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sanguínea (Fator de Hagemann) (Bathon e Proud 1991; Bhoola et al., 1992). A ação da caliceína plasmática sobre o cininogênio de alto peso molecular, resulta na formação do nonapeptídeo, BK. Por outro lado, a caliceína tecidual atuando sobre os cininogênios de alto e baixo peso molecular, origina o decapeptídeo, calidina (lisil-BK). A calidina pode ser convertida em BK através da clivagem da porção N-terminal pela ação de aminopeptidases plasmáticas (Guimarães et al., 1973; Steranka et al., 1988).

Logo depois de formadas, as cininas circulantes se difundem através da parede dos capilares ou pelos vasos linfáticos nos tecidos, e são rapidamente inativadas por várias peptidases, genericamente denominadas de cininase I, cininase II e encefalinase. O grupo das cininases I é representado pelas enzimas carboxipeptidase N (plasma) e carboxipeptidase M (membrana) que removem o aminoácido arginina da porção C-terminal das moléculas da BK e da calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente (Erdös, 1990; Marceau, 1995). Por outro lado, a cininase II, também denominada de enzima conversora da angiotensina (ECA), e é responsável por clivar o dipeptídeo da porção C-terminal da BK, transformando-a em um metabólito inativo (Bhoola et al., 1992). Em alguns casos a cininase II é capaz de clivar o tripeptídeo da extremidade C-terminal da des-

Arg⁹-BK, embora este fenômeno não ocorra com frequência, devido à baixa afinidade que a cininase II apresenta por metabólitos des-Arg⁹ (Inokuchi e Nagamatsu, 1981; Oshima et al., 1985). Finalmente, a encefalinase ou endopeptidase neutra, é uma metalopeptidase, presente especialmente em células epiteliais, capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da molécula da BK, da maneira semelhante a cininase II (Gafford et al., 1983).

O processo de inativação rápida das cininas na circulação levou ao desenvolvimento de substâncias capazes de inibir a atividade das cininases. Inicialmente verificou-se que o veneno extraído da *Bothrops jararaca* era capaz de potencializar a contração do íleo de cobaia ou a resposta hipotensora causada pela BK (Ferreira, 1965). O fator responsável por este efeito foi chamado de fator potencializador da BK (BPF), e sua atividade foi correlacionada com a inibição da inativação enzimática das cininas (Ferreira e Vane, 1967). Posteriormente, este fator foi isolado e sintetizado (Stewart et al., 1971) e, em 1977, foi desenvolvido o primeiro inibidor da cininase II, o captopril (Ondetti et al., 1977).

A importância relativa das cininases varia de acordo com a espécie, com o tipo de fluido biológico e com o sítio de formação da enzima (Bhoola et al., 1992). Em humanos, os níveis circulantes das cininas são primariamente regulados pela cininase I, enquanto que em superfícies endoteliais e no leito pulmonar vascular, a ação da

cininase II é mais importante. No plasma de ratos, onde o metabolismo das cininas é bastante estudado, a cininase II exerce uma ação muito maior do que as outras peptidases (Ishida et al., 1989).

A cininase II possui maior afinidade pela BK e pela calidina do que a cininase I. Este fato sugere que a formação dos metabólitos des-Arg⁹ não acontece *in vivo* sob condições normais. A formação da des-Arg⁹-BK é observada em exsudatos inflamatórios, que são compostos por proteínas do plasma, incluindo as carboxipeptidases que metabolizam as cininas pela via da cininase I. Além disso, a formação de fibrina, típica de muitos exsudatos, aumenta expressivamente a atividade da cininase I (Heindriks et al., 1990; Campbell et al., 1990). O predomínio da atividade da cininase I sobre a da cininase II pode ser bem observado no fluido sinovial de humanos, ou na secreção nasal de pacientes com rinite alérgica (Cherchuitte et al., 1987; Proud et al., 1987).

Depois de formadas, as cininas BK e calidina, exercem uma série de efeitos biológicos que envolvem, principalmente, a regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, envolvimento na regulação da pressão arterial, transporte de glicose e de eletrólitos, além de estimularem a reabsorção óssea e a proliferação celular (Bhoola et al., 1992). Em adição a estas ações, as cininas participam de vários eventos pró-inflamatórios que incluem dilatação venular, aumento da permeabilidade

vascular, além da estimulação de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C (Marceau et al., 1983; Roch-Arveiller et al., 1985; Szólkzani, 1987; Hargreaves et al., 1988; Proud e Kaplan, 1988; Dray e Perkins, 1992). Estas ações sugerem que as cininas podem participar de vários estados fisiopatológicos, tais como reações alérgicas, rinite viral, asma, pancreatite, peritonite ou artrite reumatóide. Além disso, as cininas podem estar envolvidas na regulação da pressão arterial em certos tipos de hipertensão ou ainda durante o desenvolvimento do choque séptico (Regoli e Barabé, 1980; Gavras et al., 1987; Steranka et al., 1988; Bathon e Proud, 1991; Hall, 1992).

A maioria das ações biológicas das cininas é mediada pela interação com receptores de membrana. A existência de dois subtipos de receptores para as cininas, denominados B₁ e B₂, foi proposta inicialmente por Regoli e Barabé (1980), com base na determinação da ordem de potência dos agonistas em diversos tecidos isolados. Posteriormente, esta classificação foi confirmada através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos, obtidos por modificações ou substituições dos aminoácidos que compõem a estrutura das moléculas da BK e da des-Arg⁹-BK (Vavrek e Stewart., 1985; Roberts, 1989; Regoli et al., 1990; Regoli et al., 1994; ver para revisão: Hall e Morton, 1997). Recentemente, a existência dos receptores B₁ e B₂ também foi confirmada através da clonagem e expressão desses receptores, bem

como pelo emprego de estudos de binding (McEachern et al., 1991; Eggerix et al., 1992; Hess et al., 1992; 1994; Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996).

Os receptores do tipo B₁ são ativados pelos fragmentos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina produzidos a partir da BK e da calidina por ação das carboxipeptidases N e M, enquanto os receptores B₂ são praticamente insensíveis aos metabólitos que não possuem o resíduo arginina da porção C-terminal. As primeiras evidências para a existência dos receptores B₁ foram obtidas em preparação de aorta de coelho. A ordem de potências relativas observada para os agonistas nesta preparação era diferente daquela obtida em preparações clássicas, tais como o íleo de cobaia e a veia jugular de coelho. O critério decisivo para definir a existência dos receptores B₁ foi o desenvolvimento de antagonistas seletivos, com o protótipo [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK (Regoli et al., 1977; Regoli e Barabé, 1980). Os receptores B₁ podem ser expressos em várias preparações, principalmente em tecidos vasculares de coelhos. Podem também, ser encontrados em tecidos isolados, em cultura de células ou ainda em alguns sistemas *in vivo* obtidos de cães, gatos, ratos, camundongos, humanos, bovinos ou suínos, embora não haja nenhuma evidência da presença destes receptores em cobaias (para revisão ver: Marceau et al., 1995).

O estudo dos receptores B₁ tem sido de grande interesse, uma vez que estes receptores apresentam a particularidade de serem induzidos em certas ocasiões,

como por exemplo após trauma tecidual ou durante processos inflamatórios crônicos (Donaldson et al., 1997; Marceau, 1995; 1997). A indução dos receptores B₁ pode ser facilmente observada na maioria das preparações *in vitro* obtidas de coelhos, ratos, suínos (Marceau, 1995) e também em tiras de cólon humano (Couture et al., 1981). Estas preparações não respondem aos agonistas dos receptores B₁ na primeira hora de incubação, mas se tornam progressivamente reativas após algumas horas de incubação *in vitro*. A preparação mais estudada em relação à indução dos receptores B₁ tem sido a aorta isolada de coelho, onde se observa aumento gradativo da resposta contrátil ao agonista de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK. Este efeito pode ser totalmente prevenido pela incubação do inibidor da síntese de RNA, actinomicina D, pelo bloqueador de síntese protéica, a cicloheximida ou ainda pelo inibidor da translocação de proteínas, brefeldin A (Regoli et al., 1978; Marceau et al., 1980; Whalley et al., 1983; Audet et al., 1994; Campos e Calixto, 1994). Preparações como a artéria carótida e a artéria mesentérica de coelho, exibem um aumento progressivo da resposta relaxante a agonistas dos receptores B₁ após algumas horas de incubação *in vitro*, sendo que estas respostas também podem ser prevenidas por inibidores de síntese protéica (DeBlois e Marceau, 1987; Pruneau e Belichard, 1993). Desta forma, a indução dos receptores B₁ parece constituir um processo que ocorre em função do tempo e que depende diretamente de síntese protéica.

Provavelmente, a indução dos receptores B₁ envolve a ativação de um ou mais genes, a expressão de RNAs mensageiros, translocação ao nível dos ribossomos e o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (Hall, 1992; Menke et al., 1994).

A importância fisiopatológica do fenômeno de indução dos receptores B₁ tem sido estudada em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. A indução dos receptores B₁ *in vivo* foi demonstrada inicialmente no modelo de cistite química em ratos. Preparações de bexiga urinária obtidas de animais expostos a um detergente 20 h antes, eram contraídas em resposta ao agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK (Marceau et al., 1980). Posteriormente a indução dos receptores B₁ *in vivo* foi demonstrada no modelo de pressão arterial em coelhos, onde, ao contrário do que ocorre em animais normais, a injeção de des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina causou hipotensão de forma marcante em animais pré-tratados com doses sub-letais (10 - 40 µg) de endotoxina de *Escherichia coli* (lipopolissacarídeo bacteriano, LPS) (Marceau et al., 1983; 1984). Foi também demonstrado que as preparações obtidas de animais tratados com LPS, *in vivo*, responderam com forte contração em resposta aos agonistas seletivos de receptores B₁ des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina já a partir da primeira hora de incubação, sugerindo que os receptores foram adquiridos *in vivo*, antes do sacrifício (Regoli et al., 1981). Por outro lado, a expressão *in vitro* dos

receptores B₁ pode ser acelerada pela adição de substâncias como o LPS, o dipeptídeo murâmico e a oncostatina M (Bouthillier et al., 1987; DeBlois et al., 1989; Nwator e Whalley, 1989; Levesque et al., 1995) ou ainda expressivamente aumentada pela incubação de certas citocinas tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-8 (IL-8) e interferon γ (IFN γ) (DeBlois et al., 1991; DeKimpe et al., 1994). Glicocorticóides e inibidores de síntese protéica são capazes de bloquear o aparecimento dos receptores B₁ modulado por estas substâncias (DeBlois et al., 1988; 1989a; 1991). Evidências a respeito da indução dos receptores B₁ *in vivo* também têm sido demonstradas em modelos de hiperalgesia inflamatória em ratos, após a irradiação com raios ultravioleta, depois da injeção intra-articular de adjuvante de Freund ou após a injeção intra-articular de algumas citocinas, incluindo IL-1, IL-2 e IL-8 (Perkins et al., 1993; Perkins e Kelly, 1993; Davis et al., 1994; Kahsar et al., 1995; Perkins et al., 1995).

Todas as substâncias que induzem o aparecimento dos receptores B₁, incluindo o LPS, o dipeptídeo murâmico, a oncostatina M e as próprias citocinas (IL-1, IL-2 IL-8), possuem a capacidade de interferir com a produção autócrina de citocinas, principalmente IL-1 α e IL-1 β . Portanto, o efeito inibitório exercido pelos glicocorticóides poderia ser explicado pela inibição direta da síntese protéica de citocinas. Tem sido demonstrado, que a preparação de aorta isolada de coelho

apresenta uma produção espontânea de IL-1, mesmo em condições assépticas (Clinton et al., 1991). Além disso, a indução dos receptores B₁ na hiperalgesia causada pela injeção intra-articular de IL-1, IL-2 e IL-8 em ratos, pode ser inibida pelo antagonista do receptor de IL-1 (Davis e Perkins, 1994). Este dados mostram que os efeitos da IL-2 e da IL-8 na hiperalgesia inflamatória, são mediados através da secreção de IL-1, sugerindo que várias citocinas são capazes de influenciar a expressão funcional de receptores B₁. O envolvimento das citocinas no aparecimento dos receptores B₁ tem sido confirmado também através de estudos de binding. Dados da literatura mostram que o tratamento prolongado com o fator de crescimento epidermal (EGF), com IL-1 ou com LPS aumenta significativamente a população de receptores B₁ (B_{máx}) sem, no entanto, afetar a afinidade dos agonistas pelos receptores B₁ em células de aorta de coelho (Galizzi et al., 1994; Schneck et al., 1994; Levesque et al., 1995). Além disso, respostas funcionais, como o aumento da produção de fosfatidilinositóis, bem como a produção de prostanóides, podem ser amplificadas expressivamente pela incubação de IL-1, sugerindo a possibilidade de interações pós-receptor entre as citocinas e os agonistas dos receptores B₁ (ver para revisão Marceau, 1995; 1997).

Embora a maioria das respostas mediadas pelos receptores B₁ pareçam envolver a ativação de receptores induzidos, existem várias evidências acerca da

ocorrência de receptores B_1 constitutivos. Dados da literatura mostram que a des-Arg⁹-BK é capaz de produzir alterações cardiovasculares em gatos e cães em condições normais. Hipotensão, natriurese e respostas vasodilatadoras renais são observadas em cães normais, em resposta à des-Arg⁹-BK (Lortie et al., 1992; Nakhostine et al., 1993). Por outro lado, a injeção deste peptídeo produz efeitos hemodinâmicos complexos sobre a circulação pulmonar em gatos (DeWitt et al., 1993). Em ambos os casos, a co-existência dos receptores B_1 e B_2 foi confirmada através de agonistas e antagonistas seletivos. Foi também demonstrado que a des-Arg⁹-BK é capaz de induzir hipertensão *in vivo*, em uma cepa especial de ratos Sprague-Dawley (Cunoosamy e Wheeldon, 1995). Além disso, preparações obtidas destes animais respondem aos agonistas dos receptores B_1 de maneira constitutiva. Outros exemplos de preparações obtidas de ratos, que apresentam receptores B_1 constitutivos são o fundo de estômago e a veia porta isolados de rato (Cabrini e al., 1996). Desta forma, em algumas espécies, como ratos, suínos e coelhos, a população basal de receptores B_1 normalmente é nula, sendo que o aparecimento dos receptores B_1 está relacionado a estados patológicos. Por outro lado, em alguns casos, como é observado em cães e gatos, os receptores do tipo B_1 parecem co-existir com os receptores B_2 , de forma constitutiva em condições fisiológicas (ver para revisão: Marceau, 1997).

Ao contrário dos receptores do tipo B₁, os receptores B₂ estão distribuídos ao longo dos sistemas nervoso central e periférico, e parecem mediar a maior parte das ações fisiológicas das cininas, tendo sido identificados nos tratos gastrintestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como ao nível neuronal (Gaudrau et al., 1981; Hall e Morton, 1991; Couture et al., 1982; Maggi et al., 1989; Field et al., 1992, ver para revisão Hall e Morton, 1997). As respostas inflamatórias e nociceptivas induzidas pela BK são mediadas por receptores B₂ presentes em neurônios, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e possivelmente em macrófagos e neutrófilos. Por outro lado, as propriedades vasoativas da BK são mediadas por receptores B₂ localizados nas células endoteliais, devido à liberação de substâncias vasodilatadoras tais como óxido nítrico e prostaglandinas (Hess, 1997). Além disso, através do uso de antagonistas seletivos, tem sido demonstrado que a ativação dos receptores B₂ pode estar envolvida em várias respostas, incluindo a broncoconstrição, a hipotensão, processos inflamatórios agudos, dor e hiperalgesia (Steranka e Burch, 1991; Corrêa e Calixto, 1993; Dray e Perkins, 1993; Hall, 1997).

Os receptores B₂ podem ser caracterizados pelo uso de agonistas e antagonistas seletivos. Apresentam alta afinidade pela BK e pela calidina, enquanto os metabólitos des-Arg⁹ são praticamente inativos neste receptor. Os primeiros antagonistas seletivos e competitivos para os receptores B₂ tiveram sua estrutura

baseada no protótipo [D-Phe⁷]-BK (Vavrek e Stuart, 1985). Posteriormente, foi desenvolvida a segunda geração de antagonistas B₂, tais como o Hoe 140 e o NPC 17731, com maior afinidade e seletividade do que os primeiros (Hock et al., 1991; Kyle et al., 1991; Wirth et al., 1991). Recentemente, foram desenvolvidos os primeiros antagonistas não-peptídicos e também seletivos para os receptores B₂, o Win 64338 (Salvino et al., 1993; Sawutz, 1994) e o FR 173657, que apresenta atividade por via oral, quando testado em modelos de broncoconstrição, dor e inflamação (Asano et al., 1997; Griesbacher et al., 1997; Griesbacher e Legat, 1997).

A existência de dois receptores para as cininas foi confirmada através de estudos de biologia molecular. Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de binding têm contribuído para o desenvolvimento de radioligantes seletivos para os receptores B₁ e B₂ (Hall, 1997). Os radioligantes [³H]des-Arg⁹-calidina e [³H]des-Arg⁹-[Leu⁸]-calidina possuem alta afinidade pelos receptores B₁ e têm sido utilizados em estudos de binding para caracterizar as propriedades farmacológicas do receptor B₁. Células musculares lisas da aorta de coelho têm sido utilizadas tanto para estudos de binding, como para estudos funcionais das vias de transdução de sinais (Tropea et al., 1993; Schneck et al., 1994). Os radioligantes [³H]BK e [¹²⁵I]Tyr⁸-BK apresentam alta afinidade pelos receptores B₂ e tem sido utilizados para a identificação destes receptores em várias preparações isoladas ou culturas celulares, incluindo o íleo de

cobaia, o útero de rata e fibroblastos humanos (Ramson et al., 1992; Tropea et al., 1992; Roscher et al., 1990). Além disso, alguns estudos têm sido realizados com o radioligante [³H]NPC 17731 em células de miométrio bovino e de rato (Leeb-Lundberg et al., 1994; ver para revisão: Hess, 1997).

Os genes que codificam os receptores B₁ foram clonados em coelhos (MacNeil et al., 1995), em humanos (Menke et al., 1994; Webb et al., 1994) e em camundongos (McIntyre et al., 1993; Pesquero et al., 1996). O receptor B₁ humano possui uma seqüência de 353 aminoácidos e apresenta apenas 36 % de homologia com o receptor do tipo B₂, o que sugere que ambos os receptores podem ser componentes de sistemas regulatórios diferentes (Menke et al., 1994). Os genes que codificam os receptores B₂ foram inicialmente clonados em ratos (McEachern et al., 1991) e posteriormente em humanos (Hess et al., 1992) e em camundongos (Ma et al., 1994a). Os receptores B₂ clonados em ratos e camundongos possuem uma estrutura composta de 366 aminoácidos e apresentam 92 % de homologia entre si. Por outro lado, o receptor clonado em humanos apresenta uma seqüência de 364 aminoácidos, possuindo 81 e 84 % de homologia com os receptores do rato e do camundongo, respectivamente (Eggerickx et al., 1992; Hess et al., 1992; Powell et al., 1993). O gene do receptor B₂ de tecido humano foi mapeado no cromossomo 14q32 (Powell et al., 1993; Ma et al., 1994b; Kammerer et al., 1995) sendo que

foram identificados alguns polimorfismos para o mesmo (Braun et al., 1995). Recentemente, foi desenvolvida uma cepa de camundongos onde o gene responsável pela expressão do receptor B₂ foi deletado (Borkowski et al., 1995). A existência desta cepa de animais permite avaliar o papel dos receptores B₂ para as cininas em fenômenos como o processo inflamatório e a pressão arterial, bem como avaliar a possível existência de múltiplos genes que codifiquem subtipos do receptor B₂ (Borkowski e Hess, 1995). Os estudos de biologia molecular mostram ainda que os receptores B₁ e B₂ para as cininas são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G que apresentam 7 domínios transmembrana. Além disso, a clonagem e a caracterização farmacológica dos receptores para cininas têm demonstrado que existem variações entre espécies, em relação a afinidade de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂, sugerindo a existência de subtipos de receptores (Field et al., 1994; Butt et al., 1995).

As ações mediadas pelos receptores para as cininas podem envolver múltiplas vias de transdução de sinal, através de sistemas de segundos mensageiros. Os receptores B₁ e B₂ para as cininas são preferencialmente acoplados à uma proteína do tipo G_q (Gutowski et al., 1991) e na maioria das vezes sua ativação está relacionada com estimulação da fosfolipase C, com conseqüente formação de inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O aumento dos níveis de IP₃ resulta

em influxo de cálcio intracelular (Lee et al., 1993) enquanto a formação de DAG promove ativação de isoformas específicas da proteína quinase C (Tippmer et al., 1994). Os eventos celulares estimulados pelos receptores para cininas podem ainda envolver a mobilização de cálcio, ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio, transporte de íons cloreto, a ativação da adenilato ciclase, formação de óxido nítrico ou aumento expressivo dos níveis de prostanóides em resposta a ativação da fosfolipase A₂ (Burch e Axelrod, 1987; Burch et al., 1990; Bhoola et al., 1992; Farmer e Burch, 1992; Hall et al., 1992; Burch, 1993).

O sistema de cininas exerce um papel central no desenvolvimento de processos inflamatórios agudos e crônicos. Os efeitos pró-inflamatórios causados pelas cininas têm sido extensivamente revisados e confirmam a participação dos receptores B₁ e B₂ na patofisiologia de várias doenças inflamatórias, incluindo pancreatite, artrite reumatóide, desordens do trato genitourinário, asma, rinite alérgica, bem como dor e hiperalgesia, além de participação na inflamação neurogênica (Lewis, 1970; Marceau et al., 1983; Roch-Arveiller et al., 1985; Hargreaves et al., 1988; Proud e Kaplan, 1988; Bhoola et al., 1992; Hall e Morton, 1997). A resposta inflamatória aguda é caracterizada por vasodilatação, extravasamento plasmático e aderência de neutrófilos (Polosa et al., 1993). Os efeitos inflamatórios das cininas são mediados por receptores B₁ e B₂, por ação

direta sobre a microvasculatura endotelial ou indiretamente através da estimulação da liberação de neuropeptídeos a partir de fibras aferentes e pelo recrutamento e mobilização de células imunes para o sítio inflamatório. Além disso, os efeitos inflamatórios das cininas podem ser amplificados através da interação com outros mediadores do processo inflamatório, freqüentemente ao nível dos segundos mensageiros. Finalmente, existem também evidências substanciais que sugerem o envolvimento de ambos receptores B_1 e B_2 no início e na amplificação de processos dolorosos, incluindo a alodinia e hiperalgesia de origem inflamatória (Perkins et al., 1993; Perkins e Kelly, 1993; Ferreira et al., 1993; Dray, 1995; Rang e Urban; 1995) ver para revisão: Hall e Morton, 1997).

