

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

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO MODULATÓRIO DE
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS SOBRE AS RESPOSTAS
MEDIADAS PELOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS CININAS NA
PATA DE RATO**

Tese 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 Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

**MARIA MARTHA CAMPOS
Florianópolis, 2001**

CAMPOS, Maria Martha. *Mecanismos envolvidos no efeito modulatório de citocinas pró-inflamatórias sobre as respostas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ para as cininas na pata de rato*. Florianópolis, 2001, 151f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

Defesa: 23/08/2001

Estudo do efeito do tratamento local com [citocinas pró-inflamatórias] sobre as respostas mediadas pelos [receptores B₁ e B₂] para as [cininas] na [pata de rato]. O tratamento com as citocinas [IL-1 β] ou [TNF α] foi capaz de induzir um aumento dose-dependente e marcante da [resposta edematogênica] mediada pelos receptores B₁, acompanhado de um aumento na [expressão] destes receptores, sem interferir com as respostas mediadas pelos receptores B₂. O aumento funcional dos receptores B₁ na pata de rato, induzido pela IL-1 β e pelo o TNF α , parece depender da produção de metabólitos do [ácido araquidônico], da produção secundária de outras citocinas pró-inflamatórias, da ativação de algumas [quinases], além da estimulação do fator de transcrição nuclear [NF- κ B] e de [síntese protéica]. Além disso, o aumento das respostas mediadas pelos receptores B₁, na pata de ratos pré-tratados com IL-1 β , parece envolver a migração de [neutrófilos], dependente da produção de [PAF] e de [moléculas de adesão]. Estes dados contribuem para esclarecer alguns mecanismos envolvidos na interação entre o sistema de cininas e citocinas durante o processo inflamatório.

[bradicinina], [des-Arg⁹-bradicinina], [citocinas inflamatórias], [glicocorticóides], [fatores de transcrição], [migração celular]

**“MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO MODULATÓRIO DE CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS SOBRE AS RESPOSTAS MEDIADAS PELOS
RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS CININAS NA PATA DE RATO”.**

POR


MARIA MARTHA CAMPOS

**Tese 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)**



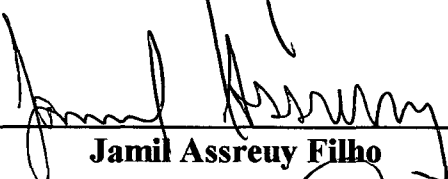
Jorge Almeida Guimarães **UFRGS**



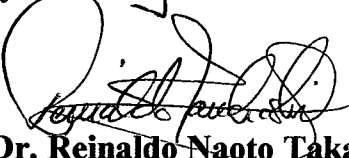
Roberto Soares de Moura **UERJ**



Giles Alexander Rae **FMC/UFSC**



Jamil Assreuy Filho **FMC/UFSC**


Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 23 de agosto de 2001.

Comece fazendo o que é necessário, depois
o que é possível e de repente você estará
fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Ao Professor João Batista Calixto, pelo apoio, incentivo e segurança dispensados durante toda minha vida acadêmica. Seu profissionalismo, humildade, dedicação e integridade são um exemplo a seguir, e sua orientação, pode ser considerada um privilégio. A ele dedico esta tese.

À Professora Glória Emília P. de Souza, pela inestimável contribuição neste trabalho e em outros anteriores, e ainda, pelo carinho, amizade e apoio incondicional.

Ao Professor Mauro Martins Teixeira, pela constante troca de informações e por constituir mais um dos bons exemplos dentro da pesquisa brasileira.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Professor Reinaldo N. Takahashi.

Aos professores da Coordenadoria Especial em Farmacologia, principalmente aos Professores Giles Alexander Rae e Jamil Assreuy Filho, pelos ensinamentos e apoio recebidos.

A todos os funcionários do Departamento, em especial a Zeri Pedro da Cunha e a Pedro Paulo de Souza, pelo carinho e paciência.

À Professora Maria Cristina Avellar e à Dra. Daniela A. Cabrini pelo auxílio nos experimentos com NF- κ B.

Ao Professor Jorge L. Pesquero e Natasha D. Ricci pela importante contribuição nos experimentos de PCR.

A Patrícia Vianna de Abreu e a Rosana Maria Ostroski pelo carinho, amizade e principalmente pela paciência interminável.

A todos os colegas e amigos do Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

Aos alunos de iniciação científica, especialmente Karla, Ricardo, Rafael, Priscilla, Rodrigo e Fernanda, pela amizade e companheirismo.

À Professora Jussara Terezinha Raitz, pela criteriosa revisão de Língua Portuguesa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

À minha mãe, pela dedicação, incentivo e carinho em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Maria Léa e ao meu cunhado Moacir, pela paciência e compreensão, e principalmente, por estarem sempre ao meu lado quando mais precisei de apoio.

A minha sobrinha Beatriz, pequena grande companheira de todas as horas.

Ao meu irmão Alexandre, que apesar da distância, sempre me transmitiu apoio.

Minha gratidão, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	38
1. Objetivos gerais	38
2. Objetivos específicos	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
1. Animais	40
2. Procedimentos experimentais	40
2.1. Medida do edema de pata.....	40
2.2. Tratamento com citocinas pró-inflamatórias	41
2.3. Análise dos mecanismos envolvidos no edema de pata causado pela des-Arg ⁹ -BK em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α	42
2.4. Análise do efeito de inibidores de quinases ou do fator nuclear NF- κ B sobre as respostas mediadas pelos receptores B ₂ para as cininas.....	46
2.5. Medida dos níveis de IL-1 β e TNF α	47
2.6. Detecção do RNAm para o receptor B ₁	48
2.7. Ativação do fator nuclear NF- κ B	49
2.8. Medida da atividade da mieloperoxidase	52
3. Drogas e reagentes	53

4. Análise estatística.....	54
RESULTADOS.....	56
1. Caracterização da resposta edematogênica causada por agonistas seletivos dos receptores B ₁ e B ₂ em animais pré-tratados com citocinas pró-inflamatórias	56
2. Efeito do tratamento com IL-1 β sobre o aumento do RNAm para o receptor B ₁ na pata de rato	59
3. Análise dos mecanismos envolvidos no edema de pata causado pela des-Arg ⁹ -BK em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α	65
4. Análise do efeito de inibidores de quinases ou do fator nuclear NF- κ B sobre as respostas mediadas pelos receptores B ₂ para as cininas.....	74
5. Medida dos níveis de IL-1 β e TNF α após o tratamento com IL-1 β na pata de rato	81
6. Efeito da injeção intraplantar de IL-1 β sobre a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B	82
7. Influência da migração de neutrófilos sobre o aumento das respostas mediadas pelos receptores B ₁ após o tratamento com IL-1 β	84
DISCUSSÃO	91
SUMMARY AND CONCLUSIONS	119
RESUMO E CONCLUSÕES	122
TRABALHOS PUBLICADOS	126

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
--	------------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Edema de pata de rato causado por agonistas seletivos dos receptores B₁ em animais pré-tratados com IL-1 β 59

FIGURA 2 - Edema de pata de rato causado por agonistas seletivos dos receptores B₁ em animais pré-tratados com TNF α 60

FIGURA 3 - Efeito tempo-resposta para o tratamento com IL-1 β , TNF α ou IL-6 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK..... 61

FIGURA 4 - Edema de pata de rato causado pelo agonista seletivo dos receptores B₂, tirosina⁸-BK, em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 62

FIGURA 5 - Efeito dose-resposta para o tratamento com IL-1 β ou TNF α sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK 63

FIGURA 6 - Efeito tempo-dependente do tratamento com IL-1 β sobre o aumento do RNAm para o receptor B₁ na pata de rato..... 64

FIGURA 7 - Efeito da co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-NPC 17731 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 66

- FIGURA 8** - Influência do tratamento com indometacina sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 67
- FIGURA 9** - Influência do tratamento com os inibidores preferenciais da COX-2, meloxicam e NS 398 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 68
- FIGURA 10** - Efeito da co-injeção dos anticorpos anti-IL-1 β e anti-TNF α sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 70
- FIGURA 11** - Efeito da co-injeção dos anticorpos anti-IL-8 e anti-IL-6 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 71
- FIGURA 12** - Efeito da co-injeção das citocinas antiinflamatórias IRA e IL-10 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 72
- FIGURA 13** - Efeito da co-injeção dos inibidores da proteína quinase C, estaurosporina e RO 318220 sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 75
- FIGURA 14** - Efeito da co-injeção do inibidor da MAP-quinase, PD 098059, sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 76

- FIGURA 15** - Influência do tratamento com o inibidor da tirosina quinase, genisteína, sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 77
- FIGURA 16** - Influência do tratamento com o dexametasona ou cicloheximida sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 78
- FIGURA 17** - Influência do tratamento com os inibidores do fator de transcrição nuclear NF- κ B, TLCK e PDTC, sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α 79
- FIGURA 18** - Aumento dos níveis de IL-1 β e TNF α induzido pela injeção de IL-1 β na pata de rato 82
- FIGURA 19** - Ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B induzido pela injeção de IL-1 β na pata de rato. Efeito do tratamento com dexametasona e PDTC..... 83
- FIGURA 20** - Efeito da injeção intraplantar de IL-1 β e/ou des-Arg⁹-BK sobre a ativação da MPO na pata de rato. Efeito da co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK..... 86
- FIGURA 21** - Efeito da co-injeção do antagonista de PAF, WEB 2086, ou do antagonista de receptores LTB₄ sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β 87

FIGURA 22 - Efeito do tratamento com os inibidores de moléculas de adesão, fucoidina e anti-CD18, sobre o edema de pata causado pela des-Arg ⁹ -BK em ratos pré-tratados com IL-1 β	88
FIGURA 23 - Efeito do tratamento com fucoidina sobre o aumento do RNAm para o receptor B ₁ induzido pela IL-1 β na pata de rato	89
FIGURA 24 - Efeito do tratamento com vários inibidores da migração celular sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela IL-1 β na pata de rato	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito do tratamento com várias classes de drogas sobre o edema de pata causado pela BK.....	80
--	----

QUADRO 1	36
-----------------------	----

ESQUEMA 1	118
------------------------	-----

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorre em resposta a estímulos específicos, tais como infecções ou danos teciduais. A extensão dos eventos observados está diretamente relacionada com a intensidade do estímulo inicial e com os mecanismos imunológicos que são ativados (McIntyre et al., 1997).

As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório. As principais células envolvidas na fase aguda da inflamação são os neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de linfócitos migram para o sítio inflamatório (Huerre e Gounon, 1996). O influxo de leucócitos é regulado por mediadores produzidos por células inflamatórias, por células endoteliais, ou ainda, por mastócitos. Os mediadores da inflamação podem ser definidos como moléculas solúveis e difusíveis e são representados por produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), por componentes do sistema complemento, por citocinas, leucotrienos e prostaglandinas, ou por outros mediadores lipídicos. Além destes, mediadores peptídicos, como as cininas, as neurocininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), também exercem papel fundamental no processo inflamatório.

As cininas representam um grupo importante de moléculas envolvidas na inflamação, cujas ações têm sido extensivamente revisadas e confirmadas

em várias alterações inflamatórias, incluindo pancreatite, peritonite, artrite reumatóide, asma, desordens do trato genito-urinário, além de dor e hiperalgesia, e inflamação neurogênica (para revisão ver: Roch-Arveiller et al., 1985; Hargreaves et al., 1988; Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000; McLean et al., 2000a; Blais et al., 2000). Desta forma, a produção de cininas, no sítio inflamatório, resulta em vasodilatação, extravasamento plasmático e aderência de neutrófilos, em consequência de uma ação direta sobre o endotélio da microvasculatura, ou ainda indireta, através da liberação de outras substâncias pró-inflamatórias. Ademais, as ações das cininas podem ser amplificadas pela interação com outros mediadores da inflamação, freqüentemente no nível dos segundos mensageiros (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1996; para revisão ver: Calixto et al., 2000). Em adição a estes efeitos, vários outros papéis biológicos, incluindo a participação no controle da pressão arterial e a contração e o relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, têm sido atribuídos às cininas desde a sua descoberta (Marceau e Bachvarov, 1998).

A identificação dos componentes do sistema de cininas teve início há quase um século, com os estudos de Abelous e Bardier (1909), que demonstraram que a injeção de uma fração da urina humana insolúvel em álcool produzia hipotensão acentuada quando injetada por via endovenosa em cães. Mais tarde, estas evidências foram confirmadas por Pribram e Hernheiser (1920) e por Frey (1926), que apresentaram resultados

semelhantes aos anteriores, em coelhos e em cães. O efeito hipotensivo observado foi atribuído a um componente isolado da urina humana e denominado inicialmente de *substância F* (Frey e Kraut, 1928). Posteriormente, Kraut et al. (1930) identificaram a *substância F* no pâncreas, que foi indicado como o sítio principal de síntese da nova substância. Desde então, a *substância F* passou a se chamar *calicreína* (derivada do termo grego relacionado ao pâncreas, *kallikreas*).

Em 1937, Werle et al. demonstraram que a incubação da calicreína com soro resultava na produção de uma substância contrátil a partir de um precursor inativo. Mais tarde, Rocha e Silva et al. (1949) demonstraram que a incubação do veneno da *Bothrops jararaca* ou de tripsina, com a fração pseudoglobulina do plasma, causava a liberação de um potente agente vasodilatador e contracturante. O novo fator foi definido como um polipeptídeo produzido por ação enzimática, a partir de proteínas plasmáticas. Esta substância produzia uma resposta contrátil lenta em relação à histamina e à acetilcolina, quando avaliada em preparações de íleo isolado de cobaia. Baseados nesses resultados, os mesmos autores sugeriram o nome *bradicinina* para definir a nova molécula (do grego, *bradi* - lento; *kinin* - movimento).

As primeiras tentativas para o isolamento e a purificação da bradicinina (BK) foram realizadas com proteínas precipitadas do plasma bovino, utilizando veneno de *B. jararaca* como fonte enzimática (Andrade e Rocha e Silva, 1956). Em 1960, Elliot et al. identificaram os 5 aminoácidos que

formavam a molécula da BK (*arginina, fenilalanina, prolina, glicina e serina*), embora não soubessem a quantidade e proporção correta dos mesmos. Assim, os autores propuseram a seguinte estrutura: *Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg*, mas infelizmente o octapeptídeo sintetizado era biologicamente inativo. Apenas mais tarde, em um estudo conduzido pela *Sandoz*, Boissonas et al. (1960) encontraram um erro na proporção de prolina e identificaram a sequência correta para o nonapeptídeo BK: *Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg*. Com o advento da BK sintética, foram iniciados os primeiros estudos para a caracterização das ações biológicas deste peptídeo. Em 1964, Lewis demonstrou a capacidade das cininas em evocar os sinais clássicos da inflamação: edema, hiperemia e dor. Atualmente, são descritos inúmeros outros papéis relevantes para a BK e para as outras cininas a ela relacionadas (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992; Hall e Morton, 1997; Blais et al., 2000; Calixto et al., 2000; 2001).

A cascata de formação das cininas é um processo bem caracterizado e compreende a ação de proteases sobre precursores plasmáticos e teciduais. Os substratos para a síntese das cininas são α -globulinas com múltiplos domínios, conhecidos como cininogênios. O cininogênio de alto peso molecular (HMWK; 120 KDa) é uma proteína plasmática e funciona como precursor da BK. Por outro lado, o cininogênio de baixo peso molecular (LMWK; 66 KDa) é o precursor da calidina (Lys-BK), embora também possa originar BK, estando largamente distribuído em tecidos, fibroblastos e em

outras estruturas celulares do tecido conectivo. O terceiro tipo, o T-cininogênio, é o equivalente para o HMWK encontrado unicamente em roedores (Bhoola et al., 1992; McLean et al., 2000a). O gene que codifica o cininogênio humano foi encontrado no cromossomo 3 e codifica a expressão de ambos HMWK e LMWK (Fong et al., 1991).

Os cininogênios são clivados por um grupo de enzimas conhecidas genericamente por calicreínas. A calicreína plasmática libera BK a partir do HMWK, um processo aumentado durante as respostas inflamatórias. Por outro lado, a calicreína tecidual age sobre o LMWK, produzindo principalmente calidina. A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula na corrente sangüínea em uma forma inativa, denominada de pré-calicreína (*fator de Fletcher*). A pré-calicreína é rapidamente convertida em calicreína em um processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sangüínea (*Fator de Hagemann*) (Bhoola et al., 1992).

A BK apresenta uma meia-vida plasmática bastante curta, que pode variar entre 10 e 50 segundos, dependendo da espécie estudada (Décarie et al., 1996). O metabolismo e a degradação das cininas são mediados através da ativação de enzimas, coletivamente chamadas de cininases. A BK e a calidina são predominantemente metabolizadas pela cininase II, também conhecida por enzima conversora da angiotensina (ECA) (Erdös, 1990). A ECA está distribuída especialmente na membrana de células endoteliais, sendo responsável pela remoção do dipeptídeo da porção C-terminal da BK e da

calidina, resultando na inativação completa dos 2 peptídeos. A encefalinase ou endopeptidase neutra, uma metalopeptidase presente em células epiteliais, também é capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da molécula da BK, de maneira semelhante à cininase II (Gafford et al., 1983). Além disso, a calidina pode ser convertida em BK por meio da clivagem da porção N-terminal pela ação da aminopeptidase plasmática (Guimarães et al., 1973).

Por outro lado, as atividades das cininases I, carboxipeptidase N (plasma) e carboxipeptidase M (membrana), apresentam uma importância particular, já que suas ações envolvem a produção dos metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina, a partir da BK e da calidina, respectivamente (Bhoola et al., 1992; Erdös e Skidgel, 1997; Blais et al., 2000). O metabolismo das cininas *des-Arg* possui algumas particularidades: embora a cininase II seja capaz de clivar o tripeptídeo da extremidade C-terminal da des-Arg⁹-BK, ela o faz de forma muito mais lenta do que em relação à BK e à calidina (Erdös et al., 1990). Um estudo recente conduzido com humanos (116 voluntários sadios) demonstrou que a BK apresenta uma meia-vida de aproximadamente 10 s, comparada a 643 s para a des-Arg⁹-BK (Cyr et al., 2001).

A cininase II possui maior afinidade pela BK e pela calidina do que a cininase I. Este fato indica que a formação dos metabólitos *des-Arg* não acontece *in vivo* sob condições normais. A formação da des-Arg⁹-BK é observada em exsudatos inflamatórios, que são compostos de proteínas do

plasma, incluindo as cininases do tipo I. Além disso, a formação de fibrina, típica de muitos exsudatos, aumenta expressivamente a atividade das cininases I (Heindriks et al., 1990; Campbell et al., 1990). O predomínio da atividade da cininase I sobre a cininase II pode ser bem observado no fluido sinovial de humanos ou na secreção nasal de pacientes com rinite alérgica (Chercuitte et al., 1987; Proud et al., 1987).

O processo rápido de inativação das cininas na circulação levou ao desenvolvimento de substâncias capazes de inibir a atividade das cininases. Inicialmente, verificou-se que o veneno extraído da *B. 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).

Depois de liberadas, a BK e as cininas relacionadas exercem uma série de efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, hiperemia local, redução da pressão sangüínea, sensibilização de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C, além de formação de edema, em consequência do aumento da permeabilidade vascular. Suas ações parecem contribuir para a hipotensão e para o desenvolvimento do choque, observados na pancreatite, na sepse e na

coagulação intravascular (Dendorfer et al. 1999; Calixto et al., 2000). Ademais, as cininas também são capazes de controlar o tônus de vários tipos de musculatura lisa, o transporte de glicose, além de estimularem a reabsorção óssea e a proliferação celular (Bhoola et al., 1992; Hall e Morton, 1997).

Os maiores efeitos celulares das cininas são mediados pela ativação de receptores específicos, denominados B_1 e B_2 . A classificação dos dois subtipos de receptores teve origem em estudos farmacológicos iniciados no final da década de 70. Atualmente, a existência dos dois receptores foi confirmada por estudos de biologia molecular e de deleção gênica (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992; Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000; 2001). Estes estudos foram ainda de grande utilidade para a determinação das principais diferenças entre as respostas mediadas pela ativação dos receptores B_1 e B_2 em vários sistemas celulares distintos. Os principais critérios e características que definem os subtipos de receptores B_1 e B_2 estão descritos no Quadro 1.

A existência dos receptores B_1 e B_2 foi proposta com base na determinação da ordem de potência dos agonistas em diversos tecidos isolados. Esta classificação foi ainda confirmada por estudos conduzidos com agonistas e antagonistas seletivos, obtidos por modificações ou substituições da estrutura das moléculas das cininas (Vavrek e Stewart., 1985; Regoli et al., 1994; Stewart et al., 1999; Bock e Longmore, 1999). Desta forma, os receptores do tipo B_1 são ativados preferencialmente pela des-Arg⁹-BK e pela

des-Arg¹⁰-calidina, enquanto que os receptores B₂ são praticamente insensíveis a esses metabólitos. As primeiras evidências para a existência dos receptores B₁ foram obtidas em preparações de aorta de coelho. A ordem de potência observada para os agonistas nesta preparação é 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). Por outro lado, os receptores B₂ apresentam alta afinidade pela BK e pela calidina, enquanto os metabólitos que não possuem a arginina C-terminal 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). A segunda geração de antagonistas B₂ teve origem com o Hoe 140, que possui 2 aminoácidos sintéticos (*Tic* e *Oic*) nas posições 7 e 8 (Hock et al., 1991; Wirth et al., 1991). Outros antagonistas desta classe incluem o NPC 17731 e o NPC 17761, que apresentam um resíduo alifático (D-cis-propoxiprolina) na posição 7 (Kyle et al., 1991). Em ambos os casos, as substituições realizadas produziram um aumento significativo da meia-vida dos antagonistas, facilitando a caracterização dos efeitos das cininas em modelos *in vitro* e *in vivo* (Marceau e Bachvarov, 1998). Além disso, a modificação recente destes antagonistas, pela remoção da arginina da porção C-terminal, forneceu 2 potentes antagonistas seletivos para os receptores B₁, o

des-Arg⁹-Hoe 140 e o des-Arg⁹-NPC 17731 (Stewart et al., 1999). Recentemente, foram desenvolvidos os primeiros antagonistas não-peptídicos e também seletivos para os receptores B₂, incluindo o WIN 64338, o FR 173657, o FR 167344, o NPC 18884 e o *bradyzide*. Todos estes antagonistas foram efetivos quando testados por via oral, em modelos de broncoconstrição, dor e inflamação (Sawutz et al., 1994; Asano et al., 1997; Griesbacher et al., 1998; De Campos et al., 1999; Watanabe et al., 1999; Burgess et al., 2000; Griesbacher e Legat, 2000). Outros avanços na área do desenvolvimento de bloqueadores dos receptores cininérgicos são representados pelos novos antagonistas seletivos dos receptores B₁, R715 e B9958, bem como de antagonistas mistos B₁/B₂, como o B9430 (Regoli et al., 1998). Por outro lado, até o momento, não se obteve sucesso no desenvolvimento de um antagonista não-peptídico para os receptores B₁, o que seria de importância fundamental para confirmar o papel fisiopatológico destes receptores.

Estudos com o uso de radioligantes também representaram uma ferramenta farmacológica importante para a caracterização das respostas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ (Marceau e Bachvarov, 1998; Blais et al., 2000). Os primeiros estudos foram realizados com [³H]-BK, que constitui o ligante mais utilizado para a caracterização dos receptores B₂. Para os estudos que envolvem os receptores B₁, o principal ligante é a [³H]-des-Arg¹⁰-calidina. Os estudos conduzidos com as cininas marcadas continuam sendo de grande utilidade, já que os peptídeos utilizados apresentam alta afinidade por

seu respectivo receptor. Até agora, foram realizados estudos de *binding* para os receptores B₂ em preparações teciduais ou culturas celulares distintas, tais como: miométrio uterino de rato (Liebmann et al., 1987), íleo, pulmão e traquéia de cobaia (Manning et al., 1986; Farmer et al., 1989; Farmer et al., 1991) e fibroblastos de pulmão humano (Roscher et al., 1990). Entretanto, para os receptores B₁, a maior parte dos estudos com radioligantes é descrita em culturas celulares, provavelmente em decorrência da baixa densidade destes receptores nos tecidos (Hall e Morton, 1997). Os estudos mais relevantes são demonstrados em cultura de células da musculatura lisa da aorta de coelhos (Schneck et al., 1994), em macrófagos RAW 264.7 de camundongos (Burch e Kyle, 1992) e em células mesangiais de rato (Bascands et al., 1993).

Os estudos de biologia molecular com os receptores para as cininas tiveram início em 1991, com a clonagem do receptor B₂ a partir do útero de ratas. Neste estudo, McEachern et al. (1991) demonstraram que o receptor B₂ pertencia à superfamília de receptores acoplados à proteína G, apresentava uma seqüência de 366 aminoácidos e vários sítios de fosforilação para as proteínas quinases A e C. Posteriormente, o receptor B₂ foi clonado e seqüenciado, a partir de fibroblastos de pulmão humano (Hess et al., 1992). Os autores apontaram que o DNAC para o receptor B₂ humano codificava uma proteína de 364 aminoácidos, com características de um receptor acoplado à proteína G e com 81 % de homologia em relação ao receptor B₂ de rato.

Outros estudos adicionais também demonstraram a seqüência do receptor B₂ em humanos (Eggerickx et al., 1992; Ma et al., 1994a). O gene do receptor B₂ humano consiste de 3 éxons, separados por dois íntrons, e foi mapeado no cromossomo 14q32 (Powell et al., 1993; Ma et al., 1994a; Kammerer et al., 1995).

Mais tarde, o receptor B₂ também foi clonado em camudongos (Ma et al., 1994b), codificando uma seqüência de 366 aminoácidos, e em coelhos (Bachvarov et al., 1995), com uma seqüência de 367 aminoácidos, apresentando 92 % e 80 % de homologia em relação ao receptor B₂ do rato, respectivamente. Vários sítios de importância funcional foram identificados nos receptores B₂ de todas as espécies de mamíferos estudadas. Estes pontos incluem 3 sítios de N-glicosilação, 1 sítio de palmitoilação e vários sítios de fosforilação (Blais et al., 2000).