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Analisar os mecanismos envolvidos na resposta edematogênica induzida pela BK através do uso de agonistas e antagonistas seletivos para as cininas, bem como analisar a possível interação da BK com outros mediadores do processo inflamatório;

2. Verificar a influência da dessensibilização dos receptores B₂ para as cininas e do tratamento agudo com endotoxina de *E. coli* sobre a indução dos receptores B₁ para as cininas, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas mediadas pelos receptores B₁ no edema de pata de rato.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar (150-180 g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, e com livre acesso à água e ração até a hora dos experimentos. Os animais foram aclimatizados no laboratório durante um período de pelo menos 1 hora. Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 horas.

Procedimentos experimentais

Medida do edema de pata

O procedimento utilizado para a avaliação do edema de pata foi similar àquele descrito por Winter et al. (1962) com pequenas modificações. Os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e receberam, por via intraplantar e na pata direita, 0,1 ml de salina tamponada com fosfato (PBS; composição em mmol/litro: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) contendo BK, des-Arg⁹-BK (agonista seletivo de receptores B₁) ou tirosina⁸-BK (agonista seletivo de receptores B₂) (0,3 - 300 nmol/pata). A pata esquerda recebeu o mesmo volume (0,1 ml) de PBS e foi utilizada como controle. O aumento do volume foi medido

pletismometricamente (Pletismômetro, Ugo Basile, Itália) em vários intervalos de tempo (10, 20, 30, 60 e 120 minutos após a injeção das cininas) ou apenas no pico do edema (20 minutos). A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (em ml) e tomada como índice de edema. Em todos os experimentos os animais foram pré-tratados com o inibidor da cininase II, o captopril (5 mg/kg, 1 h, s.c.), a fim de prevenir a degradação das cininas (Corrêa et al., 1993).

Análise da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação no edema de pata de rato

Com o objetivo de verificar o efeito sinérgico da associação entre vários mediadores da inflamação com a BK, no edema de pata de rato, os animais receberam, por via intraplantar e na pata direita, 0,1 ml de PBS contendo BK (1 nmol/pata) injetada isoladamente ou associada com um dos seguintes mediadores do processo inflamatório: substância P (SP), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), fator de agregação plaquetária (PAF), serotonina (5-HT) ou histamina, em doses de 1 pmol a 1 nmol/pata. Em outros grupos de animais, a fim de analisar a possível interação dos mediadores entre si, foram co-injetados SP, PGE₂, PGI₂, CGRP, PAF, 5-HT e histamina (todos 1 nmol/pata) em diferentes combinações binárias. O edema foi

avaliado como descrito anteriormente. Os efeitos da interação foram verificados comparando-se os edemas produzidos pela associação dos mediadores com a BK, com os edemas produzidos pela injeção dos mediadores isoladamente.

Para verificar o envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para a BK na resposta edematogênica resultante da associação entre a BK e os outros mediadores inflamatórios, os animais receberam uma co-injeção do antagonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (200 nmol/pata) ou dos antagonistas seletivos dos receptores B_2 , o Hoe 140 ou o NPC 17731 (0,1 - 3 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema de pata produzido pela associação da BK e dos outros mediadores da inflamação, na ausência ou na presença dos referidos antagonistas.

Influência da dessensibilização dos receptores B_2 sobre a resposta edematogênica resultante da interação entre a BK e outros mediadores da inflamação

A fim de verificar a especificidade da interação entre a BK e os outros mediadores envolvidos no processo inflamatório, bem como analisar os mecanismos relacionados com este processo, os animais foram dessensibilizados segundo o método descrito anteriormente por Martins et al. (1992). A dessensibilização foi

induzida através da injeção intraplantar diária de BK (10 nmol/pata), por um período de 7 dias. A pata contralateral recebeu apenas PBS e foi utilizada como controle. O edema foi avaliado diariamente, 20 minutos depois da injeção de BK. No oitavo dia, quando os animais já estavam completamente dessensibilizados ao efeito edematogênico da BK, receberam uma injeção intraplantar (0,1 ml) contendo BK (1 nmol/pata) em associação com PGE₂, PGI₂ ou SP (todos 1 nmol/pata).

Com o objetivo de analisar se o processo de dessensibilização era seletivo, outros grupos de animais que haviam sido dessensibilizados à BK, receberam injeções intraplantares dos seguintes mediadores: PGE₂ (10 nmol/pata), SP (3 nmol/pata), PAF (10 nmol/pata) ou histamina (100 nmol/pata). O edema foi avaliado como descrito anteriormente, comparando-se as respostas obtidas nos animais controle com aquelas obtidas nos animais dessensibilizados à BK.

Em uma outra série de experimentos, a fim de analisar a influência de outros mediadores da inflamação sobre o processo de dessensibilização induzido pela BK, os animais receberam uma injeção intraplantar contendo SP ou PGE₂ (ambas 10 nmol/pata) em associação com BK (10 nmol/pata) no primeiro dia da indução da dessensibilização. Nos dias subsequentes (2 - 7 dias) os animais receberam apenas BK (10 nmol). O edema de pata foi avaliado diariamente conforme a descrição anterior.

Efeito da dessensibilização dos receptores B₂ sobre o edema de pata induzido pelo agonista seletivo dos receptores B₁, a des-Arg⁹-BK

Com o objetivo de analisar o efeito da dessensibilização dos receptores B₂ sobre o edema de pata causado pelo agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK, as patas foram dessensibilizadas através da injeção diária de BK (10 nmol/pata), durante 7 dias, conforme a descrição anterior. No oitavo dia, os animais dessensibilizados à BK receberam uma injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata). O edema de pata foi avaliado como descrito anteriormente.

Para comprovar o possível envolvimento dos receptores B₁ no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em animais dessensibilizados à BK, um outro grupo de animais recebeu uma injeção intraplantar do antagonista de receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (200 nmol/pata) em conjunto com a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata).

Em uma outra série de experimentos, a fim de verificar a participação de síntese protéica no edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais dessensibilizados à BK, os animais foram tratados por via subcutânea (s.c.) com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/kg), ou com salina (0,9 %), 24 h antes da injeção da des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata).

Influência do tratamento com endotoxina de *Escherichia coli* (LPS) sobre o edema de pata de rato causado por agonistas dos receptores B₁ e B₂

Para investigar a influência do tratamento agudo com endotoxina obtida de *Escherichia coli* (lipopolissacarídeo bacteriano, LPS) sobre o edema de pata causado por agonistas seletivos de receptores B₁ e B₂ de BK, os animais foram tratados por via endovenosa (e.v.) com LPS (10 µg/animal) ou com salina (0,9 %) 24 h antes dos experimentos. O edema de pata foi induzido pela injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B₁ de BK, des-Arg⁹-BK (3 - 300 nmol/pata), ou pela injeção do agonista seletivo de receptores B₂, a tirosina⁸-BK (3 nmol/pata). O edema foi avaliado como descrito anteriormente, comparando-se as respostas obtidas nos animais tratados com salina, com aquelas obtidas nos animais tratados com LPS.

A fim de determinar os receptores envolvidos na resposta edematogênica produzida pela des-Arg⁹-BK em animais previamente tratados com LPS, os animais receberam uma injeção intraplantar contendo o antagonista de receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 - 300 nmol/pata) ou os antagonistas de receptores B₂, Hoe 140 e NPC 17731 (ambos, 10 nmol/pata) em conjunto com a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela des-Arg⁹-BK na presença ou ausência dos antagonistas.

Com o objetivo de verificar o possível envolvimento de síntese protéica no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) nos ratos tratados com LPS, outros grupos de animais foram tratados previamente com o glicocorticoide, dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), 24 e 48 h antes dos experimentos, ou com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c.) 24 h antes dos experimentos. Os animais controle foram tratados com salina (0,9 %) nos mesmos intervalos de tempo.

A fim de avaliar a participação de metabólitos do ácido araquidônico, no desenvolvimento do edema de pata à des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em ratos tratados com LPS, os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o inibidor da ciclooxigenase indometacina (2 mg/kg) 1 h antes dos experimentos. Os animais controle foram tratados com salina (0,9 %) e o edema de pata avaliado como descrito acima.

Influência do tratamento com LPS sobre o edema de pata induzido por outros mediadores da inflamação

Em outra série de experimentos, com o objetivo de investigar os efeitos do tratamento agudo com LPS, sobre o edema de pata causado por outros mediadores do processo inflamatório, os animais foram pré-tratados com LPS (10 µg/kg, i.v.) ou

com salina (0,9 %), com descrito anteriormente, e 24 h depois, o edema de pata foi induzido pela injeção intraplantar de histamina (100 nmol/pata), SP (3 nmol/pata), PGE₂ (10 nmol/pata) ou 5-HT (10 nmol/pata). O edema foi avaliado como descrito anteriormente, comparando-se as respostas obtidas nos animais tratados com salina, com aquelas obtidas nos animais tratados com LPS.

Análise da interação entre a des-Arg⁹-BK e alguns mediadores da inflamação no edema de pata de animais tratados com LPS

Para analisar a possível interação do agonista seletivo de receptores B₁ des-Arg⁹-BK, com outros mediadores do processo inflamatório, os animais tratados com LPS receberam uma injeção intraplantar (0,1 ml) de PBS contendo des-Arg⁹-BK isoladamente ou associada a um dos seguintes mediadores químicos da inflamação: SP, PGE₂, PGI₂, CGRP, PAF, 5-HT ou histamina (todos 1 nmol/pata). O edema de pata foi avaliado como descrito anteriormente. Os efeitos da interação foram verificados comparando-se os edemas produzidos pela associação dos mediadores com a des-Arg⁹-BK, com aqueles produzidos pela injeção dos mediadores isoladamente nos animais tratados com LPS.

Com o objetivo de confirmar o envolvimento dos receptores B₁ para as cininas no edema de pata produzido pela associação de des-Arg⁹-BK com outros

mediadores inflamatórios em ratos tratados com LPS, os animais receberam uma injeção intraplantar conjunta do antagonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100- 300 nmol/pata). A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema de pata produzido pela associação da des-Arg⁹-BK com os mediadores da inflamação, na ausência ou na presença do antagonista.

Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: BK, des-Arg⁹-BK, tirosina⁸-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, substância P, prostaglandina E₂, prostaglandina I₂ (Iloprost, análogo estável da PGI₂), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, serotonina, histamina, captopril, dexametasona, cicloheximida, indometacina, lipopolissacarídeo bacteriano (*Escherichia coli*, sorotipo: 0111 B4) (todas obtidas da Sigma Chemical Company, St.Louis, EUA), fator de agregação plaquetária (Bachem, Suécia). O Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) e o NPC 17731 (D-Arg⁰-Arg¹-Pro²-Hyp³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-[D-Hype³(transpropyl)⁷]-Oic⁸-Arg⁹), foram cedidos gentilmente pela Hoechst (Frankfurt, Alemanha) e pela Scios/Nova Corporation (Baltimore, EUA), respectivamente. As soluções-estoque para todos os peptídeos foram preparadas em PBS (1 - 10 mM) em tubos siliconizados, mantidas a -18 °C e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos. As outras drogas foram diluídas em salina, com exceção da dexametasona e indometacina que foram diluídas em 5% de etanol.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média, exceto os valores individuais de DE_{50} ou DI_{50} (ou seja, doses dos agonistas que produziram 50 % da resposta máxima, ou doses dos antagonistas que reduziram a formação do edema em 50 % em relação aos controles, respectivamente). Esses valores foram expressos como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95 % e calculados através de interpolação gráfica em papel semilogarítmico. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste “t” de Student ou por análise de variância, seguida pelo teste de Dunnett, quando apropriado. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS

Edema de pata induzido pela BK

Os resultados da figura 1A mostram que a injeção intraplantar de BK (0,3 a 30 nmol/pata) em ratos pré-tratados com captopril (5 mg/kg, s.c., 1h), causou edema de pata de maneira dose-dependente, com DE_{50} (nmol/pata) (juntamente com o intervalo de confiança) de 1,9 (1,2 - 2,4), sendo que a resposta máxima obtida foi de $0,43 \pm 0,04$ ml. Por outro lado, a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol/pata), produziu apenas um discreto aumento de volume na pata ($0,06 \pm 0,009$ ml) (figura 1B).

O edema de pata induzido pela BK (3 nmol/pata), foi significativamente inibido pela co-injeção dos antagonistas seletivos de receptores B_2 , Hoe 140 e NPC 17731 (ambos 3 nmol/pata). As inibições observadas com os dois antagonistas, foram de (média \pm e.p.m.) 41 ± 5 % e 49 ± 3 %, respectivamente. Por outro lado, a co-injeção do antagonista de receptores B_1 , des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (200 nmol/pata), não foi capaz de interferir com o edema de pata causado pela BK (figura 1C).

Interação entre a BK e outros mediadores da inflamação

A injeção intraplantar de BK (1 nmol/pata) causou edema de pata de pequena intensidade ($0,17 \pm 0,05$ ml). Além disso, os seguintes mediadores do processo inflamatório: SP, PGI₂, PGE₂, CGRP, 5-HT, PAF ou histamina (1 nmol/pata), quando

injetados isoladamente, causaram pequena ou nenhuma alteração de volume nas patas (figuras 2 e 3). Entretanto, a injeção intraplantar de BK (1 nmol/pata) em associação com SP, PGI₂, PGE₂, CGRP, PAF ou 5-HT em doses entre 1 pmol e 1 nmol/pata, produziu potencialização significativa e dose-dependente do edema de pata de rato (figuras 2 e 3). A ordem de potências relativas observada foi (DE₅₀, pmol/pata, juntamente com o limite de confiança 95 %, obtidas em 20 min): SP (8,1; 6,7 - 9,1) > PAF (13,7; 10,2 - 16,8) > PGI₂ (20,5; 19,2 - 22,1) > 5-HT (23,8; 22,9 - 25,3) > CGRP (25,7; 23,4 - 26,3) > PGE₂ (52,0; 50,4 - 57,6). As respostas máximas obtidas pela co-injeção de BK com os outros mediadores da inflamação foram (ml): PGE₂ (0,71 ± 0,02); PGI₂ (0,66 ± 0,03); 5-HT (0,65 ± 0,01); SP (0,63 ± 0,06); CGRP (0,60 ± 0,05) e PAF (0,47 ± 0,02). Ao contrário do que foi observado em relação aos outros mediadores da inflamação, a co-injeção histamina (1 nmol/pata) não foi capaz de promover potencialização do edema de pata causado pela BK (1 nmol/pata) (figura 3C).

Por outro lado, a co-injeção de SP, PGE₂, PGI₂, CGRP, PAF e 5-HT (1 nmol/pata) em diferentes combinações, produziu edema de pata de intensidade correspondente a somação de seus efeitos individuais, alcançando no máximo 50 % da resposta observada pela associação desses mediadores com a bradicinina (resultados não apresentados).

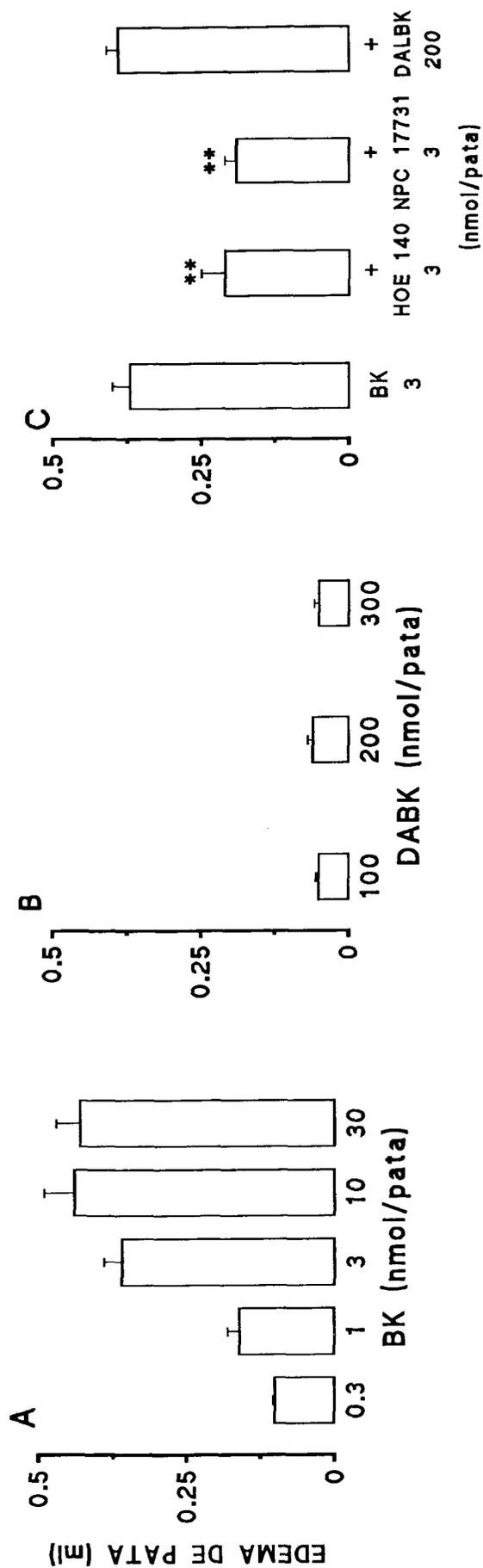


FIGURA 1 - Edema de pata de rato causado pela injeção intraplantar de BK (0,3 - 1 nmol/pata) (A) ou de des-Arg⁹-BK (DABK, 100 -300 nmol/pata) (B). Efeito causado pela co-injeção de Hoe 140 (3 nmol/pata), NPC 17731 (3 nmol/pata) ou des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (DALBK, 200 nmol/pata) sobre o edema de pata induzido pela BK (3 nmol/pata) (C). Cada coluna representa a média de 5 animais e as barras verticais indicam os erros padrão da média.

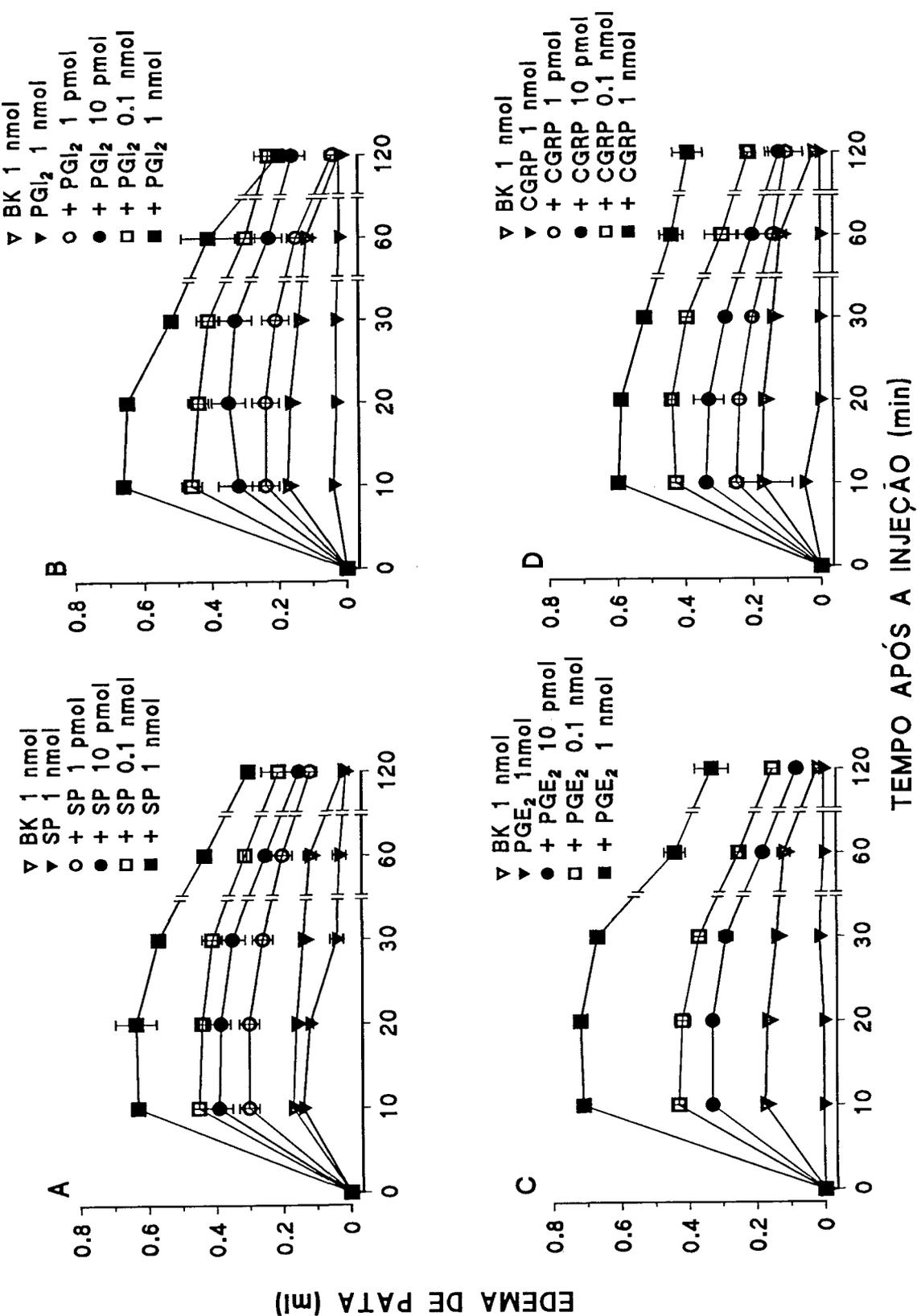


FIGURA 2 - Edema de pata de rato resultante da interação entre a BK (1 nmol/pata) e SP (A), PGI₂ (B), PGE₂ (C) ou CGRP (D) (1pmol - 1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os erros padrão da média.