O receptor B₁ de humanos foi clonado apenas em 1994 (Menke et al.), apresentando os 7 domínios transmembrana típicos de receptores acoplados à proteína G, mas apenas 36 % de homologia em relação ao receptor B₂. Este grau de homologia entre os receptores B₁ e B₂ pode ser considerado baixo, uma vez que o receptor B₁ apresenta 30 % de similaridade em relação ao receptor do tipo 1 para a angiotensina II (Hess, 1997). O estudo da estrutura e da organização genômica do receptor B₁ de humanos mostrou que este receptor contém 3 éxons, separados por 2 íntrons, e está localizado em um sítio muito próximo ao do receptor B₂, no cromossomo 14q32 (Bachvarov et

al., 1996; Yang e Polgar, 1996). Posteriormente, o receptor B₁ também foi clonado em coelhos (MacNeil et al., 1995), em camundongos (Pesquero et al., 1996) e em ratos (Ni et al., 1998a). Apenas recentemente (Hess et al., 2001), os receptores B₁ e B₂ foram clonados em cães. A seqüência do DNAC do receptor B₁ do cão codifica uma proteína de 350 aminoácidos e 76 % de homologia em relação ao receptor B₁ humano. Por outro lado, o DNAC para o receptor B₂ do cão codifica uma proteína de 392 aminoácidos, com 81 % de homologia com o receptor B₂ de humanos. Os estudos de clonagem realizados em cães confirmam a baixa homologia entre os receptores B₁ e B₂ (35 %), reforçando a proposição de que os dois receptores sejam componentes de sistemas regulatórios distintos (Marceau et al., 1997; Hess et al., 2001) (para maiores detalhes, ver Quadro 1).

A definição molecular dos receptores B₁ e B₂ possibilitou um avanço considerável para o estudo do papel fisiopatológico das cininas. Desta forma, a identificação da seqüência peptídica de ambos os receptores revelou a presença de polimorfismos, que podem ser responsáveis por doenças que envolvem alterações do sistema de cininas (Hall e Morton, 1997). Os estudos de biologia molecular também permitiram o desenvolvimento de novos antagonistas e de anticorpos específicos para os receptores B₁ e B₂, estendendo as evidências acerca da importância das cininas nos processos inflamatórios (Müller-Esterl, 1997; Blais et al., 2000; Mahabeer e Bhoola, 2000). Além disso, baseado nos estudos de clonagem e seqüenciamento destes

receptores, foi possível iniciar os estudos utilizando a tecnologia de deleção gênica. O desenvolvimento de uma cepa de camundongos, onde o gene responsável pela expressão do receptor B₂ foi deletado, permitiu confirmar o papel exercido pelos receptores B₂ em fenômenos como o processo inflamatório, dor e hiperalgesia, contração e relaxamento da musculatura lisa, além da sua participação no controle da pressão arterial (Borkowski et al., 1995; Boyce et al., 1996). Por outro lado, a geração de camundongos *knockout* para o receptor B₁ (Pesquero et al., 2000) demonstrou que estes receptores são fundamentais, tanto para a sensibilização central dolorosa (Pesquero et al., 2000) quanto para o desenvolvimento de respostas inflamatórias (Araújo et al., 2001). Além disso, a apoptose de neutrófilos, bem como, a hipotensão induzida por LPS foram abolidas nestes animais, confirmando a importância dos receptores B₁ nesses processos.

Sem dúvida, a principal diferença entre os receptores B₁ e B₂ está relacionada com o padrão de expressão destas duas moléculas. Tem sido largamente demonstrado que a maior parte das ações fisiológicas das cininas são mediadas pela ativação dos receptores B₂, enquanto que os receptores B₁ são responsáveis por amplificar e perpetuar a sinalização, iniciada pela estimulação dos receptores B₂ (ver Quadro 1). As respostas mediadas pela ativação de ambos os receptores são qualitativamente similares e geralmente envolvem a ativação dos mesmos tipos celulares (Marceau et al., 1998; Calixto et al., 2000; 2001). Desta forma, os receptores B₂ são expressos de

forma constitutiva em vários órgãos, tecidos e tipos celulares, incluindo: células endoteliais, fibroblastos, epitélio glandular, rins, coração, musculatura esquelética, sistema nervoso central (SNC) e musculatura lisa de vasos sanguíneos, ducto deferente, traquéia, intestino, útero e bexiga (Dendorfer et al., 1999). Por outro lado, os receptores B_1 não estão presentes em condições normais, mas sua expressão pode ser aumentada após traumas teciduais ou durante alterações patológicas. Assim, tem sido demonstrado que as respostas mediadas por estes receptores podem ser moduladas em diversos tipos celulares distintos (Marceau et al., 1998; Ahluwalia e Perretti, 1999; Calixto et al., 2000).

O mecanismo de indução de receptores constitui um dos processos de regulação da responsividade de um tecido sob situações de estresse celular. Este processo, normalmente é observado com receptores do tipo tirosina-quinase ou, ainda, com receptores nucleares. Contudo, este fenômeno é raramente descrito para receptores acoplados à proteína G. O receptor B_1 para as cininas representa um dos poucos exemplos de receptores com 7 domínios transmembrana, que podem ser induzidos por estímulos específicos (Donaldson et al., 1997).

O aumento tempo-dependente das respostas mediadas pela ativação dos receptores B_1 foi descrito, pela primeira vez, por Goldberg et al. (1976), em preparações obtidas da veia safena de cães. O mesmo fenômeno foi demonstrado posteriormente em várias preparações vasculares e não-

vasculares (Regoli et al., 1977; 1978; Marceau et al., 1980; Couture et al., 1982). Outros dados da literatura, apontaram que a indução dos receptores B₁ pode ser ainda observada na maioria das preparações *in vitro*, obtidas de coelhos, ratos, suínos (Marceau, 1995) e também em tiras de cólon ou preparações de íleo humano (Couture et al., 1981; Zuzack et al., 1996). Estas preparações geralmente não respondem aos agonistas dos receptores B₁ na primeira hora de incubação, mas se tornam progressivamente responsivas após algumas horas de incubação *in vitro* (Marceau, 1995; 1997; Marceau et al., 1998). Este efeito pode ser bloqueado pela incubação do inibidor da síntese de RNA, actinomicina D, pelo bloqueador de síntese protéica, a cicloheximida, pelo inibidor da N-glicosilação, a tunicamicina, pelo inibidor da translocação de proteínas, brefeldin A ou, ainda, por glicocorticóides, como a dexametasona (Regoli et al., 1978; Marceau et al., 1980; Whalley et al., 1983; Audet et al., 1994; Campos e Calixto, 1994; Haddad et al., 2000; Sardi et al., 2000). Deste modo, a indução dos receptores B₁ parece constituir um processo tempo-dependente e que envolve a expressão de RNA mensageiro, translocação no nível ribossomal, transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, aumento da taxa de transcrição, decréscimo na degradação do RNAm ou, inclusive, aumento da estabilidade do RNAm (Haddad et al., 2000).

A indução dos receptores B₁ *in vivo* foi evidenciada no modelo de cistite química em ratos e posteriormente no modelo de pressão arterial em

coelhos (Marceau et al., 1980; 1983; 1984). Evidências a respeito da indução dos receptores B_1 *in vivo* também foram 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; Khasar et al., 1995; Perkins et al., 1995).

Recentemente, foi demonstrado que ambos os receptores, B_1 e B_2 , estão envolvidos na resposta edematogênica induzida pelas cininas na pata de rato. Neste modelo, os receptores B_2 parecem ser constitutivos, enquanto os receptores B_1 podem ser induzidos após a dessensibilização completa dos receptores B_2 , através de injeções repetidas de BK (Campos e Calixto, 1995) ou do agonista seletivo de receptores B_2 , a tirosina⁸-BK (Campos et al., 1995), em um período de 7 dias. Além disso, o aparecimento dos receptores B_1 no edema de pata de rato também foi verificado após o tratamento agudo dos animais com endotoxina de *Escherichia coli* (Campos et al., 1996), seguindo o tratamento crônico dos animais com bacilos atenuados de *Mycobacterium bovis* (Campos et al., 1997) ou após 7 dias da remoção cirúrgica das glândulas adrenais (Cabrini et al., 2001).

O aumento da expressão dos receptores B_1 *in vivo* também foi observado após a indução de estresse térmico em ratos (Lagneux e Ribuoat, 1997), pela injeção de IL-1 β em camundongos (McLean et al., 2000b) ou,

ainda, em suínos e macacos, após o tratamento com endotoxina de *E. coli* (Siebeck et al., 1998; DeBlois e Horlick, 2001). Ademais, o aumento dos receptores B₁ foi descrito no modelo de diabetes do tipo I, induzida pelo tratamento com estreptozotocina (Cloutier e Couture, 2000, Campos et al., 2001), no modelo de infarto do miocárdio em ratos, após a oclusão permanente da artéria coronária esquerda (Tschöpe et al., 2000) ou depois de 14 dias da constrição do nervo ciático em ratos (Levy e Zochodne, 2000).

De acordo com as evidências acerca da indução dos receptores B₁, é possível inferir que a expressão destes receptores seja controlada pela produção de citocinas específicas, produzidas durante o trauma ou estresse tecidual (Marceau et al., 1998). Dentre todas as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 β tem sido implicada como o principal agente regulador dos níveis do receptor B₁ *in vivo* ou *in vitro* (Marceau 1995; 1997). Sendo assim, a maior parte dos estímulos inflamatórios ou imunopatológicos que resultam no aumento das respostas mediadas pela ativação dos receptores B₁ parece envolver um aumento da produção de IL-1 β (McLean et al., 2000a).^x A síntese da IL-1 pode ser induzida por outras citocinas ou mediadores da inflamação, sendo particularmente estimulada por endotoxinas bacterianas ou produtos virais (Stylianou e Saklatvla, 1998). Tem sido descrito que a IL-1 β é capaz de estimular a indução de diversos genes, cujos promotores são regulados através de interações complexas com fatores de transcrição. A ligação da IL-1 β

resulta na associação de fatores relacionados ao receptor de TNF (TRAF6) e quinases dependentes da ativação do receptor de IL-1 (IRAK1, IRAK2 e MyD88) (Cao et al., 1996; Muzio et al., 1997). Além disso, os sinais produzidos pela IL-1 podem resultar na estimulação de várias proteínas da família das MAP-quinases, tais como: p38, p42, p44, NIK, JNK e SAPK (Saklatvala et al., 1999). Por sua vez, estas proteínas estão envolvidas na ativação de um grupo de quinases denominadas IKK1 e IKK2, responsáveis pelo controle da expressão gênica regulada pelo fator nuclear NF- κ B.

O fator de transcrição NF- κ B é um heterodímero, comumente constituído de duas subunidades denominadas p50 e p65. Em condições normais, o NF- κ B é encontrado no citoplasma, onde está complexado a um elemento inibitório, denominado I κ B. A degradação do I κ B envolve 3 etapas que incluem fosforilação pelas enzimas IKK1 e IKK2, ubiquitinação e degradação por um sistema de proteasomas. Esta reação permite que o NF- κ B passe livremente do citoplasma para o núcleo e se ligue a seqüências específicas de certos genes, possibilitando, assim, uma ativação transcripcional extremamente rápida (Mercurio e Manning, 1999; Baldwin Jr, 2001; Tak e Firestein, 2001). Além dessas vias, as respostas mediadas pela IL-1 podem envolver a produção de AMPc e ativação do elemento de resposta do AMP (CREB), ou ainda, a ativação do fator de transcrição AP-1, via estimulação da proteína quinase C (PKC) (Barnes et al., 1998).

De fato, tem sido sugerido que o fenômeno de indução dos receptores B_1 envolve a ativação de fatores transcripcionais, incluindo o fator nuclear NF- κ B. É possível que estímulos como citocinas pró-inflamatórias ou LPS induzam a fosforilação do inibidor endógeno I κ B, promovendo a ativação do NF- κ B, modulando a síntese *de novo* dos receptores B_1 (Calixto et al., 2000). Estas evidências são confirmadas por dados recentes, que mostram a ocorrência de sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como AP-1, CREB e NF- κ B, na região promotora do gene do receptor B_1 (Ni et al., 1998b, Yang et al., 1998). Foi também demonstrado que mutações do sítio de ligação para o NF- κ B são capazes de impedir os efeitos do LPS e das citocinas sobre o receptor B_1 em células de musculatura vascular humana (Ni et al., 1998b). Resultados similares foram mostrados por Schanstra et al. (1998), indicando que a expressão dos receptores B_1 em fibroblastos de pulmão humano, após a estimulação com IL-1 β , é modulada no nível transcripcional pelo NF- κ B. Outros dados da literatura demonstram a participação do NF- κ B no aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 no rim (Marceau et al., 1999) e na aorta (Medeiros et al., 2001) de coelhos tratados com LPS, e ainda em vários tecidos obtidos de animais adrenalectomizados 7 dias antes (Cabrini et al., 2001).

Embora a maior parte das respostas mediadas pelos receptores B_1 envolva a ativação de receptores induzidos, a expressão constitutiva dos

receptores B_1 tem sido evidenciada em tecidos vasculares de cães (Bélichard et al., 1996; Staszewska-Wooley e Woodman, 1991), no SNC de ratos espontaneamente hipertensos (Emanueli et al., 1999), na vasculatura pulmonar de gatos (Santiago et al., 1995; Seyedi et al., 1997) e em tecidos oculares ou em linfócitos humanos (Ma et al., 1996; Prat et al., 1999). Por outro lado, os receptores B_2 são expressos de forma constitutiva pela maior parte dos tipos celulares, mas sua expressão pode ser induzida pela estimulação com citocinas inflamatórias, por fatores de crescimento, pelo supressor tumoral p53 ou por drogas que elevam os níveis de AMPc (Bathon et al., 1992; Dixon, 1994, Dixon et al., 1996, Haddad et al., 2000; Saifudeen et al., 2000).

Apesar das diferenças entre o padrão de expressão dos receptores B_1 e B_2 , na maioria das vezes, as vias de transdução ativadas pelos dois tipos de receptores são muito semelhantes (Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001). Os receptores B_1 e B_2 para as cininas são preferencialmente acoplados a proteínas das famílias $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha q}$ (Liao e Homcy, 1993) e sua ativação pode estar relacionada com estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização intracelular. Estas vias incluem: fosfolipase C, fosfolipase D, produção de cálcio intracelular, ativação de isoformas específicas da proteína quinase C, estimulação de canais de potássio sensíveis ao cálcio, transporte de íons cloreto, a ativação da adenilato ciclase, formação de óxido nítrico (NO), aumento expressivo dos níveis de prostanóides em resposta à ativação da

fosfolipase A₂ ou, ainda, ativação da via da MAP-quinase. (Schanstra et al., 1999; Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001). Recentemente, foi demonstrado que a ativação dos receptores B₁ e B₂ pode resultar na ativação de outros grupos de quinases, incluindo: tirosina-quinase, fosfatidilinositol-3-quinase e esfingosina-6-quinase (Blaukat e Dikic, Liebmanne Böhmer, 2000; Liebmann, 2001) (ver Quadro 1).

Há pouco tempo, foi proposto que a ativação do receptor B₂ e sua dessensibilização poderiam constituir estímulos diretos para a indução dos receptores B₁. Além do perfil de expressão, os receptores B₁ e B₂ também apresentam diferenças importantes relacionadas com a susceptibilidade à dessensibilização (Marceau e Bachvarov, 1998) (para maiores detalhes, ver Quadro 1). Enquanto os receptores B₂ são rapidamente dessensibilizados e internalizados após a estimulação com o agonista, o receptor B₁ não é passível de tais processos. Estas diferenças podem ser explicadas pela presença de resíduos de *tirosina* e *serina*, bem como de um resíduo de *cisteína* (*Cys 324*) na alça C-terminal do receptor B₂ (Austin et al., 1997; Faussner et al., 1998; 1999). Desta forma, é possível sugerir que, depois de ativados, os receptores B₂ sofrem dessensibilização, levando ao aumento da expressão dos receptores B₁. Estudos recentes demonstram que a BK, agindo em receptores B₂, promove ativação do fator nuclear NF-κB e aumento da expressão de IL-1β em células epiteliais humanas (Pan et al., 1998). A BK também é capaz de estimular a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos de gengiva ou pulmão

humanos, todos estímulos conhecidos por induzir o aumento dos receptores B₁ (Hayashi et al., 1998; Modéer et al., 1998). Realmente, algumas evidências recentes (Phagoo et al., 1999; 2000) confirmam a ocorrência de um balanço entre as duas populações de receptores para as cininas, em um processo controlado pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os dois genes correspondentes aos receptores B₁ e B₂ humanos estão localizados na mesma região cromossômica (14q32), sugerindo uma possível regulação coordenada dos dois subtipos de receptores (Ma et al., 1994; Chai et al., 1996). Assim, os receptores B₂ seriam responsáveis por mediar as ações das cininas durante a fase aguda do processo inflamatório, ao passo que os receptores B₁ seriam induzidos durante a fase crônica, a fim de promover a manutenção e a amplificação do processo inflamatório.

Quadro 1 - Receptores cininérgicos - Principais características

	Receptores B₂	Receptores B₁
Agonistas naturais	BK e calidina	Des-Arg ⁹ -BK and des-Arg ¹⁰ -calidina
Principais antagonistas seletivos	HOE 140, NPC 17731, WIN 64338, FR 1773657, FR 167344, NPC 18884 e <i>bradyzide</i>	Des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK Des-Arg ¹⁰ -[Leu ⁹]-calidina Des-Arg ¹⁰ -HOE 140 B9858, R715
Padrão de expressão	Expressão constitutiva. Pode ser induzido na musculatura lisa arterial, em células sinoviais e fibroblastos de pulmão humano por algumas citocinas ou por substâncias que aumentam o AMPc	<i>Silenciosos</i> ou ausentes na maioria dos tecidos. São induzidos após traumas ou no processo inflamatório. Expressos constitutivamente em alguns tecidos, especialmente obtidos de cães ou felinos
Localização cromossômica	Os receptores B ₁ and B ₂ humanos estão localizados no cromossomo 14q32	
Estudos de clonagem	Os receptores B ₁ and B ₂ já foram clonados em camundongos, ratos, coelhos, cães e humanos	
Principais vias de transdução de sinal	Vias dependentes da PLC. Aumento transitório das concentrações intracelulares de Ca ⁺⁺	Vias dependentes da PLC. Aumento sustentado das concentrações intracelulares de Ca ⁺⁺
Vias de sinalização alternativas	Sua estimulação pode resultar na ativação de vários grupos de quinases, incluindo: MAPK, TK, PI3K etc	Várias evidências demonstram que sua expressão pode ser regulada pela ativação da MAPK, PKC e TK

	Receptores B₂	Receptores B₁
Interação com outros sistemas envolvidos na inflamação	A ativação do receptor B ₂ pode resultar na estimulação da PLA ₂ , COX-1/2 e NOS. Sua ativação também pode induzir a síntese <i>de novo</i> de algumas citocinas (IL-1β, IL-6 e IL-8)	Sua expressão ocorre freqüentemente em paralelo com a de outros componentes do processo inflamatório, tais como: COX-2 e NOS _i .
Relação com fatores de transcrição	A BK pode estimular a ativação fator nuclear NF-κB via receptores B ₂	A região promotora do receptor B ₁ apresenta sítios de ligação para vários fatores de transcrição (NF-κB, AP-1 e CREB)
Taxa de dissociação do agonista	Rápida	Lenta
Dessensibilização	Facilmente dessensibilizado	Normalmente resistem à dessensibilização, exceto quando são expressos artificialmente
Efeito da estimulação prolongada	Dessensibilização completa	Aumento da expressão e sinalização Persistente
Envolvimento em respostas inflamatórias e dolorosas	Em geral, estão associados com a fase aguda da dor e da inflamação	Parecem estar envolvidos no estágio crônico do processo inflamatório e na amplificação das respostas dolorosas
Potencial terapêutico	Questionável. Sua estimulação está freqüentemente relacionada a processos fisiológicos	Alta. É possível que antagonistas não-peptídicos seletivos para os receptores B ₁ sejam de grande utilidade como adjuvante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas

*Adaptado de: Regoli e Barabé, 1980; Marceau et al., 1998; Faussner et al., 1999. NOS, óxido nítrico sintase; COX-2, ciclooxigenase-2; PKC, proteína quinase C, TK, tirosina-quinase; MAPK, MAP-quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi analisar, através de estudos farmacológicos, e de técnicas de bioquímica e de biologia molecular, os mecanismos envolvidos nas ações modulatórias de citocinas com ação pró-inflamatória, sobre as respostas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ para as cininas no modelo do edema de pata de rato.

2. Objetivos específicos

2.1. Caracterizar a resposta edematogênica causada por agonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ em animais pré-tratados com IL-1 β , TNF α ou IL-6.

2.2. Analisar alguns mecanismos envolvidos no aumento das repostas mediadas pelos receptores B₁ após o tratamento com IL-1 β ou TNF α , incluindo a participação de síntese protéica, a ativação de quinases e o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico.

2.3. Investigar os efeitos da co-injeção de anticorpos monoclonais e de citocinas antiinflamatórias sobre o edema de pata mediado pelos receptores B₁ em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α .

2.4. Examinar a influência da injeção intraplantar de IL-1 β sobre os níveis de IL-1 β e de TNF α na pata de rato;

2.5. Investigar o possível envolvimento do fator nuclear NF- κ B sobre a indução do receptor B₁ na pata de rato, após o tratamento com citocinas pró-inflamatórias;

2.6. Confirmar a expressão do receptor B₁ para as cininas após a injeção de IL-1 β na pata de rato.

2.7. Analisar a possível correlação entre o recrutamento de neutrófilos induzido pela IL-1 β , bem como a participação de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos sobre o aumento funcional dos receptores B₁ na pata de rato.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos machos Wistar (140-180 g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h, 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 h e os experimentos realizados entre 8:00 e 18:00 h. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as indicações para o cuidado com animais de laboratório e recomendações éticas para experimentos com animais conscientes (Zimmerman, 1983).

2. Procedimentos experimentais

2.1. Medida do edema de pata

O procedimento utilizado para a avaliação do edema de pata foi similar àquele descrito por Campos e Calixto (1995), com pequenas modificações. Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam, por via intraplantar, na pata direita, 0,1 ml de salina tamponada (PBS; composição em mmol/litro: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) contendo BK (3 nmol/pata), tirosina⁸-BK (0,3 - 100 nmol/pata; agonista

seletivo de receptores B_2), ou des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (10 – 100 nmol/pata; agonistas seletivos de receptores B_1). A pata esquerda recebeu o mesmo volume (0,1 ml) de PBS e foi utilizada como controle. O aumento de volume foi medido pletismometricamente (Pletismômetro, Ugo Basile) em vários intervalos de tempo (10, 20, 30, 60 e 120 min após a injeção das cininas) ou apenas no pico do edema (20 min). A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (em ml) e tomada com índice de edema. Em todos os experimentos, os animais foram pré-tratados com um inibidor da cininase II, o captopril (5 mg/kg, 1 h, s.c), a fim de evitar a degradação das cininas (Corrêa e Calixto, 1993).

2.2. Tratamento com as citocinas pró-inflamatórias

Na maior parte dos experimentos, os animais foram tratados por via intraplantar com IL-1 β ou TNF α (1 - 5 ng/pata, 15, 30, 60, 120 ou 360 min antes da injeção das cininas). Em alguns experimentos, com o objetivo de determinar o possível efeito sistêmico das citocinas, os animais receberam IL-1 β ou TNF α (ambos na dose de 5 ng/pata) na pata direita, e a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) na pata contralateral. Alguns animais foram tratados com IL-6 (1 – 10 ng/pata) nos mesmos intervalos de tempo usados para a IL-1 β e para o TNF α . O edema foi avaliado como descrito anteriormente, comparando-se as respostas obtidas nos animais tratados com PBS com aquelas obtidas nos animais tratados com as citocinas pró-inflamatórias.

2.3. Análise dos mecanismos envolvidos no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α

2.3.1. Efeito da co-injeção de antagonistas B₁ e B₂

Visando determinar quais os receptores para as cininas estariam envolvidos na resposta edematogênica produzida pela des-Arg⁹-BK, em ratos pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) ou com TNF α (5 ng/pata, 30 min), os animais receberam uma injeção intraplantar contendo o antagonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-NPC 17731 (1 - 30 nmol/pata), ou o antagonista seletivo de receptores B₂, Hoe 140 (10 nmol/pata), em conjunto com a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata). As respostas obtidas foram analisadas comparando-se o edema produzido pela des-Arg⁹-BK, após o tratamento com as citocinas IL-1 β ou TNF α , na presença ou ausência dos referidos antagonistas.

2.3.2. Efeito da associação de anticorpos para citocinas pró-inflamatórias

Para avaliar o envolvimento da produção secundária de outras citocinas sobre o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK, os animais receberam os anticorpos anti-IL-1 β , anti-TNF α , anti-IL-8 e anti-IL-6 (50 - 100 ng/pata), em conjunto com a IL-1 β ou com o TNF α (ambos na dose de 5 ng/pata), 60 e 30 min antes da injeção da des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), respectivamente. Os

animais controle receberam PBS e a resposta inibitória foi analisada comparando-se o aumento de volume produzido pela des-Arg⁹-BK, na presença ou ausência dos anticorpos.

2.3.3. Influência da co-injeção de citocinas antiinflamatórias

Para verificar a participação de citocinas antiinflamatórias sobre o edema de pata mediado pelos receptores B₁ em ratos tratados com IL-1 β ou TNF α , outros grupos de animais receberam as citocinas antiinflamatórias, IL-10 (10 – 30 ng/pata) ou IRA (antagonista dos receptores da IL-1; 100 μ g/pata), em associação com a IL-1 β ou com o TNF α (ambos 5 ng/pata), 60 e 30 min antes da injeção da des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), respectivamente. As respostas obtidas foram comparadas com aquelas observadas nos animais controle (tratados com PBS).

2.3.4. Efeito do tratamento com inibidores da ciclooxigenase (COX)

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 que receberam IL-1 β ou TNF α , os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o inibidor não-seletivo das COXs- 1 e 2, indometacina (2 mg/kg), ou com os inibidores seletivos da COX-2, meloxicam (3 mg/kg) ou NS 398 (500 μ g/kg). Todos os inibidores foram

administrados 1 h antes da injeção de IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min). Os animais controle foram tratados com PBS e o edema de pata avaliado como descrito acima.

2.3.5. Análise da participação de alguns grupos de quinases

Para investigar o envolvimento da ativação da PKC no aumento da resposta edematogênica mediada pela ativação dos receptores B₁ em ratos tratados com IL- β ou TNF α , os animais receberam os inibidores da PKC, a estaurosporina (10 – 50 nmol/pata) ou o RO 318220 (30 nmol/pata), em conjunto com a IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) ou com o TNF α (5 ng/pata, 30 min). Em outro grupo experimental, os ratos receberam o inibidor da MAP quinase, PD 98059 (30 – 50 nmol/pata), em associação com a IL-1 β ou com o TNF α (ambos na dose de 5 ng/pata), 60 e 30 min antes da injeção da des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), respectivamente. Finalmente, para determinar a possível participação da tirosina-quinase no aumento de volume induzido pela des-Arg⁹-BK, os animais foram pré-tratados com o inibidor de tirosina-quinase, genisteína (2.5 – 5 mg/kg), 30 min antes da injeção de IL-1 β ou TNF α . As respostas edematogênicas obtidas na presença dos inibidores foram comparadas com aquelas observadas nos animais controle (tratados com PBS).