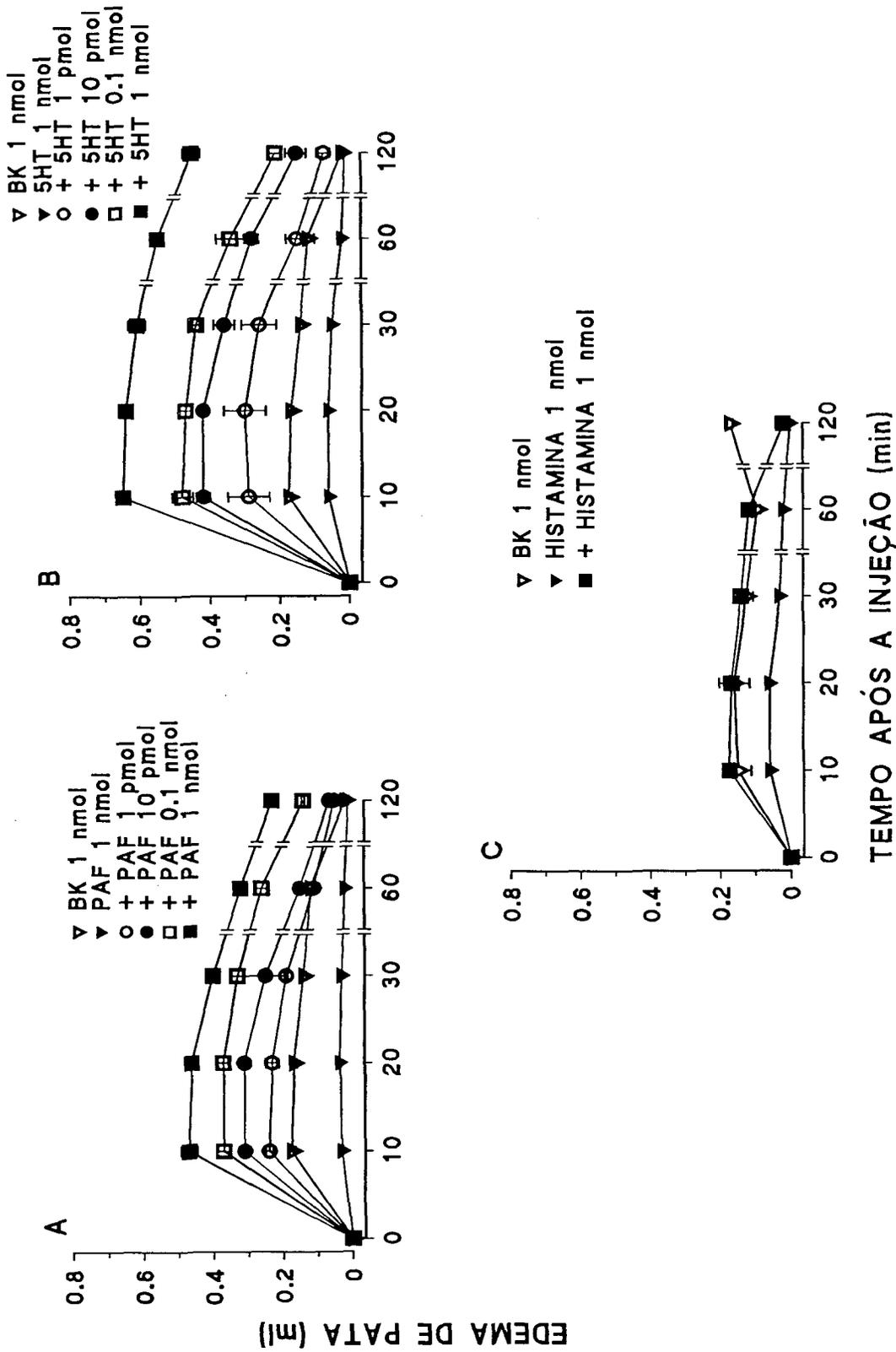


FIGURA 3 - Edema de pata de rato resultante da interação entre a BK (1 nmol/pata) e PAF (A), 5-HT (B), histamina (C) ou CGRP (D) (1pmol - 1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os erros padrão da média.

Quando injetados isoladamente os antagonistas seletivos dos receptores B₂ para as cininas, o Hoe 140 e o NPC 17731 (0,1 - 3 nmol/pata) não causaram qualquer alteração de volume nas patas. Entretanto, a co-injeção destes antagonistas com bradicinina (1 nmol/pata) associada à PGE₂, PGI₂, SP ou ao CGRP foi capaz de inibir significativamente e de forma dose-dependente a resposta edematogênica resultante da associação entre a BK e os outros mediadores da inflamação (figuras 4 e 5). As DI₅₀ (nmol/pata, juntamente com os limites de confiança 95 %) obtidas para o Hoe 140 foram: 1,4 (0,9 - 2,0); 1,3 (0,8 - 2,2); 1,5 (1,1 - 2,0) e 1,1 (0,9 - 2,2), enquanto que para o NPC 17731 foram 1,0 (0,9 - 1,1); 1,0 (0,8 - 1,2); 0,7 (0,6 - 1,4), na presença de PGE₂, PGI₂, CGRP e SP, respectivamente.

Ao contrário do que foi observado em relação aos antagonistas de receptores B₂, a co-injeção do antagonista de receptores B₁, des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (200 nmol/pata), não foi capaz de interferir com o edema de pata causado pela associação de BK com os outros mediadores da inflamação (resultados não apresentados).

Influência da dessensibilização dos receptores B₂ sobre a potencialização da resposta edematogênica à BK

Os dados da figura 6A mostram que a injeção diária de BK (10 nmol/pata) durante 7 dias foi capaz de induzir dessensibilização progressiva do edema de pata à BK. A inibição máxima foi obtida no sétimo dia, e foi correspondente a 93 ± 3 %.

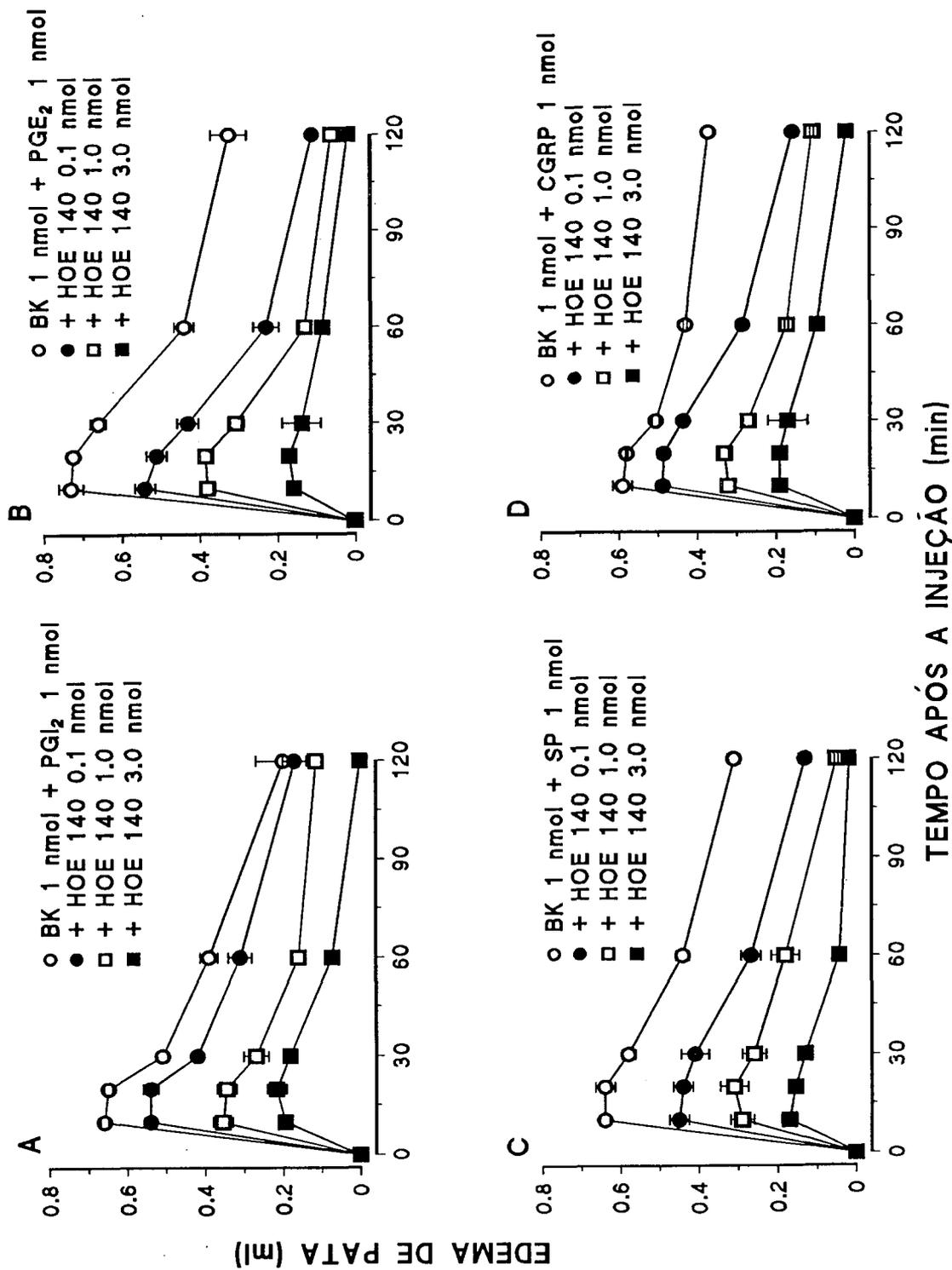


FIGURA 4 - Efeito da injeção intraplantar de Hoe 140 (0,1; 1 e 3 nmol/pata) em conjunto com a BK (1 nmol/pata) e PGI₂ (A), PGE₂ (B), SP (C) e CGRP (D) (1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais os erros padrão da média.

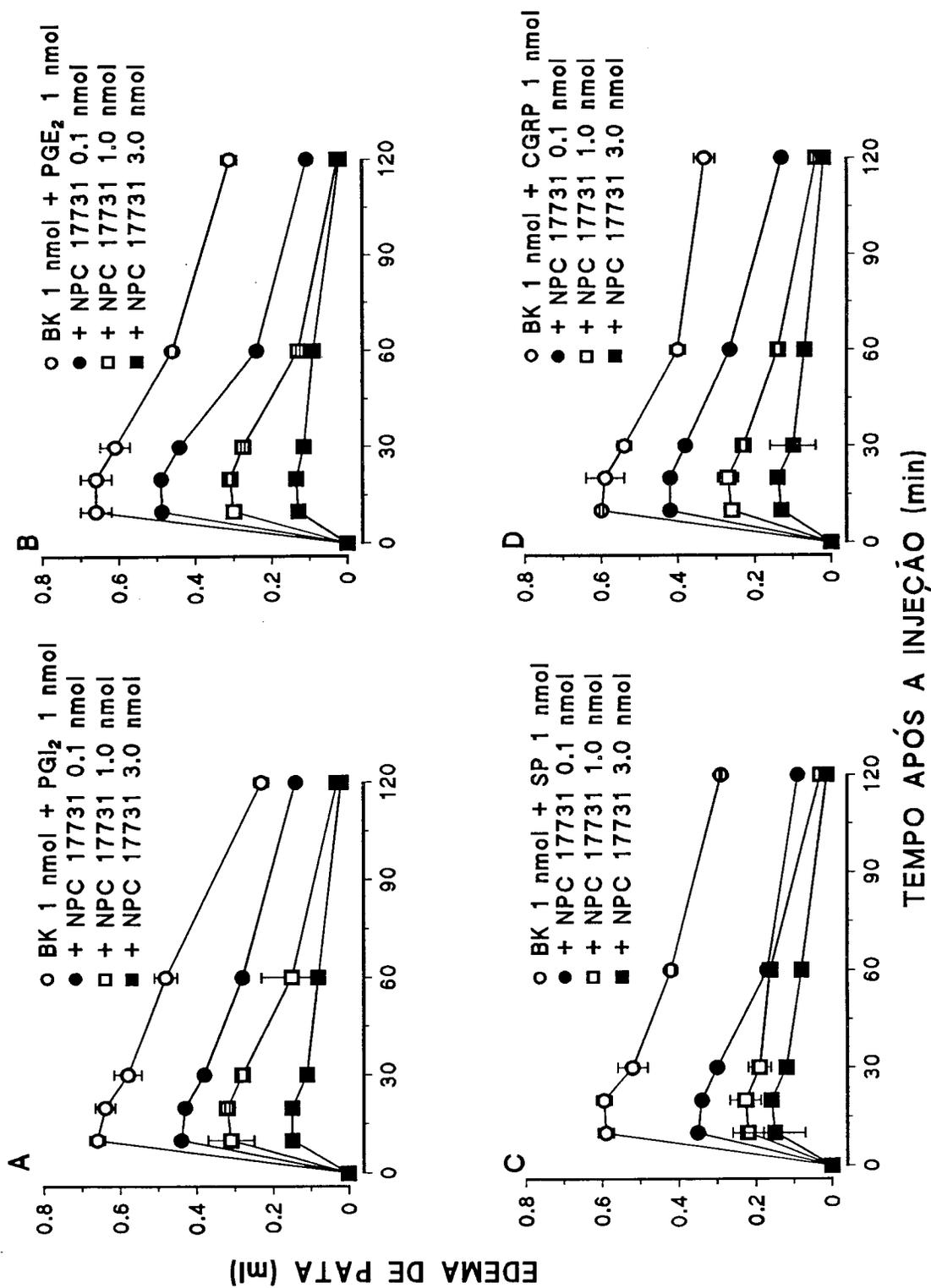


FIGURA 5 - Efeito da injeção intraplantar de NPC 17731 (0,1; 1 e 3 nmol/pata) em conjunto com a BK (1 nmol/pata) e PGE₂ (A), PGE₂ (B), SP (C) e CGRP (D) (1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais os erros padrão da média.

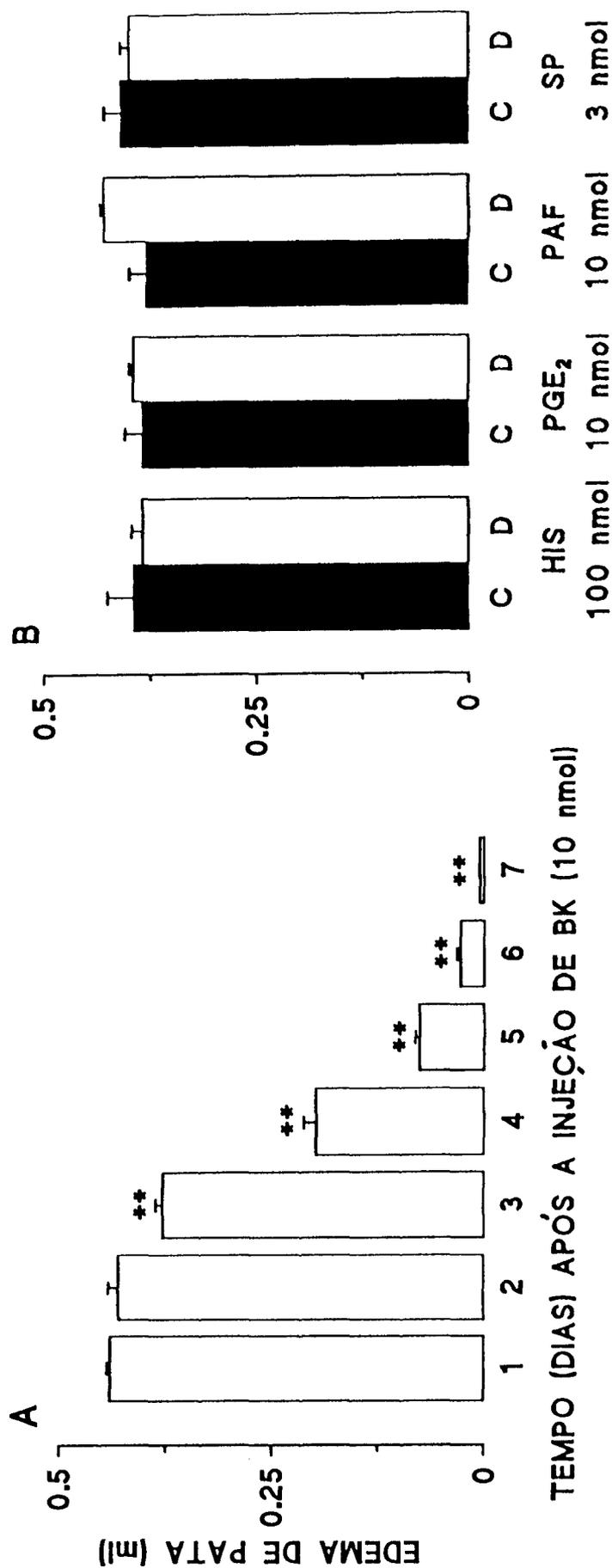


FIGURA 6 - (A) Dessensibilização induzida por injeções intraplantares diárias de BK (10 nmol/pata) durante 7 dias. (B) Edema de pata de rato induzido por histamina (HIS, 100 nmol/pata), PGE₂ (10 nmol/pata), PAF (10 nmol/pata) e SP (3 nmol/pata) em animais controle (C, colunas fechadas) ou dessensibilizados à BK (D, colunas abertas). Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais os erros padrão da média. ** P < 0,01.

A dessensibilização observada foi específica para a BK, uma vez que as injeções intraplantares de doses equipotentes de histamina (100 nmol/pata), PGE₂ (10 nmol/pata), PAF (10 nmol/pata) ou SP (3 nmol/pata) produziram edema de mesma intensidade tanto em patas normais quanto nas patas dessensibilizadas à BK (figura 6B).

A injeção intraplantar de BK (1 nmol/pata) em conjunto com a PGE₂, PGI₂ ou SP (todos 1 nmol/pata) em patas dessensibilizadas, causou potencialização do edema de pata induzido pela BK, embora essas respostas tenham sido menores do que as observadas em patas normais. As respostas obtidas (ml) na presença de PGE₂, PGI₂ e SP foram: $0,52 \pm 0,06$; $0,54 \pm 0,02$ e $0,39 \pm 0,01$, em animais dessensibilizados e $0,7 \pm 0,02$; $0,63 \pm 0,01$ e $0,6 \pm 0,02$ ml, em animais normais, respectivamente (figura 7).

O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 24 h antes) reduziu de maneira significativa o edema de pata causado pela associação de BK (1 nmol/pata) com PGE₂ ou PGI₂ nas patas dessensibilizadas à BK. As inibições observadas foram de $59 \pm 4 \%$ e $48 \pm 5 \%$, respectivamente (figura 8).

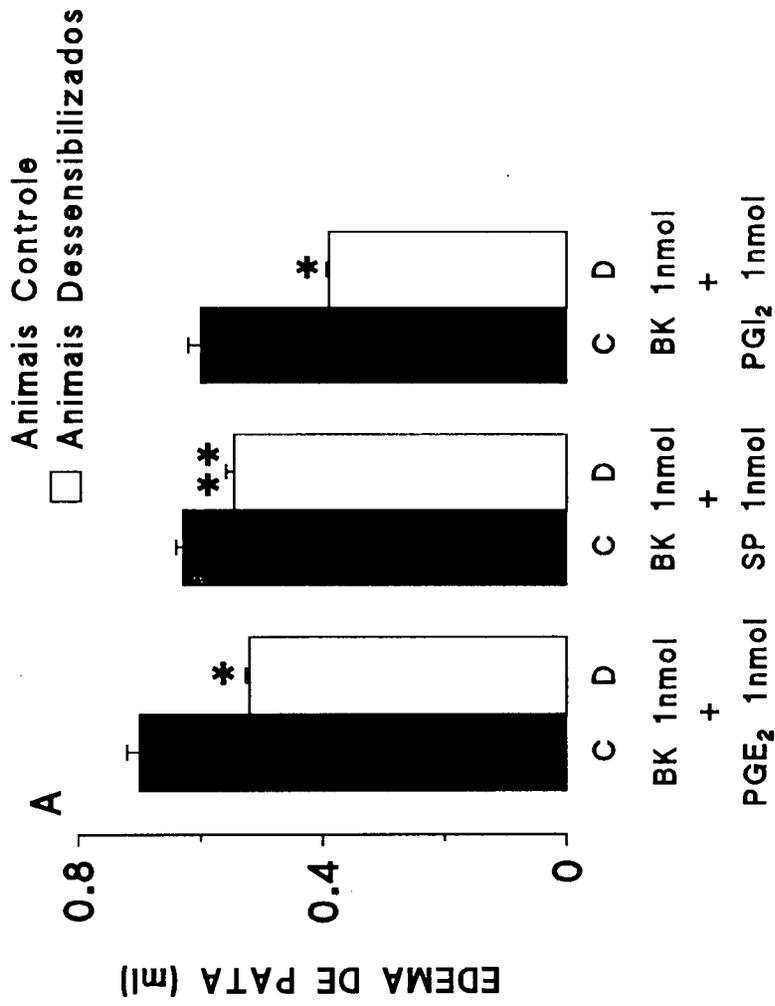


FIGURA 7 - Edema de pata de rato resultante da interação entre a BK (1 nmol/pata) e PGE₂, PGI₂ ou SP (1 nmol/pata) em animais controle (C, colunas fechadas) ou dessensibilizados à BK (D, colunas abertas). Cada coluna representa a média de 5 animais e as linhas verticais os erros padrão da média. * P < 0,05; ** P < 0,01.

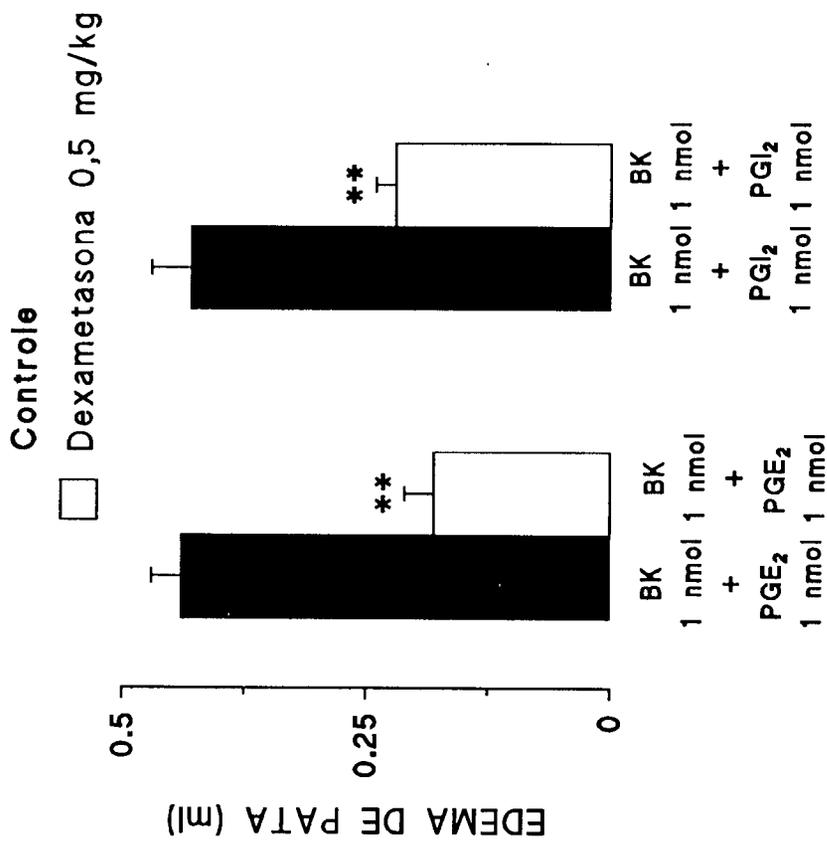


FIGURA 8 - Efeito do tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg; s.c., 24 h) sobre o edema de pata causado pela associação de BK (1 nmol/pata) com PGE₂ ou PGI₂ (1 nmol/pata) em patas dessensibilizadas à BK. Cada coluna representa a média 5 animais e as barras verticais os erros padrão da média. ** P < 0,01.

A figura 9 mostra que a associação de SP (10 nmol/pata) ou PGE₂ (10 nmol/pata) com BK (10 nmol/pata) no primeiro dia da indução da dessensibilização, foi capaz de prevenir parcialmente, mas de forma significativa o desenvolvimento da dessensibilização induzida pela BK. As inibições máximas observadas foram 78 ± 2 % e 53 ± 3 %, nos animais que receberam SP e PGE₂, respectivamente, comparada com 93 ± 3 % de inibição, quando a dessensibilização foi induzida na ausência destes mediadores.