2.3.6. Influência do tratamento com inibidores de síntese protéica

Com o objetivo de verificar a possível participação de síntese protéica no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em ratos tratados com IL-1 β ou TNF α , outros grupos de animais foram tratados previamente com o glicocorticóide, dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), 4 h antes dos experimentos, ou com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c.), 6 h antes da injeção de IL-1 β ou TNF α (5 ng/pata). Os animais controle foram tratados com PBS nos mesmos intervalos de tempo.

2.3.7. Participação do fator nuclear NF- κ B

Para analisar o envolvimento do fator de transcrição NF- κ B no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos que receberam IL-1 β ou TNF α , outros grupos de animais foram tratados com os inibidores da ativação do NF- κ B, TLCK (2 mg/kg, i.p.) ou PDTC (100 mg/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min). O edema de pata foi avaliado conforme a descrição anterior, e as respostas obtidas na presença dos inibidores foram comparadas com aquelas observadas nos animais tratados com PBS.

2.3.8. Efeito do tratamento com inibidores da migração celular

Com a finalidade de avaliar o possível envolvimento de alguns fatores quimiotáticos no desenvolvimento do edema de pata à des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β , os animais receberam o antagonista do fator de agregação plaquetária (PAF), WEB 2086 (15 μ g/pata), ou o antagonista do receptor de leucotrieno B₄ (LTB₄), CP 105696 (30 μ g/pata), em associação com a IL-1 β (5 ng/pata, 60 min). Em outra de série de experimentos, visando analisar a participação de moléculas de adesão no aumento das respostas mediadas pelos receptores B₁ em ratos que receberam IL-1 β , os animais foram pré-tratados por via endovenosa (e.v.) com o inibidor não-seletivo de selectinas, fucoidina (10 mg/kg), ou com o anticorpo anti-CD18 (β 2-integrina) (1 mg/kg), ambos administrados 15 min antes da injeção de IL-1 β . A resposta inibitória foi analisada comparando-se o edema produzido pela des-Arg⁹-BK após o tratamento com IL-1 β , na presença ou ausência dos inibidores.

2.4. Análise do efeito de inibidores de quinases ou do fator nuclear NF- κ B sobre as respostas mediadas pelos receptores B₂ para as cininas

Em outros grupos de experimentos, a fim de determinar a seletividade de alguns dos inibidores utilizados, os efeitos do tratamento com estaurosporina (10 nmol/pata), RO 318220 (30 nmol/pata), PD 98059 (10

nmol/pata), genisteína (2,5 mg/kg, i.p., 30 min), TLCK (2 mg/kg, i.p., 30 min) ou PDTC (100 mg/kg, i.p., 30 min) foram avaliados sobre a resposta edematogênica causada pela injeção intraplantar de BK (3 nmol/pata). Os protocolos de tratamento utilizados foram os mesmos descritos anteriormente. O aumento de volume observado após o tratamento com os inibidores foi comparado com aquele observado em animais pré-tratados com PBS.

2.5. Medida dos níveis de IL-1 β e de TNF α

Para a medida dos níveis de IL-1 β e TNF α , foi utilizada a metodologia previamente descrita por Francischi et al. (2000), com pequenas modificações. Os animais receberam, por via intraplantar, 0,1 ml de IL-1 β (5 ng/pata) e foram sacrificados após 30 min. Os animais controle receberam PBS. O tecido subcutâneo das patas injetadas foi removido e colocado em tampão fosfato, contendo: tween 20 0,5 %, cloreto de benzametônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, aprotinina A 2 μ g/ml, PMSF 0,1 mM e BSA 0,5 %. Os tecidos foram homogeneizados e centrifugados a 3000 g, por 10 min, a - 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio. Os níveis de IL-1 β e TNF α foram medidos através de Kit de Elisa, de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems ®). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 3 vezes. As respostas foram expressas em pg/mg de tecido.

2.6. Detecção do RNA mensageiro para o receptor B₁

Os experimentos foram realizados segundo a descrição metodológica de Bélichard et al. (2000), com algumas modificações. Os animais foram tratados por via intraplantar com IL-1 β (5 ng/pata) ou com PBS e foram sacrificados em vários intervalos de tempo (15 - 360 min). Em outro grupo de experimentos, com o intuito de determinar a possível correlação entre moléculas de adesão e a expressão dos receptores B₁, os animais foram pré-tratados com o inibidor de selectinas, a fucoidina (10 mg/kg, e.v.), 15 min antes da IL-1 β (5 ng/pata). Neste grupo experimental, os animais foram sacrificados 60 min após a injeção de IL-1 β . O tecido subcutâneo das patas foi removido, congelado em nitrogênio líquido e estocado a - 70 ° C. Posteriormente, as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando reagente Trizol (Gibco BRL®), conforme as recomendações do fabricante. A transcrição reversa (RT) foi realizada com 1 μ g de RNA total e 200 U de transcriptase reversa (Gibco BRL®) em uma mistura contendo dNTP 0,5 mM, 25 μ l/ml do oligo dT, DTT 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, em um volume final de 20 μ l. As amostras foram incubadas por 50 min a 42 °C, aquecidas por 15 min a - 70 ° e, finalmente, resfriadas em gelo. Depois do tratamento com 2 U de Rnase H (20 min, 37 °C), a amplificação do DNAc de seqüências específicas para o receptor B₁ de rato e para a β -actina foi realizada pela reação da cadeia

de polimerase (PCR), utilizando os seguintes *primers*: sense TGAAGCTGTGTGAGCTCTTTG e antisense GCCAGTTGAAACGGTTCCC, para o receptor B₁; e sense GTTCCGATGCCCCGAGGATCT e antisense GCATTTGCGGTGCACGATGGA, para a β-actina de rato. O DNAc da β-actina foi utilizado para a padronização da quantidade de RNA. Alíquotas obtidas da RT (5 μl) foram adicionadas a uma mistura contendo MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 300 μM, 2 μg/ml do *primer* e 50 U/ml de *Taq* polimerase (Gibco BRL®) em Tris-HCL 20 mM pH 8,4, em um volume final de 100 μl. O protocolo usado para o PCR foi o seguinte: 4 min a 94 °C, 36 ciclos de 35 s a 94 °C/45 s a 60 °C/ 45 s a 72 ° e, finalmente, por 7 min a 72 °C. Alíquotas de 25 μl de cada amostra foram analisadas em gel de poliacrilamida/Tris-borato-EDTA (TBE) e coradas com brometo de etídio. O tamanho dos produtos foi: 450 pares de base para o receptor B₁ e 600 pares de base para a β-actina. Os experimentos foram repetidos 4 vezes.

2.7. Ativação do fator nuclear NF-κB

A ativação do fator de transcrição NF-κB foi determinada pelo ensaio de deslocamento em gel (EMSA). Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam, por via intraplantar, na pata direita, 0,1 ml de PBS contendo IL-1β (5 ng/pata). Decorridos 30 min, os animais foram sacrificados

e o tecido subcutâneo das patas foi removido e congelado em nitrogênio líquido. Patas tratadas com PBS foram utilizadas como controle. Em alguns experimentos, os animais foram tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) ou com PDTC (100 mg/kg), como descrito nos itens 2.2.6 e 2.2.7. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 3 vezes. Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido e os extratos nucleares foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Shames et al (1998). As amostras foram homogeneizadas em 30 volumes de tampão A (HEPES 10 mmol/l pH 7.9; KCl 10 mmol/l; EDTA 0.1 mmol/l; sucrose 0.35 mol/l; NP-40 0.5%; DTT 0.5 mmol/l e PMSF 0.5 mmol/l) e centrifugadas a 1500 g, por 25 min, 4 °C. O precipitado foi ressuspenso, homogeneizado em 15 ml de tampão B (HEPES 10 mmol/l, pH 7.9; KCl 10 mmol/l; EDTA 0.1 mmol/l e sucrose 0.7 mol/l) e novamente centrifugado (1500 g, 30 min, 4 °C). O precipitado obtido foi lavado em tampão contendo: HEPES 10 mmol/l, pH 7.9; KCl 10 mmol/l e EDTA 0.1 mmol/l. Depois de ser centrifugado por 30 min, a 1500 g, o precipitado foi ressuspenso em 100 µl de tampão de extração (HEPES 20 mmol/l, pH 7.9; MgCl₂ 1.5 mmol/l; NaCl 0.42 mol/l; EDTA 0.2 mmol/l; glicerol 25%; DTT 0.5 mmol/l e PMSF 0.5 mmol/l) e incubado a 4 °C, por 20 min. Os extratos nucleares foram centrifugados por mais 30 min (1500 g). O sobrenadante foi misturado em tampão contendo: HEPES 20 mmol/l, pH 7.9; KCl 50 mmol/l; EDTA 0.2 mmol/l; glicerol 20%; DTT 0.5 mmol/l e PMSF 0.5 mmol/l e congelado em freezer -70 °C. A concentração

protéica das amostras foi determinada através de Kit conforme as determinações do fabricante (BioRad®).

O ensaio de deslocamento em gel (EMSA) foi realizado com o Kit da Promega, de acordo com as instruções do fabricante. A sonda contendo o oligonucleotídeo NF- κ B foi marcada (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Promega) com [γ - 32 P]ATP (DuPont, New England), na presença de T4 quinase (10 min, 37 °C). Os nucleotídeos não incorporados foram removidos em coluna de Sephadex G-25 (Pharmacia). Um volume de 10 μ l dos extratos nucleares foi incubado em tampão de ligação, contendo: Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; MgCl₂ 1 mM; NaCl 50 mM; DTT 0.5 mM; EDTA 0.5 mM; glicerol 4%; e 1 μ g de poli (dI:dC), por 20 min, em temperatura ambiente. Após a adição de 25000 cpm do oligonucleotídeo NF- κ B marcado, as amostras foram incubadas por mais 30 min e colocadas em gel não-desnaturante (acrilamida:bisacrilamida 6%, 37.5:1; em tampão Tris-borato/EDTA), em 150 V, por 2 h. O gel foi seco em vácuo e exposto em autoradiografia.

Para os estudos de competição, os fatores de transcrição NF- κ B ou TFIID (5'-GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA-3'; fator não relacionado à família NF- κ B, responsável pelo recrutamento da RNA polimerase II) foram incubados com a sonda marcada, a fim de detectar

interações não específicas. Células HeLa foram utilizadas como controle positivo.

2.8. Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da MPO, segundo o método descrito por Souza et al. (2000), com pequenas modificações. Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam, por via intraplantar, na pata direita, 0,1 ml de PBS contendo IL-1 β (1 e 5 ng/pata) ou des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) e foram sacrificados 60 e 20 min após as injeções, respectivamente. Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados com IL-1 β (1 e 5 ng/pata) e, após 60 min, receberam des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), sendo sacrificados 20 min depois. Em outro grupo experimental, os animais receberam o antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 nmol/pata), em conjunto com a des-Arg⁹-BK. As patas tratadas com PBS foram utilizadas como controle. Em outros experimentos, a atividade da MPO, após a injeção intraplantar de IL-1 β , foi analisada em animais tratados com WEB 2086 (15 μ g/pata), CP 105696 (30 μ g/pata), fucoidina (10 mg/kg, e.v., 15 min) ou com o anticorpo anti-CD 18 (1 mg/kg, e.v., 15 min), como descrito no item 2.3.8. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 3 vezes. Os animais foram sacrificados e o tecido subcutâneo das patas foi removido,

homogeneizado a 5 % (peso/volume) em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugado a 10000 r.p.m., por 15 min, 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em tampão contendo brometo de hexadecil-trimetilamônio 0.5 % (pH 5,4) e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Depois do último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente (10000 r.p.m., 15 min, 4 °C) e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina 1,6 mM, NaPO₄ 80 mM e peróxido de hidrogênio 0,3 mM. A absorbância foi medida em 650 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica por mg de tecido.

3. Drogas e reagentes

Os seguintes reagentes e drogas foram utilizados: BK, des-Arg⁹-BK, tirosina⁸-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, captopril, dexametasona, cicloheximida, indometacina, fucoidina, estaurosporina, TLCK (N α -tosil-clorometilcetona), PDTC (pirrolidina-ditiocarbamato), EDTA, brometo de hexadeciltrimetil amônio, tetrametilbenzidina, Tween 20, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto), aprotinin A, BSA, cloreto de benzametônio, HEPES, DTT, NP-40, Tris-HCl, glicerol, pastilhas de PBS (todos obtidos da Sigma Chemical Company, St.Louis, EUA); CP 105696 (Pfizer Global Research and Development, Groton Labs, CT, USA); NS 398 (Tocris Inc., EUA);

genisteína, PD 98059 e RO31820 (Research Biochemical International, RBI, MA, EUA); citocinas recombinantes murinas IL-1 β (lote BN091) e TNF α (lote CS 184), IL-10 recombinante humana (lote BC110), antagonista do receptor de IL-1 recombinante humano (IRA), anticorpos anti-IL-1 β (lote B01D3), anti-TNF α (lote CT101), anti-IL-6 (lote BF123) e anti-IL-8 (lote BB282) (R & D Systems INC., Minneapolis, EUA); NaPO₄, NaCl, MgCl₂, KCl, sucrose e peróxido de hidrogênio (Merk, Brasil); WEB 2086 e meloxicam (Boehringer-Manhein, Alemanha). O anticorpo anti-CD18 foi gentilmente doado pelo Dr. Paul Hellewell (University of Sheffield, UK). Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) e des-Arg⁹-NPC 17731 (D-Arg⁰-Arg¹-Pro²-Hyp³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-[D-Hype³(transpropyl)⁷]-Oic⁸) 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 PBS, com exceção da dexametasona e indometacina que foram diluídas em 5% de etanol.

4. Análise estatística

Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média, exceto para os valores individuais das DE₅₀ ou DI₅₀ (ou seja, as 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. As percentagens de inibição representam a média das inibições obtidas para cada experimento individual. A avaliação 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; **P<0,01) foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS

1. Caracterização da resposta edematogênica causada por agonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ em animais pré-tratados com citocinas pró-inflamatórias

Como demonstrado anteriormente (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1996; Campos et al., 1997), a injeção intraplantar dos agonistas seletivos para os receptores B₁, a des-Arg⁹-BK ou a des-Arg¹⁰-calidina (em doses até 300 nmol/pata), produziu apenas uma discreta alteração do volume das patas de animais controle ($0,07 \pm 0,02$ ml e $0,08 \pm 0,02$ ml, respectivamente). Por outro lado, a injeção do agonista seletivo dos receptores B₂, tirosina⁸-BK (0,3 – 10 nmol/pata), produziu edema de pata marcante e de maneira dose-dependente, com valor de DE₅₀ (acompanhado do limite de confiança) de 1,1 (0,8 – 1,4) nmol/pata e resposta máxima de $0,38 \pm 0,03$ ml.

Entretanto, os resultados do presente estudo demonstram que a injeção de des-Arg⁹-BK ou de des-Arg¹⁰-calidina (10 – 100 nmol/pata), em animais que foram pré-tratados com IL-1 β (60 min; Figura 1) ou com TNF α (30 min; Figura 2), ambos administrados na dose de 5 ng/pata, resultou em um aumento expressivo e dose-dependente do volume das patas. As respostas máximas obtidas para a des-Arg⁹-BK e para a des-Arg¹⁰-calidina foram: $0,58 \pm 0,02$ ml e $0,42 \pm 0,03$ ml, nos animais pré-tratados com IL-1 β e; $0,44 \pm$

0,03 ml e $0,29 \pm 0,04$ ml, nos animais pré-tratados com $\text{TNF}\alpha$, respectivamente. Por outro-lado, o tratamento prévio dos animais com $\text{IL-1}\beta$ (60 min) ou $\text{TNF}\alpha$ (30 min) (ambos 5 ng/pata) não foi capaz de produzir alteração significativa do edema de pata causado pelo agonista seletivo dos receptores B_2 , a tirosina⁸-BK (0,3 – 10 nmol/pata). Os valores de DE_{50} (acompanhados do limite de confiança) foram de 1,3 (0,9 – 1,6) e 0,99 (0,8 – 1,3) nmol/pata e respostas máximas de $0,37 \pm 0,01$ e $0,42 \pm 0,04$ ml, respectivamente, nos animais pré-tratados com $\text{IL-1}\beta$ ou $\text{TNF}\alpha$.

A injeção de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) também produziu edema de pata pronunciado em animais que receberam $\text{IL-1}\beta$ (5 ng/pata; 60 min) ou $\text{TNF}\alpha$ (5 ng/pata, 30 min) na pata contralateral. As respostas máximas obtidas foram $0,36 \pm 0,04$ ml e $0,39 \pm 0,03$ ml, quando a des-Arg⁹-BK foi aplicada na pata contralateral; e $0,55 \pm 0,04$ ml e $0,45 \pm 0,07$ ml, quando a $\text{IL-1}\beta$ ou o $\text{TNF}\alpha$ foi aplicado no mesmo sítio que a des-Arg⁹-BK, respectivamente.

Os resultados da Figura 3 mostram o aumento de volume tempo-dependente produzido pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com $\text{IL-1}\beta$ ou $\text{TNF}\alpha$ (ambos na dose de 5 ng/pata). O edema induzido pela des-Arg⁹-BK foi evidente 15 min após o tratamento com $\text{IL-1}\beta$ (Figura 3A) ou com $\text{TNF}\alpha$ (Figura 3B), sendo que as respostas máximas foram alcançadas 60 e 30 min após a injeção de $\text{IL-1}\beta$ ($0,64 \pm 0,06$ ml) ou $\text{TNF}\alpha$ ($0,47 \pm 0,05$ ml), respectivamente. A resposta

edematogênica produzida pelo agonista B_1 se manteve estável até 120 min, apresentando-se significativamente reduzida em 360 min (Figuras 3A e B). Por outro lado, o edema de pata produzido pela tirosina⁸-BK não foi alterado pelo tratamento com IL-1 β ou TNF α , em nenhum dos intervalos de tempo observados (Figura 4).

Quando avaliada nos mesmos intervalos de tempo utilizados para a IL-1 β ou para o TNF α , a injeção intraplantar de IL-6 (em doses até 10 ng/pata) gerou apenas um pequeno aumento da resposta edematogênica produzida pela injeção intraplantar do agonista B_1 , a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) (Figura 3C). As respostas obtidas foram 0.07 ± 0.005 ml e 0.16 ± 0.036 ml, nos animais pré-tratados com PBS e IL-6 (10 ng/pata, 60 min), respectivamente.

Os resultados do presente trabalho também demonstram que o aumento da resposta edematogênica causada pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) foi proporcional às doses utilizadas de IL-1 β (0,1 – 5 ng/pata, 60 min) ou TNF α (0,5 - 5 ng/pata, 30 min) (Figuras 5A e B). Além disso, é possível observar que a injeção intraplantar de IL-1 β (60 min) ou TNF α (30 min), em doses até 5 ng/pata, produz apenas uma pequena alteração de volume das patas ($0,05 \pm 0,008$ ml e $0,025 \pm 0,004$ ml, respectivamente) (Figuras 5A e B).

2. Efeito do tratamento com IL-1 β sobre o aumento do RNAm para o receptor B₁ na pata de rato.

A Figura 6 mostra que a injeção intraplantar de IL-1 β (5 ng/pata) é capaz de produzir um aumento tempo-dependente dos níveis de RNAm para o receptor B₁ na pata de rato, quando avaliado em 30, 60 e 120 min, após o tratamento com esta citocina. Os resultados também demonstram que expressão do receptor B₁, induzida pela injeção intraplantar de IL-1 β , foi máxima em 60 min.

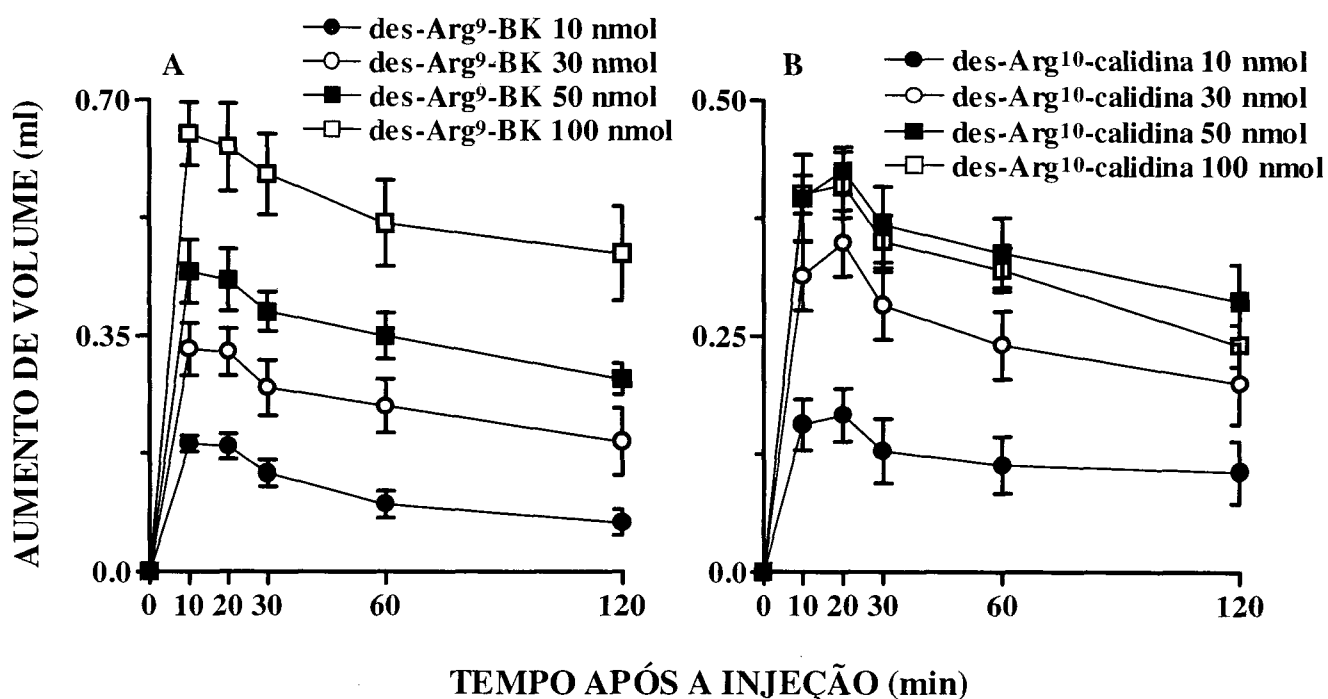


Figura 1 – Curva dose-resposta para os agonistas seletivos dos receptores B₁ para as cininas, des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (10 – 100 nmol/pata), em ratos pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m.

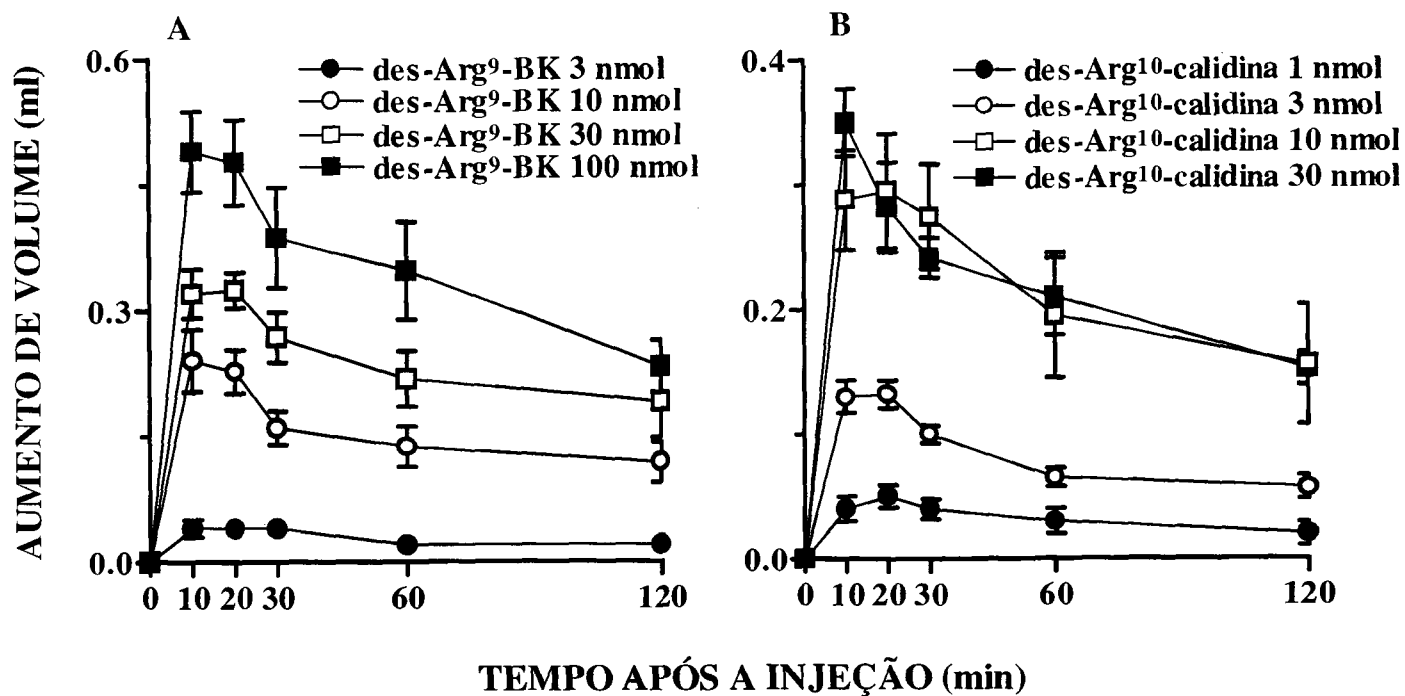


Figura 2 – Curva dose-resposta para os agonistas seletivos dos receptores B₁ para as cininas, des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (1 – 100 nmol/pata), em ratos pré-tratados com TNF α (5 ng/pata, 30 min). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m.