Efeito da dessensibilização dos receptores B₂ para a BK sobre o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK

Como observado anteriormente, a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol/pata) causou apenas uma discreta alteração de volume das patas ($0,06 \pm 0,009$ ml). Entretanto, a injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais cujas patas haviam sido dessensibilizadas à BK, resultou na formação de edema de forma expressiva ($0,25 \pm 0,03$ ml), em valores correspondentes a cerca de 60 % da resposta edematogênica produzida pela BK em animais normais. A co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 nmol/pata) inibiu significativamente (36 ± 6 %) o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais dessensibilizados (figura 10 A).

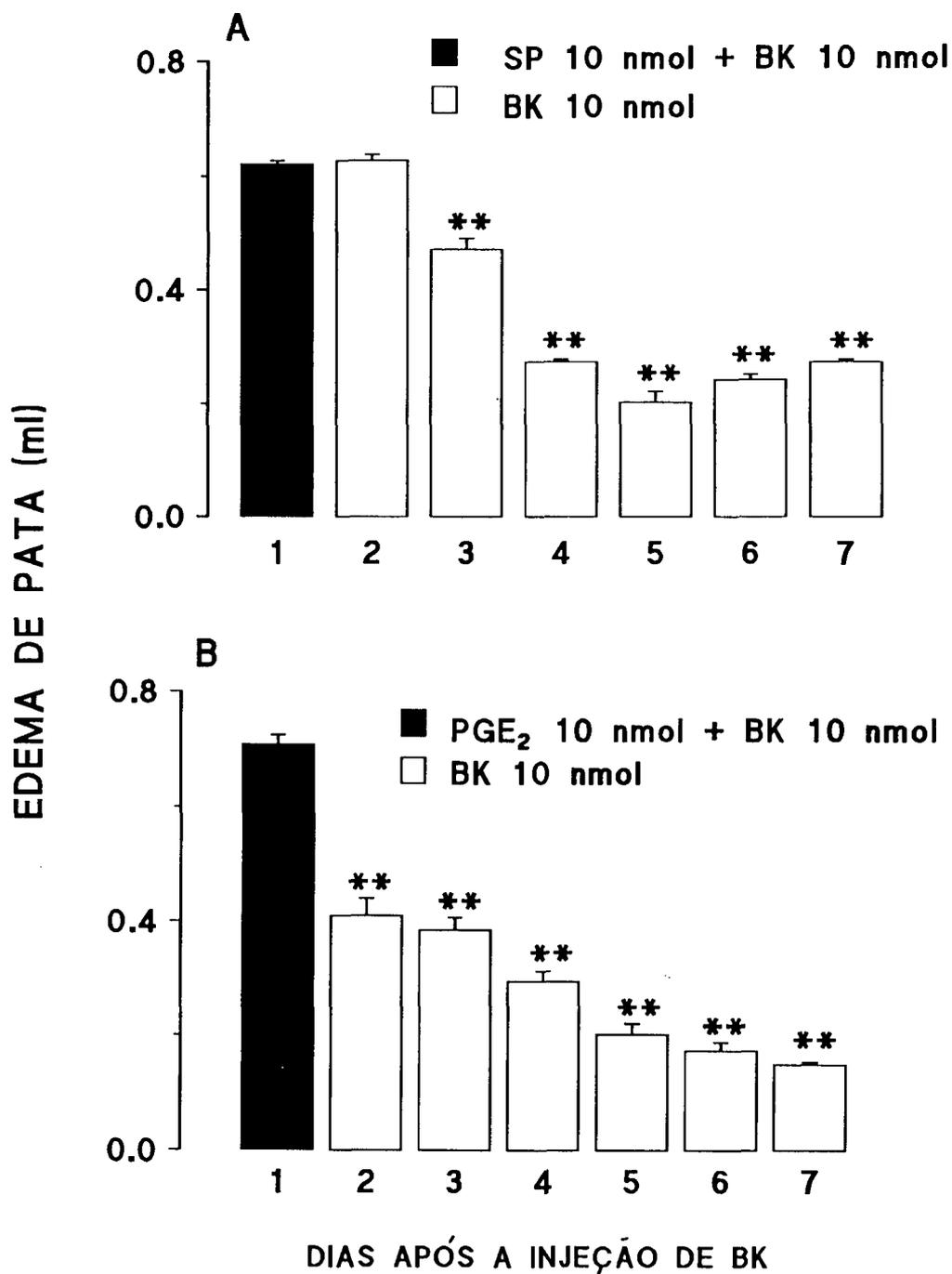


FIGURA 9 - Influência da associação entre SP (A) ou de PGE₂ (B) (10 nmol/pata) com a BK (10 nmol/pata) sobre o processo de dessensibilização induzido pela BK. Cada coluna representa a média de 6 animais e as colunas verticais os erros padrão da média. ** P < 0,01.

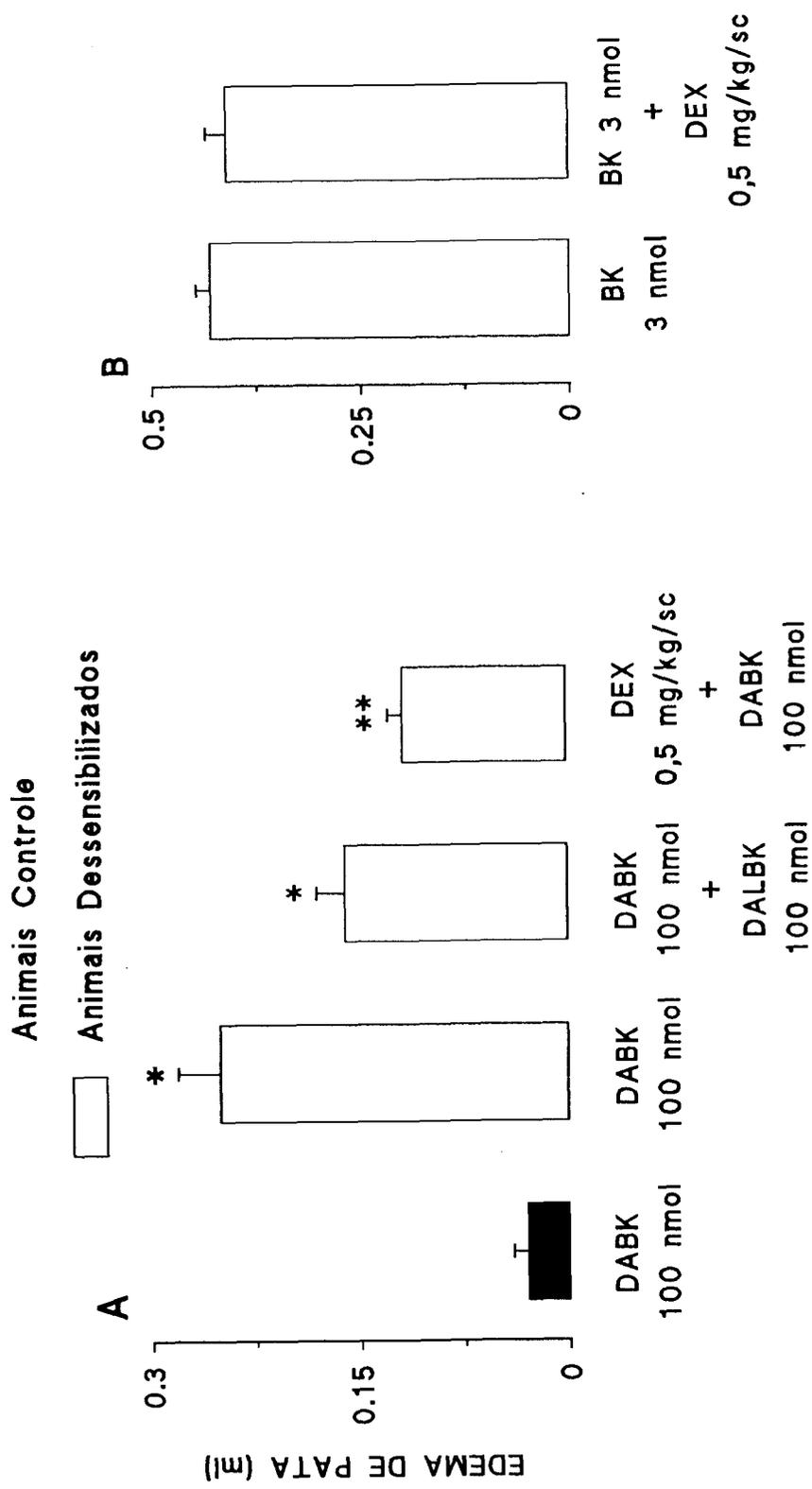


FIGURA 10 - (A) Efeito da injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (DABK, 100 nmol/pata) em patas normais e em patas dessensibilizadas à BK. Efeito da co-injeção de des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (DALBK, 100 nmol/pata) ou do tratamento com dexametasona (DEX, 0,5 mg/kg; s.c.; 24 h) sobre o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em patas dessensibilizadas à BK. (B) Efeito do tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.; 24 h) sobre o edema de pata causado pela BK em animais normais. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras verticais os erros padrão da média. * P < 0,05; ** P < 0,01.

O tratamento sistêmico dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 24 h) causou inibição significativa do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais dessensibilizados à BK (53 ± 4 %) (figura 10A). Por outro lado, o mesmo tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 24 h) em animais controle, não foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela BK (3 nmol/pata) (figura 10 B).

Efeito do tratamento agudo com LPS sobre o edema de pata de rato causado por agonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ para as cininas

Em animais controle, a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol) causou apenas uma discreta alteração de volume ($0,04 \pm 0,003$ ml), enquanto que a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B₂, a tirosina⁸-BK (0,3 - 10 nmol/pata) induziu a formação de edema de pata de forma marcante e dose-dependente. A DE₅₀ obtida para a tirosina⁸-BK (nmol/pata, juntamente com o limite de confiança 95 %) foi de 1,3 (1,0 - 1,5) com resposta máxima de 0.39 ± 0.05 ml. Entretanto, nos animais tratados sistemicamente com LPS (10 µg/animal, e.v.) 24 h antes dos experimentos, a injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), causou aumento expressivo do volume da pata ($0,46 \pm 0,08$ ml). Ao contrário, o edema de pata resultante da injeção intraplantar de

tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) foi reduzido significativamente ($79 \pm 4 \%$) nos animais tratados com LPS ($0,075 \pm 0,01$ ml) (figuras 11A e B).

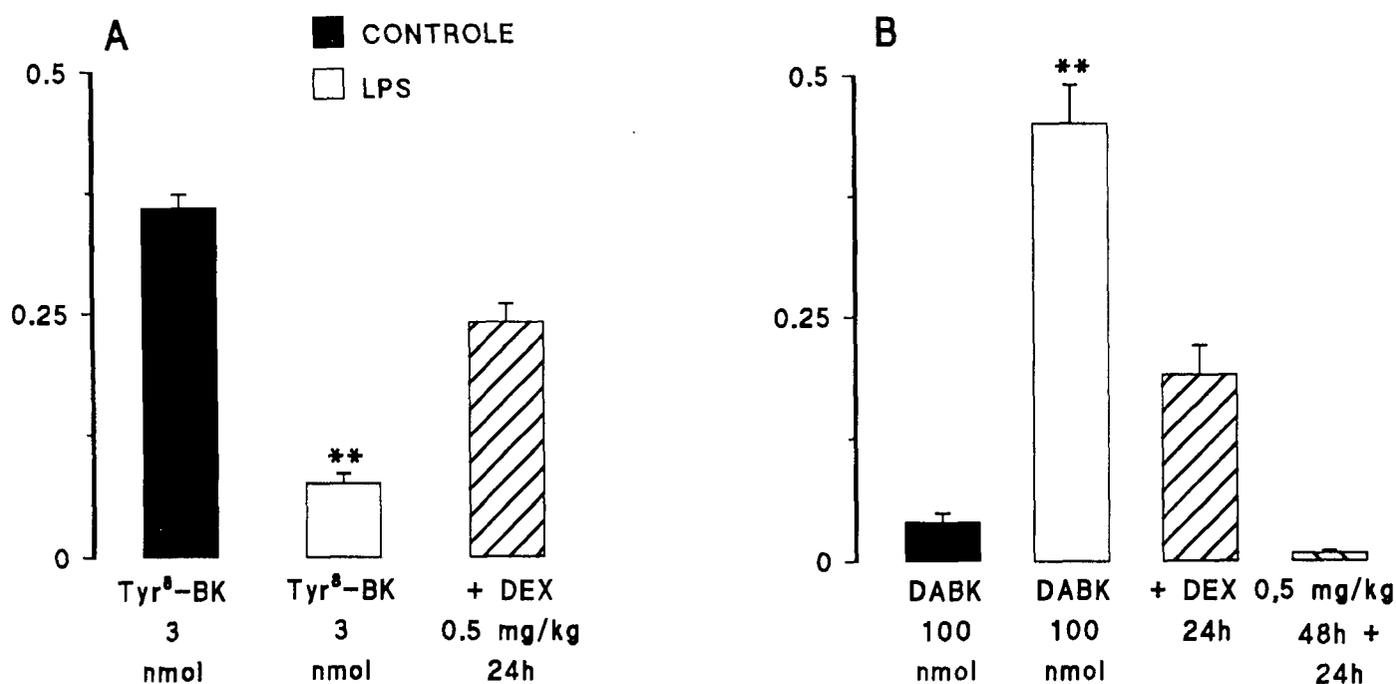


FIGURA 11 - Edema de pata de rato causado pela injeção intraplantar de tirosina⁸-BK (Tyr⁸-BK, 3 nmol/pata) (A) ou des-Arg⁹-BK (DABK, 100 nmol/pata) (B) em animais tratados com salina ou com LPS (10 µg/animal; c.v.; 24 h, antes). Efeito do tratamento com dexametasona (DEX, 0,5 mg/kg; s.c.; 24 e 48 h) sobre o edema de pata induzido por tirosina⁸-BK (Tyr⁸-BK, 3 nmol/pata) (A) ou des-Arg⁹-BK (DABK, 100 nmol/pata) (B) em ratos tratados com LPS. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras verticais os erros padrão da média. ** $P < 0,01$.

O mesmo tratamento dos animais com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$, s.c.) 24 h antes, não interferiu com o edema de pata induzido pela PGE_2 (10 nmol/pata), mas reduziu significativamente os edemas causados pela histamina (100 nmol/pata), SP (3 nmol/pata) e 5-HT (10 nmol/pata) em $25 \pm 2 \%$; $17 \pm 2,5 \%$ e $18 \pm 4 \%$, respectivamente (figura 12).

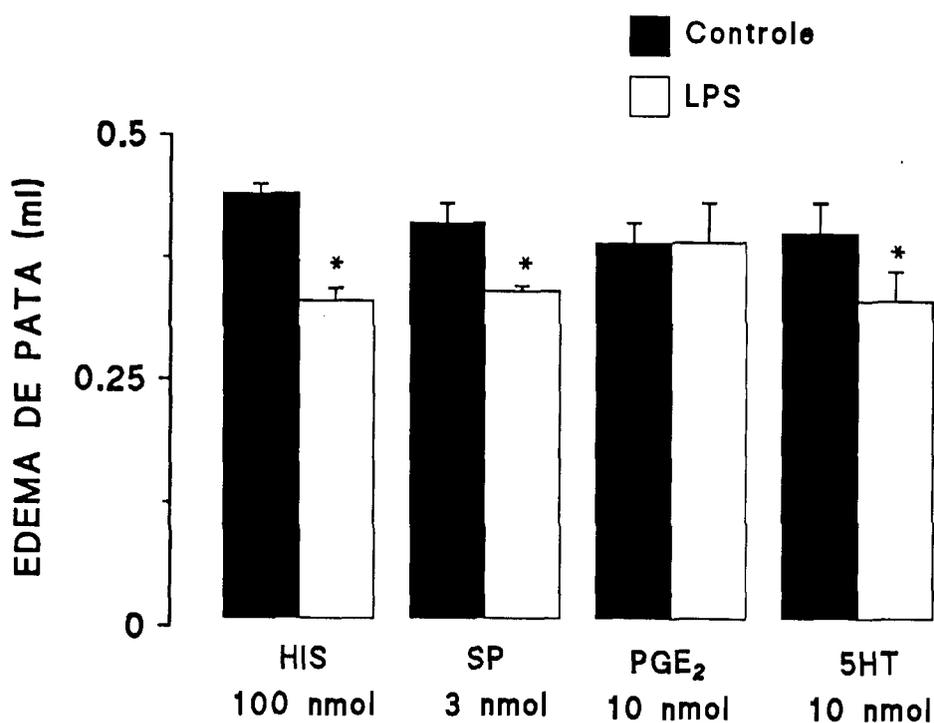
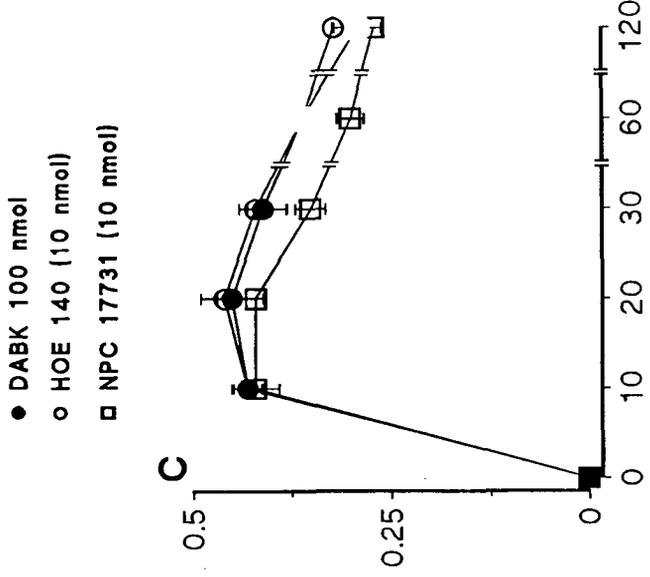
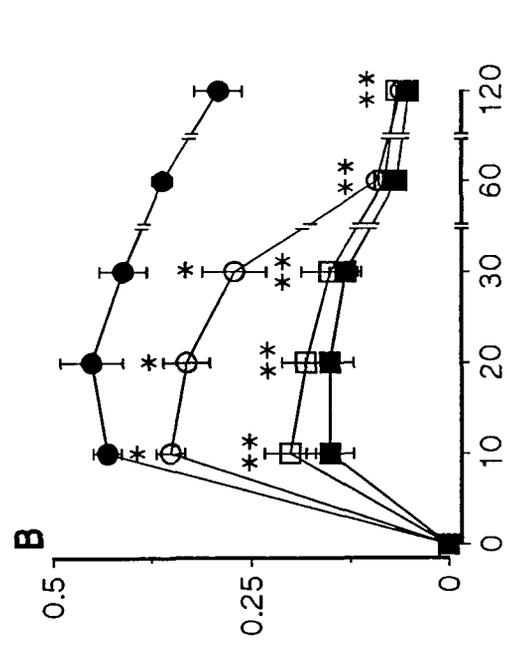
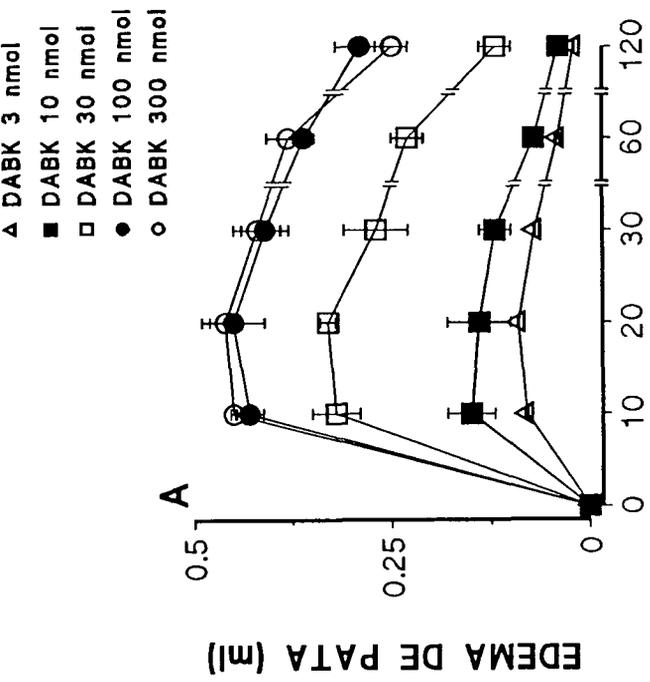


FIGURA 12 - Efeito do pré-tratamento dos animais com LPS sobre o edema de pata de rato induzido pela histamina (HIS, 100 nmol/pata), SP (3 nmol/pata), PGE_2 (10 nmol/pata) ou 5-HT (10 nmol/pata). Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras verticais os erros padrão da média. * $P < 0,05$.

O tratamento prévio dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) 24 ou 48 h antes dos experimentos foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) nos animais tratados com LPS (58 ± 3 % e 82 ± 2 %, respectivamente) (figura 11 B).

Por outro lado, o tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) 24 h antes dos experimentos, foi capaz de reverter parcialmente (66 ± 5 %), mas de forma significativa, a redução ocasionada pelo LPS sobre o edema de pata induzido pela tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) (figura 11 A).

A injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (3 - 300 nmol/pata) em animais tratados com LPS, produziu edema de pata de maneira dose-dependente com valores de DE₅₀ (juntamente com limite de confiança 95 %) e resposta máxima iguais a 24,1 (20,2 - 28,1) nmol/pata e 0,46 ± 0,05 ml, respectivamente (figura 13 A). A co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 - 300 nmol/pata) reduziu de forma significativa e dose-dependente o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), com DI₅₀ igual a 134,2 (129,4 - 143,3) nmol/pata (figura 13 B). Ao contrário, a co-injeção dos antagonistas seletivos de receptores B₂, o Hoe 140 ou o NPC 17731 (ambos 10 nmol/pata) não interferiu com o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) (figura 13C).



TEMPO APÓS A INJEÇÃO (min)

FIGURA 13 - (A) Edema da pata causado pela injeção de des-Arg⁹-BK (DABK, 3 - 300 nmol/pata) em animais tratados com LPS. (B) Efeito da co-injeção de des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (DALBK, 100 - 300 nmol/pata) sobre o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata). (C) Efeito da co-injeção de Hoe 140 e NPC 17731 (10 nmol/pata) sobre o edema causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais tratados com LPS. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras verticais os erros padrão da média. * P < 0,05; ** P < 0,01.

O tratamento prévio dos animais com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c.) 24 h antes, ou com o inibidor da ciclooxigenase, indometacina (2 mg.kg, i.p.) 1 h antes dos experimentos, causou inibição significativa do edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em ratos tratados com LPS. As inibições máximas observadas foram $98 \pm 2 \%$ e $50 \pm 4 \%$, respectivamente (figura 14).

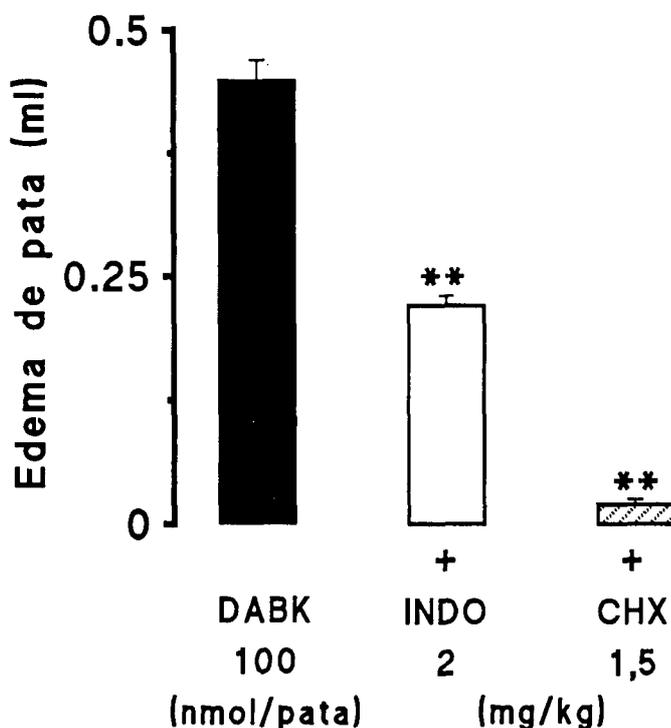


FIGURA 14 - Efeito do tratamento com indometacina (INDO, 2 mg/kg; i.p., 1 h) ou com cicloheximida (CHX, 1,5 mg/kg; s.c., 24 h) sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (DABK, 100 nmol/pata) em animais tratados com LPS. Cada coluna representa a média 5 animais e as barras verticais os erros padrão da média. ** P < 0,01.

Interação entre a des-Arg⁹-BK e outros mediadores da inflamação em animais tratados com LPS

A injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (10 nmol/pata) em ratos tratados com LPS, produziu edema de pata de pequena intensidade ($0,10 \pm 0,06$ ml). Da mesma forma, outros mediadores do processo inflamatório tais como SP, PGI₂, PGE₂, CGRP, 5-HT, PAF ou histamina quando injetados isoladamente (1 nmol/pata), causaram pequena ou nenhuma alteração de volume nas patas (figuras 15 e 16). Entretanto, a injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (1 nmol/pata) em associação com SP, PGI₂, PGE₂, CGRP, PAF ou 5-HT (todos 1 nmol/pata) resultou em potencialização significativa do edema de pata. As respostas máximas obtidas pela co-injeção da des-Arg⁹-BK com os outros mediadores da inflamação foram (ml): PGE₂ ($0,31 \pm 0,03$); PGI₂ ($0,39 \pm 0,02$); 5-HT ($0,40 \pm 0,02$); SP ($0,33 \pm 0,04$); CGRP ($0,35 \pm 0,04$) e PAF ($0,38 \pm 0,02$) (figuras 15 e 16). Ao contrário dos outros mediadores, a co-injeção de des-Arg⁹-BK com histamina (1 nmol/pata), não foi capaz de promover potencialização do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (1 nmol/pata) (figura 16C).

A co-injeção do antagonista dos receptores B₁ para as cininas, a des-Arg⁹-[Leu₈]-BK (100 - 300 nmol/pata) foi capaz de inibir de maneira significativa e dose-dependente o edema de pata causado pela associação entre a des-Arg⁹-BK e os

outros mediadores da inflamação em animais tratados com LPS (figura 17). As DI_{50} (nmol/pata) obtidas (juntamente com os limites de confiança 95 %) foram: 180 (143 - 195), 139 (130 - 145), 160 (139 - 181) e 135 (121 - 144), na presença de PGE_2 , PGI_2 , SP e 5-HT, respectivamente.

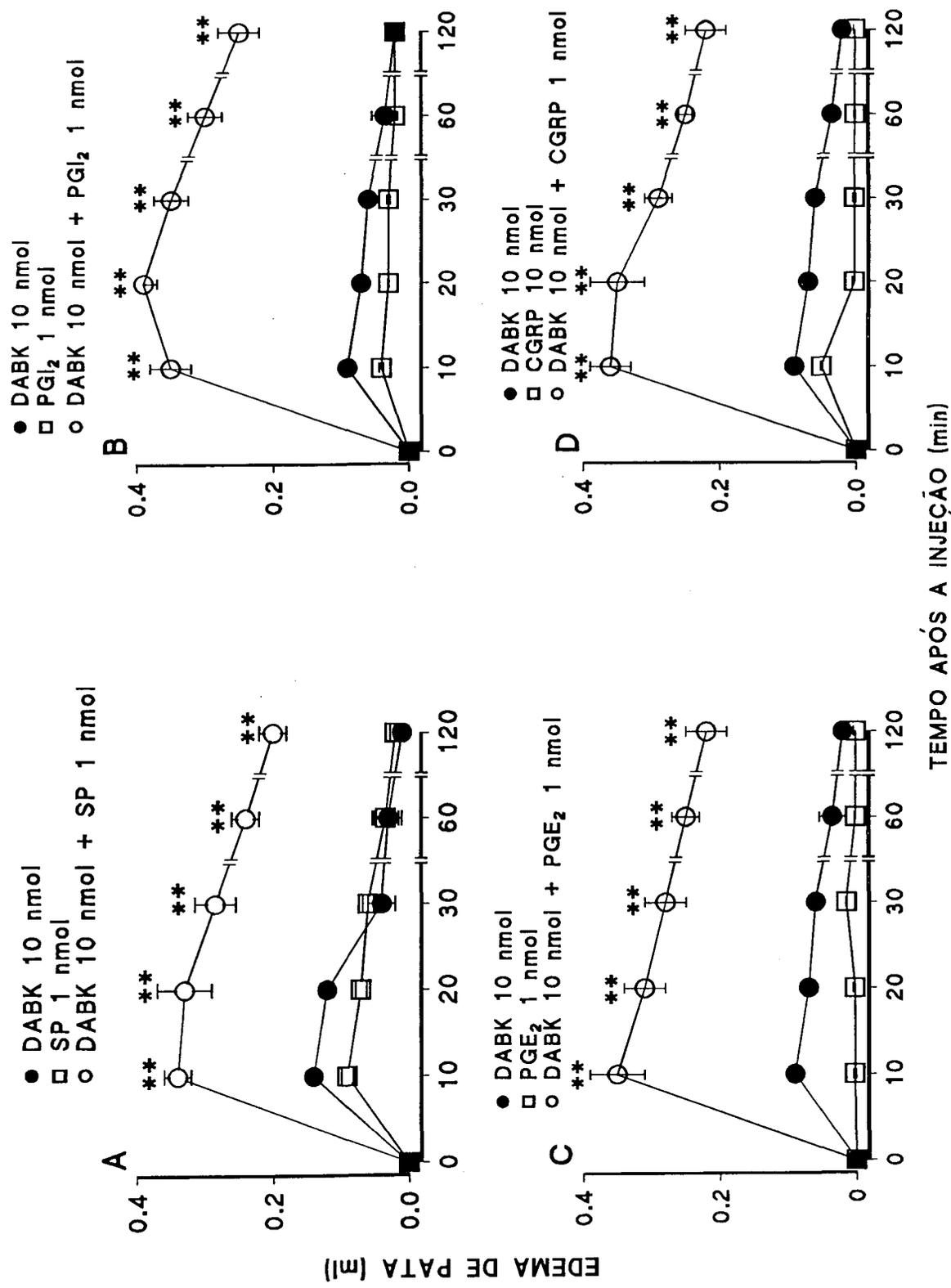


FIGURA 15 - Edema de pata de rato resultante da interação entre des-Arg⁹-BK (DABK, 10 nmol/pata) com SP (A), PGI₂ (B), PGE₂ (C) ou CGRP (D) (1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os erros padrão da média. ** P < 0,01.

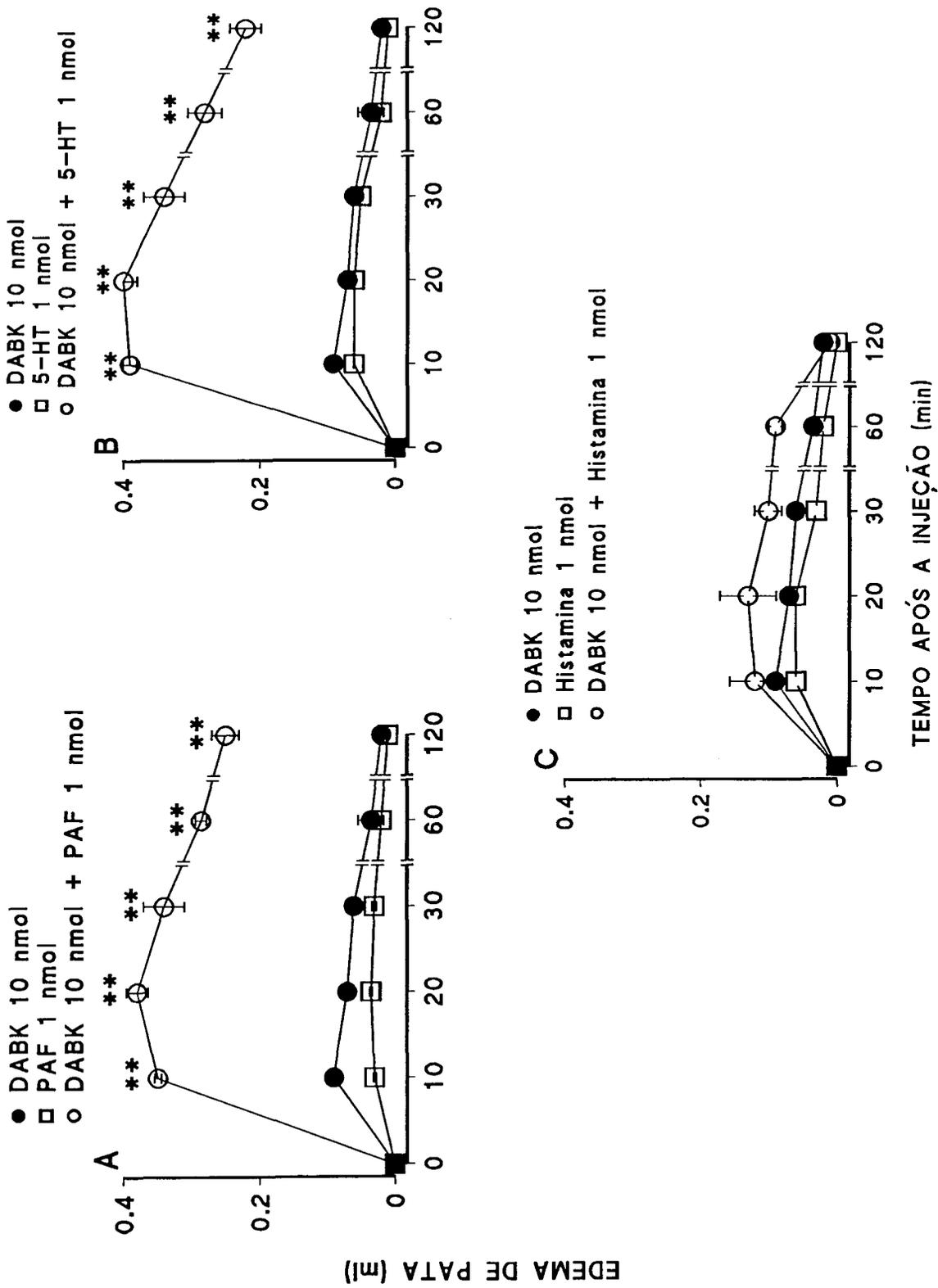


FIGURA 16 - Edema de pata de rato resultante da interação entre des-Arg⁹-BK (DABK, 10 nmol/pata) e PAF (A), 5-HT (B) e histamina (C) (1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os erros padrão da média. ** P < 0,01.

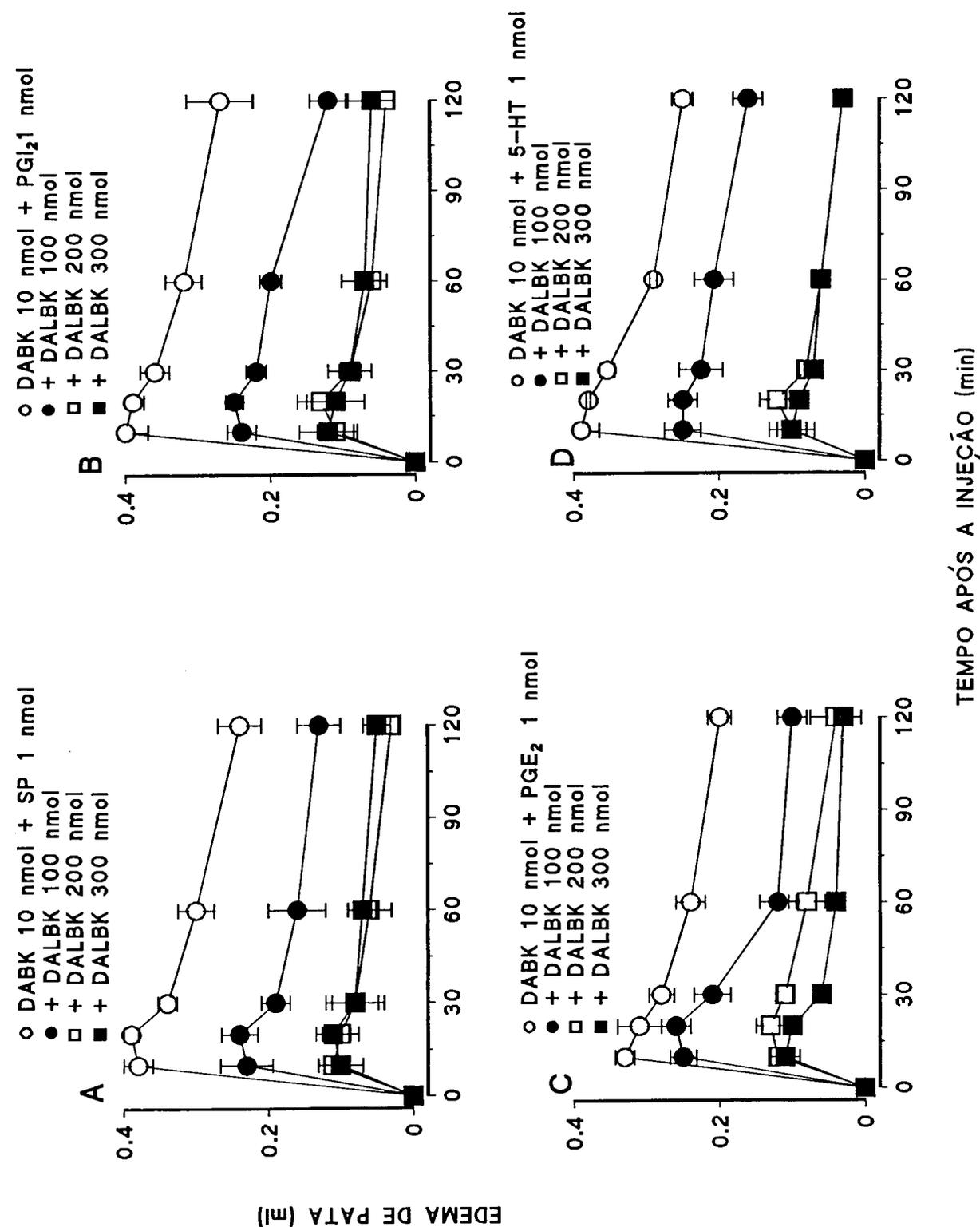


FIGURA 17 - Efeito da injeção intraplantar de des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (DALBK, 100 - 300 nmol/pata) em conjunto com des-Arg⁹-BK (DABK, 10 nmol/pata) e PGI₂ (A), PGE₂ (B), SP (C) e 5-HT (D) (1 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 5 animais e as barras verticais os erros padrão da média.

DISCUSSÃO

A bradicinina exerce um importante papel como mediador do processo inflamatório, principalmente pela estimulação de receptores constitutivos do tipo B₂. Desta forma, os resultados do presente estudo confirmam e também estendem os dados da literatura, indicando que em animais tratados com captopril, a BK induz a formação de edema de pata de rato de maneira dose-dependente, através da interação com receptores do tipo B₂, mas não do tipo B₁ (Whalley et al., 1984; Whalley, 1987; Proud e Kaplan, 1988; Damas e Remacle-Vólon, 1992; Damas et al., 1996). Estas conclusões estão baseadas no fato de que a injeção do agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK, em doses até 300 nmol/pata, produziu apenas uma discreta alteração de volume das patas. Além disso, a co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, não foi capaz de interferir com o edema de pata causado pela BK. Por outro lado, os antagonistas seletivos dos receptores B₂, Hoe 140 e NPC 17731, inibiram significativamente o edema de pata de rato induzido pela BK. Uma inibição similar das respostas produzidas pela BK *in vivo*, através do bloqueio dos receptores B₂ pelos antagonistas Hoe 140 e NPC 17731, tem sido amplamente relatada na literatura (Wirth et al., 1991; Dray et al., 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Kyle e Burch, 1993).

A BK e as cininas relacionadas aumentam a permeabilidade microvascular e promovem extravasamento plasmático em muitas espécies, sendo que a injeção intradérmica de BK produz uma resposta edematogênica característica (Polosa et al., 1993). O relaxamento de arteríolas e a constrição de vênulas causa um aumento da pressão diferencial no leito capilar, promovendo extravasamento plasmático. Dados descritos na literatura, demonstram que antagonistas seletivos dos receptores B₂ do tipo [DPhe⁷]-BK, podem inibir o extravasamento plasmático induzido pela BK em modelos de inflamação desenvolvidos em coelhos ou em ratos (Schatcher et al., 1987; Griesbacher e Lembeck, 1987; Whalley et al., 1987). Além disso, vários antagonistas dos receptores B₂ são capazes de inibir o extravasamento microvascular induzido por várias substâncias pró-inflamatórias. Por exemplo, o Hoe 140 inibe o extravasamento plasmático induzido por agentes como a carragenina (Burch e DeHaas, 1990; Damas e Remacle-Vólon, 1992; De Campos et al., 1996), o ácido úrico (Damas e Remacle-Vólon, 1992), a fosfolipase A₂ (Cirino et al., 1991) e endotoxina de *E. coli* (Ueno et al., 1995).

Os resultados do presente estudo mostram que o edema de pata causado pela BK pode ser potencializado pela co-injeção de vários mediadores do processo inflamatório. A co-injeção de doses muito baixas de PGE₂, PGI₂, SP, PAF ou 5-HT, que isoladamente produzem apenas uma discreta alteração de volume das patas,

induziu potencialização de maneira dose-dependente do edema de pata causado pela BK. Ao contrário do que foi observado em relação aos outros mediadores da inflamação, a co-injeção de histamina não produziu potencialização do edema de pata induzido pela BK. O efeito sinérgico resultante da interação entre a BK e outros mediadores do processo inflamatório, no edema de pata de rato, parece envolver uma amplificação das respostas mediadas pelos receptores B_2 para as cininas, uma vez que este efeito foi inibido de maneira dose-dependente pela co-injeção dos antagonistas seletivos de receptores B_2 , o HOE 140 e o NPC 17731. Por outro lado, não parece haver o envolvimento dos receptores B_1 no processo de interação entre a BK e os outros mediadores químicos da inflamação, pelo menos em condições normais, já que a co-injeção do antagonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, não foi capaz de interferir com a potencialização do edema de pata de rato causado pela BK. Além disso, é importante mencionar que a co-injeção dos outros mediadores do processo inflamatório, PGE₂, PGI₂, SP, CGRP, PAF, 5-HT ou histamina, em diferentes combinações, resultou na formação de edema com intensidade muito menor, do que as respostas obtidas pela associação da BK com os diversos mediadores da inflamação. Estes resultados sugerem, portanto, que a BK parece exercer um papel central neste processo através da interação com receptores do tipo B_2 .

Os mecanismos envolvidos no processo de potencialização da resposta edematogênica da BK ainda não foram totalmente esclarecidos. É possível que parte dos efeitos causados pela PGE₂, PGI₂, SP, CGRP e PAF sobre o edema de pata produzido pela BK, seja resultante pelo menos em parte, da capacidade destes mediadores em produzir aumento de fluxo sanguíneo e vasodilatação (Brain e Williams, 1989; Buckley et al., 1991; Cruwys et al., 1992; Newbold & Brain, 1993; Izzo et al., 1994). As neurocininas, incluindo a SP, causam extravasamento plasmático através da estimulação de células endoteliais vasculares que induzem vasodilatação pela liberação de óxido nítrico (NO). Por outro lado, o CGRP induz dilatação arteriolar expressiva facilitando o extravasamento plasmático por aumento do fluxo sanguíneo (Brain e Williams, 1985). Uma outra alternativa para explicar a potencialização resultante da co-injeção de BK e de outros mediadores da inflamação, seria a interação entre os sistemas de segundos mensageiros ativados pela BK e os sistemas efetores ativados pelos outros mediadores do processo inflamatório. Os dados da literatura mostram que a pré-incubação de fibroblastos 3T3 com ésteres do forbol ou com análogos do diacilglicerol é capaz de potencializar a síntese de PGE₂ estimulada pela bradicinina (Burch et al., 1988; ver para revisão Burch, et al., 1993). Também foi demonstrado que a síntese de prostanóides mediada pela BK pode ser potencializada pela IL-1 em fibroblastos sinoviais de humanos

(O'Neill e Lewis, 1989; Bathon et al., 1992) ou por IL-1 e TNF em fibroblastos 3T3 e macrófagos (Burch et al., 1988; 1989a,b; Burch e Tiffany, 1989; Tiffany e Burch, 1989). Embora a BK possa causar contração e relaxamento de vasos sanguíneos através da estimulação de receptores B_2 , o aumento de permeabilidade vascular pode estar relacionado com a estimulação direta da degranulação de mastócitos, e liberação de vários mediadores como a 5-HT e a histamina (Dray, 1994; Rang et al., 1994). Este mecanismo não requer a ativação de receptores, mas a estimulação de moléculas de superfície que ativam a fosfolipase C. Desta forma, o aumento dos níveis de cálcio induz a liberação dos mediadores a partir dos mastócitos (Bueb et al., 1990). Por outro lado, a liberação de neuropeptídeos e prostanóides pode ocorrer após a estimulação de neurônios sensoriais e simpáticos pela BK. Além disso, foi demonstrado que a co-injeção de PGE_2 é capaz de aumentar de forma expressiva a liberação de neuropeptídeos de neurônios sensoriais de rato, estimulados pela BK (Vasko et al., 1994).