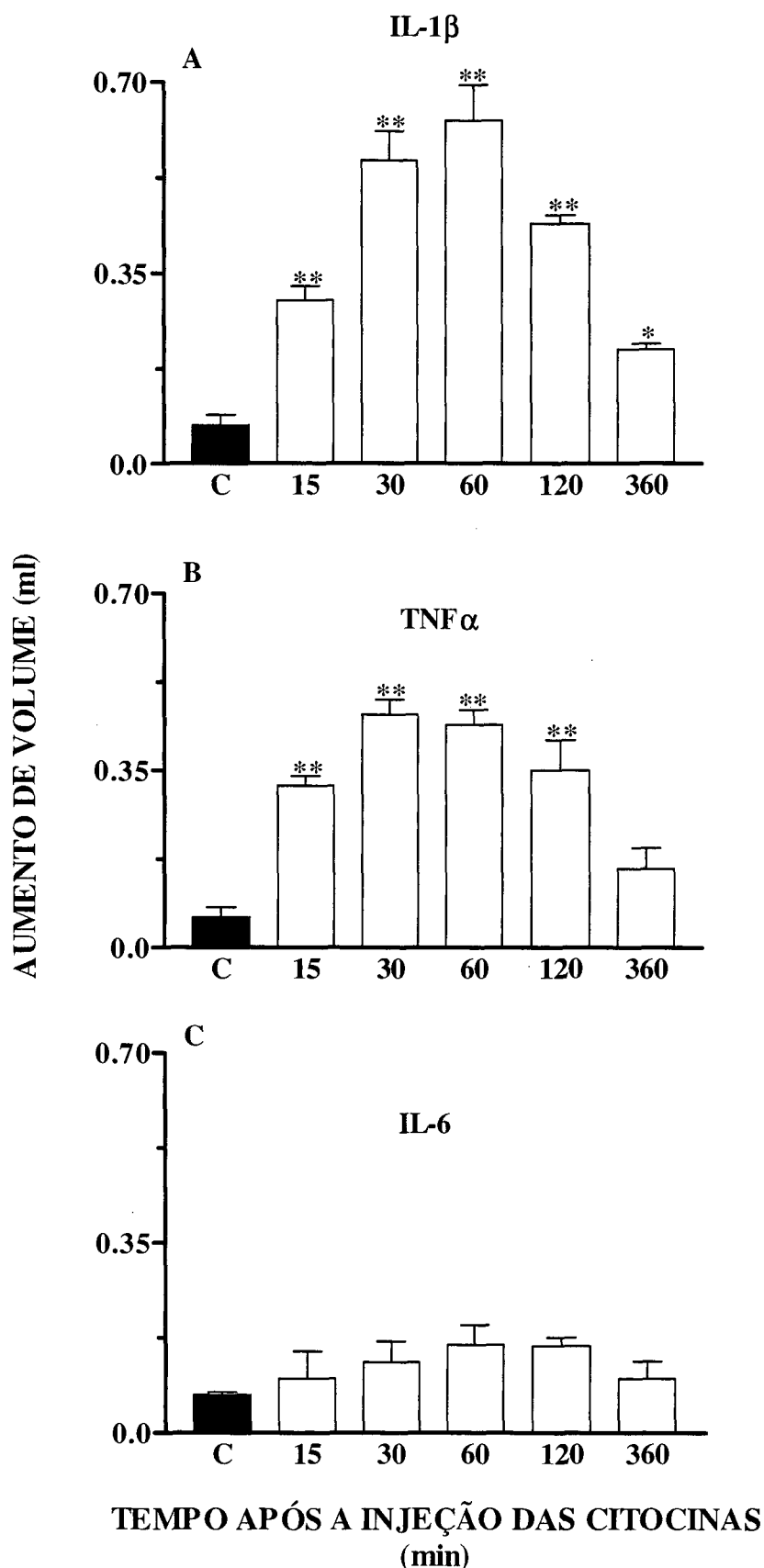


Figura 3 – Efeito tempo-dependente do tratamento com IL-1 β , TNF α ou IL-6 (5 - 10 ng/pata) sobre o edema de pata causado pelo agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata, 20 min) Cada coluna representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. *P<0,05; **P<0,01.

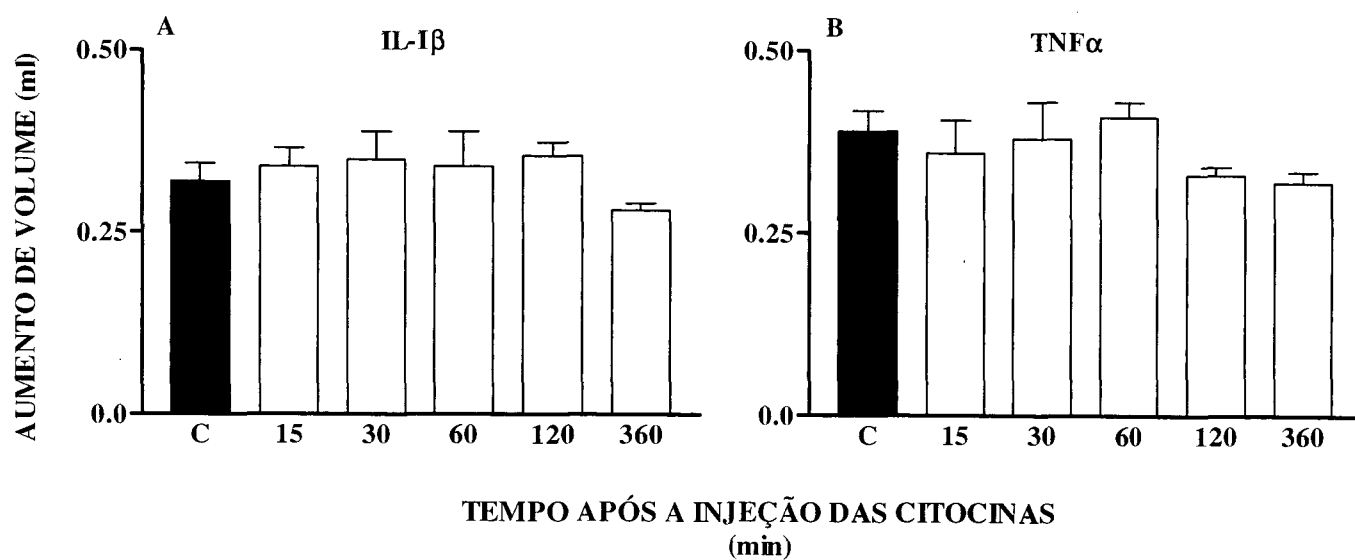


Figura 4 – Efeito tempo-dependente do tratamento com IL-1 β ou TNF α (5 ng/pata) sobre o edema de pata causado pelo agonista seletivo de receptores B₂, tirosina⁸-BK (3 nmol/pata, 20 min) Cada coluna representa a média de 4-6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. *P<0,05; **P<0,01.

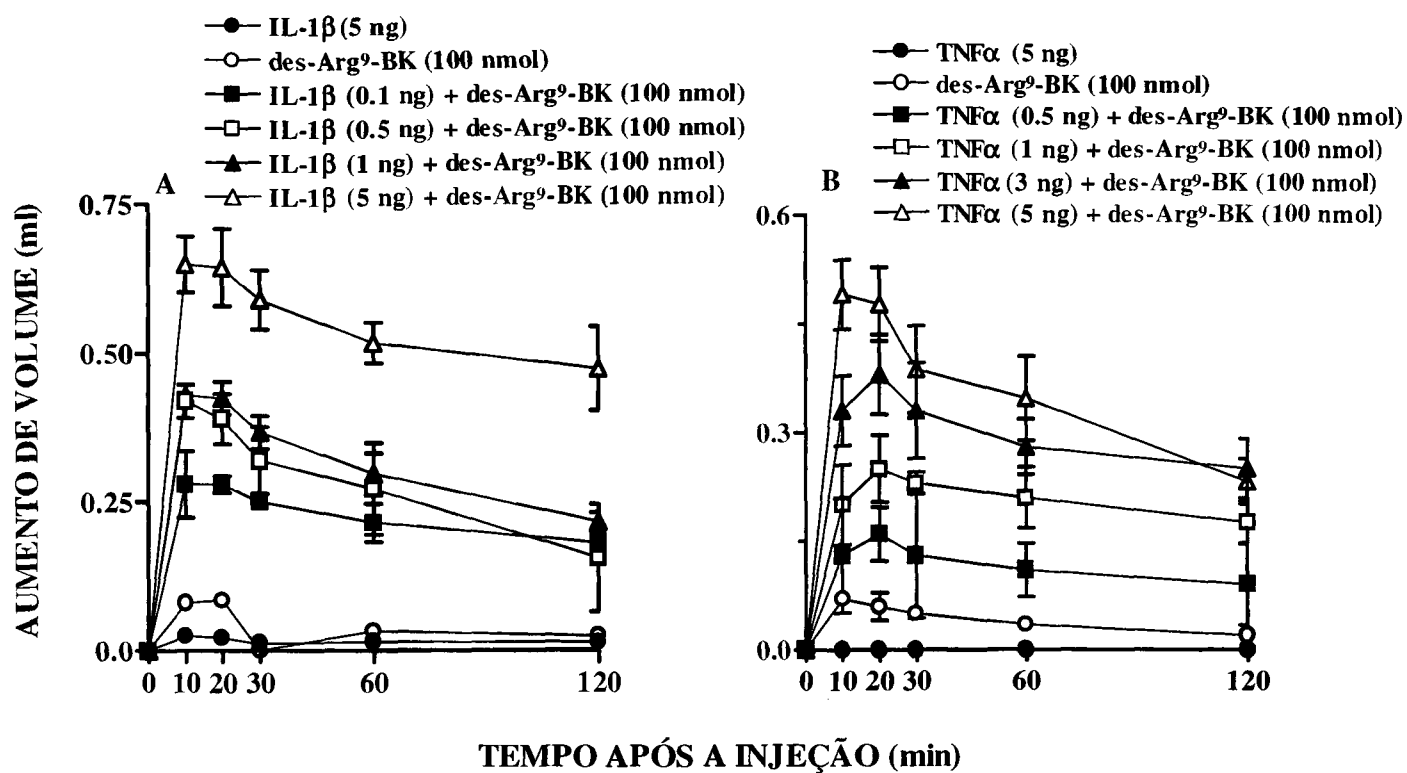


Figura 5 - Curva dose-resposta para os efeitos da IL-1 β (60 min) e do TNF α (30 min) sobre o edema de pata causado pelo agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m.

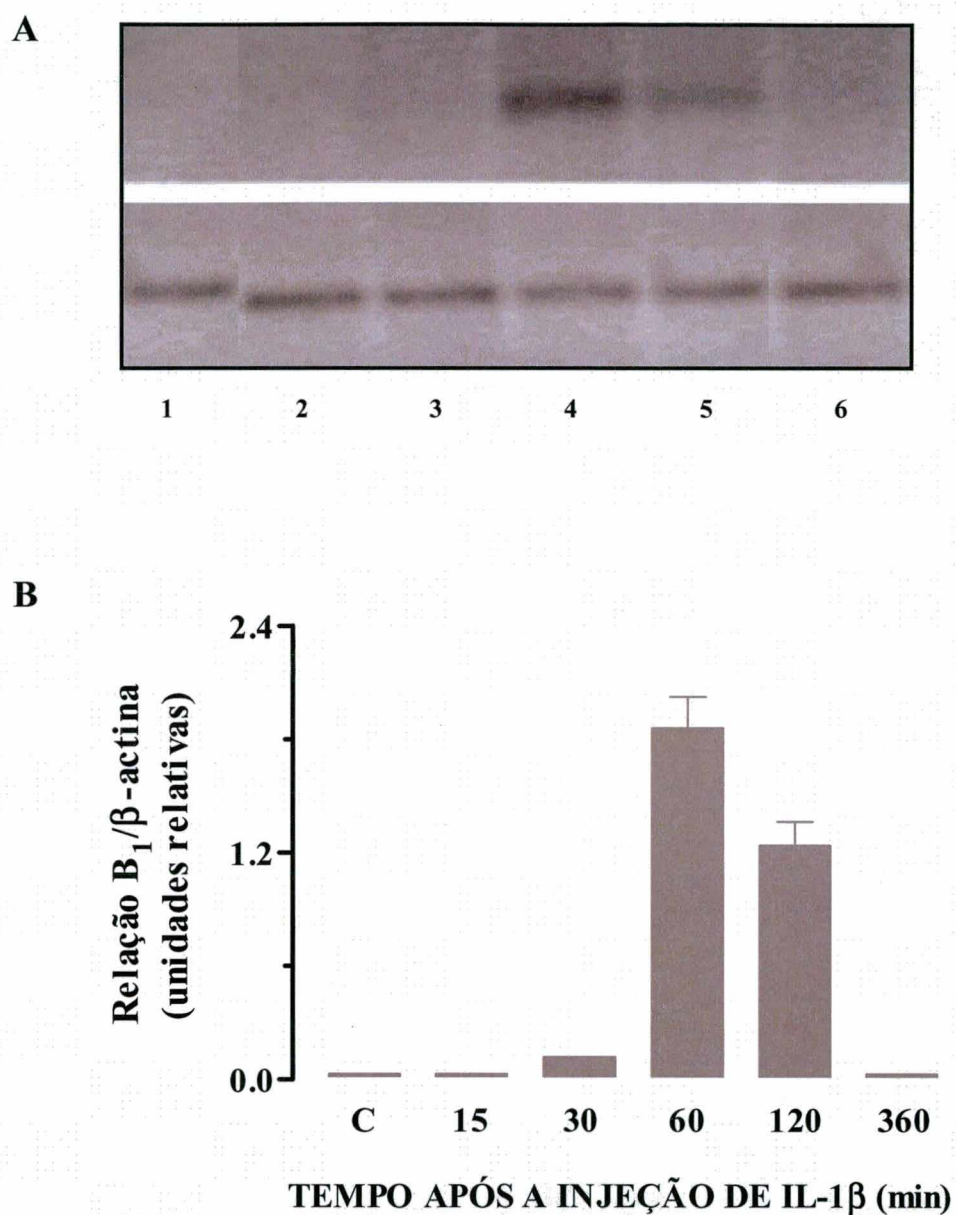


Figura 6 - (A) Efeito tempo-dependente do tratamento com IL-1 β (5 ng/pata) sobre o aumento do RNAm para os receptores B₁ na pata de rato. 1.PBS; 2. IL-1 β 15 min; 3. IL-1 β 30 min; 4. IL-1 β 60 min; 5. IL-1 β 120 min; 6. IL-1 β 360 min. (B) Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para o receptor B₁; os valores representam a relação entre o sinal do receptor B₁ e o sinal para a β -actina. Cada coluna representa a média de 4 experimentos e as barras verticais os e.p.m.

3. Análise dos mecanismos envolvidos no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α

O edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) nos animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α foi inibido de forma dose-dependente pela co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-NPC 17731 (1 – 30 nmol/pata). Os valores obtidos para a DI₅₀ (acompanhados do limite confiança) foram 4,1 (1,6 – 10,4) nmol/pata e 3,7 (2,2 - 6,5) nmol/pata, nos animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α , respectivamente (Figuras 7A e B). Entretanto, a co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₂, Hoe 140 (10 nmol/pata, na mesma dose em que esse antagonista é capaz de inibir completamente o edema causado pelo agonista seletivo B₂, a tirosina⁸-BK), ele não foi capaz de interferir de maneira significativa com o edema induzido pela des-Arg⁹-BK, após o tratamento com IL-1 β ou TNF α (resultados não apresentados).

O pré-tratamento dos animais com o inibidor não-seletivo das COXs- 1 e 2, indometacina (2 mg/kg, i.p.; Figura 8), ou com os inibidores mais seletivos da COX-2 (Figura 9), o meloxicam (3 mg/kg, i.p.) e o NS 398 (500 μ g/kg, i.p.), 1 h antes da injeção de IL-1 β ou TNF α , foi capaz de inibir significativamente o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK. As inibições obtidas foram 40 \pm 6 %, 69 \pm 8 % e 57 \pm 4 % nos animais pré-tratados com

IL-1 β ; e 43 ± 3 %, 53 ± 9 % e 61 ± 6 % nos animais que receberam TNF α , respectivamente.

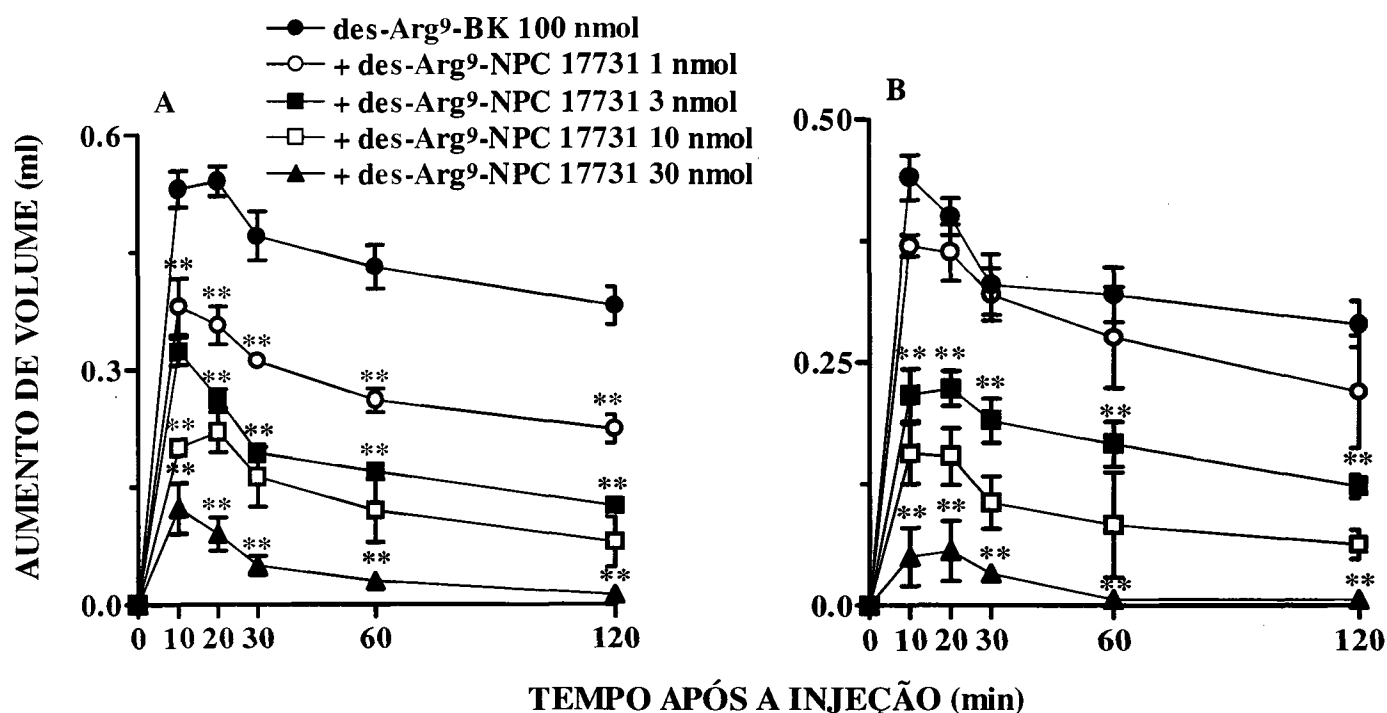


Figura 7 – Efeito da co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-NPC 17731 (1 – 30 nmol/pata) sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A) ou com TNF α (5 ng/pata, 30 min; B). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

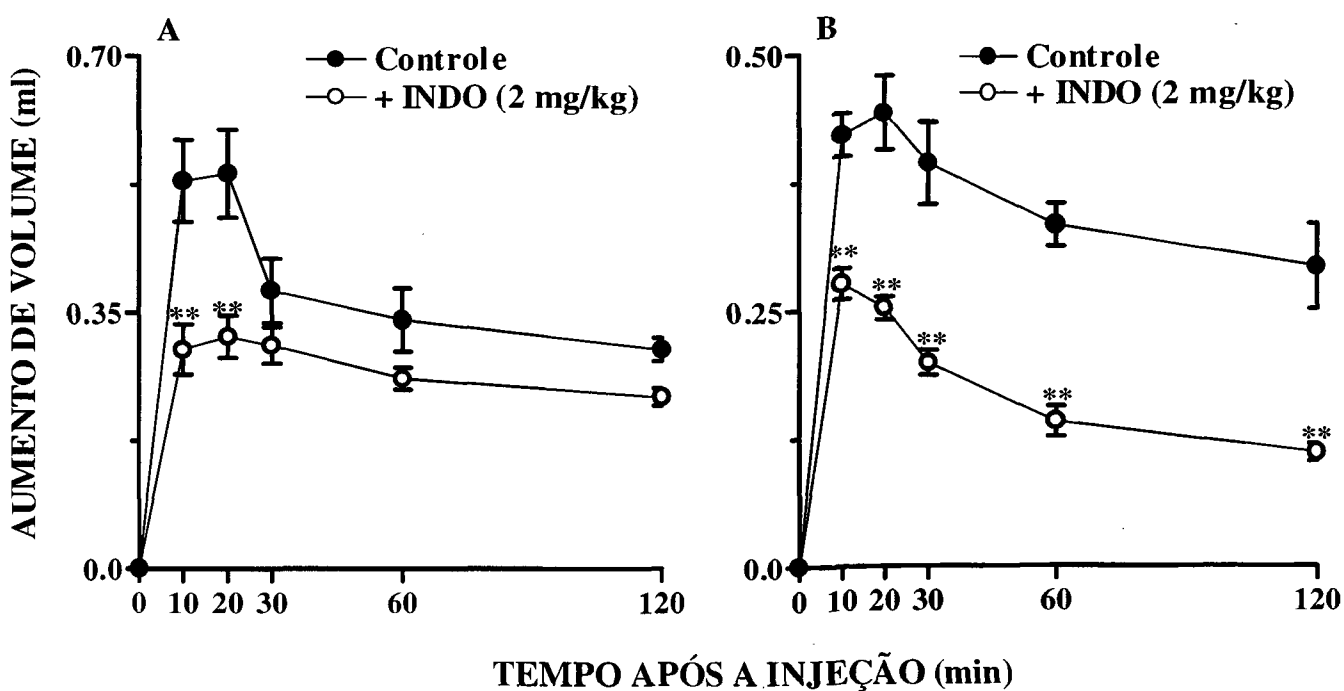


Figura 8 – Efeito do tratamento sistêmico com indometacina (2 mg/kg, i.p., 1h) sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

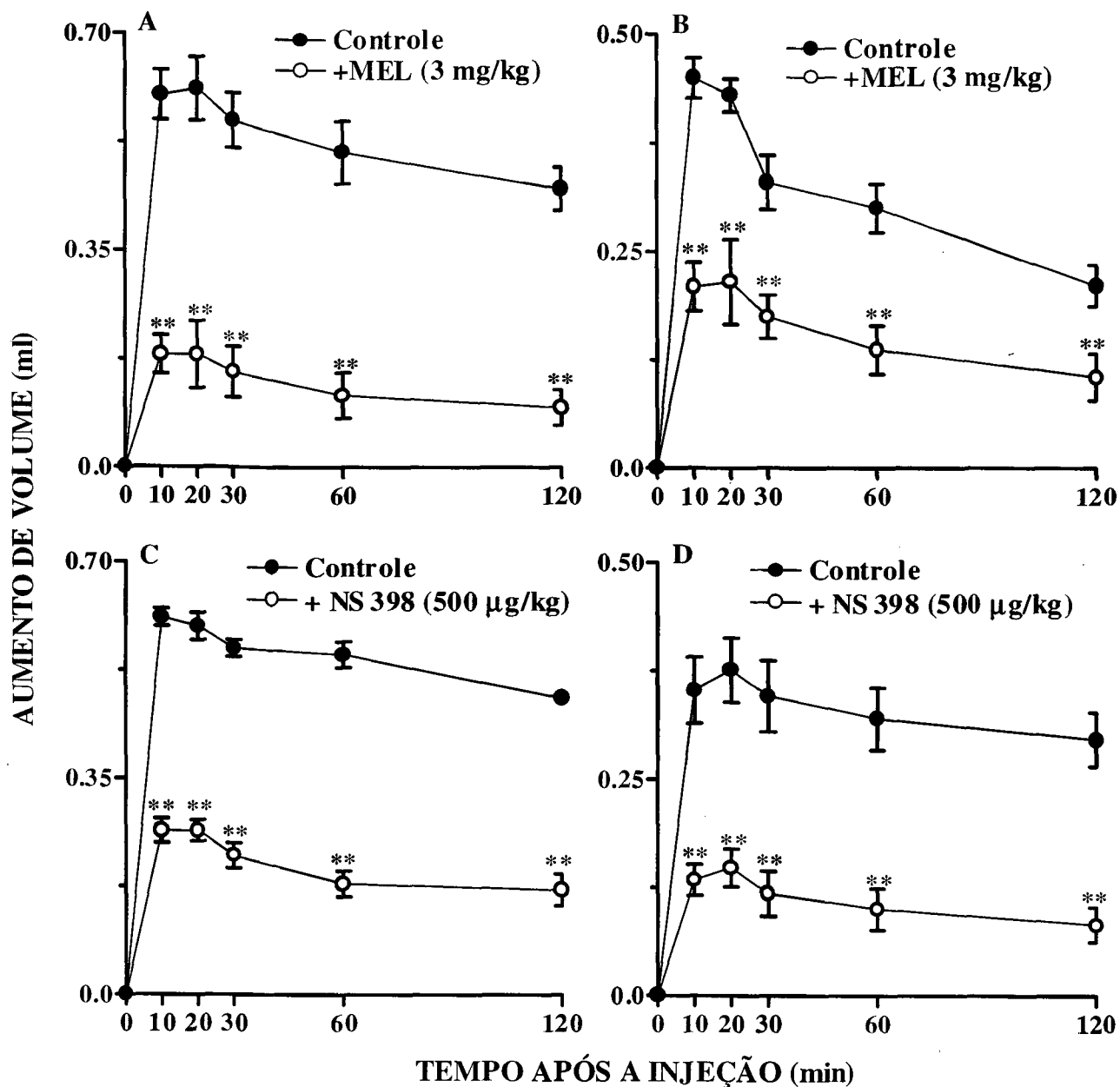


Figura 9 – Efeito do tratamento sistêmico com os inibidores preferenciais da COX-2, meloxicam (3 mg/kg, i.p., 1h) e NS 398 (500 μ g/kg, i.p., 1h), sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

Os resultados mostrados nas Figuras 10 e 11 indicam que o edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β ou TNF α foi significativamente inibido pela co-injeção dos anticorpos anti-IL-1 β , anti-TNF α e anti-IL-8 (50 - 100 ng/pata). As percentagens de inibição observadas foram $65 \pm 3 \%$, $37 \pm 3 \%$ e $42 \pm 4 \%$ nos animais pré-tratados com IL-1 β ; e $39 \pm 3 \%$, $64 \pm 6 \%$ e $25 \pm 7 \%$ nos animais pré-tratados com TNF α , respectivamente. Por outro lado, o aumento de volume da pata causado pela des-Arg⁹-BK, nos animais que receberam IL-1 β ou TNF α , não foi alterado de forma significativa pela associação do anticorpo anti-IL-6 (50 - 100 ng/pata) (Figuras 11C e D).

A resposta edematogênica à des-Arg⁹-BK, em animais tratados com IL-1 β (Figuras 12A e B) ou TNF α (Figuras 12 C e D), também foi inibida pela co-injeção do antagonista natural do receptor de IL-1, IRA (100 μ g/pata), ou pela citocina antiinflamatória, IL-10 (10 ng/pata). As inibições obtidas foram 44 ± 3 e $42 \pm 2 \%$ nos animais que receberam IL-1 β ; e $46 \pm 5 \%$ e $35 \pm 5 \%$ nos animais tratados com TNF α , respectivamente.