Foi demonstrado que tanto o edema de pata, quanto a exsudação pleural induzidos pela BK, podem ser progressivamente inibidos por injeções diárias repetidas deste peptídeo, sendo que a inibição máxima é obtida depois de 7 e 4 dias de estimulação, respectivamente (Martins et al., 1992). Além disso, sabe-se que a ativação de neurônios sensoriais ou fibras aferentes pela BK, pode induzir

dessensibilização. Neste caso, o processo de dessensibilização é observado particularmente quando os neurônios são expostos várias vezes à BK (Dray et al., 1992). Confirmando estes dados, os resultados do presente trabalho demonstram que a injeção intraplantar diária de BK (10 nmol/pata), durante um período de 7 dias, causou dessensibilização progressiva e completa do edema de pata induzido pela BK. A dessensibilização foi específica para a BK, uma vez que, o edema de pata induzido por PAF, PGE₂, SP ou histamina em patas dessensibilizadas a BK, foi equivalente ao edema produzido por estes mediadores em patas normais. Estes dados estão de acordo com as descrições da literatura, que mostram que dessensibilização do edema de pata, bem como da exsudação pleural induzida pela BK, constitui um processo homólogo, que envolve apenas os receptores B₂ das cininas (Martins et al., 1992).

Estudos bioquímicos recentes têm sugerido que a dessensibilização induzida pela BK envolve mudanças ao nível do receptor, bem como alterações das vias de segundos mensageiros envolvidos na transdução de sinal. Dados da literatura demonstram que a incubação de BK em cultura de fibroblastos humanos por um intervalo de 5 a 10 min, resulta em diminuição das respostas causadas pela BK. A redução dessas respostas parece estar relacionada com a inibição da formação de prostanóides (Roscher et al., 1984). Foi também demonstrado que a

dessensibilização induzida pela BK em neurônios sensoriais, é mediada pela liberação de NO, que por sua vez ativa a guanilato ciclase, promovendo aumento dos níveis intracelulares de GMP cíclico (Burguess et al., 1989; Lang et al., 1990; McGhee et al., 1992; Harvey & Burgess, 1993). É possível que a dessensibilização dos receptores B₂ esteja envolvida com a alteração da produção de IP₃, mediada pela ativação de uma proteína quinase sensível ao GMP cíclico, através da produção de NO (Bradley e Burgess, 1993; Rueff et al., 1994). Por outro lado, existem poucas evidências mostrando a participação de AMP cíclico no desenvolvimento da dessensibilização à BK (Rueff et al., 1994). Desta forma, o fenômeno de dessensibilização induzido pela BK parece envolver diretamente, a interferência com os sistemas efetores acoplados ao receptor B₂. Pode haver ainda o envolvimento de processos de agregação, internalização ou ainda de redução do número de receptores (Roberts e Gullick, 1990; Roscher et al., 1990; Munoz e Leeb-Lundberg; Wolsing e Rosenbaum, 1993).

A co-injeção de SP ou PGE₂, no primeiro dia da indução da dessensibilização a BK, foi capaz de prevenir parcialmente o desenvolvimento do processo de dessensibilização. Além disso, a co-injeção de BK e PGE₂, PGI₂ ou SP, em patas dessensibilizadas, produziu edema de pata em valores próximos aos observados em patas normais. Estes resultados são consistentes com a proposta, de que outros

mediadores da inflamação podem ser moduladores importantes dos efeitos pró-inflamatórios das cininas.

Como descrito na introdução, ao contrário dos receptores B₂, os receptores do tipo B₁ raramente são constitutivos, embora sua síntese possa ser estimulada por trauma tecidual ou durante o processo inflamatório. Desta forma, a maioria das preparações obtidas de musculatura lisa não respondem ao agonista seletivo de receptores B₁ a des-Arg⁹-BK, na primeira hora de incubação *in vitro*, mas se tornam gradualmente reativas a este agonista, após algumas horas de incubação (Ver para revisão: Marceau, 1995). A expressão dos receptores B₁ tem sido descrita essencialmente em todas as preparações musculares lisas obtidas de coelhos (Regoli, 1980; DeBlois et al., 1988; Whalley, 1983), ratos (Marceau et al., 1980; Campos e Calixto, 1994; Cabrini et al., 1995) e também de tiras de cólon humano (Couture et al., 1981). A natureza dos mecanismos patológicos que estão envolvidos com a indução dos receptores B₁ tem sido estudada pela utilização paralela de modelos *in vivo* e *in vitro*. Tem sido demonstrado que o processo de indução dos receptores B₁ *in vitro*, pode ser acelerado pela incubação de substâncias, tais como o LPS, o dipeptídeo murâmico e a oncostatina M (Bouthillier et al., 1987; DeBlois et al., 1989; Levesque et al., 1995) ou ainda expressivamente aumentado, pelo acréscimo das citocinas IL-1, IL-2, IL-8 ou IFN γ (DeBlois et al., 1988; 1991; DeKimpe et al.,

1994). A expressão de receptores B₁ *in vivo* pode ser observada no modelo de pressão arterial em coelhos, onde ao contrário do que ocorre em animais normais, a injeção endovenosa dos agonistas seletivos dos receptores B₁, des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina causa hipotensão de maneira dose-dependente em animais pré-tratados com doses sub-letais de LPS (10 - 40 µg) (Marceau et al., 1983). Foi também demonstrado que a indução dos receptores B₁ ocorre em vários modelos de inflamação crônica em ratos, tais como cistite ou colite de origem química (Marceau et al., 1980; Kachur et al., 1986) ou ainda na artrite reumatóide induzida por complexos imunes (Cruwys et al., 1994). Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento dos receptores B₁ da bradicinina no desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória, após a incidência de raios ultravioleta (Perkins e Kelly, 1993; Perkins et al., 1993), seguindo a injeção intra-articular de várias citocinas ou pela injeção de adjuvante de Freund (Davis et al., 1994; Davis e Perkins, 1994; Khasar et al., 1995; Perkins et al., 1995). Dados descritos na literatura mostram que as respostas mediadas pela indução dos receptores B₁ parecem envolver a participação de síntese de proteínas, uma vez que estas respostas podem ser totalmente prevenidas pela incubação de doses baixas de glicocorticóides ou pela adição de inibidores da síntese protéica, tais como a cicloheximida (Bouthillier et al., 1987; DeBlois et al., 1988; 1989; 1991; ver para revisão: Marceau, 1995). Tem sido proposto, que a indução do

aparecimento dos receptores B₁ poderia ser dependente da produção local de citocinas, principalmente IL-1 α e IL-1 β . Todas as substâncias conhecidas por estimularem a indução dos receptores B₁, incluindo o LPS, o dipeptídeo murâmico e mesmo as citocinas IL-1, IL-2 e IL-8, possuem a capacidade de induzir a síntese de IL-1. O efeito inibitório produzido pelos glicocorticóides, poderia ser explicado pelo menos em parte, pela supressão da síntese de IL-1. Além disso, a possibilidade de uma ação adicional para os glicocorticóides, relacionada com a inibição dos receptores das citocinas não poderia ser descartada (DeBlois et al., 1991). A participação da IL-1 na indução dos receptores B₁ pode ser confirmada pela ocorrência da produção espontânea de IL-1 α , após o isolamento e a incubação “*in vitro*” de preparações de aorta de coelho, mesmo em condições estéreis. Estes dados podem ser confirmados *in vivo* no modelo de pressão arterial em coelhos, onde o agente liberador de citocinas, o dipeptídeo murâmico e a própria IL-1, são capazes de mimetizar a ação do LPS na indução dos receptores B₁ (DeBlois et al., 1991). Por outro lado, o antagonista de receptores IL-1 (IRA) não foi capaz de inibir a indução dos receptores B₁ após algumas horas de incubação *in vitro* de aorta isolada de coelho. Foi também demonstrado, que o IRA não previne a resposta hipotensiva em coelhos, causada pela des-Arg⁹-BK, após o tratamento *in vivo* com LPS (Whalley et al., 1983). Por outro lado, no modelo de hiperalgesia crônica induzida pela injeção

intra-articular de IL-1, IL-2 e IL-8 em ratos, o tratamento com o IRA foi capaz de inibir os efeitos produzidos pelas três citocinas, sugerindo que as respostas produzidas pela IL-2 e pela IL-8 são dependentes da secreção de IL-1 (Davis e Perkins, 1994). O IRA é um antagonista que bloqueia as ações mediadas pela IL-1 α e IL-1 β através de ligação com receptores de membrana, não tendo a capacidade de interferir com os efeitos autócrinos das IL-1 sobre a síntese de proteínas (Clinton et al., 1991; Dripps et al., 1991). Desta forma, está definido que várias citocinas podem amplificar as respostas funcionais produzidas por agonistas seletivos de receptores B₁, bem como são capazes de induzir a sua própria síntese. Em conjunto, estes dados sugerem que a indução dos receptores B₁ após o dano tecidual ou durante o desenvolvimento do processo inflamatório, constitui um processo tempo-dependente, que envolve síntese protéica e possivelmente a participação direta de algumas citocinas inflamatórias, principalmente, IL-1 α e IL-1 β . (ver para revisão: Marceau, 1995; 1997; Dray e Perkins, 1997).

Os dados do presente estudo mostram que a injeção do agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK causa apenas uma alteração discreta no volume das patas em ratos normais. Entretanto, em animais completamente dessensibilizados à BK, a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) causou edema de pata de forma expressiva. A resposta edematogênica causada pela des-Arg⁹-BK em animais dessensibilizados

parece envolver ativação de receptores do tipo B₁ para as cininas, um vez que o edema de pata causado pelo agonista receptores B₁, a des-Arg⁹-BK foi significativamente inibido pela co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK.

Os dados do presente trabalho sugerem portanto, o possível envolvimento de síntese protéica no aparecimento das respostas mediadas pelos receptores B₁, uma vez que tratamento sistêmico dos animais com o glicocorticóide dexametasona, inibiu de forma expressiva, o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais dessensibilizados. Por outro lado, o mesmo tratamento com dexametasona falhou em inibir o edema da pata causado pela BK em animais normais, o qual é mediado pela ativação de receptores B₂ constitutivos. Baseado em dados da literatura, que mostram que o aparecimento dos receptores B₁ envolve a produção de citocinas e que sua síntese pode ser inibida pelo tratamento com glicocorticóides (Marceau et al., 1980; Whalley et al., 1983; Bouthillier et al., 1987; DeBlois et al., 1988; 1991), pode-se concluir que o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em patas dessensibilizadas, parece estar associado com a indução dos receptores B₁, através de um processo sensível a dexametasona.

A injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B₂, tirosina⁸-BK (0,3 - 10 nmol/pata) causou edema de pata de forma marcante e dose-dependente,

enquanto que o agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol/pata) produziu apenas uma pequena alteração de volume das patas. Os resultados apresentados, mostram que a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, foi capaz de induzir edema de pata de forma expressiva e dose-dependente em animais previamente tratados com LPS (24 h). A des-Arg⁹-BK foi cerca de 18 vezes menos potente, embora tenha sido mais eficaz em causar edema de pata, quando comparada ao agonista seletivo de receptores B₂, a tirosina⁸-BK em animais normais. Por outro lado, o tratamento agudo com LPS produziu uma redução significativa do edema de pata causado pela tirosina⁸-BK. Além disso, o pré-tratamento com LPS não alterou o edema de pata induzido pela PGE₂, mas causou uma diminuição significativa dos edemas de pata produzidos por histamina, SP ou 5-HT.

A formação de edema seguindo a injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK em animais previamente tratados com LPS, parece ser mediada exclusivamente pela ativação de receptores do tipo B₁, sem interferência dos receptores do tipo B₂. A co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK inibiu de forma dose-dependente o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK, enquanto que a co-injeção dos antagonistas seletivos de receptores B₂, o Hoe 140 e o NPC 17731, não foi capaz de interferir com o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK nos

animais tratados com LPS. O tratamento com LPS parece induzir a expressão dos receptores B_1 principalmente em tecidos isolados de coelhos (Bhoola et al., 1992; ver para revisão: Hall, 1992). Resultados semelhantes também foram descritos após o tratamento sistêmico com LPS (24 h), onde ocorre um aumento da resposta mediada pelos receptores B_1 , associado a uma redução do efeito relaxante, provavelmente mediado pelos receptores B_2 , em preparação de fundo de estômago isolado de rato (Cabrini et al., 1996).

O aumento de permeabilidade vascular constitui um evento importante decorrente da injeção da BK e de outras cininas relacionadas (Marceau et al., 1983). A estimulação do extravasamento plasmático em resposta a injeção de BK, envolve a separação física das células endoteliais particularmente ao nível das vênulas pós-capilares. Os dados descritos na literatura são unânimes em afirmar que sob condições normais, o aumento de permeabilidade vascular causado pelas cininas envolve a ativação de receptores do tipo B_2 , mas excluem qualquer participação dos receptores do tipo B_1 (Whalley et al., 1984; Whalley, 1987; Proud e Kaplan, 1988). Por exemplo, o agonista seletivo de receptores B_1 , des-Arg⁹-BK não produz qualquer efeito sobre a permeabilidade vascular quando injetado na pele de coelhos (Marceau et al., 1981). A ativação dos receptores B_2 , sem qualquer envolvimento dos receptores B_1 , também foi demonstrada no edema de pata de rato causado pela

injeção de BK (Whalley et al., 1984). Além disso, a injeção do antagonista seletivo dos receptores B₂, Hoe 140 inibe de forma expressiva o aumento de permeabilidade vascular induzido pelas cininas na pele de rato (Lembeck et al., 1991). Outros dados mostram ainda, que a inalação em aerosol de BK, tanto em humanos quanto em roedores, produz edema de mucosa, acompanhado da formação de exsudato rico em albumina. Este efeito também parece ser modulado pelos receptores B₂, já que a inalação de des-Arg⁹-BK não causa qualquer efeito (Baraniuk et al., 1990). Por outro lado, ao contrário do que foi demonstrado em condições normais, quadros que envolvem processos inflamatórios crônicos, parecem estar relacionados com a indução dos receptores B₁. Desta forma, vários modelos de hiperalgesia inflamatória demonstram a participação dos receptores B₁, após estímulos como a injeção intra-articular de adjuvante de Freund ou de várias citocinas (ver para revisão: Marceau, 1995; Dray e Perkins, 1997). Portanto, os resultados do presente trabalho, confirmam e estendem os dados descritos na literatura, mostrando que em condições normais, o edema de pata de rato é mediado pela ativação de receptores B₂. Por outro lado, estímulos como a dessensibilização dos receptores B₂ ou o tratamento agudo com LPS, podem evidenciar a participação dos receptores B₁ na resposta edematogênica causada pelas cininas.

Como observado em relação a resposta edematogênica mediada pelos receptores B_1 em animais dessensibilizados, o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS, foi expressivamente inibido pelo tratamento prévio com dexametasona 48 e 24 horas antes dos experimentos. Além disso, o tratamento prévio com o inibidor de síntese protéica, cicloheximida, aboliu quase que completamente o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK nestes animais. Vários dados da literatura demonstram que a dexametasona e a cicloheximida são capazes de prevenir o aparecimento dos receptores B_1 , observada após a indução de trauma tecidual ou infecção (Regoli et al., 1978; Marceau et al., 1980; Whalley et al., 1983). Em conjunto, estes resultados indicam que o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com LPS, envolve provavelmente a indução de receptores B_1 dependente de síntese protéica, sendo esse um processo sensível ao tratamento com dexametasona e cicloheximida. Uma vez que o tratamento sistêmico com LPS é capaz de promover a indução dos genes de certas citocinas a partir de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos *in vivo* (Ulich et al., 1992; Cockfield et al., 1993; Huleihel et al., 1993) através de mecanismos sensíveis ao tratamento com glicocorticóides (Geiger et al., 1993; Ochalski et al., 1993; Pang et al., 1994), torna-se aparente que o edema de pata induzido por receptores B_1 em ratos pré-tratados com LPS, constitui um processo mediado pela liberação de citocinas. Estes

resultados são consistentes com outros dados descritos na literatura, que mostram que em alguns modelos de inflamação e de hiperalgesia, a indução dos receptores B₁ pelo tratamento com LPS, parece exercer um papel importante na manutenção do processo inflamatório (Burch et al., 1989; Bhoola et al., 1992; Dray e Perkins, 1993; Perkins et al., 1993).

Muitas ações mediadas pelos receptores B₁ das cininas, estão associadas com a ativação da fosfolipase A₂ e conseqüente liberação de metabólitos derivados da via do ácido araquidônico através da via da ciclo-oxigenase (Gaginella e Kachur, 1989; Calixto e Medeiros, 1991; Burch, 1993; Shlemper e Calixto, 1994; Cabrini et al., 1995, 1995). Os resultados do presente trabalho mostram que o inibidor da ciclo-oxigenase, a indometacina, inibiu significativamente o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS, sugerindo o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico na resposta edematogênica, após a ativação dos receptores B₁.

Como demonstrado previamente em relação ao edema de pata (presente trabalho) ou ao aumento de permeabilidade vascular (Brain e Williams, 1989; Buckley et al., 1989; Cruwys et al., 1992) causados pela BK, o agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, também foi capaz de interagir de maneira sinérgica com outros mediadores do processo inflamatório, em animais previamente tratados

com LPS . Esta conclusão, está baseada no fato de que a co-injeção de doses muito baixas de PGE₂, PGI₂, SP, CGRP, PAF ou 5-HT, que isoladamente causaram uma pequena alteração de volume da pata, foram capazes de produzir potencialização do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS.

Por outro lado, assim como descrito para a BK em animais controles, a co-injeção de histamina não causou potencialização da resposta edematogênica induzida pela des-Arg⁹-BK. Estes resultados sugerem, que embora a histamina exerça um papel importante no processo inflamatório, ela não possui a capacidade de potencializar o edema de pata de rato induzido pelas cininas.

O edema de pata resultante da interação entre os vários mediadores da inflamação com a des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com LPS, parece ser mediado apenas por receptores do tipo B₁, já que foi antagonizado de maneira dose-dependente pela co-injeção do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, sem no entanto ser afetado pela co-injeção dos antagonistas seletivos de receptores B₂, como o Hoe 140 e o NPC 17731.

Os mecanismos envolvidos no processo de potencialização do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK através de outros mediadores da inflamação, ainda permanecem obscuros. Resultados da literatura têm demonstrado que assim com a BK, a des-Arg⁹-BK é capaz de estimular a liberação de alguns mediadores

envolvidos no processo inflamatório, tais como PGE₂ e PGI₂ (Toda et al., 1987; Cahil et al., 1988; Galizzi et al., 1994) ou IL-1 (Burch et al., 1989a; Tiffany e Burch, 1989; Lerner e Modeer, 1991). Além disso, tem sido demonstrado que a IL-1 potencializa a formação de PGE₂ induzida pela des-Arg⁹-BK em fibroblastos sinoviais ou gengivais (Lerner e Moder, 1991; Bathon et al., 1992; Lerner et al., 1992).

Em conclusão, os dados do presente estudo estendem e confirmam as observações iniciais de que o edema de pata induzido pela BK em condições normais é mediado pela ativação de receptores do tipo B₂ (Whalley et al., 1984; Whalley, 1987; Proud e Kaplan, 1988). Além disso, foi demonstrado que a BK pode interagir de maneira sinérgica com outros mediadores inflamatórios, em um processo mediado pela ativação dos receptores B₂. Os resultados também demonstram que a co-injeção de outros mediadores da inflamação é capaz de alterar o perfil da dessensibilização induzida pela BK, sugerindo que outros mediadores da inflamação podem modular diretamente os efeitos pró-inflamatórios das cininas. Por outro lado, tanto a dessensibilização dos receptores B₂ da bradicinina, como o tratamento agudo dos animais com LPS, foi capaz de induzir o aparecimento de receptores do tipo B₁, associado a uma diminuição expressiva das respostas mediadas pelos receptores B₂. As respostas mediadas pelos receptores B₁ parecem depender diretamente de síntese

protéica, uma vez que o tratamento dos animais com o glicocorticóide, a dexametasona, bem como, com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida, foi capaz de inibir de forma expressiva o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK. Além disso, a resposta edematogênica causada pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS, parece envolver a liberação de metabólitos derivados do ácido araquidônico, já que o tratamento sistêmico dos animais com o inibidor da ciclo-oxigenase, a indometacina, produziu inibição significativa do edema de pata mediado pelos receptores B₁. Os resultados também demonstram que o agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, é capaz de interagir de maneira sinérgica com outros mediadores do processo inflamatório.

Em conjunto os resultados do presente trabalho, mostram que o edema de pata de rato causado pelas cininas envolve a ativação de receptores do tipo B₁ e B₂. Enquanto os receptores B₂ (constitutivos) medeiam a formação de edema em condições normais, os receptores do tipo B₁ (induzidos) parecem mediar a resposta edematogênica apenas em condições especiais, como após a dessensibilização dos receptores B₂ ou depois do tratamento dos animais com LPS. Desta forma, estes mecanismos podem ser relevantes na instalação e manutenção de processos inflamatórios agudos e crônicos.

SUMMARY

- This study investigated some of the mechanisms underlying kinin-induced oedematogenic response in the rat paw, by use of selective agonists and antagonists.

- Intraplantar injection of bradykinin (BK, 0.3 - 10 nmol/paw) in rats pretreated with captopril (5 mg/kg⁻¹, s.c.) caused a dose-related increase in rat paw volume, with ED₅₀ value 1.9 nmol/paw and maximal response of 0.43 ± 0.04 ml. On the other hand des-Arg⁹-BK, a selective B₁ receptor agonist, up to 300 nmol/paw caused minimal oedema (0.06 ± 0.009 ml). The response to BK (3 nmol/paw) in the rat paw oedema was antagonised by B₂ receptor antagonists, Hoe 140 and NPC 17731 (both 3 nmol/paw).

- Co-administration of prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin I₂ (PGI₂), calcitonin gene-related peptide (CGRP), serotonin (5-HT), substance P (SP) or PAF-acether (PAF) (1 pmol - 1 nmol/paw) with BK (1 nmol/paw) potentiated in a dose-dependent manner the rat paw oedema induced by BK. The rank order of potency (mean ED₅₀, pmol/paw) for this effect was: SP (8.1) > PAF (13.7) > PGI₂ (20.5) > 5-HT (23.8) > CGRP (25.7) > PGE₂ (52.0). Co-administration of BK with the various inflammatory mediators resulted in maximal paw oedemas (ml) of: PGE₂ (0.71 ± 0.02); PGI₂ (0.66 ± 0.02); 5-HT (0.65 ±

0.01); SP (0.63 ± 0.05); CGRP (0.60 ± 0.05) and PAF (0.47 ± 0.02) ml. Histamine (up to 1 nmol/paw) was ineffective in potentiating the response to BK.

4- Hoe 140 or NPC 17731 (two selective B₂ receptor antagonists, 0.1 - 3 nmol/paw) produced dose-dependent inhibition of paw oedema potentiation induced by co-injection of BK with other mediators with the following mean ID₅₀s (nmol/paw): Hoe 140- 1.4; 1.3; 1.5 and 1.1 and NPC 17731- 1.0; 1.0; 0.9 and 0.7; in the presence of PGE₂, PGI₂, CGRP and SP, respectively. The selective B₁ receptor antagonist des-Arg⁹ [Leu⁸]-BK (up to 300 nmol/paw) had no effect.

5- Daily intraplantar injections of BK (10 nmol/paw) once a day for 7 consecutive days caused a progressive and complete desensitization of the paw oedema, which was specific for BK, since paw oedema induced by PAF, PGE₂, SP or histamine was not affected. In addition, the oedema caused by BK in the paw desensitised to the peptide was almost completely reversed if BK was co-injected with PGE₂, PGI₂ or SP (1 nmol/paw). Injection of PGE₂ or SP (10 nmol/paw) together with the first BK injection (10 nmol/paw), partially prevented BK-induced desensitisation.

6- When animals were completely desensitized to BK, des-Arg⁹-BK (100 nmol/paw) caused paw oedema (0.25 ± 0.03 ml) which was consistently blocked by the B₁ receptor antagonist, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 nmol/paw).

7- Treatment of animals with dexamethasone (0.5 mgkg^{-1} s.c., 24 h previously) antagonized paw oedema induced by des-Arg⁹-BK (100 nmol/paw) in desensitized paws, but not that induced by BK (3 nmol/paw) in naive paws. The steroid also prevented the recovery of oedema seen after co-injection of BK with PGE₂ or PGI₂ (1 nmol/paw) in desensitized paws.

8 - Intraplantar injection of des-Arg⁹-BK (3- 300 nmol) in rats pretreated with LPS (24h prior) resulted in a marked dose and time-related increase in paw volume, being 18.5-fold less potent than tyrosine⁸-BK (0.1 - 30 nmol) in naive animals, with mean ED₅₀s of 24.1 and 1.3 nmol, respectively. In sharp contrast, oedema caused by tyrosine⁸-BK (3 nmol) was reduced by 79 ± 4 in animals treated with LPS.

9 - Oedema caused by PGE₂ (10 nmol) was unaffected by LPS treatment, while oedema induced by histamine (100 nmol), 5-HT (10 nmol) and SP (3 nmol) were reduced ($P < 0.01$).

10 - The selective B₁ antagonist, des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (100 - 300 nmol), produced dose-dependent inhibition of des-Arg⁹-BK (100 nmol)-induced paw oedema in LPS-treated animals with mean ID₅₀ value of 134 nmol, while the selective B₂ antagonists Hoe 140 and NPC 17731 (each 10 nmol) had no effect.

11 - Treatment of animals with dexamethasone (0.5 mgkg⁻¹, s.c.) 24 or 48 h prior to LPS injection resulted in a graded inhibition of des-Arg⁹-BK (100 nmol)-induced oedema formation (58 ± 3 and 82 ± 2 %, respectively), and almost completely reversed to control value oedema formation induced by tyrosine⁸-BK (3 nmol) in animals that were pretreated with LPS. Treatment of animals with cycloheximide (1.5 mg.kg⁻¹, s.c.) or with indomethacin (2 mgkg⁻¹, i.p.) 24 and 1 h prior to LPS injection, respectively, markedly inhibited des-Arg⁹-BK (100 nmol)-induced paw oedema (98 ± 2 and 50 ± 4 %, respectively).

12 - Intraplantar injection of sublineal dose of des-Arg⁹-BK (10 nmol) in LPS-treated rats produced modest paw oedema (0.09 ± 0.03 ml). However, intraplantar injections of PGE₂, PGI₂, CGRP, SP, 5-HT, or PAF (each 1 nmol), which alone caused little or no paw oedema, resulted in significantly greater paw oedemas. The increases in paw volume (in ml) were: PGE₂ (0.31 ± 0.03), PGI₂ (0.39 ± 0.02), CGRP (0.35 ± 0.04), SP

0.33 ± 0.04), 5-HT (0.40 ± 0.02) and PAF (0.38 ± 0.016) ml. In contrast, histamine (1 μmol/paw) was ineffective in potentiating the response to des-Arg⁹-BK.

13 - The selective B₁ receptor antagonist, des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol), produced dose-dependent inhibition of paw oedema potentiation induced by co-injection of des-Arg⁹-BK and other mediators with mean ID_{50s} (nmol) of: 180, 160, 139 and 135 in the presence of PGE₂, PGI₂, SP and 5-HT, respectively.

14 - These results suggest that both B₁ and B₂ receptors are involved in BK-induced rat paw oedema. The B₂ receptors are constitutive, but induction of expression of B₁ receptors seems to occur following complete desensitization of the paw to BK or after treatment of animals with LPS. In addition, very low doses of inflammatory mediators markedly potentiate BK-induced paw oedema, as well as can interact in a synergistic manner with des-Arg⁹-BK-induced paw oedema in rats pre-treated with LPS. Such mechanisms may be relevant for the manifestation of acute and chronic inflammatory processes.

Most of these results have been published in British Journal of Pharmacology **114** : 1005 - 1013, 1995 and 117 : 793 - 798, 1996.

RESUMO

- No presente estudo foram analisados, através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas causadas pelas cininas na pata de rato.

- A injeção intraplantar de bradicinina (BK; 0,3 - 10 nmol/pata) causou edema de pata dose-dependente com DE_{50} de 1,9 nmol/pata e resposta máxima de $0,43 \pm 0,04$ ml. Por outro lado, a injeção intraplantar do agonista seletivo de receptores B_1 , des-Arg⁹-BK (100 - 300 nmol/pata) causou apenas uma discreta alteração do volume das patas ($0,06 \pm 0,009$). O edema de pata causado pela BK (3 nmol/pata) foi significativamente inibido pela co-injeção dos antagonistas seletivos dos receptores B_2 , o Hoe 140 e o NPC 17731 (43 ± 3 e 41 ± 4 %, respectivamente), mas não pela co-injeção do antagonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (200 nmol/pata).

- A co-administração de PGE₂, PGI₂, CGRP, 5-HT, SP ou PAF (1 pmol - 1 nmol/pata) em conjunto com a BK (1 nmol/pata) causou potencialização dose-dependente do edema de pata induzido pela BK. A ordem de potência para os efeitos

observados foi (DE_{50} , pmol/pata): SP (8,1) > PAF (13,7) > PGI_2 (20,5) > 5-HT (23,8) > CGRP (25,7) > PGE_2 (52). As respostas máximas resultantes da interação da BK com os outros mediadores da inflamação foram (ml): PGE_2 ($0,71 \pm 0,02$); PGI_2 ($0,66 \pm 0,02$); 5-HT ($0,65 \pm 0,01$); SP ($0,63 \pm 0,05$); CGRP ($0,60 \pm 0,05$) e PAF ($0,47 \pm 0,02$). A histamina (1 nmol/pata) não foi capaz de potencializar o edema de pata causado pela BK.

4 - O Hoe 140 e o NPC 17731 (0,1 - 3 nmol/pata) produziram inibição dose-dependente da potencialização do edema de pata induzido pela co-injeção da BK com outros mediadores inflamatórios. As DI_{50s} observadas foram (nmol/pata): para o Hoe 140, 1,4; 1,3; 1,5; 1,1 e para o NPC 177131, 1,0; 1,0; 0,9 e 0,7, na presença de PGE_2 , PGI_2 , CGRP e SP, respectivamente.

5 - A injeção intraplantar diária de BK (10 nmol/pata) durante 7 dias foi capaz de induzir dessensibilização progressiva do edema de pata causado pela BK. A dessensibilização foi específica para a BK, já que os edemas de pata produzidos pelo PAF (10 nmol/pata), PGE_2 (10 nmol/pata), SP (3 nmol/pata) ou histamina (100 nmol/pata) não foram alterados. A dessensibilização causada pela BK foi quase que totalmente revertida quando a mesma foi co-injetada com PGE_2 , PGI_2 ou SP. Além

disso, a injeção de PGE₂ ou SP (10 nmol/pata) em conjunto com a BK (10 nmol/pata) no primeiro dia, preveniu parcialmente o desenvolvimento da dessensibilização.

6 - A injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) causou edema de pata marcante em animais dessensibilizados à BK. A formação de edema induzida pela des-Arg⁹-BK foi significativamente inibida pelo antagonista de receptores B₁, a des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (100 nmol/pata).

7 - O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, 24 h, s.c.) inibiu significativamente o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais dessensibilizados, mas não foi capaz de interferir com o edema de pata induzido pela BK em animais controle. A dexametasona também foi efetiva em inibir a reversão do edema de pata em animais dessensibilizados, causada pela co-injeção de BK com PGE₂ ou PGI₂.

8 - A injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais controle causou uma pequena alteração de volume das patas (0,06 ± 0,009 ml), enquanto que a injeção do agonista seletivo dos receptores B₂, tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) causou

edema de pata de forma marcante ($0,36 \pm 0,02$ ml). Entretanto, a injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS (24 h antes) resultou na formação de edema de pata expressivo, de maneira dose-dependente, com DE₅₀ igual a 24,1 nmol/pata e resposta máxima de $0,46 \pm 0,08$ ml. Por outro lado, o edema de pata causado pela tirosina⁸-BK em animais tratados com LPS foi reduzido em 79 ± 4 %.

9 - Por outro lado, o tratamento dos animais com LPS reduziu significativamente o edema de pata causado pela histamina (100 nmol/pata), 5-HT (10 nmol/pata) e SP (3 nmol/pata), mas não interferiu com o edema de pata induzido pela PGE₂ (10 nmol/pata).

10 - O antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 -300 nmol/pata) produziu inibição dose-dependente do edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS, com DE₅₀ de 134 nmol/pata, enquanto que os antagonistas seletivos de receptores B₂, o Hoe 140 ou o NPC 17731 (10 nmol/pata) foram inefetivos.

11 - O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) 24 ou 48 h antes do tratamento com LPS produziu inibição marcante do edema de pata causado pela

des-Arg⁹-BK (58 ± 3 e 82 ± 2 %, respectivamente). Além disso, o tratamento com dexametasona foi capaz de reverter a valores próximos do controle, o edema de pata induzido pela tirosina⁸-BK em animais tratados com LPS. A cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c.) e a indometacina (2 mg/kg, i.p.), administrados 24 e 1 h antes dos experimentos, inibiram significativamente o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais pré-tratados com LPS.

12 - A injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (10 nmol/pata) causou edema de pequena intensidade. Entretanto, a injeção de PGE₂, PGI₂, CGRP, SP, 5-HT, ou PAF (1 nmol/pata) em conjunto com a des-Arg⁹-BK (10 nmol/pata) resultou em potencialização do edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK. O edemas observados foram (ml): PGE₂ ($0,31 \pm 0,03$); PGI₂ ($0,39 \pm 0,02$); CGRP ($0,35 \pm 0,04$); SP ($0,33 \pm 0,04$); 5-HT ($0,40 \pm 0,02$) ou PAF ($0,38 \pm 0,016$). Ao contrário dos outros mediadores da inflamação, a histamina não foi capaz de potencializar o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK.

13 - O antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 - 300 nmol/pata) produziu inibição dose-dependente do edema de pata resultante da associação da des-Arg⁹-BK com outros mediadores da inflamação. Os valores de

DE₅₀ observados foram (nmol): 180, 160, 139 e 135, na presença de PGE₂, PGI₂, SP e 5-HT.

14 - Os resultados do presente trabalho sugerem o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ no edema de pata causado pelas cininas. Os receptores B₂ são constitutivos, enquanto que os receptores B₁ podem ser induzidos pela dessensibilização dos receptores B₂ ou pelo tratamento agudo dos animais com LPS. Além disso, doses muito baixas de outros mediadores da inflamação podem potencializar o edema de pata causado pela BK, bem como potencializar o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em animais tratados com LPS. Em conjunto estes resultados sugerem que as cininas, através da interação com os receptores B₁ e B₂, podem ser relevantes na instalação e na manutenção de processos inflamatórios crônicos.

A maioria destes resultados foi publicada no British Journal of Pharmacology, 114 : 1005 - 1013, 1995 e 117 : 793 - 798, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 66: 511, 1909.
- ASANO, M.; INAMURA, N.; HATORI, C.; SAWAI, H.; FUJIWARA, T.; KATAYAMA, A.; KAYAKIRI, H.; SATOH, S.; ABE, Y.; INOUE, T.; SAWADA, Y.; NAKAHARA, K.; OKU, T.; OKUHARA, M. The identification on an orally active, non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR173657. *Br. J. Pharmacol.*, 120: 617 - 624, 1997.
- AUDET, R.; PETICLERC, E.; DRAPEAU, G.; RIOUX, F.; MARCEAU, F. Further analysis of the upregulation of bradykinin B₁ receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, 271: 551 - 555, 1994.
- BARANUIK, J.N.; LUNDGREN, J.D.; MIZOGUSHI, H.; PEDEN, D.; GAWIN, A.; MERIDA, M.; SHAELHAMER, J.H.; KALINER, M.A. Bradykinin and the respiratory membranes. *Am. J. Physiol.*, 141: 706 - 714, 1990.
- BATHON, J.M., MANNING, D.C., GOLDMAN, D.W., TOWNS, M.C. & PROUD, D. Regulation of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, 384-392, 1992.
- BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. *Annu Rev. Pharmacol.*, 31: 129 - 162, 1991.
- BEAUBIEN, G. ROSINSKI-CHUPIN, I.; MATTEI, M.G.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M.; SEIDAH, N.G. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry*, 30: 1628 - 1635, 1991.
- BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44: 1 - 80, 1992.

- BOISSONAS, R.A.; GUTTMANN, S.; JAQUENOUD, P.A. Synthèse de la L- arginyl - L - propyl - L - propyl - glycil - L - phénylalanil - L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta*, 43: 1349 - 1358, 1960.
- BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F. Target disruption of the mouse B₂ bradykinin receptor in embrionic stem cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73: 773 - 779, 1995.
- BORKOWSKI, J.A.; RANSOM, R.W.; SEABROOK, E.R.; TRUMBAUER, M.; CHEN, H.; HILL, R.E.; STRADER, C.D.; HESS, J.F. Target disruption of a B₂ bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J. Biol. Chem.*, 270: 13706 - 13170, 1995.
- BOUTHILLIER, J. DEBLOIS, D. & MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg⁹-bradykinin in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 257 - 264, 1987.
- BRADLEY, C.; BURGUESS, G. A nitric oxide synthases inhibitor reduces desensitization of bradykinin-induced activation of phospholipase C in sensory neurones. *Trans. Biochem. Soc.*, 21: 4353, 1993.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin-gene related paptide and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*, 86: 855 - 860, 1985.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Interactions between tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *Br. J. Pharmacol.*, 97, 77 - 82, 1989.
- BRAUN, A.; KAMMERER, S.; BOHME, E.; MULLER, B.; ROSCHER, A.A. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211: 234 - 240, 1995.
- BUCKLEY, T.L.; BRAIN, S.D.; RAMPART, M.; WILLIAMS, T.J. Time-dependent synergist interactions between the vasodilatador neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 103: 1515 - 1519, 1991.

- BUEB, J.L.; MOUSLI, M.; BRONNER, C.; ROUTOT, B.; LANDRY, Y. Activation of G_i-like proteins, a receptor independent effect of kinin in mast cells. *Mol. Pharmacol.*, 38: 816 - 822, 1990.
- BURCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-stimulated arachidonic acid and release from inositol phosphate formation in swiss 3T3 fibroblasts. Evidence for G-protein coupled phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 85: 6374 - 6378, 1987.
- BURCH, R.M.; CONNOR, J.R.; AXELROD, J. Interleukin-1 amplifies receptor-mediated activation of phospholipase A₂ in 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 6306 - 6309, 1988.
- BURCH, R.M.; CONNOR, J.R.; TIFFANY, C.W. The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation, *Agents Actions*, 27: 258-260, 1989a.
- BURCH, R.M.; DEHAAS, C.J. A bradykinin antagonist inhibits carragenin edema in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 342: 189 - 193, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J.; MARTIN, J.A.; HINER, R.N.; CONNOR, J.; WAN, Y.P. New potent, selective radiolignads for studying bradykinin B₁ and B₂ receptors. *Du Pont Biotech Update*, p.p. 127 - 140, June, 1992.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J.; STORMENN, T.M. Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors, ed Burch RM, pp. 107, Austin, R.G. Landes Co, 1993.
- BURCH, R.M.; TIFFANY, C.W. Tumor necrosis factor amplification of arachidonic acid metabolism in responses to interleukin-1, bradykinin, and other agonists. *J. Cell Physiol.*, 141: 85 - 89, 1989.
- BURCH, R.M.; WHITE, M.F.; CONNOR, J.R. Interleukin-1 stimulates prostaglandin synthesis and cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 fibroblasts: interaction between two second messenger systems. *J. Cell. Physiol.*, 139: 29 - 33, 1989b.

- BURGUESS, G.M.; MULLANEY, I.; MCNEIL, M.; COOTE, P.R.; MINHAS, A.; WOOD, J.N. Activation of guanylate cyclase by bradykinin in sensory neurons is mediated by calcium influx: possible role of increase in cyclic GMP. *J. Neurobiochem.*, 53: 1212 - 1218, 1989.
- BUTT, S.K.; DAWSON, L.G.; HALL, J.M. Bradykinin B₁ receptors in the rabbit urinary urinary bladder: induction of responses, smooth muscle contraction and phosphatidylinositol hydrolysis. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 612 - 617, 1995.
- CABRINI, DA.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. A pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277: 299 - 307, 1996.
- CABRINI, D.A.; SILVA, A.M.; CALIXTO, J.B. Mechanisms of bradykinin-induced contraction of the guinea-pig gallbladder in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1549 - 1556, 1995.
- CAHILL, M.; FISHMAN, J.B.; POLGAR, P. Effect of des-Arg⁹-BK and other bradykinin fragments on the synthesis of prostacyclin and the binding by vascular cells in culture. *Agents Actions*, 24: 224 - 231, 1988.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Characterisation of bradykinin mediating pertussis-toxin-insensitive biphasic responses in circular muscle of the isolated guinea pig ileum, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259: 659 - 665, 1991.
- CAMPBELL, W.; YONEZU, K.; SHINOHARA, T; OKADA, H. An arginine carboxypeptidase generated during coagulation is diminished or absent in patients with reumathoid arthritis. *J. Lab. Clin. Invest.*, 115: 610 - 612, 1990.
- CAMPOS, A.H.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: mediation by B₁ and B₂ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268: 902 - 909, 1994.

- CHERCUITTE, F.; BEAULIEU, A.D.; POUBELLE, P.; MARCEAU, F. Carboxypeptidase N (kininase I) activity in blood and synovial fluid from patients with arthritis. *Life Sci.*, 41: 1225 - 1232, 1987.
- CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; REGOLI, D. Effect of bradykinin atagonists, NG-monomethyl-L-arginine and L-NG-nitro arginine on phospholipaseA₂ induced oedema in rat paw. *Gen. Pharmacol.*, 22: 801 - 804, 1991.
- CLINTON, S.K.; FLEET, J.C.; LOPPNOW, H.; SALOMON, R.N.; CLARK, B.D.; CANNON, J.G.; SHAW, A.R.; DINARELLO, C.A.; LIBBY, P. Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am. J. Pathol.*, 138: 1005 - 1014, 1991.
- COCKFIELD, S.M.; RAMASSAR, V.; NOUJAIM, J.; VAN DER MEIDE, P.H.; HALLORAN, P.F. Regulation of IFN-gamma expression in vivo. IFN-gamma up-regulates expression of its mRNA in normal and lipopolysaccharide-stimulated mice. *J. Immunol.*, 150: 715 - 725, 1993.
- CORRÊA, 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.
- COUTORE, R.; MIZRAHI, J.; REGOLI, D.; DEVROEDE, G. Peptides and the human colon: an in vitro pharmacological study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59: 957 - 964, 1981.
- COUTURE, R.; MIZRAHI, J.; CARANIKAS, S.; REGOLI, D. Acute effects of peptides on the rat colon. *Pharmacology*, 24: 230 - 242, 1982.
- CRUWYS, S.C.; GARRET, N.E.; PERKINS, N.M.; 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.
- CRUWYS, S.C.; KIDD, B.L.; MAPP, P.I.; WALSH, D.A.; BLAKE, D.R. The effects of calcitonin gene-related peptide on formation of intra-articular oedema by inflammatory mediators. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 116 - 119, 1992.

- CUNOOSAMY, M.P.; WHEELDON, A. Haemodynamic effects of bradykinin B₁ and B₂ receptor activation in anaesthetized rats. **Br. J. Pharmacol.**, 227, 1995.
- DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J-F; SIMMONS, W.H. Potentiation of the pro-inflammatory effects of bradykinin by inhibition of angiotensin-converting enzyme and aminopeptidase P in rat paws. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 354: 670 - 676, 1996.
- DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G. Influence of long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 211: 81 - 86, 1992.
- DAVIS, A.J.; KELLY, D.; PERKINS, M.N. The induction of des-Arg⁹-bradykinin-mediated hyperalgesia in the rat paw by inflammatory stimuli. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27: 1793 - 1802, 1994.
- DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. The involvement of B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 63 - 68, 1994.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factor on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-Bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, 93: 969-977, 1988.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulation of the up-regulated responses to des-Arg⁹-bradykinin in vivo and in vitro. **Immunopharmacology**, 17: 187 - 198, 1989.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances tissue response to des-Arg⁹-bradykinin: possible role of interleukin-1. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 314-315, 1991.
- DEBLOIS, D.; DRAPEAU, G.; PETICLERC, E.; MARCEAU, F. Synergism between the contractile effect of the epidermal growth factor and that of des-Arg⁹-bradykinin and of α -thrombin in rabbit aortic rings. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 959 - 967, 1992.

- DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. The ability of des-Arg⁹-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired during in vitro incubation. **Eur J. Pharmacol.**, 142: 141 - 144, 1987.
- DE CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 316: 227 - 286, 1996.
- DEKIMPE, S.J.; TIELEMANS, W.; VAN HAUVEN-NOLSEN, D.; NIJKAMP, F.P. Reversal of bradykinin-induced relaxation to contraction after interferon- γ in bovine isolated mesenteric arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, 261: 111 - 120, 1994.
- DEWITT, B.J.; CHNEG, D.Y.; KADOWITZ, P.J. Des-Arg⁹-bradykinin produces tone-dependent kinin B₁ receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. **Circ. Res.**, 75: 1064 - 1072, 1994.
- DONALDSON, L. F.; HANLEY, M.R.; VILLABRANCA, A.C. Inducible receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 171 - 181, 1997.
- DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. **Pain Rev.**, 1: 153 - 171, 1994.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Trends Neurosci.**, 16: 99 - 104, 1995.
- DRAY, A.; PATEL, I.A.; PERKINS, M.N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor studies on neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 1129 - 1134, 1992.
- DRIPPS, D.J.; BRANDHUBER, B.J.; THOMPSON, R.C.; EISENBERG, S.P. Interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-KDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. **J. Biol. Chem.**, 153: 473 - 480, 1991.