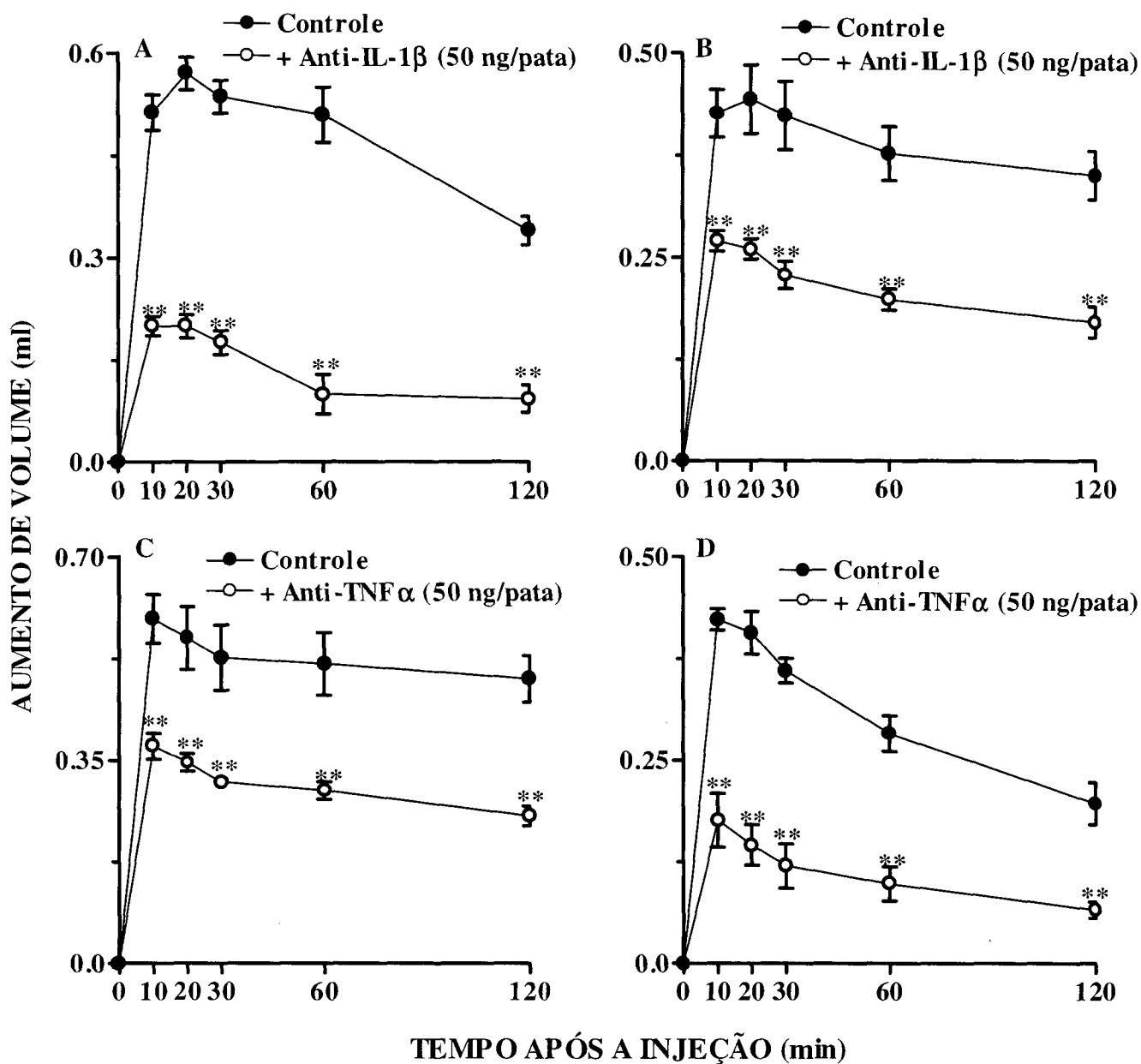


Figura 10 – Efeito da co-injeção dos anticorpos anti-IL-1 β e anti-TNF α sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

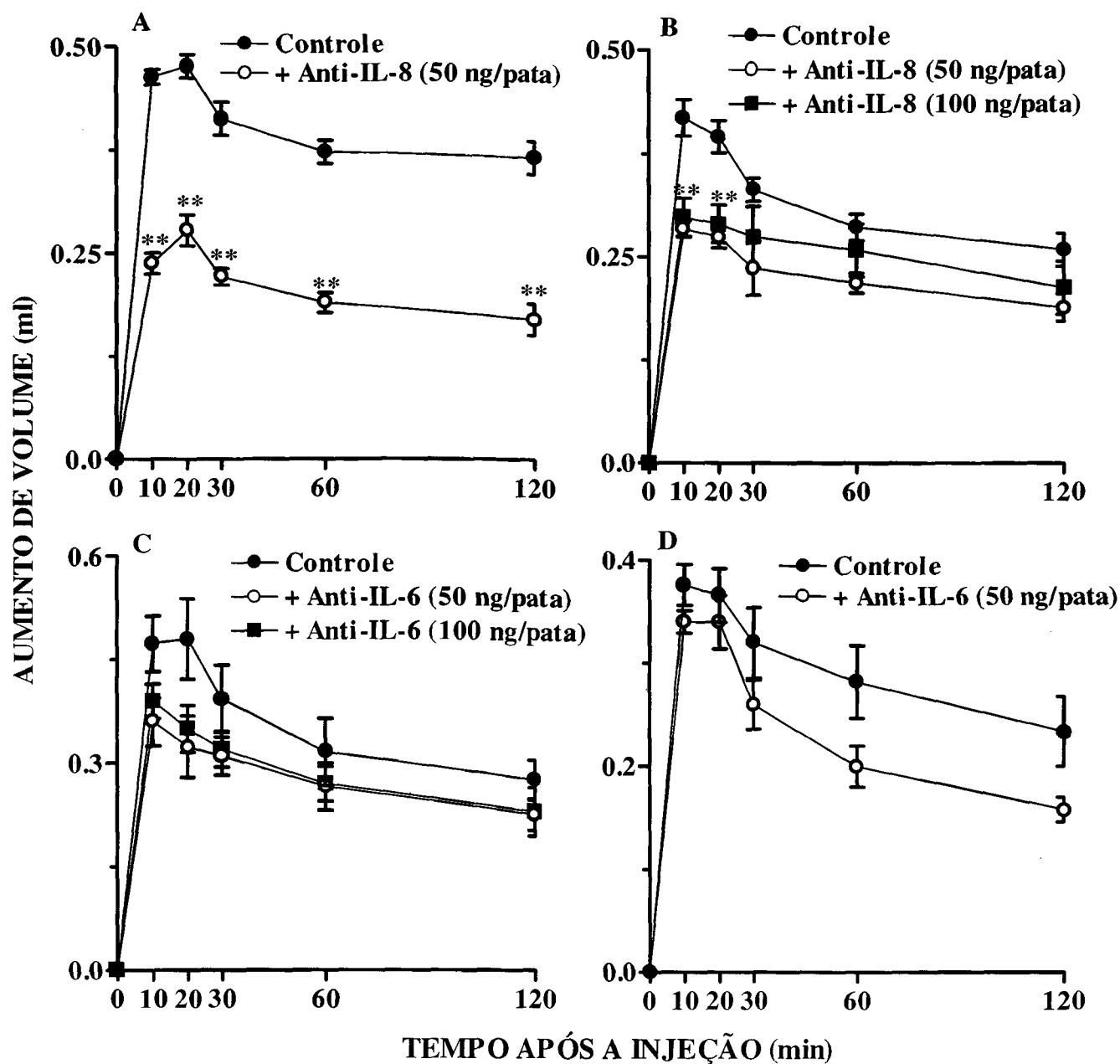


Figura 11 – Efeito da co-injeção dos anticorpos anti-IL-8 e anti-IL-6 sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

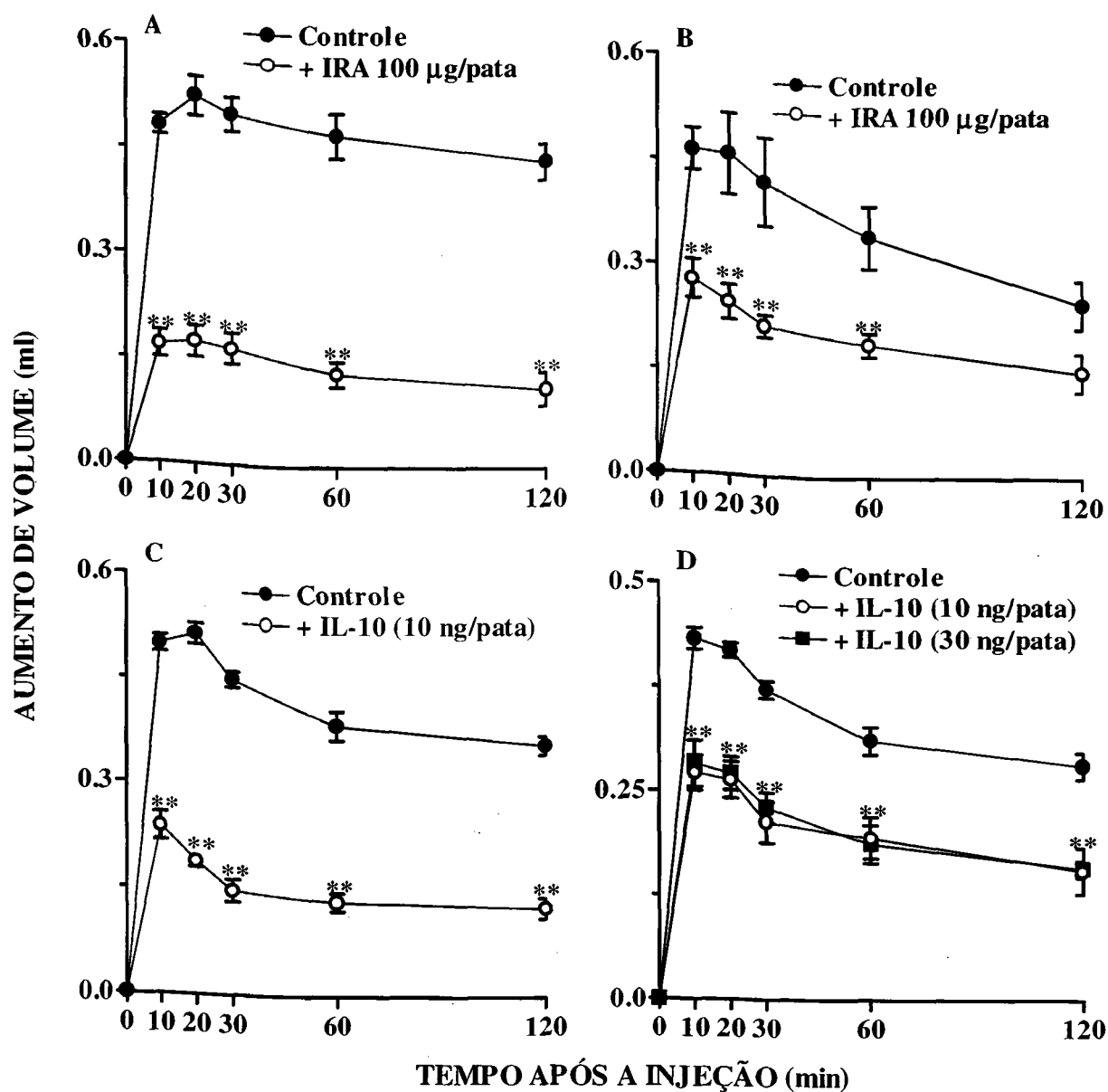


Figura 12 – Efeito da co-injeção de IL-10 ou IRA sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

Os resultados apresentados indicam que a co-injeção dos inibidores da PKC, estaurosporina (10 nmol/pata) e RO 318220 (30 nmol/pata), produziu inibição significativa da resposta edematogênica à des-Arg⁹-BK em ratos tratados com IL-1 β (Figuras 13 A e C) ou com TNF α (Figuras 13 B e D). As inibições obtidas foram $44 \pm 3 \%$ e $53 \pm 7 \%$ para o tratamento com IL-1 β ; e $53 \pm 7 \%$ e $30 \pm 3 \%$ para o tratamento com TNF α , respectivamente.

Os dados da Figura 14 demonstram que a co-injeção do inibidor da MAP-quinase, PD 98059 (30 nmol/pata), reduziu de forma significativa o aumento da resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁ em ratos tratados com IL-1 β ($39 \pm 4 \%$) ou TNF α ($35 \pm 7 \%$). Além disso, os resultados também demonstram que o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK foi significativamente prevenido pelo tratamento sistêmico dos animais com o inibidor da tirosina-quinase, genisteína (2,5 mg/kg, s.c., 30 min) (Figura 15). As inibições observadas foram $58 \pm 3 \%$ e $31 \pm 8 \%$, para a IL-1 β e para o TNF α , respectivamente.

O edema de pata mediado pelos receptores B₁, em ratos que receberam IL-1 β ou TNF α , foi significativamente bloqueado pelo pré-tratamento com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c, 6 h) (Figuras 16 A e B), ou com o glicocorticóide, dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4h) (Figuras 16C e D). As percentagens de inibição observadas após o tratamento com

esses inibidores foram: $81 \pm 5 \%$ e $59 \pm 3 \%$ para os animais que receberam IL-1 β ; e $78 \pm 4 \%$ e $43 \pm 2 \%$ nos ratos pré-tratados com TNF α , respectivamente.

Os resultados da Figura 17 demonstram que o tratamento sistêmico dos animais com os inibidores da ativação do fator de transcrição NF- κ B, TLCK (2 mg/kg, i.p.) ou com PDTC (100 mg/kg, i.p.), ambos administrados 30 min antes da injeção das citocinas pró-inflamatórias, resultou em uma redução significativa do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos tratados com IL-1 β ou TNF α . As percentagens de inibição obtidas foram $27 \pm 4 \%$ e $83 \pm 3 \%$ para os ratos que receberam IL-1 β ; e $28 \pm 6 \%$ e $80 \pm 2 \%$ para os animais tratados com TNF α , respectivamente.

4. Análise do efeito de inibidores de quinases ou do fator nuclear NF- κ B sobre as respostas mediadas pelos receptores B₂ para as cininas

Os resultados da Tabela 1 demonstram que o tratamento dos animais com RO 318220 (30 nmol/pata), genisteína (2,5 mg/kg, s.c., 30 min) ou com TLCK (2 mg/kg, i.p., 30 min) não foi capaz de interferir de forma significativa com a resposta edematogênica causada pela BK (3 nmol/pata). Por outro lado, o tratamento com a estaurosporina (10 nmol/pata) ou com PDTC inibiu significativamente o edema de pata produzido pela injeção

intraplantar de BK na pata de rato. As inibições observadas foram de 29 ± 8 % e 24 ± 4 % para a estaurosporina e para o PDTC, respectivamente.

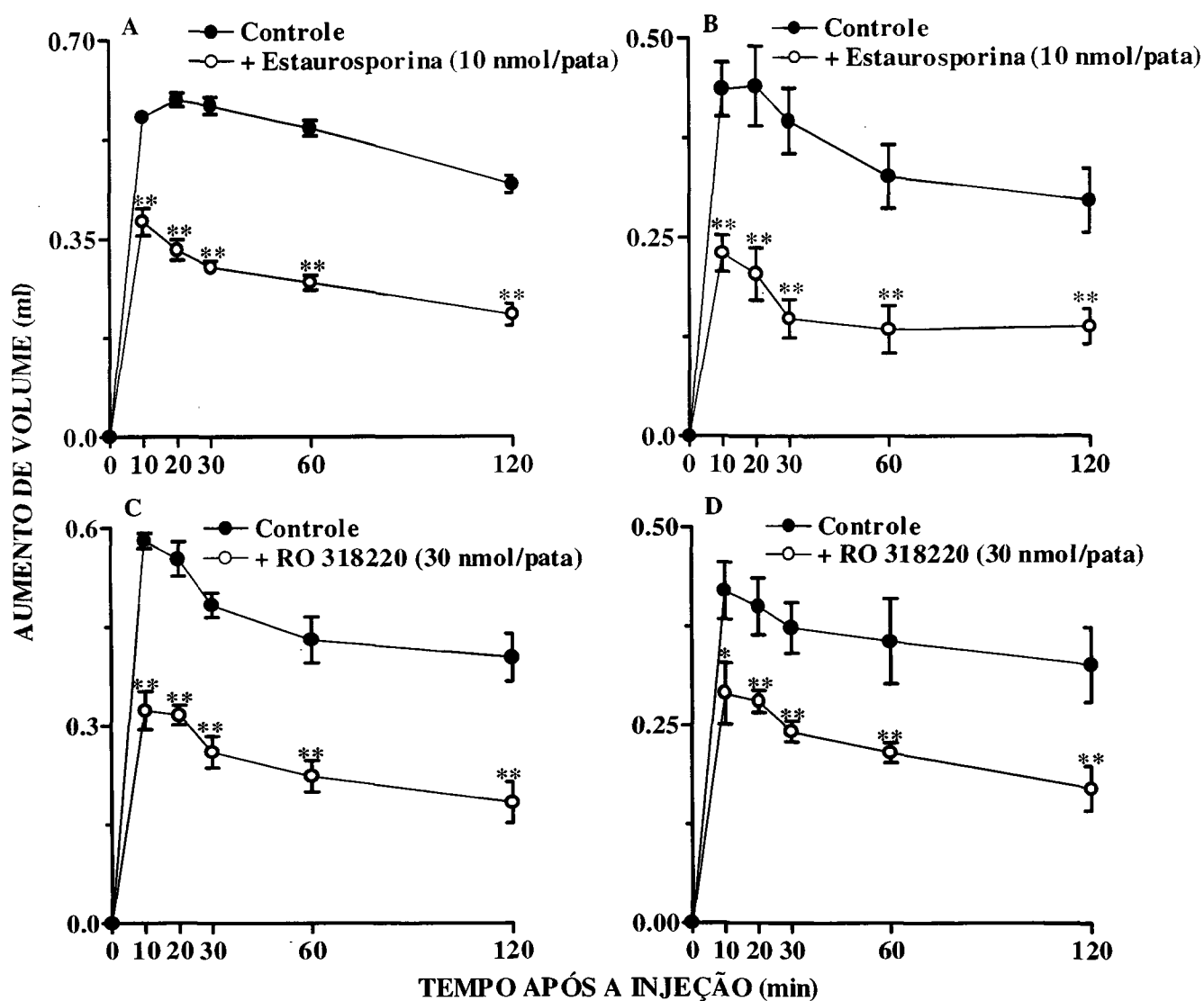


Figura 13 – Efeito da co-injeção dos inibidores da proteína quinase C, estaurosporina ou RO 318220, sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

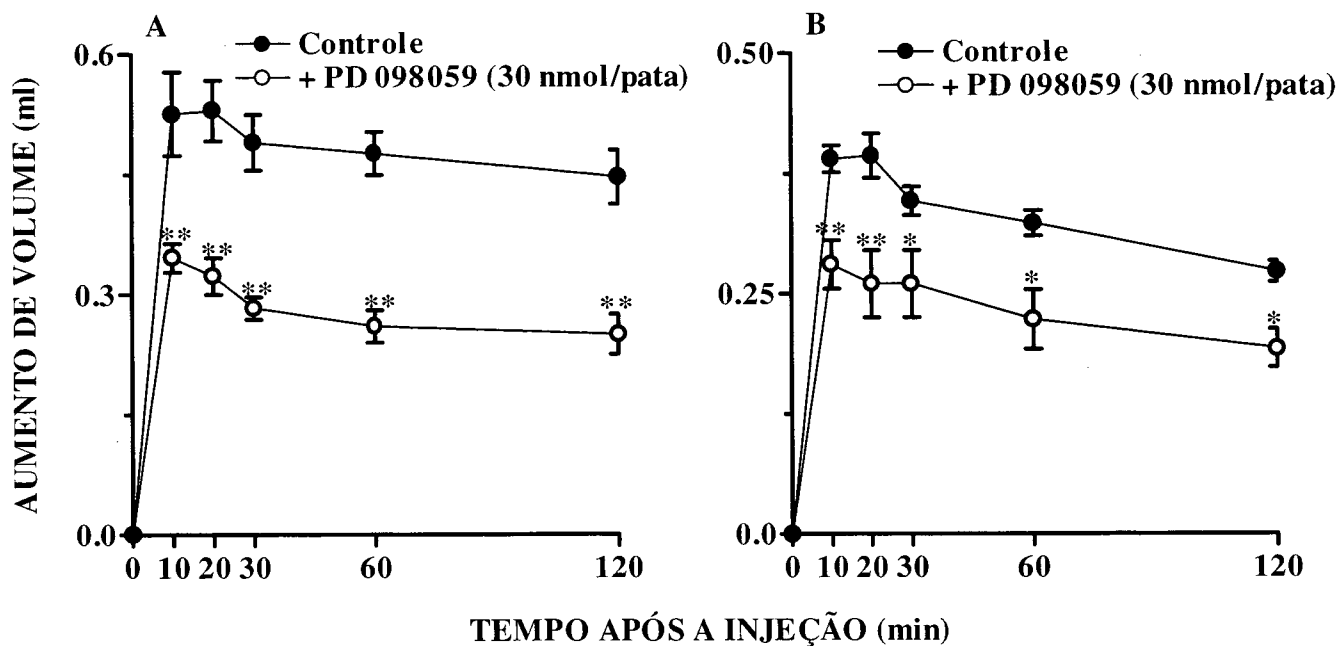


Figura 14 – Efeito da co-injeção do inibidor da MAP-quinase, PD98059, sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

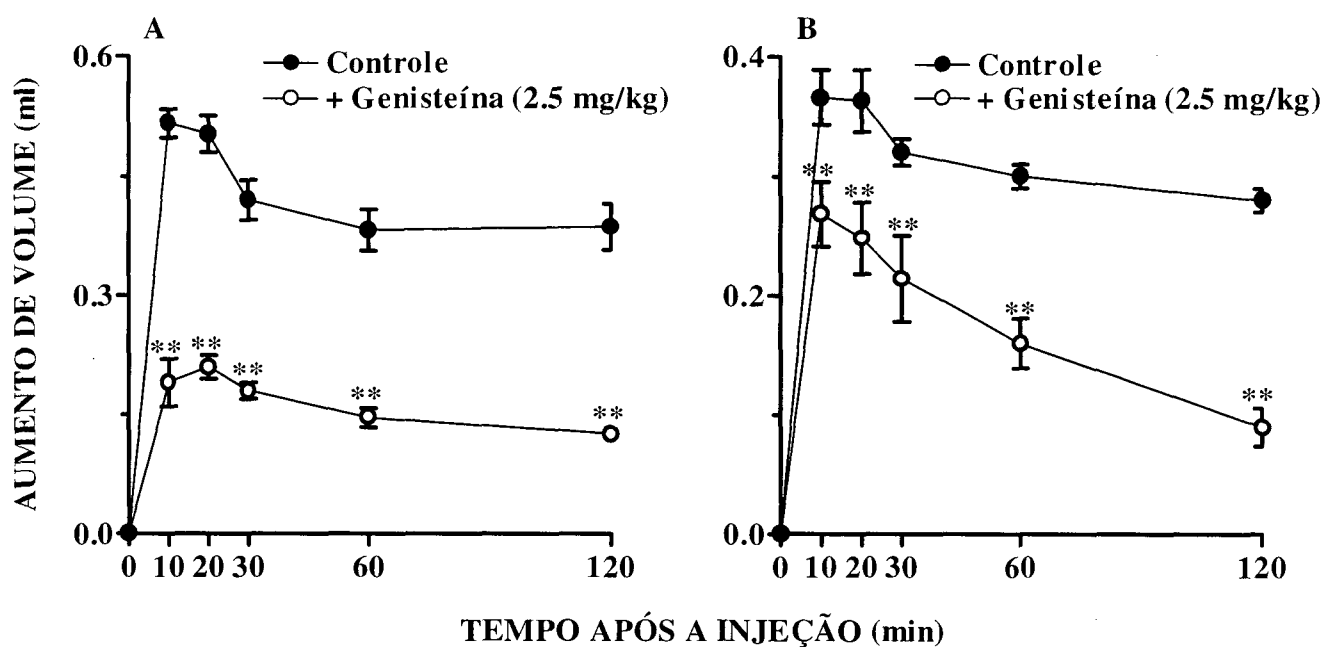


Figura 15 – Efeito do tratamento sistêmico com o inibidor da tirosinaquinase, genisteína (2,5 mg/kg, s.c., 30 min), sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

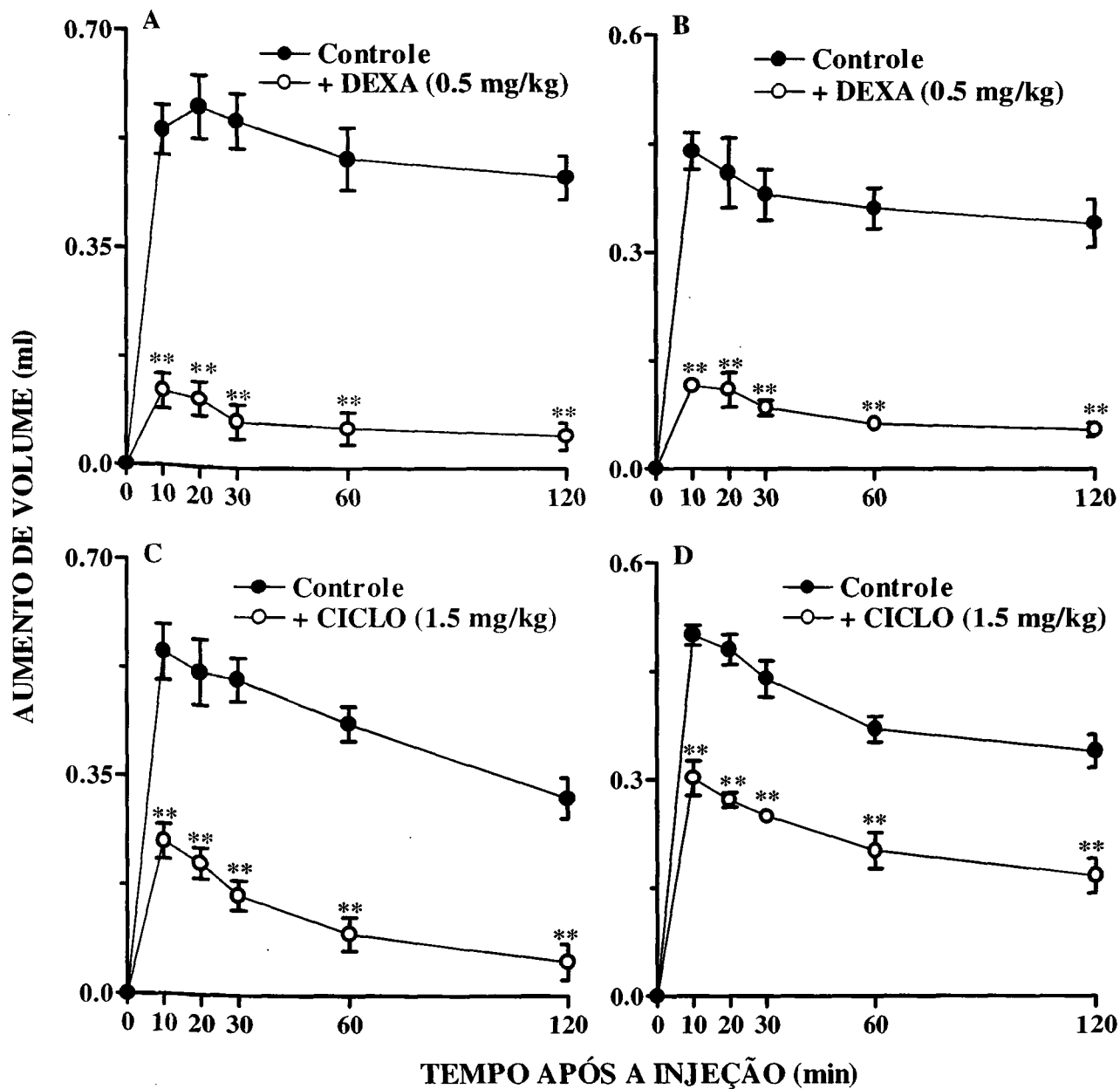


Figura 16 – Efeito do tratamento sistêmico com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4h) ou cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c., 6h) sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

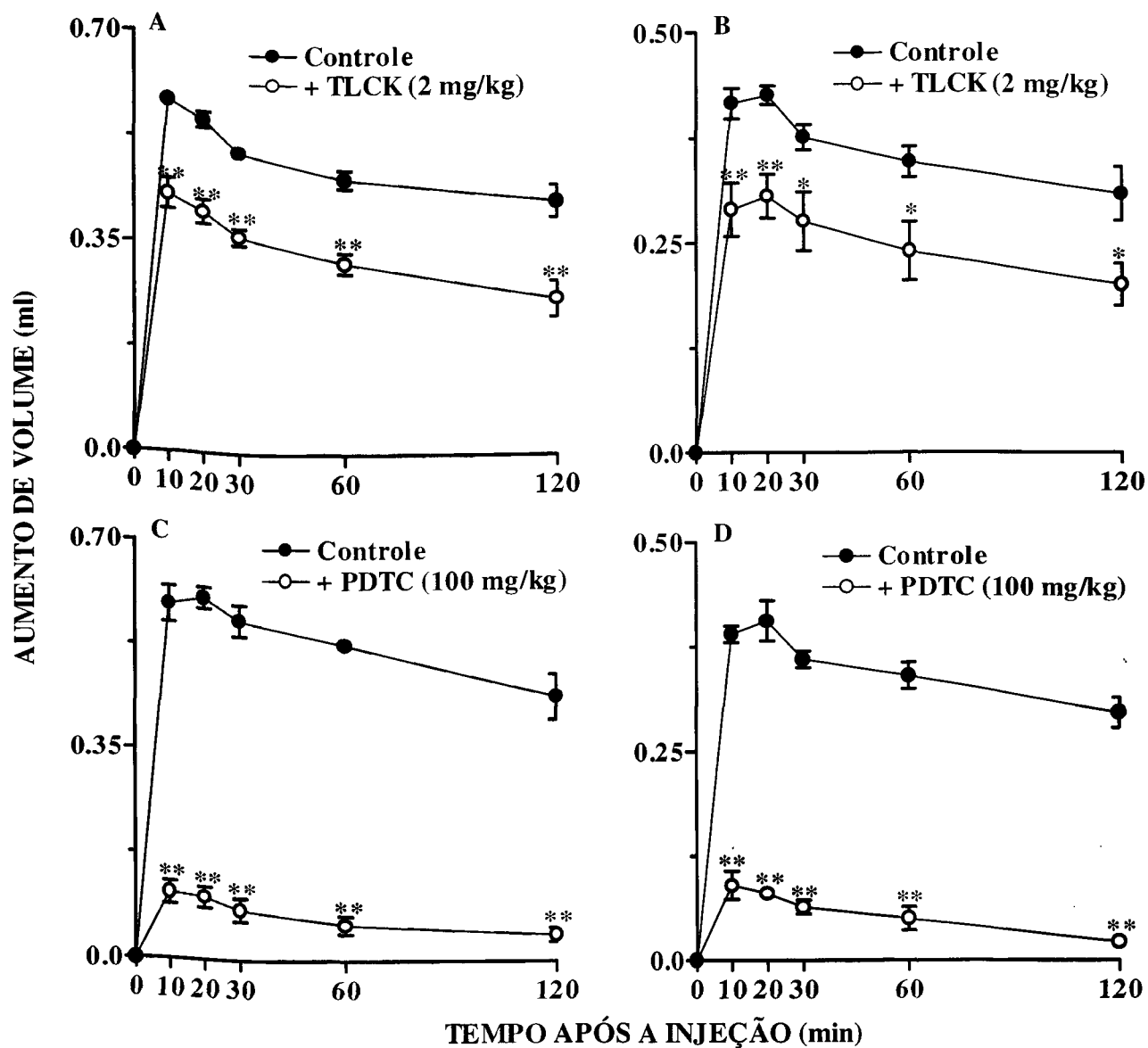


Figura 17 – Efeito do tratamento sistêmico com os inibidores do fator nuclear NF- κ B, TLCK (2 mg/kg, i.p., 30 min) ou PDTC (100 mg/kg, i.p., 30 min) sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min; A e C) ou TNF α (5 ng/pata, 30 min; B e D). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

Tabela 1

Efeito do tratamento com várias classes de drogas sobre o edema de pata causado pela BK (3 nmol/pata)

	Edema de pata (ml) ^a
Controle (BK 3 nmol/pata)	0.40 ± 0.02
+ Estaurosporina (10 nmol/pata)	0.28 ± 0.04**
+ RO 318220 (30 nmol/pata ¹)	0.38 ± 0.04
+ PD 098059 (10 nmol/pata)	0.40 ± 0.03
+ Genisteína (2.5 mg/kg, s.c., 30 min)	0.44 ± 0.03
+ TLCK (2 mg/kg, i.p., 30 min)	0.37 ± 0.02
+ PDTC (100 mg/kg, i.p., 30 min)	0.30 ± 0.02**

Cada grupo representa a média ± e.p.m de 4 a 6 experimentos. ^aEdema de pata medido 20 min após a injeção de BK. Difere significativamente do controle **P<0.01

5. Medida dos níveis de IL-1 β e TNF α após o tratamento com IL-1 β na pata de rato

Os resultados da Figura 18 indicam que o tratamento com IL-1 β (5 ng/pata, 30 min) foi capaz de induzir um aumento marcante dos níveis de IL-1 β e TNF α no tecido subcutâneo da pata de rato. Os níveis de IL-1 β e TNF α observados foram: 57 ± 5 e 8 ± 2 pg/mg de tecido nos animais pré-tratados com IL-1 β ; e 20 ± 3 e $0,3 \pm 0,06$ nos animais controle, respectivamente.

6. Efeito da injeção intraplantar de IL-1 β sobre a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B na pata de rato

O ensaio de deslocamento em gel (EMSA) demonstrou que a injeção intraplantar de IL-1 β (5 ng/pata, 30 min) foi capaz de induzir ativação expressiva do fator nuclear NF- κ B na pata de rato (Figura 19A). Esses resultados também mostram que o tratamento dos animais com dexametasona ou com PDTC (nas mesmas doses em que inibiram o aumento do edema causado pela des-Arg⁹-BK) aboliu completamente a ativação do NF- κ B induzida pela IL-1 β na pata de rato (Figura 19B).

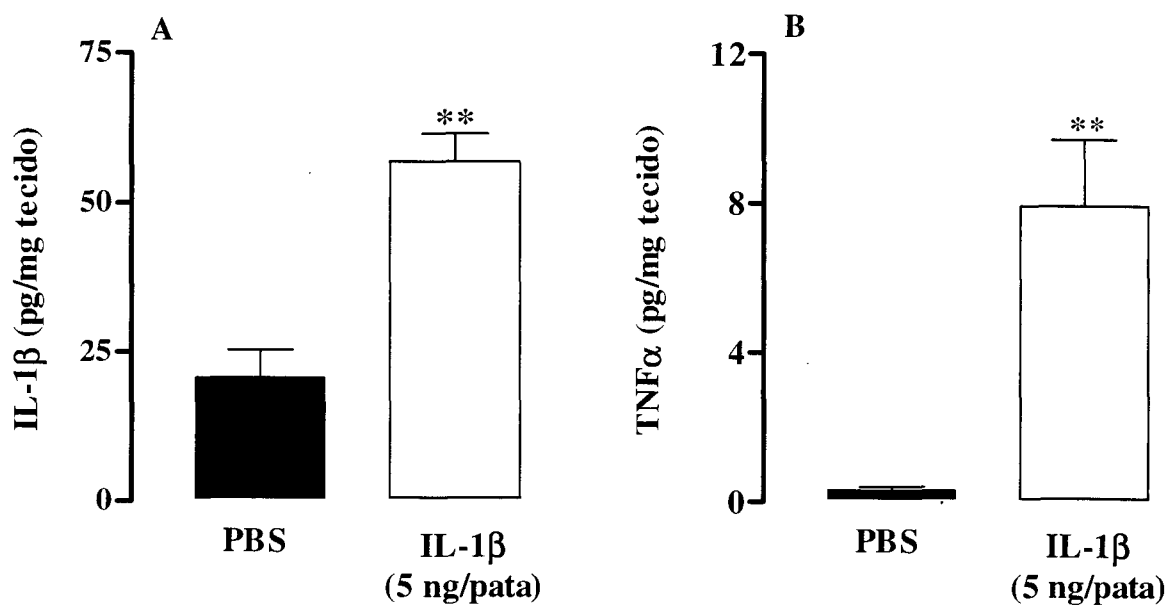


Figura 18 – Aumento dos níveis de IL-1 β (A) e TNF α (B) induzido pela IL-1 β (5 ng/pata, 30 min) na pata de rato. Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

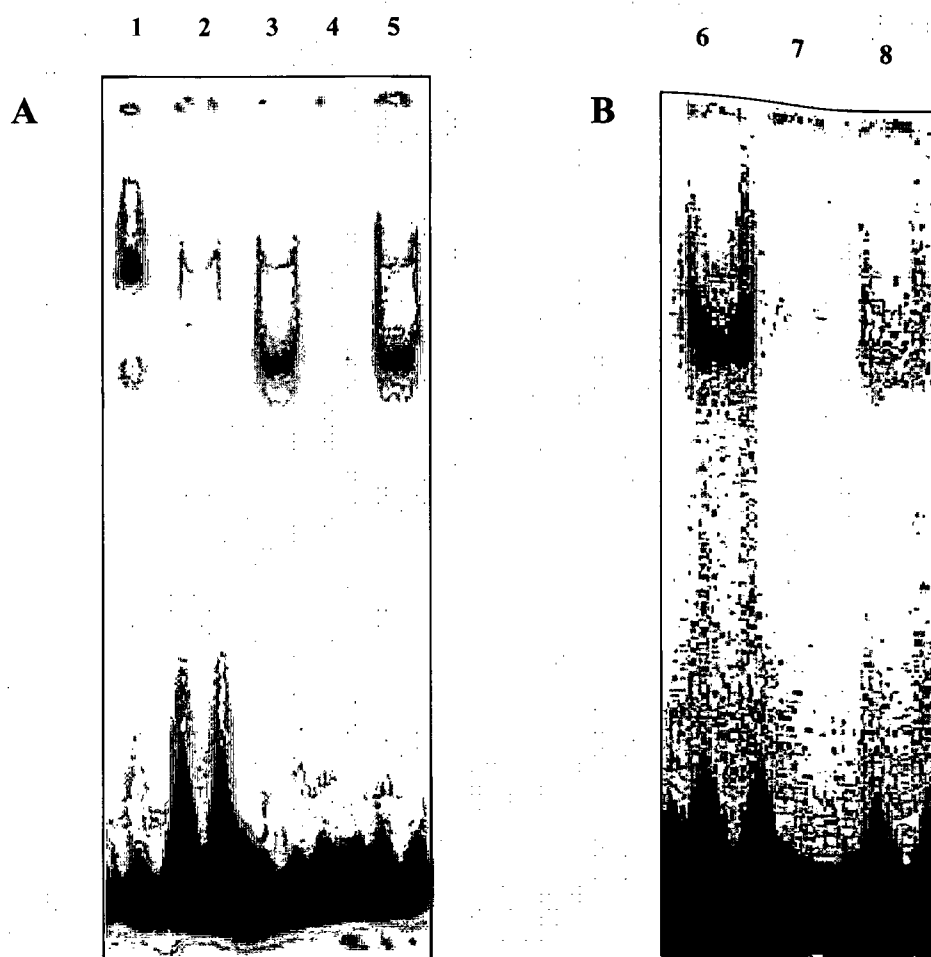


Figura 19 – Ativação do fator nuclear NF- κ B induzida pela IL-1 β (5 ng/pata, 30 min) na pata de rato (A). Efeito do tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) ou PDTC (100 mg/kg, i.p., 30 min) (B). 1. Células Hela; 2. PBS; 3. IL-1 β 5 ng/pata; 4. competição específica; 5. competição inespecífica; 6. IL-1 β 5 ng/pata; 7. dexametasona; 8. PDTC.

7. Influência da migração de neutrófilos sobre o aumento das respostas mediadas pelos receptores B₁ após o tratamento com IL-1 β

Os resultados da Figura 20 mostram que a injeção intraplantar de IL-1 β (1 e 5 ng/pata, 60 min) produziu migração intensa de neutrófilos, como indicado pelo aumento de 5 a 10 vezes na atividade da MPO, respectivamente. A injeção do agonista seletivo dos receptores B₁, a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata), não foi capaz de induzir aumento adicional da atividade da MPO em animais controle. Por outro lado, a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) foi capaz de potencializar (em 38 ± 4 %) o aumento da atividade da MPO induzida pela injeção intraplantar de baixas doses de IL-1 β (1 ng/pata, 60 min). Este aumento foi inibido de forma significativa, quando os animais receberam o antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (100 nmol/pata) em conjunto com a des-Arg⁹-BK. Neste grupo experimental, a percentagem de inibição obtida foi de 33 ± 6 %. Ao contrário do que foi observado em relação à injeção de IL-1 β (1 ng/pata, 60 min), a des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata, 20 min) não produziu qualquer aumento adicional da atividade da MPO, quando aplicada em animais que receberam IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) (resultados não apresentados).

A co-injeção do antagonista de PAF, WEB 2086 (15 μ g/pata), inibiu de forma significativa (37 ± 5 %) o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos que receberam IL-1 β (Figura 21A). Por outro lado, a co-injeção do

antagonista seletivo do receptor para o LTB_4 , CP 105696 (30 $\mu\text{g/pata}$, na dose em que esse composto foi capaz de inibir significativamente o edema causado pelo ácido araquidônico, $76 \pm 12 \%$), não produziu inibição significativa do aumento de volume induzido pela $\text{des-Arg}^9\text{-BK}$ (Figura 21B). O edema de pata causado pela $\text{des-Arg}^9\text{-BK}$, em ratos pré-tratados com $\text{IL-1}\beta$, foi ainda bloqueado pelo tratamento sistêmico com o inibidor de selectinas, fucoidina (10 mg/kg, i.v, 15 min) ($43 \pm 4 \%$), ou pelo anticorpo anti-CD18 ($44 \pm 4 \%$) (Figura 22).

Os resultados também demonstram que o tratamento prévio dos animais com o inibidor de selectinas, fucoidina (10 mg/kg, i.v.), 15 min antes, foi capaz de inibir de forma significativa ($49 \pm 5 \%$) o aumento do RNAm para o receptor B_1 , induzido pela injeção intraplantar de $\text{IL-1}\beta$ (5 ng/pata, 60 min) (Figura 23).

Finalmente, os resultados do presente trabalho mostram que o aumento da atividade da MPO causado pela injeção de $\text{IL-1}\beta$, foi significativamente inibido pelo tratamento com WEB 2086 ($46 \pm 9 \%$), fucoidina ($68 \pm 5 \%$) ou anti-CD18 ($84 \pm 3 \%$), mas não pelo tratamento com CP105696 (Figura 24). A redução do influxo de neutrófilos mediado pela $\text{IL-1}\beta$ foi proporcional à inibição observada sobre a resposta edematogênica causada pela $\text{des-Arg}^9\text{-BK}$, quando foram utilizados estes mesmos inibidores.

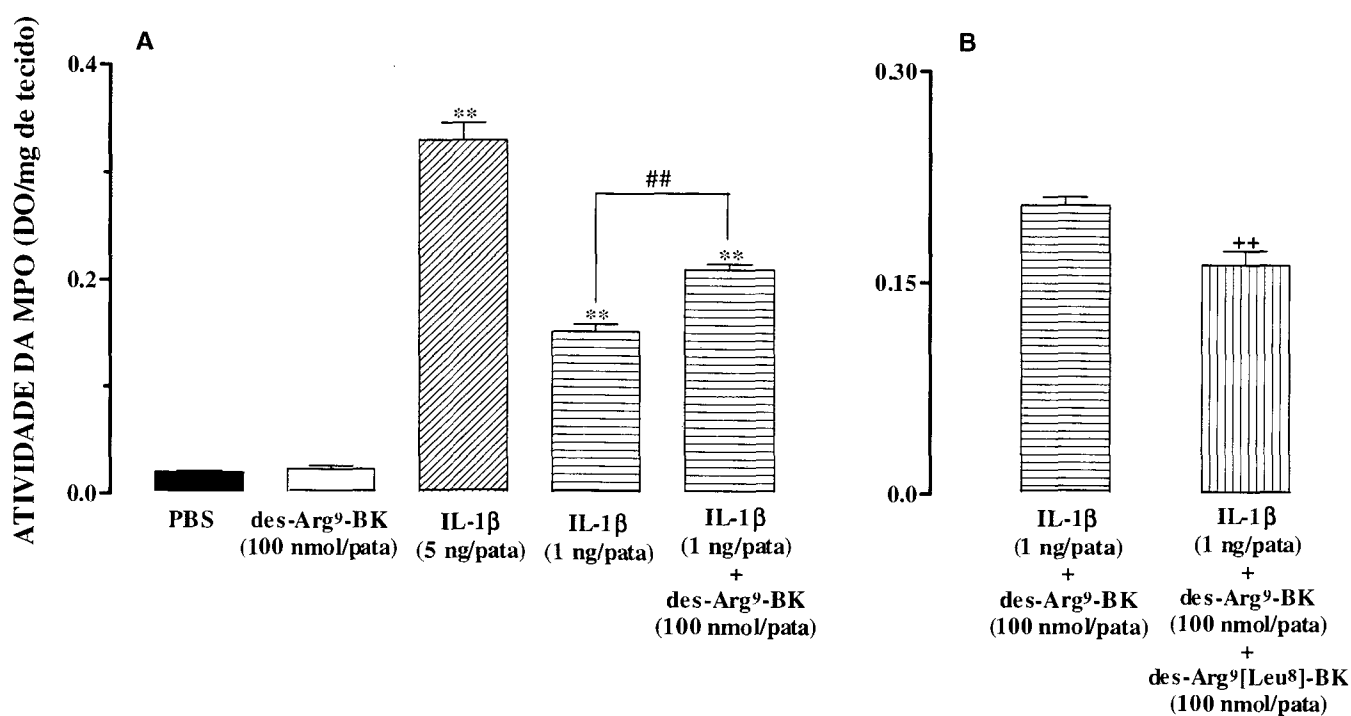


Figura 20 – (A) Efeito da injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata, 20 min), ou de IL-1 β (1 -5 ng/pata, 60 min) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata de rato. (B) Efeito da co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁ des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK sobre a atividade da MPO. Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os e.p.m. Difere significativamente do controle PBS^{**}, IL-1 β (1 ng/pata)^{##} ou IL-1 β (1 ng/pata) + des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata)⁺⁺ (P<0,01).

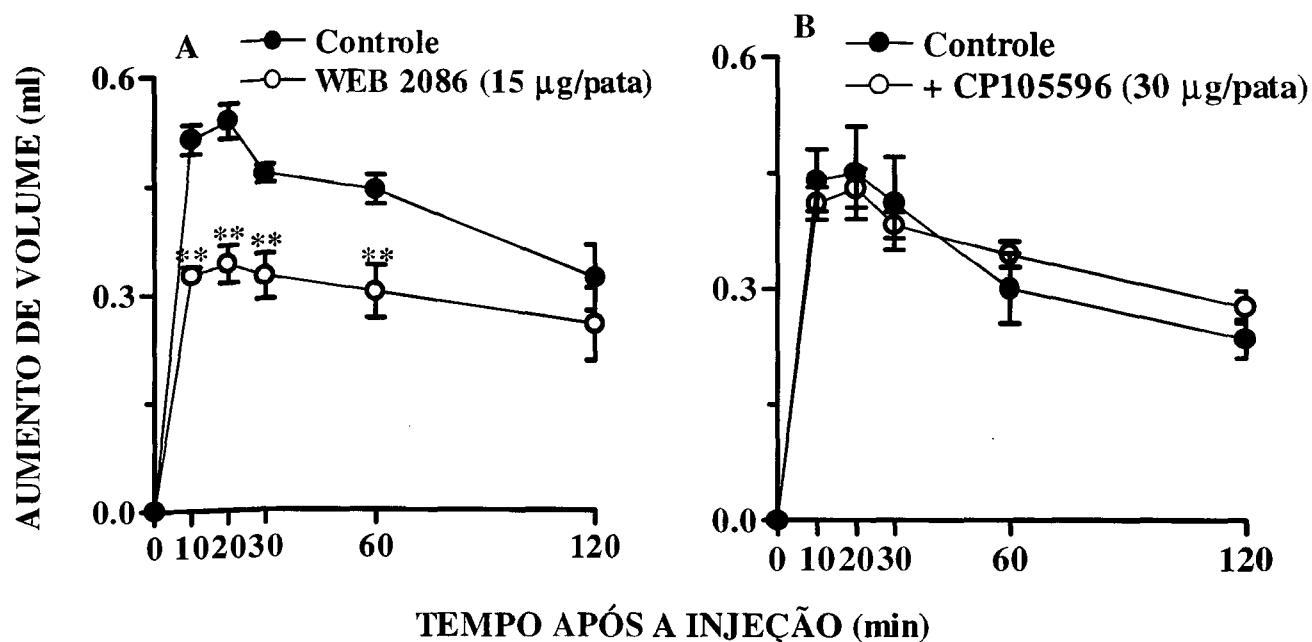


Figura 21 – Efeito da co-injeção do antagonista de PAF, WEB 2086, ou do antagonista de receptores LTB_4 , CP 105696, sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

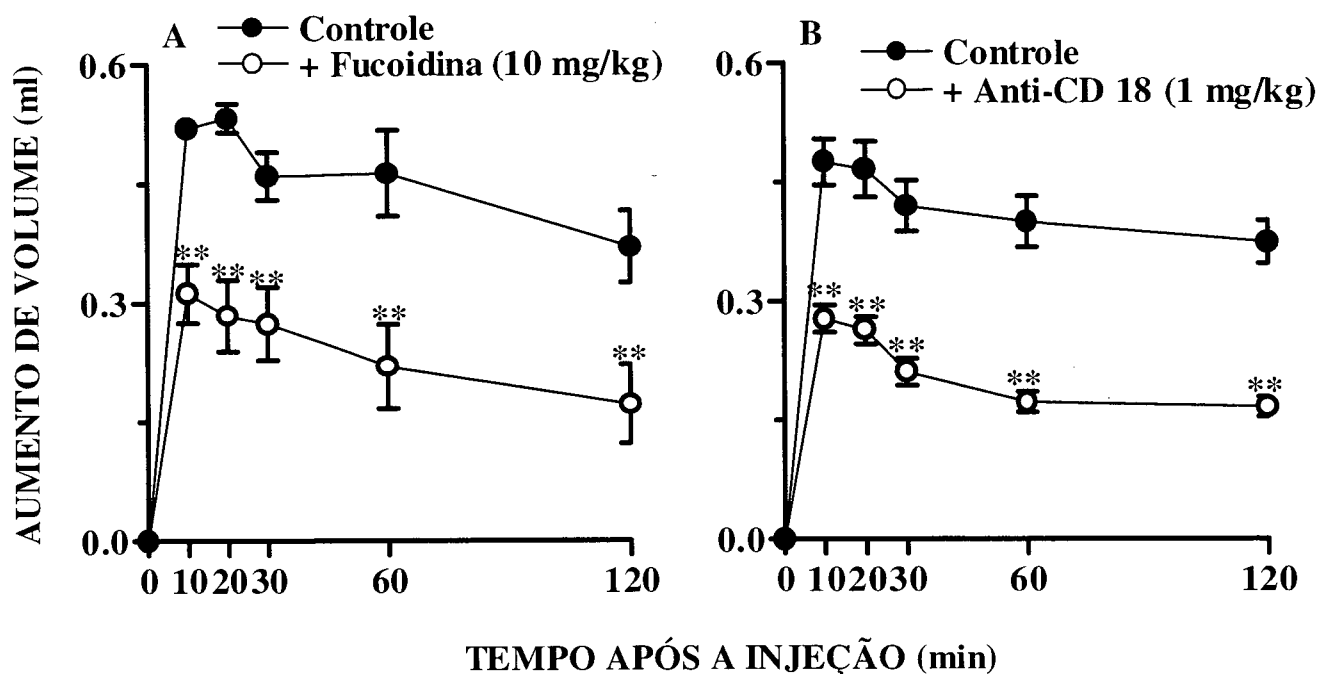


Figura 22 – Efeito do tratamento sistêmico com o inibidor de selectinas, fucoidina (10 mg/kg, e.v., 15 min), ou do anticorpo anti-CD-18 (1 mg/kg, e.v., 15 min) sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (100 nmol/pata) em animais pré-tratados com IL-1 β (5 ng/pata, 60 min). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais os e.p.m. **P<0,01.