- EGGERIKX, D.; RASPE, E.; BERTRAND, D.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187: 1306 - 1313, 1992.
- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas of kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: S20 - S24, 1990.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. The pharmacology of bradykinin receptors. In *Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research.* Ed Marcel Dekker. New York, pp. 1 - 31, 1991.
- FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.*, 24: 163 - 169, 1965.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1227 - 1231, 1993.
- FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of cat. *Br. J. Pharmacol.*, 30: 417 - 421, 1967.
- FIELD, J.L.; BUTT, S.K.; MORTON, I.K.M.; HALL, J.M. Bradykinin B₂ receptors and coupling mechanisms in the smooth muscle in the guinea pig taenia caeci. *Br. J. Pharmacol.*, 113: 607 - 613, 1993.
- FIELD, J.L.; HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. Putative novel bradykinin B₃ receptors in the smooth muscle of the guinea pig taenia caeci and trachea. *Agents Actions Suppl.*, 38: 540 - 545, 1992.
- GAFFORD, J.T.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G.; HERSH, L.B. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry*, 22: 3265 - 3271, 1983.
- GAGINELLA, T.S.; KACHUR, J.F. Kinin mediators of intestinal secretion. *Am. J. Physiol.*, 256, G1- G15, 1989.

- GALIZZI, J.P.; BODINER, M.C.; CHAPELAIN, B.; LY, S.M.; COUSSY, L.; GIRAUD, S.; NEILAT, G.; JEAN, T. Up-regulation of [³H]-des-Arg¹⁰-kallidin binding to the bradykinin B₁ receptor by interleukin-1 β in isolated smooth muscle cells: correlation with B₁ agonist-induced PGI₂ production. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 389 - 394, 1994.
- GARCIA LEME, J. Bradykinin system. In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 50, Inflammation, ed Vane, J.R. e Ferreira, S.H. p.p. 464 - 522. Berlin: Springer-Verlag, 1978.
- GAUDREAU, P.; BARABÉ, J.; ST-PIERRE, S.; REGOLI, D. Pharmacological studies of kinins in venous smooth muscles. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 59: 371 - 379, 1981.
- GAVRAS, H.; BENETOS, A.; GAVRAS, I. Contribution of bradykinin to maintenance of normal blood pressure. **Hypertension**, 9: 147 - 149, 1987.
- GEIGER, T.; ARNOLD, J.; RORDORF, C.; HENN, R.; VOSBECK, K. Interferon-gamma overcomes the glucocorticoid-mediated and interleukin-4-mediated inhibition of interleukin-1 beta synthesis in human monocytes. **Lymphokine Cytokine Res.**, 12: 271 - 278, 1993.
- GRIESBACHER, T; LEGAT, F.J. Effects of FR173657, a non-peptide B₂ antagonist, on kinin-induced hypotension, visceral and peripheral oedema formation and broncoconstriction. **Br. J. Pharmacol.**, 120: 933 - 939, 1997.
- GRIESBACHER, T.; SAMETZ, W.; LEGAT, F.J.; DIETHART, S.; HAMMER, S.; JUAN, H. Effects of the non-peptide B₂ antagonist FR173657 on kinin-induced smooth muscle contraction and relaxation, vasoconstriction and prostaglandin release. **Br. J. Pharmacol.**, 1997, In Press.
- GUIMARÃES, J.A.; BORGES, B.R.; PRADO, E.S.; PRADO, J.L. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochem. Pharmacol.**, 22: 3157 - 3172, 1973.

- GUTOWSKI, S.; SMRCKA, A.; NOWAK, L.; WU, D.G.; SIMON, M.; STERNWEISS, P.C. Antibodies to the α_q subfamily of guanine nucleotide binding regulatory protein subunits attenuate activation of phosphatidylinositol-4,5-biphosphate hydrolysis by hormones. *J. Biol. Chem.*, 266: 20519 - 20524, 1991.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, 56: 131 - 190, 1992.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol.*, 28: 1 - 6, 1997.
- HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. Bradykinin B_2 receptor evoked K^+ permeability increase mediates relaxation in the rat duodenum. *Eur. J. Pharmacol.*, 193: 231 - 238, 1991.
- HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, New York, p.p. 9 - 43, 1997.
- HARGREAVES, K.M.; TROULLOS, E.S.; DIONNE, R.A.; SCHMIDT, E.A.; SCHAFFER, S.C.; JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 44: 613 - 621, 1988.
- HARVEY, J.S.; BURGESS, G.M. A nitric oxide synthase inhibitor reduces desensitization of bradykinin-induced activation of phospholipase C in sensory neurons. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 435S, 1993.
- HEINDRIKS, D.; WANG, W.; SCHARPÉ, S.; LOMMAERT, M.P.; VAN SANDE, M. Purification and characterization of a new carboxypeptidase in human serum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1034: 86 - 92, 1990.
- HESS, J.F. Molecular pharmacology of kinin receptors. In *The Kinin System*. Farmer, S.G., Ed. Academic Press, New York, p.p. 45 - 55, 1997.
- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; MACNEIL, T.; STONESIFER, G.Y.; FRAHER, J.; STRADER, C.D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B_2 bradykinin receptors. *Molec. Pharmacol.*, 45: 1 - 8, 1994.

- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; YOUNG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSON, R.W. Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem. Res. Commun.**, 184: 260 - 268, 1992.
- HOCK, F.J.; WIRTH, K.; ALBUS, U.; LINZ, W.; GERHARDS, H.J.; WIEMER, G.; HENKE, S.T.; BREIPORHL, G.; KONIG, W.; KNOLLE, J.; SCHOLKENS, B.A. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vitro studies. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 769 - 773, 1991.
- HULEIHEL, M.; DOUVDEVANI, A.; SEGAL, S.; APTE, R.N. Different regulatory levels are involved in the generation of hemopoietic cytokines (CFSs and IL-6) in fibroblasts stimulated by inflammatory products. **Cytokine**, 5: 47 - 56, 1993.
- INOKUCHI, J-I; NAGAMATSU, A. Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin converting enzyme). **Biochim. Biophys. Acta.** 662: 300 - 307, 1981.
- ISHIDA, H.; SCILLI, A.G.; CARRETERO, O.A. Contributions of various rat plasma peptidases to kinin hydrolysis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 251: 817 - 820, 1989.
- IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; DI URNO, M.V.; AUTORE, G.; DI CARLO, G. CAPASSO, F. Platelet activating factor potentiates rat paw oedema induced by different phlogogen agents. **Agents Actions**, 41: 140 - 143, 1994.
- KACHUR, J.F.; ALLBEE, W.; GAGINELLA, T.S. Effect of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin on ion transport across normal and inflamed rat colonic mucosa. **Gastroenterology**, 90: 1481, 1986.
- KAMMERER, S.; BRAUN, A.; ARNOLD, N.; ROSCHER, A.A. The human bradykinin B₂ receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 211: 226 - 233, 1995.

- KHASAR, S.G.; MIAO, F.J.; LEVIE, J.D. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in rat. **Neuroscience**, 69: 685 - 690, 1995.
- KRAUT, H.; FREY, E.K.; WERLE, E. Der Nachweis eines krieslaufhomons in der pankreasdrüse. Hoppe-Seyler's Z. **Physiol. Chem.**, 189: 97 - 106, 1930.
- KYLE, D.J.; MARTIN, J.A.; FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Design and conformational analysis of several highly potent bradykinin receptor antagonists. **J. Med. Chem.**, 34: 1230 - 1233, 1991.
- KYLE, D.J.; BURCH, R.M. A survey of bradykinin receptors and their antagonists. **Curr. Opin. Invest. Drugs**, 2: 5 - 20, 1993.
- LANG, E.; NOVAK, A.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. Chemosensitivity to fine afferents from rat skin in vitro, **J. Neurophysiol.**, 63: 887 - 901, 1990.
- LEE, K.M.; TOSCAS, K.; VILLEREAL, M.L. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca^{2+} entry by tyrosine kinase inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 268: 9945 - 9948, 1993.
- LEEB-LUNDBERG, L.M.F.; MATHIS, S.A.; HERZIG, M.C.S. Antagonists of bradykinin that stabilize a G-protein-uncoupled state of the B_2 receptor act as inverse agonists in rat myometrial cells. **J. Biol. Chem.**, 269: 25970 - 25973, 1994.
- LEMBECK, F.; GRIESBACHER, T.; ECKHARHARDT, M.; HENKE, S.; BREIPOHL, G.; KNOLLE, J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 297 - 304, 1991.
- LERNER, U.H.; BRUNIUS, G.; MODEER, T. On the signal transducing mechanisms involved in the synergistic interaction between interleukin-1 and bradykinin on prostaglandin biosynthesis in human gengival fibroblasts. **Biosci. Reports**, 12: 263 - 272, 1992.

- LERNER, U.H.; MODEER, T. Bradykinin B₁ and B₂ receptor agonists synergistically potentiate interleukin-1-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Inflammation*, 15: 427 - 436, 1991.
- LEVESQUE, L.; HARVEY, N.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Development of a binding assay for the B₁ receptors for kinins. *Immunopharmacology*, 29: 141 - 147, 1995.
- LEWIS, G.P. Plasma kinin and other vasoactive compounds in acute inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 116: 847 - 854, 1964.
- LEWIS, G.P. Kinin in inflammation and tissue injury. In handbook of Experimental Pharmacology, Vol XXV, ed Erdos, E.G. pp. 516 - 530. Berlin: Springer-Verlag, 1970.
- LORTIE, M.; REGOLI, D.; RHALEB, N.E.; PLANTE, G.E. The role of B₁ and B₂ kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol.*, 262: R72 - R76, 1982.
- MA, J.; WANG, D.; CHAO, L.; CHAO, J. Cloning, sequence analysis and expression of gene encoding the mouse bradykinin B₂ receptor gene. *Genomics*, 23: 362 - 369, 283 - 288, 1994a.
- MA, J.; WANG, D.; WARD, D.C.; CHEN, L.; DESSAI, T.; CHAO, J.; CHAO, L. Structure and chromosomal localization of the gene encoding human bradykinin B₂ receptor. *Genomics*, 23: 362 - 369, 1994b.
- MACNEIL, T.; BIERILLO, K.K.; MENKE, J.G.; HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. *Biochem. Biophys. Acta Gene Struct. Express.*, 1264: 223 - 228, 1995.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; GEPPETI, P.; CECCONI, R. GIULIANI, S.; MELI, A. Multiple mechanisms in the motor responses of the guinea pig isolated urinary bladder to bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, 98: 619 - 629, 1989.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30:1 - 26, 1995.

- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptor induction and inflammation. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, New York, p.p. 143 - 156, 1997.
- MARCEAU, F.; KNAP, M.; REGOLI, D. Pharmacological characterization of the vascular permeability-enhancing effects of kinins in the rabbit skin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59: 921 - 926, 1981.
- 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., LUSSIER, A.; ST-PIERRE, S. Selective induction of cardiovascular responses to des-Arg⁹-bradykinin by bacterial endotoxin. *Pharmacology*, 29: 70 - 74, 1984.
- MARCEAU, F.; ST-PIERRE, S; REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 58: 536 - 542, 1980.
- MARTINS, M.A.; PASQUALE, C.P.; BOZZA, P.T.; SILVA, P.M.; FARIA NETO, H.C.; CORDEIRO, R.S. Homologous tachyphylaxis to bradykinin and its interference with allergic pleurisy in actively sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 220: 55 - 61, 1992.
- MCEACHERN, A.E.; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKA, J.; ALDRICH, R.W.; JARANGIN, K. Expression cloning of rat B₂ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7724 - 7728, 1991.
- MCGEHEE, D.S.; GOY, M.F.; OXFORD, G.S. Involvement of nitric oxide-cyclic GMP pathway in desensitisation of bradykinin responses of cultured sensory neurons. *Neuron*, 9: 315 - 324, 1992.
- MCINTYRE, P.; PHILLIPS, E.; SKIDMORE, E.; BROWN, M.; WEBB, M. Cloned murine bradykinin receptor exhibits a mixed B₁ and B₂ pharmacological selectivity. *Mol. Pharmacol.*, 44: 346 - 355, 1993.

- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILLO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, 269: 21583 - 21586, 1994.
- MUNOZ, C.M.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Receptor-mediated internalization of bradykinin. *J. Biol. Chem.*, 267: 303 - 309, 1992.
- MURRAY, S.R.; CHAO, J.; LIN, F.; CHAO, L. Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: S7 - S15, 1990.
- NAKHOSTINE, N.; RIBUOT, C.; LAMONTAGNE, D.; NADEAU, R.; COUTURE, R. Mediation by B₁ and B₂ receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 71 - 76, 1993.
- NEWBOLD, P.; BRAIN, S.D. The modulation of inflammatory oedema by calcitonin gene-related peptide. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 705 - 710, 1993.
- NWATOR, I.A.A.; WHALLEY, E.T. Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of des-Arg⁹-bradykinin (kinin B₁) receptors in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 160: 125 - 132, 1989.
- OCHALSKI, S.J.; HARTMAN, D.A.; BELFAST, M.T.; WALTER, T.L.; GLASER, K.B.; CARLSOM, R.P. Inhibition of endotoxin-induced hypothermia and serum TNF-alpha levels in CD-1 mice by various pharmacological agents. *Agents Actions*, 39: C52 - C54, 1993.
- ONDETTI, M.A.; CUSHMAN, D.W.; RUBIN, B. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: a new class of orally-active anti-hypertensive agents. *Science*, 196: 4033 - 4039, 1977.
- OSHIMA, G.; HIRAGA, Y.; SHIRONO, K.; OH-ISHI, S.; SAKAKIBARA, S.; KINOSHITA, T. Cleavage of des-Arg⁹-bradykinin by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex. *Experientia*, 41: 325 - 328, 1985.

- PANG, G.; COUCH, L.; BATEY, R.; CLANCY, R.; CRIPPS, A. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. **Clin. Exp. Immunol.**, 96: 437 - 443, 1994.
- PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E; DRAY, A. Antinoceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat., **Pain**, 53: 191-197, 1993.
- PERKINS, M.N.; KELLY D. Induction of bradykinin-B₁ receptors "in vivo" in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1441-1444, 1993.
- PERKINS, M.N.; KELLY, D.; DAVIS, A.J. Bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73: 832 - 836, 1995.
- PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; OLIVEIRA, S.M.; ROSCHER, A.A.; METZGER, R.; GANTEN, D.; BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. **Biochem. Biophys.**, 220: 219 - 225, 1996.
- POLOSA, R.; DJUKANOVIC, R.; RAJAKULASINGAM, K.; PALERMO, F.; HOLGATE, S.T. Skin responses to bradykinin, kallidin, and des-Arg⁹-bradykinin in nonatopic and atopic volunteers. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 92: 683 - 689, 1993.
- POWEL, S.J.; SLYNN, G.; THOMAS, C.; HOPKINS, B.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. **Genomics**, 15: 435 - 438, 1993.
- PROUD, D.; BAUMGARTEN, C.R.; NACLEIRO, R.M.; WARD, P.E. Kinin metabolism in human nasal secretions during experimentally induced allergic rhinitis. **J. Immunol.**, 138: 428 - 434, 1987.

- PROUD, D.; KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Am. Rev. Immunol.*, 6: 49 - 83, 1988.
- PRUNEAU, D.; BÉLICHARD, P. Induction of bradykinin B₁ receptor-mediated relaxation in the isolated rabbit carotid artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 239: 63 - 67, 1993.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties. in *Textbook of Pain*. (eds. P.D. Wall e R. Melzak), pp 57 - 78. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994.
- RANG, H.P.; URBAN, L. New molecules in analgesia. *Br. J. Anest.*, 75: 145 - 156, 1995.
- RANSOM, R.W.; YOUNG, G.S.; SCHNECK, K.; GOODMAN, C.B. Characterization of solubilized bradykinin B₂ receptor from smooth muscle and mucosa of guinea pig ileum. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 1823 - 1827, 1992.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 32: 1 - 46, 1980.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J.; PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55: 855 - 867, 1977.
- REGOLI, D.; GOBIEL, F.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D.; SEONE, P.R.; SALVINO, J.M.; SAWUTZ, D.G. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sci.*, 55: 735 - 749, 1994.
- REGOLI, D.; MARCEAU, F.; BARABÉ, J. De novo formation of vascular receptors for kinins. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 56: 674 - 677, 1978.
- REGOLI, D.; MARCEAU, F.; LAVIGNE, J. Induction of b1 receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 105 - 115, 1981.
- REGOLI, D. RHALEB, N-E.; DRAPEAU, G.; DION, S. Kinin receptors subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: S30 - S38, 1990.

- ROBERTS, R.A. Bradykinin receptors: characterization, distribution and mechanisms of signal transduction. **Prog. Growth Factors Res.**, 1: 237 - 252, 1989.
- ROBERTS, R.A.; GULLICK, W.J. Bradykinin receptors undergo ligand-induced desensitization. **Biochemistry**, 29: 1975 - 1979, 1990.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, 156: 261 - 273, 1949.
- ROCH-ARVEILLER, M.; GIROUD, J.P.; REGOLI, D. Kinins and inflammation: emphasis on interactions of kinins with various cell types. **Prog. Appl. Microcirc.**, 7: 81 - 95, 1985.
- ROSCHER, A.A.; KLIER, C.; DENGLER, R.; FAUBNER, A.; MÜLLER-ESTERL, W. Regulation of bradykinin action at the receptor level. **J. Cardiovasc. Physiol.**, 15: 39 - 43, 1990.
- ROSCHER, A.A.; MANGANIELLO, V.C.; JESELMA, C.L, MOSS, J. Receptors for bradykinin in intact cultured human fibroblasts. Identification and characterization by direct binding study. **J. Clin. Invest.**, 72: 626 - 635, 1983.
- ROSCHER, A.A.; MANGANIELLO, V.C.; JESELMA, C.L, MOSS, J. Autoregulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced prostacyclin formation in human fibroblasts. **J. Clin. Invest.**, 74: 552 - 558, 1984.
- RUEFF, A.; PATEL, I.A.; URBAN, L.; DRAY, A. Regulation of bradykinin sensitivity in peripheral sensory fibres of the neonatal rat by nitric oxide and cyclic GMP. **Neuropharmacology**, 33: 1139 - 1145, 1994.
- SALVINO, J.M.; SEONE, P.R.; DOUTTY, B.D.; AWAD, M.M.A; DOLEE, R.E.; HOUCK, W.T.; FAUNCE, D.M.; SAWUTZ, D.G. Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin receptor. **J. Med. Chem.**, 36: 2583 - 2584, 1993.

- SAWUTZ, D.G.; SALVINO, J.M.; DOLLE, R.E.; CASIANO, F.; WARD, S.J.; HOUCK, W.T.; FAUNCE, D.M.; DOUTY, B.D.; BAIZMAN, E.; AWAD, M.M.A.; MARCEAU, F.; The non-peptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. USA*, 91: 4693 - 4697, 1994.
- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J.B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 11: 83 - 88, 1994.
- SCHENECK, K.A.; HESS, J.F.; STONESIFER, G.Y.; RANSOM, R.W. Bradykinin B₁ receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharm. Sect.*, 266: 277 - 282, 1994.
- STERANKA, L.R.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pain and in inflammation. In *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinical Research*. Burch, R.M., 191 - 211, Marcell Dekker, New York, 1991.
- STERANKA, L.R.; BURCH, R.M.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; ENNA, S.J. Multiple bradykinin receptors: results of studies using a novel class of receptor antagonists. In: *Neuroreceptors and Signal Transduction*, Ed Plenum Publishing Corporation, 111 - 127, 1988.
- STEWART, J.M.; FERREIRA, S.H.; GREENE, L.J. Bradykinin-potentiating peptide Pca-Lys-Tryp-Ala-Pro. *Biochem Pharmacol.*, 20: 1557 - 1567, 1971.
- SZOLCSANYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors on the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J. Physiol.*, 388: 9 - 23, 1987.
- TIFFANY, C.W., BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages, *FEBS Lett.*, 247: 189-192, 1989.
- TIPPMER, S.; QUITTERER, U.; KOLM, V.; FAUSSNER, A.; ROSCHER, A.A.; MOSTHAF, L.; MÜLLER-ESTERL, W.; HÄRING, H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α , ϵ , and ζ . *Eur. J. Biochem.*, 225: 297 - 304, 1994.

- TODA, N.; BIAN, K.; AKIBA, T.; OKAMURA, T. Heterogeneity in mechanisms of bradykinin of bradykinin action in canine isolated blood vessels. **Eur. J. Pharmacol.**, 135: 321 - 329, 1987.
- TROPEA, M.M.; GUMMELT, D.; HERZIG, M.S.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. B₁ and B₂ kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg⁹-bradykinin and bradykinin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 264: 930 - 937, 1993.
- TROPEA, M.M.; MUNOZ, C.M.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Bradykinin binding to B₂ kinin receptors and stimulation of phosphoinositide turnover and arachidonic acid release in primary cultures of cells from late pregnant rat myometrium. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, 70: 1360 - 1371, 1992.
- UENO, A.; TOKUMASU, T.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of bradykinin in endotoxin-induced vascular permeability increase in the skin of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 284: 211 - 214, 1995.
- ULICH, T.R.; GUO, K.; YIN, S.; DEL CASTILHO, J.; YI, E.S.; THOMPSON, R.C.; EISENBERG, S.P. Endotoxin-induced gene expression in vivo. Expression of interleukin-1 alpha/beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation. **J. Pathol.**, 141: 61 - 68, 1992.
- VASKO, M.R.; CAMPBELL, W.B.; WAITE, K.J. Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons. **J. Neurosci.**, 14: 4987 - 4997, 1994.
- VAVREK, R.; STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides**, 6: 161 - 164, 1985.
- WHALLEY, E.T. Receptors mediating the increase in vascular permeability to kinins: comparative studies in rat, guinea-pig and rabbit. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 336: 99 - 104, 1987.
- WHALLEY, E.T.; FRITZ, H.; GEIGER, R. Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar arteries. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 336: 296 - 301, 1983.

- WHALLEY, E.T.; SAMPAIO, C.A.M.; FRITZ, H.; EDWARDS, G. The effects of kinins on paw oedema and uterus in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 328: 202 - 206, 1984.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 111: 544 - 547, 1962.
- WIRTH, K.; HOCK, F.J.; ALBUS, U.; LINZ, W.; ALPERMANN, H.G.; AGNOSTOPOULOS, H.; HENKE, H.; BREIPHOL, S.; KÖNIG, G.; KNOLLE, W.; SCHÖLKENS, B.A. Hoe 140 a new potent and long-acting bradykinin antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.*, 102: 774 - 777, 1991.
- WOLSING, D.H.; ROSENBAUUN, J.S. The mechanism for the rapid desensitization in bradykin-stimulated inositol monophosphate production in NG 108-15 cells involves interaction of a single receptor with multiple signalling pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 253 - 261, 1993.