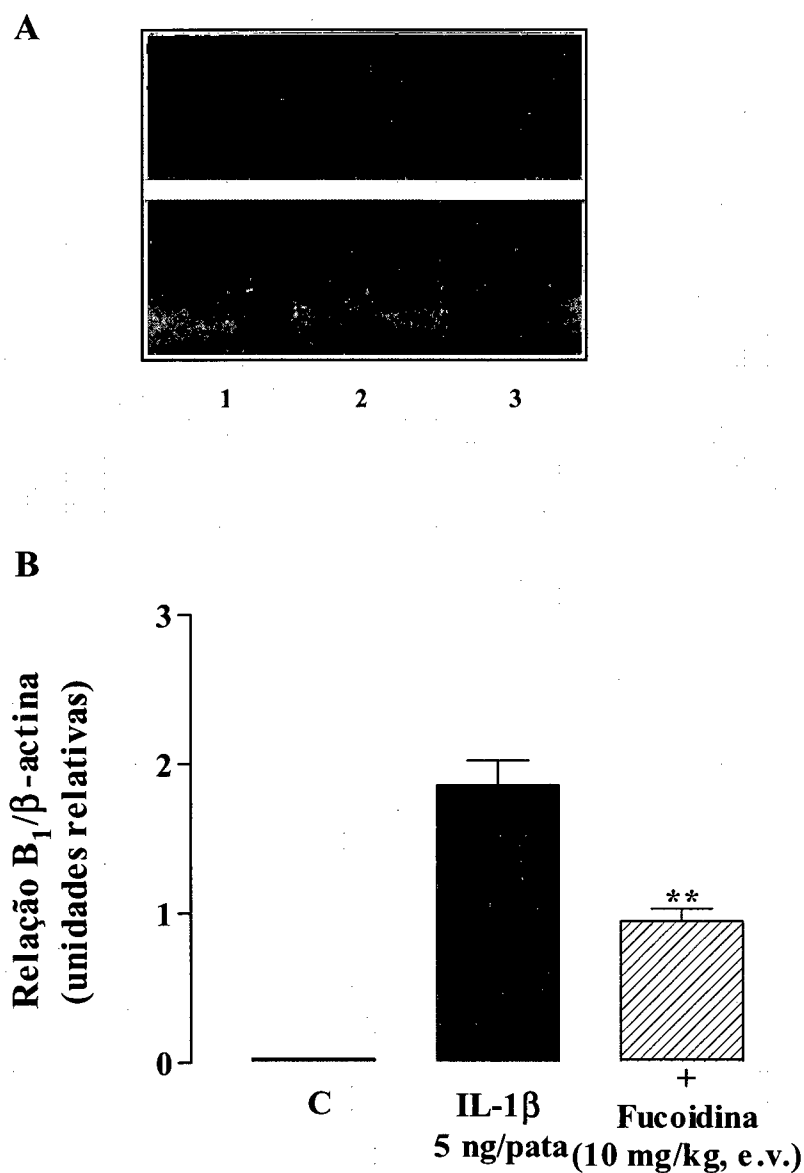


Figura 23 – (A) Efeito do tratamento com fucoïdina (10 mg/kg, e.v.) sobre o aumento dos níveis do RNAm para o receptor B_1 induzido pela IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) na pata de rato. 1. PBS; 2. IL-1 β (5 ng/pata); 3. Fucoïdina . (B) Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para o receptor B_1 ; os valores representam a relao entre o sinal de β -actina e o sinal para o receptor B_1 . Cada coluna representa a média de 4 experimentos e as barras verticais os e.p.m. ** $P < 0.01$.

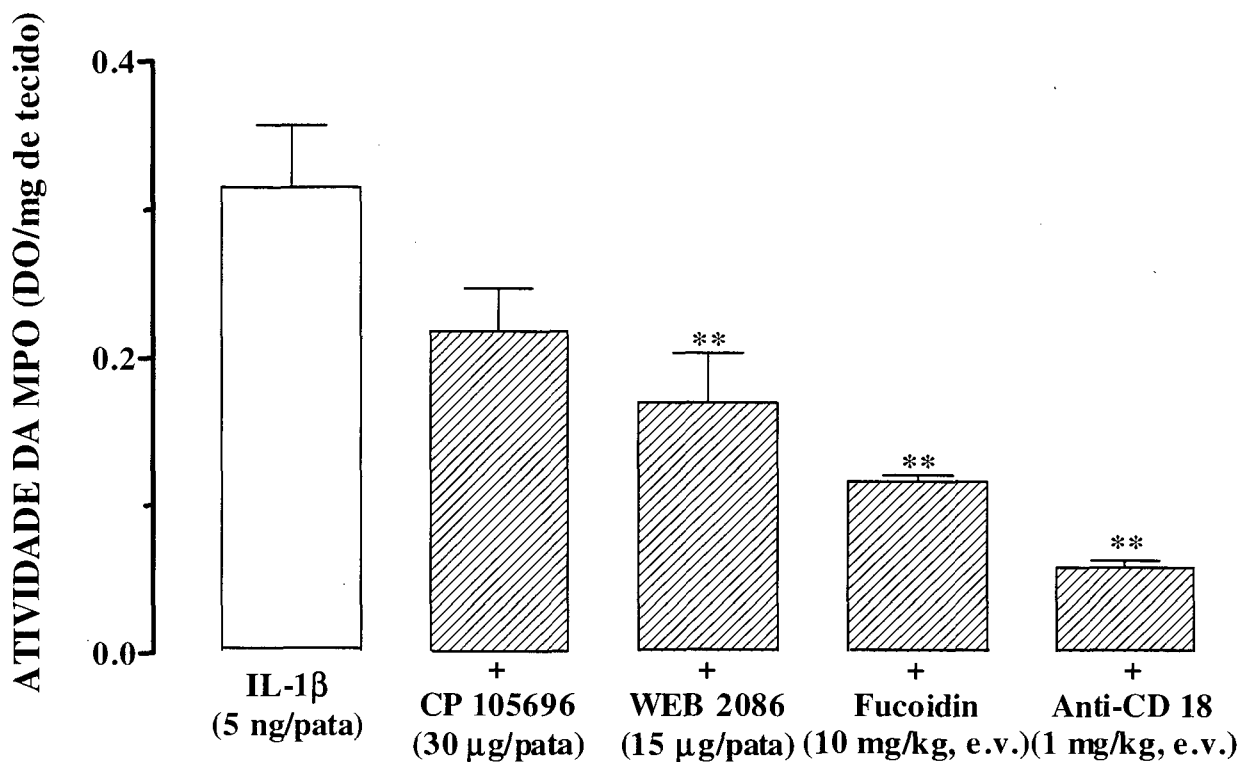


Figura 24 – Efeito do tratamento com vários inibidores da migração celular sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzida pela IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) na pata de rato. Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as barras verticais os e.p.m. *P<0,05; **P<0,01.

DISCUSSÃO

Desde sua descoberta, várias evidências têm sugerido que a BK e as demais cininas são importantes mediadores do processo inflamatório, sendo rapidamente produzidas após danos teciduais ou estímulos estressores (Blais et al., 2000). Estas evidências são principalmente baseadas em estudos utilizando agonistas e antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂, que indicam o envolvimento do sistema de cininas durante alterações inflamatórias de caráter agudo ou crônico. Sua participação tem sido implicada na gênese da artrite reumatóide, da pancreatite, em desordens do trato urinário e respiratório, além de participarem dos eventos relacionados com a rinite e a alergia (Steranka et al., 1988; Hall e Morton, 1997; Calixto et al., 2000). Assim, as cininas podem evocar vários sinais inflamatórios diretos, incluindo o aumento da permeabilidade vascular, vasodilação arteriolar, formação de edema, migração de células, dor e hiperalgesia (Hall e Morton, 1997; Calixto et al., 2000). As ações das cininas estão ainda relacionadas com a inflamação neurogênica, através da estimulação de fibras aferentes sensoriais e da liberação de neuropeptídeos como a substância P e o CGRP (Geppetti, 1993; Campos e Calixto, 2000). Os efeitos pró-inflamatórios das cininas podem compreender, ainda, mecanismos independentes da interação com receptores, provavelmente através da liberação de histamina e serotonina, a partir da degranulação de mastócitos (Hall e Morton, 1997; Pinheiro et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que as cininas podem induzir a

liberação de citocinas e prostanóides (Burch e Tiffany, 1989; Tiffany e Burch, 1989; Ferreira et al., 1993), um efeito que pode ser potencializado pela IL-1 β em fibroblastos sinoviais e gengivais humanos (Bathon et al., 1992; Nakao et al., 2001), ou pela IL-1 β e pelo TNF α em fibroblastos 3T3 (Burch et al., 1988; 1989a;b). A IL-1 β é capaz, também, de potencializar outras respostas das citocinas, incluindo a mobilização de cálcio e a hidrólise de fosfatidilinositóis em células da musculatura lisa traqueal de cães (Yang et al., 2001). Assim, tem sido sugerida a ocorrência de uma interação sinérgica entre as citocinas e citocinas, particularmente através da ativação de receptores B₁, na vigência de estímulos pró-inflamatórios.

Os receptores B₁ não são expressos normalmente, mas sua indução pode ser observada em diversas situações de estresse, incluindo o choque séptico e os processos inflamatórios. A indução dos receptores B₁ tem sido descrita em várias preparações de musculatura lisa, em resposta ao dano tecidual produzido pela incubação *in vitro*, ou ainda pela adição de várias substâncias, como citocinas e produtos bacterianos (Marceau et al., 1998; Sardi et al., 2000). O LPS é um polímero de bactérias gram-negativas, capaz de ativar vários sistemas efetores e modular a expressão gênica em diversos tipos celulares, sendo um potente indutor da síntese de citocinas em leucócitos e em outras células da resposta imune (Libby et al., 1986). Tem sido largamente demonstrado que o tratamento com LPS é capaz de induzir um aumento marcante das respostas mediadas pelos receptores B₁ em tecidos

vasculares de coelhos. O LPS também apresenta um efeito semelhante sobre os receptores B₁, quando avaliado em vários modelos *in vivo* (Marceau, 1995; 1997). Além disso, a maior parte dos efeitos produzidos pelo LPS pode ser mimetizada por citocinas pró-inflamatórias, particularmente pela IL-1 β (DeBlois et al., 1991; Marceau, 1995). Estudos recentes destacam, ainda, que as citocinas pró-inflamatórias são capazes de regular a expressão dos receptores cininérgicos, em especial dos receptores B₁, através de mecanismos complexos de sinalização, envolvendo a ativação de quinases específicas e fatores transcricionais (Larrivéé et al., 1998; Phagoo et al., 2000; Calixto et al., 2000). Deste modo, o processo de indução dos receptores B₁ parece envolver mecanismos complexos de regulação, dependentes da produção de citocinas pró-inflamatórias (para maiores detalhes, ver Quadro 1).

Estudos anteriores mostraram que a dessensibilização induzida por injeções repetidas de BK ou tirosina⁸-BK (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1995), o tratamento sistêmico dos animais com LPS (Campos et al., 1996) ou com BCG (Campos et al., 1997), a remoção cirúrgica das glândulas adrenais (Cabrini et al., 2001), ou ainda, a indução de diabetes do tipo I por estreptozotocina (Campos et al., 2001) são estímulos capazes de produzir um aumento expressivo das respostas edematogênicas, mediadas pelos agonistas dos receptores B₁ na pata de rato. Na maior parte destes modelos, a indução funcional dos receptores B₁ é significativamente inibida

pelo tratamento prévio com o glicocorticóide dexametasona, ou ainda pelo inibidor de síntese protéica, cicloheximida. Assim, é possível sugerir que o aumento do edema de pata causado por agonistas seletivos dos receptores B_1 esteja relacionado com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. De fato, os resultados descritos no presente estudo, demonstram que da mesma forma que outros estímulos, a injeção intraplantar de IL-1 β ou de TNF α é capaz de produzir um aumento marcante das respostas edematogênicas causadas pela injeção de des-Arg⁹-BK ou de des-Arg¹⁰-calidina. Além disso, os dados apresentados também demonstram, que o aumento dos receptores B_1 induzido por estas duas citocinas, é um fenômeno bastante rápido e tempo-dependente. Estas conclusões são sustentadas tanto por evidências funcionais, que indicam um aumento tempo-resposta do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK, quanto por evidências moleculares, que demonstram a expressão rápida dos receptores B_1 (máxima em 60 min), após a injeção de IL-1 β na pata de rato.

O aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 foi proporcional às doses de IL-1 β e TNF α utilizadas. Estes resultados confirmam a idéia de que a produção de citocinas pró-inflamatórias está diretamente relacionada com a expressão dos receptores B_1 (ver, para revisão: Marceau et al., 1998). Desta forma, a liberação de citocinas a partir de grupos celulares específicos (como macrófagos e células endoteliais), após inflamação ou trauma tecidual,

poderia ser responsável pelo aumento da expressão de receptores B_1 , promovendo, assim, a manutenção do processo inflamatório. Os efeitos da IL- 1β e do TNF α também parecem envolver alterações sistêmicas, uma vez que a injeção destas citocinas produziu aumento (embora de menor intensidade) da resposta edematogênica causada pela des-Arg⁹-BK, quando injetada na pata contralateral.

Ao contrário do que foi observado para a IL- 1β e para o TNF α , a injeção intraplantar de IL-6 não foi capaz de induzir aumento das respostas relacionadas aos receptores B_1 para as cininas. Esses dados podem indicar a existência de mecanismos de sinalização intracelulares ou respostas temporais distintas para estas citocinas. Dados da literatura demonstram que a injeção de IL-6 é capaz de produzir um aumento marcante da resposta hiperalgésica causada por agonistas dos receptores B_1 na pata de rato (Davis et al., 1994). A razão destas diferenças pode estar relacionada com os parâmetros avaliados em cada modelo. É possível que as respostas dolorosas e inflamatórias que envolvem a ativação dos receptores B_1 sejam reguladas por vias distintas. Ademais, várias evidências têm demonstrado papéis paradoxais para a IL-6. Em alguns modelos, esta citocina pode apresentar efeitos pró-inflamatórios (Ferreira et al., 1993), enquanto em outros, pode estar relacionada com a inibição de vários componentes da resposta inflamatória (Schindler et al., 1990; Fröde et al., 2001).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a IL-1 β exerce um papel fundamental no processo de indução dos receptores B₁. Assim, a indução da expressão, associada com o aumento funcional dos receptores B₁ após o tratamento com IL-1 β , tem sido demonstrada na cultura de macrófagos alveolares de camundongo (Tsukagoshi et al., 1999), durante o choque endotoxêmico em ratos (McLean et al., 1999), no leito mesentérico de camundongos (McLean et al., 2000b) ou, ainda, em vários tecidos de ratos adrenalectomizados (Cabrini et al., 2001). Nossos resultados estendem estas evidências, e indicam que a injeção intraplantar de IL-1 β é capaz de produzir um aumento expressivo da resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁, acompanhado de um aumento dos níveis de RNAm deste receptor na pata de rato. Os resultados funcionais apresentam algumas diferenças relevantes quando comparados aos dados de expressão do receptor: as respostas funcionais já são observadas depois de 15 min da injeção de IL-1 β , enquanto que o sinal para o receptor B₁ foi observado apenas em 30 min. Estas diferenças podem estar relacionadas com a ausência do agonista seletivo dos receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, nos experimentos de expressão do receptor. Talvez, parte do aumento das respostas funcionais seja decorrente de um efeito sinérgico (envolvendo mecanismos pós-traducionais), entre a IL-1 β e a des-Arg⁹-BK. Além disso, outros mecanismos, incluindo a autoregulação dos receptores B₁ (Schanstra et al., 1998; Phagoo et al., 2001), podem estar

envolvidos com essas respostas, mas experimentos adicionais seriam necessários para esclarecer tais pontos.

Os efeitos do TNF α sobre a indução dos receptores B₁, não foram ainda tão estudados quanto aqueles produzidos pela IL-1 β . Uma vez que estas duas citocinas possuem papéis relacionados, e parecem ser produzidas pelos mesmos estímulos, é possível inferir que o TNF α seja capaz de modular a expressão dos receptores B₁, nos mesmos sistemas que a IL-1 β . De fato, os resultados do presente estudo demonstram que a injeção intraplantar de TNF α produziu um aumento expressivo da resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁. Desta forma, os resultados sugerem que, embora com menor intensidade do que a IL-1 β , o TNF α também é capaz de modular a indução dos receptores B₁, pelo menos no modelo do edema de pata de rato. Estes resultados contrastam com evidências *in vitro*, que indicam que a incubação de TNF α recombinante humano não causa indução dos receptores B₁ na aorta de coelho (DeBlois et al., 1988). Outros resultados *in vivo* também mostram que o TNF α , ao contrário da IL- β , não produz aumento das respostas hiperalgênicas causadas por agonistas B₁ na pata de rato (Davis e Perkins, 1994; Davis et al., 1994). Por outro lado, os resultados do presente estudo são reforçados por dados recentes, que indicam que o TNF α é capaz de induzir a expressão dos receptores B₁, quando testado em células de musculatura lisa vascular (Ni et al., 1998a) ou em fibroblastos de pulmão humano (Phagoo et

al., 1997; 2000). Além disso, confirmam outras evidências *in vitro*, que sugerem que o TNF α e a IL-1 β induzem aumento rápido (máximo em 2 h) da expressão do RNAm para o receptor B₁ em células embrionárias de pulmão humano (Haddad et al., 2000).

Ao contrário do que foi observado em relação aos receptores B₁, a resposta edematogênica causada pela injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B₂, a tirosina⁸-BK, não foi alterada pelo tratamento prévio com IL-1 β ou com TNF α . Estes resultados estão de acordo com as evidências que demonstram que o aumento do edema de pata mediado pelos receptores B₁, em ratos tratados com BCG ou em animais adrenalectomizados 7 dias antes (Cabrini et al., 2001), não está relacionado com alterações das respostas que envolvem a ativação dos receptores B₂ (Campos et al. 1997). No entanto, existem diversas evidências que sugerem que o aumento dos receptores B₁ pode ser dependente de uma redução dos receptores B₂. Em trabalhos anteriores (Campos e Calixto, 1995, Campos et al., 1995; 1996; 2001), foi demonstrado que o aumento da resposta edematogênica causada por agonistas seletivos do receptor B₁ estava associado a uma redução do edema induzido por agonistas B₂, quando o edema foi avaliado após a dessensibilização dos receptores B₂ (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1995), depois do tratamento sub-agudo com LPS (Campos et al., 1996), ou após a indução de diabetes através do tratamento com estreptozotocina (Campos et al., 2001). De fato, evidências recentes (Phagoo et al., 1999; 2000) destacam a

ocorrência de um balanço entre as populações de receptores B_1 e B_2 , coordenada pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Os receptores B_2 seriam responsáveis por iniciar os eventos relacionados com o processo inflamatório, enquanto que a indução e a ativação dos receptores B_1 permitiriam a perpetuação da resposta inflamatória. Estas sugestões estão baseadas em resultados que demonstram que a estimulação dos receptores B_2 pode ativar vias de transdução de sinal envolvidas no processo de indução dos receptores B_1 (McLean et al., 2000a). Assim, a ativação dos receptores B_2 pode resultar na fosforilação de algumas classes de quinases, incluindo a tirosina-quinase, MAP-quinase, proteína ribossomal S6 quinase ou fosfatidilinositol-3-quinase (Pyne et al., 1997; Pan et al., 1999; Ritchie et al., 1999). Também tem sido demonstrado que a estimulação dos receptores B_2 pode resultar no aumento da produção de citocinas (como a IL-6 e a IL-8) em fibroblastos de gengiva ou de pulmão humano (Hayashi et al., 1998; Modéer et al., 1998). Da mesma forma, foi demonstrado que a BK (via receptores B_2) é capaz de induzir a ativação do fator de transcrição NF- κ B ou de induzir a expressão do gene da IL-1 β em células epiteliais humanas (Pan et al., 1999). É importante salientar que não há evidências definitivas que indiquem que a IL-1 β possa ser responsável pela redução dos receptores B_2 durante o processo inflamatório (Phagoo et al., 1999). Tem sido demonstrado que a IL-1 β pode regular a expressão dos receptores B_2 *in vitro*, mas as alterações

observadas são pequenas e, geralmente, associadas com o aumento destes receptores (Schmidlin et al., 1998). Em relação aos resultados do presente estudo, é possível que o tempo de tratamento, bem como as doses utilizadas para as citocinas IL-1 β e TNF α , não tenham sido suficientes para produzir alterações das respostas edematogênicas que envolvem a ativação dos receptores B₂. Desta forma, outros estudos, conduzidos com protocolos de tratamento distintos, seriam necessários para esclarecer a modulação destas respostas, no modelo de edema de pata, em ratos pré-tratados com citocinas pró-inflamatórias.

A formação de edema causada pela injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, em ratos pré-tratados com IL-1 β ou com TNF α , foi inibida de forma dose-dependente pela co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-NPC 17731, mas não pelo antagonista seletivo dos receptores B₂, Hoe 140. Os resultados obtidos indicam, portanto, que a resposta edematogênica à des-Arg⁹-BK, nos animais pré-tratados com IL-1 β , envolve a ativação dos receptores B₁, mas não dos receptores B₂ para as cininas. Outros resultados semelhantes foram obtidos quando o aumento dos receptores B₁ foi induzido pelo tratamento com LPS ou BCG (Campos et al., 1996; 1997) ou, ainda, após 7 dias da remoção cirúrgica das glândulas adrenais (Cabrini et al., 2001).

Os resultados do presente estudo sugerem que a formação de produtos derivados do ácido araquidônico pode estar implicada no aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 , na pata de ratos pré-tratados com IL- 1β ou com TNF α . De acordo com os dados da literatura, o envolvimento de prostanóides na indução dos receptores B_1 pode ser variável. A indometacina não exerce qualquer efeito sobre o aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 em preparações de aorta de coelho (Levesque et al., 1995), no fundo de estômago de rato (Cabrini et al., 1996) ou na veia umbilical humana (Sardi et al., 1997). Por outro lado, o envolvimento de produtos do ácido araquidônico foi demonstrado na artéria coronária suína (Beny et al., 1987), na veia porta de rato (Campos e Calixto, 1994) ou na artéria renal de cão (Rhaleb et al., 1989). A participação de metabólitos da COX, na resposta à des-Arg⁹-BK, também foi descrita no modelo do edema de pata em ratos tratados com LPS ou com BCG (Campos et al., 1996; Campos et al., 1997). Contudo, é importante salientar que a IL- 1β e o TNF α são capazes de induzir a expressão da COX-2 em vários sistemas celulares (Fiebich et al., 2000; Nakao et al., 2000), através de mecanismos semelhantes àqueles envolvidos na indução dos receptores B_1 . É possível que a injeção destas citocinas na pata de rato seja capaz de induzir a expressão de várias moléculas, incluindo a COX-2. Em conjunto, estes resultados permitem sugerir, que alguns dos efeitos antiinflamatórios observados com inibidores da COX-1 e 2 estejam

relacionados, pelo menos em parte, com a inibição parcial de respostas que envolvem a ativação dos receptores B₁ das cininas.

A resposta imune é regulada por mecanismos complexos, incluindo a produção de diversos componentes. Dentre estes elementos, estão as citocinas com ação antiinflamatória, que funcionam como substâncias reguladoras durante reações inflamatórias intensas e/ou prolongadas (Opal e Depalo, 2000). É possível inferir que a indução *in vivo* dos receptores B₁, através de estímulos que promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, possa ser regulada pela produção secundária de citocinas antiinflamatórias. Os resultados do presente estudo sugerem que a indução funcional dos receptores B₁, após o tratamento dos animais com IL-1 β ou TNF α , parece ser dependente da produção secundária de outras citocinas, uma vez que o edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK foi significativamente reduzido pela associação de anticorpos para citocinas pró-inflamatórias. As evidências funcionais foram ainda reforçadas pelos dados que indicam que a injeção intraplantar de IL-1 β é capaz de produzir um aumento marcante dos níveis de IL-1 β e de TNF α na pata de rato. Estes resultados estão de acordo com outras evidências que mostram que o aumento dos receptores B₁ depende da produção local (autócrina ou parácrina) de várias citocinas (Marceau, 1995; 1997; Marceau et al., 1998; Ahluwalia e Perretti, 1999). A expressão dos receptores B₁, induzida pela IL-8 em fibroblastos de pulmão humano, é expressivamente reduzida pelo anticorpo anti-IL-1 β (Bastian et al., 1998).

Além disso, foi demonstrado que o aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 , após a injeção intra-articular de IL-1, IL-6 e IL-8, em um modelo de hiperalgesia em ratos, é expressivamente inibido pela co-injeção do IRA, o que sugere que parte desse efeito seja mediada pela produção de IL-1 (Davis e Perkins, 1994). O IRA é uma substância de ocorrência natural, que se liga aos receptores IL-1 com a mesma afinidade que a IL-1 β , embora não seja capaz de ativar qualquer sistema de transdução de sinal, funcionando, assim, como um antagonista competitivo destes receptores (Granowitz et al., 1991; Dinarello, 2000b). Os resultados do presente estudo confirmam e estendem estas evidências e mostram que o aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 na pata de rato, após o tratamento com IL-1 β , depende da síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α , IL-8 e a própria IL-1 β . Os dados apresentados também estão de acordo com as indicações que mostram que a IL-10 é capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (especialmente IL-1 β e TNF α) (Firestein e Zavaifler, 1997; Nikolaus et al., 1998; McCafferty et al., 2000), de bloquear a resposta hiperalgésica induzida pela IL-1 β e pelo TNF α na pata de rato (Poole et al., 1995), bem como, de inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B, após a estimulação com LPS (Clarke et al., 1998).

Tem sido sugerido que as ações das citocinas são dependentes da interação com vias de sinalização responsáveis pela estimulação de quinases

específicas (Sridhar et al., 200). Além disso, o processo de indução dos receptores B_1 tem sido relacionado com a ativação de algumas classes de quinases. Desta forma, foi demonstrado que o aumento espontâneo ou induzido por IL- 1β , da expressão dos receptores B_1 na aorta isolada de coelho, é bloqueado pelos inibidores de MAP-quinases, PD 98059 (inibidor de MAP-quinases ativadas por sinais extracelulares, p42/44) ou SB 203590 (inibidor da MAP-quinase p38) (Larrivéé et al., 1998). Os mesmos autores mostraram que anéis de aorta isolada de coelho apresentam altos níveis de atividade para MAP-quinase, sendo que esta atividade pode ser aumentada pela incubação de IL- 1β ou de fatores de crescimento (Larrivéé et al., 1998). De fato, a ativação de MAP-quinases ocorre em resposta a vários estímulos conhecidos por induzir o aumento dos receptores B_1 , incluindo citocinas pró-inflamatórias, danos químicos ou térmicos e produtos bacterianos (Paul et al., 1997). Além disso, as MAP-quinases parecem ser importantes na ativação de vias de sinalização, assim como de fatores de transcrição, responsáveis pela síntese de componentes do processo inflamatório (Larrivéé et al., 1998; Yamakawa et al., 1998). Esta classe de proteínas compreende pelo menos 3 famílias de quinases, ativadas pela dupla fosforilação de resíduos de treonina e tirosina, em resposta a muitos sinais extracelulares (Whitmarsh e Davis, 1996; Rao, 2001). Recentemente, a participação das MAP-quinases p42/44 e p38 foi demonstrada no modelo de indução dos receptores B_1 causada por estresse térmico, em células da musculatura lisa vascular de ratos (Lagneux et

al., 2001). Além disso, tem sido ressaltado que a ativação de algumas MAP-quinases, especialmente a p38, pode ser responsável pela regulação da síntese de citocinas em vários níveis de expressão (Han e Ulevitch, 1999). Os dados do presente estudo confirmam e estendem estas evidências e demonstram que o aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 *in vivo*, após o tratamento dos animais com IL-1 β ou TNF α , foi prevenido pela co-injeção do inibidor seletivo da MAP-quinase p42/44, o PD98059.

A resposta edematogênica causada pelo agonista seletivo dos receptores B_1 , des-Arg⁹-BK, em ratos pré-tratados com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α , parece envolver a ativação da tirosina-quinase. Estas conclusões são baseadas nos resultados que indicam que o edema de pata à des-Arg⁹-BK, foi significativamente bloqueado pelo tratamento com o inibidor da tirosina-quinase, a genisteína. Estes resultados, estão em conformidade com outras evidências da literatura, que apontam o envolvimento da tirosina-quinase no processo de indução dos receptores B_1 *in vitro*. Foi demonstrado que a incubação de genisteína foi capaz de prevenir o aumento tempo-dependente da resposta contrátil produzida pela des-Arg⁹-BK, em preparações de aorta de coelho (Larrivéé et al., 1998; Medeiros et al., 2001). Além disso, dados mais recentes (Phagoo et al., 2001) indicam que a incubação de genisteína inibe, de forma marcante, a expressão do receptor B_1 , induzida pela IL-1 β ou pelo próprio agonista B_1 , a des-Arg¹⁰-calidina, em fibroblastos de pulmão humano.

A ativação da PKC está diretamente associada com alterações funcionais e morfológicas de células endoteliais, sendo responsável por alguns efeitos de mediadores da inflamação, tais como, BK e TNF α (Ross e Joyner, 1997). Deste modo, a PKC parece estar envolvida na ativação seqüencial de MAP-quinases após o tratamento com BK (Lal et al., 1998). Os resultados do presente estudo estendem as evidências da literatura e sugerem que a ativação da proteína quinase C está diretamente relacionada com a indução funcional dos receptores B₁, após o tratamento com IL-1 β ou TNF α na pata de rato. Esses resultados confirmam as evidências obtidas *in vitro*, indicando que o tratamento de fibroblastos de pulmão humano, com o inibidor seletivo da PKC, o GF 109203, previne a expressão do receptor B₁ induzida pela des-Arg¹⁰-calidina (Schanstra et al., 1998). Além disso, inibição semelhante da indução dos receptores B₁ foi observada com a estaurosporina e com o RO 318220 na aorta isolada de coelho (Medeiros et al., 2001).

Vários estudos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, indicam que as citocinas pró-inflamatórias, notadamente a IL-1 β , exercem um papel fundamental no aumento das respostas funcionais mediadas pelos receptores B₁ (De Blois et al., 1988; 1991; Perkins et al., 1995; McLean et al., 2000a). Além disso, tem sido demonstrado que o tratamento com agentes como o dipeptídeo murâmico (Bouthillier et al., 1987), o adjuvante de Freund (Perkins et al., 1993), o LPS (Campos et al., 1996) ou o BCG (Campos et al., 1997) são capazes de induzir o aumento dos efeitos mediados por estes receptores. A resposta a todos estes

estímulos inflamatórios é sensível ao tratamento com inibidores da síntese protéica ou com glicocorticóides. Assim, a resposta edematogênica causada pelo agonista dos receptores B_1 , a des-Arg⁹-BK, em ratos tratados com IL-1 β ou TNF α , foi praticamente abolida pelo tratamento com dexametasona ou com cicloheximida. Esta resposta inibitória marcante pode estar relacionada com a interferência destes bloqueadores em diversos níveis do processo de indução dos receptores B_1 . Os principais efeitos dos glicocorticóides estão associados com sua capacidade de influenciar a expressão gênica em todos os níveis de regulação conhecidos. Por causa de sua lipofilicidade, os glicocorticóides se difundem através da membrana plasmática e se ligam a receptores nucleares específicos (GR). Estes receptores estão localizados no citoplasma formando complexos com várias proteínas, incluindo as *heat shock proteins*. Depois da ligação do agonista, os receptores sofrem alterações conformacionais, que resultam na mudança do estado de fosforilação do receptor, permitindo a passagem para o núcleo e a ligação com seqüências específicas no DNA. Estas seqüências são chamadas de elementos responsivos e podem estimular ou inibir a transcrição de diversos genes, particularmente aqueles que levam à expressão de moléculas envolvidas no processo inflamatório. As ações dos elementos responsivos são mediadas, em parte, pela interação com fatores de transcrição específicos, incluindo AP-1 e NF- κ B. Além disso, os efeitos dos glicocorticóides não estão limitados à regulação da transcrição. No nível pós-transcricional, os glicocorticóides

podem aumentar ou reduzir a estabilidade do RNAm, bem como, alterar processos translacionais, através da ligação com proteínas regulatórias específicas (Sternberg, 2001). Desta forma, os efeitos dos glicocorticóides sobre a expressão dos receptores B_1 podem estar relacionados com a redução de sua síntese ou da síntese de citocinas pró-inflamatórias, através da inibição do fator de transcrição NF- κ B (Donaldson et al., 1997; Marceau et al, 1998; Blais et al., 2000). Além disso, dados recentes (Haddad et al., 2001) sugerem que as ações da dexametasona sobre o aumento dos receptores B_1 , induzido pela IL-1 β ou TNF α , em fibroblastos de pulmão humano, podem envolver alterações na taxa de transcrição do gene para o receptor B_1 , decréscimo na degradação do RNAm ou, ainda, aumento na estabilidade do RNAm deste receptor, provavelmente via inibição da MAP-quinase p38 (Lasa et al., 2001). É possível inferir que um ou mais destes processos estejam associados com os efeitos inibitórios da dexametasona sobre o aumento do edema causado pela ativação dos receptores B_1 na pata de rato.

Acredita-se que as vias que controlam a produção autócrina/parácrina de citocinas e de fatores de crescimento são capazes de manter a ativação de células do sistema imune, perpetuando, assim, a resposta inflamatória. Existem evidências substanciais de que a ativação persistente do fator NF- κ B pode estar envolvida na manutenção de muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo, entre outras, a artrite, asma, colite ulcerativa e aterosclerose (Makarov, 2000). O NF- κ B controla a expressão das citocinas

IL-1 β e TNF α , que, por sua vez, são potentes ativadores do NF- κ B, através de sinais produzidos pela interação com seus receptores (Rothwarf e Karin, 1999). Tem sido demonstrado que a administração de inibidores seletivos do NF- κ B é capaz de bloquear a expressão de IL-1 β e TNF α em vários modelos animais de inflamação crônica (Tak e Firestein, 2001). O envolvimento da via de ativação do NF- κ B também tem sido implicada no controle da expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, além de outras citocinas (Baldwin Jr, 2001; Tak e Firestein, 2001).

Alguns estudos *in vitro* têm sugerido o envolvimento do fator nuclear NF- κ B no processo de indução dos receptores B₁ (para maiores detalhes, ver Quadro 1). Deste modo, foi demonstrado que o aumento da expressão dos receptores B₁, induzido pela IL-1 β , em fibroblastos de pulmão humano, é modulado ao nível transcripcional e mediado pela ativação do NF- κ B (Schanstra et al., 1998). Além disso, tem sido indicada a presença de sítios de ligação para o NF- κ B na região promotora do receptor B₁ (Ni et al., 1998a). Várias evidências têm também demonstrado que a ativação do fator nuclear NF- κ B constitui uma das principais vias de sinalização ativadas por citocinas pró-inflamatórias (ver, para revisão: Dinarello, 2000a). Com base nesses resultados, pode-se sugerir, portanto, que a indução dos receptores B₁, pela IL-1 β ou pelo TNF α *in vivo* é acompanhada pela ativação do fator de transcrição NF- κ B. Nossos resultados reforçam estas sugestões e indicam que

o aumento funcional dos receptores B_1 , em animais pré-tratados com IL-1 β ou TNF α , pode ser bloqueado pelo tratamento sistêmico com o antioxidante, PDTC, ou ainda pelo inibidor do sistema de proteasomas, TLCK. Resultados adicionais e mais conclusivos, foram obtidos quando foi utilizado o ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), confirmando os estudos *in vivo* e demonstrando que a injeção intraplantar de IL-1 β é capaz de induzir a ativação do fator de transcrição NF- κ B na pata de rato, uma resposta que foi bloqueada pelo tratamento com PDTC ou com dexametasona. Estes resultados reforçam outras evidências anteriores, que apontam que o aumento das respostas edematogênicas mediadas pelos receptores B_1 , em ratos adrenalectomizados, é acompanhado pela ativação do NF- κ B em diversos tecidos, incluindo o tecido subcutâneo da pata de rato (Cabrini et al., 2001). O envolvimento do fator NF- κ B, na indução dos receptores B_1 , também foi evidenciado em preparações de aorta, obtidas de coelhos tratados com PDTC *in vivo* (Medeiros et al., 2001). É importante destacar que a mesma dose de PDTC utilizada no presente estudo foi capaz de inibir, de forma marcante e seletiva (sem interferir com a estimulação de outros fatores de transcrição), a ativação do NF- κ B, bem como a expressão de TNF α , COX-2 e de moléculas de adesão, após o tratamento sistêmico com LPS em ratos (Liu et al., 1999).

Os resultados do presente trabalho sugerem também que a redução das respostas causadas pela des-Arg⁹-BK é resultante da inibição do processo de

indução dos receptores B_1 . Esta conclusão está baseada nos dados que demonstram que a maior parte dos bloqueadores testados não foi capaz de interferir com a resposta edematogênica causada pela BK na pata de rato. Dentre os inibidores analisados, apenas o PDTC e a estaurosporina produziram alteração do edema de pata mediado pelos receptores B_2 . Estas evidências estão de acordo com dados da literatura, que mostram que a ativação da PKC e do NF- κ B podem constituir vias importantes de transdução de sinal para os receptores B_2 (Calixto et al., 2000). Portanto, é possível que parte dos efeitos destes inibidores sobre o edema causado pela des-Arg⁹-BK seja decorrente da interferência com vias de sinalização pós-receptor.

Uma das principais ações da IL-1 β está relacionada com sua capacidade de induzir migração e adesão de neutrófilos ao endotélio (Thorlacius et al., 1997; Derevianko et al., 1998; Grutkoski et al., 1999). Assim, é possível que o acúmulo de leucócitos, induzido pela IL-1 β , possa estar diretamente relacionado com o aumento das respostas edematogênicas mediadas pela ativação dos receptores B_1 . Tem sido demonstrado que parte das respostas da IL-1 β são mediadas pela produção de PAF ou de leucotrienos (Showell et al., 1998; Wen et al., 1998). Além disso, a liberação de moléculas quimiotáticas parece constituir um passo essencial para o recrutamento de neutrófilos. Desta forma, dados da literatura indicam que o PAF está relacionado com os efeitos da IL-1 β sobre a migração de neutrófilos em

microvasos mesentéricos de rato (Nourshargh et al., 1995). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento com antagonistas de PAF previne a indução da COX-2 mediada pela IL-1 β em cultura de células neuronais do hipocampo (Serou et al., 1999). Os dados do presente estudo mostram ainda que o edema de pata mediado pelos receptores B₁, em ratos tratados com IL-1 β , pode ser inibido pelo antagonista de receptores de PAF, sugerindo a participação deste fator quimiotático no processo de indução dos receptores B₁ na pata de rato. Por outro lado, o aumento da resposta edematogênica que envolve a ativação dos receptores B₁, em animais pré-tratados com IL-1 β , não parece depender da formação de leucotrienos, já que o edema causado pela des-Arg⁹-BK não foi significativamente inibido pela co-injeção do antagonista do receptor LTB₄, o CP 105696.

A identificação de moléculas envolvidas no processo de migração celular demonstrou que o recrutamento de células para o sítio inflamatório depende de interações complexas entre leucócitos e células endoteliais. O pré-requisito para estas interações é a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, que são representadas principalmente por selectinas, integrinas ou imunoglobulinas (Walzog e Gaehtgens, 2000). Os dados do presente estudo sugerem que o aumento da resposta edematogênica ao agonista de receptores B₁, des-Arg⁹-BK, após o tratamento local com IL-1 β , envolve um processo dependente da produção e ativação de moléculas de

adesão. Estas conclusões são baseadas nos resultados que mostram que o edema causado pela des-Arg⁹-BK foi inibido pelo tratamento sistêmico com fucoidina ou com o anticorpo anti-CD-18. Segundo a literatura, a IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias induzem a ativação do fator nuclear NF- κ B e estimulam a expressão de moléculas de adesão (incluindo selectinas e integrinas) (Barnes e Karin, 1997; Stylianou e Saklavalala, 1998). Deste modo, a IL-1 β é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio, promovendo a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (Meager, 1998; Mansson et al., 2000).

A idéia de que parte dos efeitos da IL-1 β sobre o aumento dos receptores B₁ na pata de rato, são mediados pela migração de neutrófilos pode ser reforçada por outra série de resultados obtidos no presente estudo: 1) a IL-1 β é capaz de produzir um aumento expressivo (5 a 10 vezes) da atividade da MPO na pata de rato, um indicador indireto da migração de neutrófilos; 2) é importante salientar que os mesmos inibidores que reduziram a resposta edematogênica causada pela des-Arg⁹-BK na pata de rato também foram capazes de prevenir, de forma marcante, o aumento da atividade da MPO induzido pela IL-1 β ; e 3) a indução da expressão dos receptores B₁ causada pela IL-1 β , medida pelo aumento dos níveis de RNAm na pata de rato, foi significativamente inibida pelo tratamento dos animais com o bloqueador de selectinas, a fucoidina. Analisados em conjunto, todos estes resultados

sugerem que o recrutamento de neutrófilos pode constituir um pré-requisito essencial para a expressão funcional dos receptores B_1 na pata de rato. Realmente, a capacidade dos neutrófilos em produzir espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios, além de interagir com outros tipos celulares, pode sustentar esta sugestão. Em algumas condições (como depois da injeção intraplantar de IL-1 β), produtos oxidantes derivados de neutrófilos poderiam agir como segundos mensageiros das vias de sinalização intracelular da IL-1 β (Derevianko et al., 1998), colaborando para a indução dos receptores B_1 . Além disso, dados recentes da literatura demonstraram a expressão dos receptores B_1 em neutrófilos de camundongos (Araújo et al., 2001). Estes achados podem ser de grande relevância para definir os mecanismos envolvidos em várias doenças, nas quais a migração de neutrófilos constitui o principal fator patológico. Por outro lado, os resultados descritos no estudo discordam em parte de outros da literatura, que sugerem que os neutrófilos não participam do processo de indução dos receptores B_1 no modelo de pressão arterial em coelhos pré-tratados com LPS, já que a neutropenia experimental não foi capaz de alterar as respostas causadas pela des-Arg⁹-BK neste modelo (Bouthillier et al., 1997). As diferenças para estas respostas podem estar relacionadas ao caráter distinto de indução dos receptores B_1 em ratos e em coelhos.

Os resultados do presente trabalho mostram, ainda, que a injeção intraplantar do agonista seletivo dos receptores B_1 , des-Arg⁹-BK, não é capaz

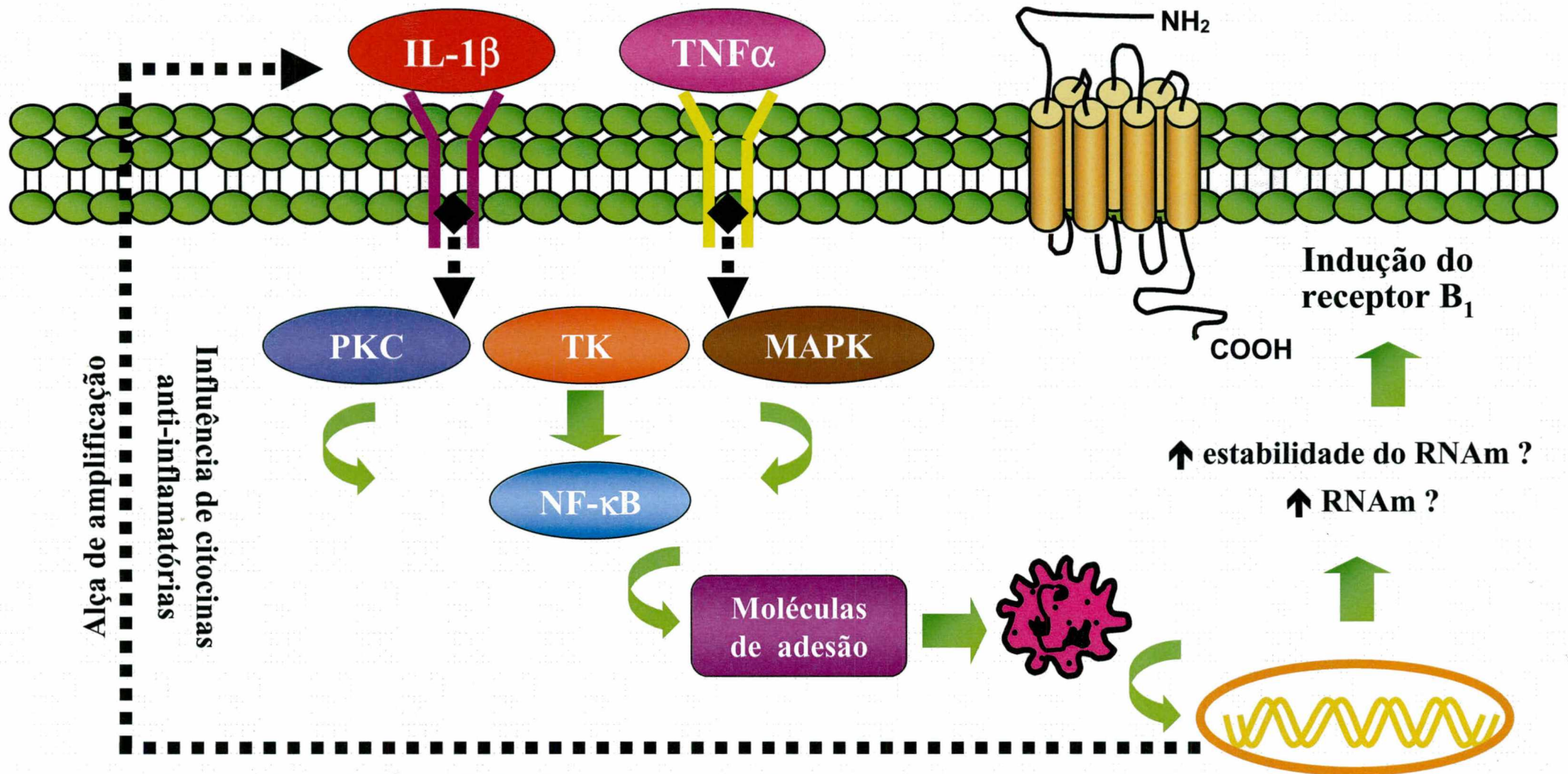
de induzir qualquer alteração da atividade da MPO, quando injetada isoladamente na pata de rato. De fato, quando comparadas a outros fatores quimiotáticos, as cininas são consideradas indutores fracos da migração celular. Assim, tem sido sugerido que o envolvimento das cininas durante o recrutamento de células depende da interação com outros mediadores do processo inflamatório (Böckmann e Paegelow, 2000). Desta forma, os resultados apresentados indicam que a des-Arg⁹-BK é capaz de potencializar (em aproximadamente 40 %) o efeito de doses baixas de IL-1 β sobre a atividade da MPO. Estes dados estão de acordo com outros resultados obtidos em camundongos, que mostram que a des-Arg⁹-BK induz migração celular apenas em animais previamente tratados com IL-1 β (Ahluwalia e Perretti, 1996; McLean et al., 2000b). Pode-se sugerir, portanto, que a migração de neutrófilos, durante o processo inflamatório, pode ser dependente de uma estreita interação entre o sistema de cininas e de citocinas. Neste caso em particular, a migração de neutrófilos, induzida pela IL-1 β , resultaria na expressão funcional dos receptores B₁, que, depois de ativados, poderiam amplificar o influxo de células, perpetuando a resposta inflamatória.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que a injeção intraplantar das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF α , produz um aumento marcante e rápido da resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁ (sem interferir com o edema mediado pelos receptores B₂),

através de um processo sensível ao tratamento com dexametasona ou com cicloheximida. Outros mecanismos envolvidos com o aumento de volume mediado pelos receptores B_1 , após o tratamento com estas citocinas, incluem a produção de metabólitos do ácido araquidônico (via COX-1 e COX-2) e a ativação de algumas quinases específicas como a PKC, a MAP-quinase e a tirosina-quinase. Os resultados também indicam que o aumento das respostas relacionadas com a estimulação dos receptores B_1 , na pata de rato, depende da produção secundária de outras citocinas pró-inflamatórias, através de mecanismos que envolvem a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Finalmente, a indução funcional dos receptores B_1 , após o tratamento com IL- 1β , foi acompanhada por um aumento marcante da expressão do receptor B_1 na pata de rato, em um processo relacionado com migração de neutrófilos e dependente da ativação de moléculas de adesão. Estes dados contribuem para esclarecer alguns mecanismos envolvidos na interação entre o sistema de cininas e citocinas durante o processo inflamatório. Os principais mecanismos relacionados com o efeito modulatório de IL- 1β e do TNF α sobre as respostas mediadas pelos receptores B_1 no modelo do edema de pata de rato estão ilustrados no Esquema 1.

As cininas têm sido descritas como um grupo importante de mediadores da inflamação, que apresentam papel fundamental em vários processos fisiopatológicos. Nos últimos 10 anos, vários avanços foram realizados no estudo do sistema de cininas, e o conhecimento a respeito destes peptídeos foi

especialmente favorecido pelos estudos de biologia molecular e pela geração de animais *knockout* para os receptores B₁ e B₂. Os dados mais recentes da literatura sugerem que os receptores B₂ estariam relacionados com fase aguda das respostas inflamatórias que envolvem a produção de cininas, enquanto os receptores B₁, através do processo de indução, bem como pela interação com outros sistemas pró-inflamatórios, estariam implicados na manutenção e perpetuação da resposta inflamatória. Assim, antagonistas seletivos para os receptores B₁, não peptídicos e ativos por via oral, poderiam constituir uma ferramenta farmacológica importante para o controle de doenças inflamatórias, especialmente daquelas que não apresentam tratamento satisfatório até o momento.



Esquema 1 - A IL-1 β e o TNF α são capazes de estimular várias proteínas quinases, incluindo a proteína quinase C (PKC), tirosina quinase (TK) e MAP-quinase (MAPK), além de ativar o fator de transcrição NF- κ B. A estimulação destas vias pode induzir a síntese *de novo* de vários componentes inflamatórios, incluindo moléculas de adesão, outras citocinas pró-inflamatórias e ainda, do receptor B₁ para as cininas, em um processo controlado negativamente por citocinas antiinflamatórias. É possível que a migração de neutrófilos induzida por estas citocinas seja um pré-requisito para a indução do receptor B₁.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1- The aim of the present study was investigate the mechanisms involved in the modulatory role of pro-inflammatory cytokines on B₁ and B₂ receptors-mediated oedematogenic responses in the rat paw, by means of pharmacological, biochemical and molecular approaches.

2 - Intradermal (i.d.) injection of cytokines, IL-1 β and TNF α (5 ng/paw, 60 and 30 min prior) produces a rapid onset up-regulation of des-Arg⁹-BK-mediated rat paw oedema, being this response, associated to a marked increase in B₁ receptors expression, as assessed by PCR experiments. On the other hand, the i.d. injection of the same cytokines, did not affect the responses related to B₂ receptors activation.

3 - The paw oedema induced by des-Arg⁹-BK in rats pre-treated with IL-1 β or TNF α , was significantly prevented by the co-injection of the selective B₁ receptor antagonist des-Arg⁹-NPC 17731, while B₂ receptor antagonist Hoe 140 had no effect. Indomethacin (2 mg/kg, i.p.), meloxicam (3 mg/kg, i.p.) or NS 398 (500 μ g/kg, i.p.) 1 h prior, significantly reduced the edema induced by des-Arg⁹-bradykinin (100 nmol/paw) in IL-1 β (40, 69 and 57 %) or TNF α (43, 53 and 61 %) treated rats, respectively.

4 - Likewise, co-injection of anti-IL-1 β , anti-TNF α and anti-IL-8 (50 ng/paw) significantly inhibited des-Arg⁹-BK-induced oedema in animals pre-treated with IL-1 β (65, 37 and 42 %) or TNF α (39, 64, 25 %). IL-1 receptor

antagonist (IRA, 100 µg/paw) or IL-10 (10 ng/paw) also inhibited the oedema caused by des-Arg⁹-BK, in rats that had received either IL-1β (67 and 63 %) or TNFα (46 and 35 %). Furthermore, i.d. injection of IL-1β resulted in an expressive increase of IL-1β and TNFα levels in the rat paw.

5 - PKC inhibitors, staurosporine (10 nmol/paw) or RO 318220 (30 nmol/paw) inhibited des-Arg⁹-BK-induced paw oedema (44 and 42 % for IL-1β and, 53 and 30 % for TNFα, respectively). Genistein (tyrosine kinase inhibitor, 2.5 mg/kg, s.c.) or PD 098059 (MAP-kinase inhibitor, 30 nmol/paw) produced a marked inhibition of des-Arg⁹-BK-induced oedema (58 and 39 % for IL-1β and, 31 and 35 % for TNFα, respectively).

6 - Dexamethasone (0.5 mg/kg, s.c., 4 h) or cycloheximide (1.5 mg/kg, s.c., 6 h) significantly prevented the edema caused by des-Arg⁹-bradykinin (100 nmol/paw) in rats treated with IL-1β (81 and 59 %) or TNFα (78 and 43 %). Likewise, the NF-κB inhibitors TLCK (2 mg/kg, i.p.) and PDCT (100 mg/kg, i.p.) significantly inhibited the oedema of des-Arg⁹-BK in IL-1β (27 and 83 %) or TNFα (28 and 80 %) pre-treated animals, respectively. In addition, it was demonstrated that IL-1β i.d. injection was capable of inducing a marked activation of nuclear factor-κB in the rat paw.

7 - The PAF antagonist WEB 2086 (15 µg/paw) inhibited des-Arg⁹-BK-induced oedema, in rats pre-treated with IL-1β (37 %), while the LTB₄ antagonist CP105696 (30 µg/paw) had no effect. Des-Arg⁹-BK-induced paw

oedema was also inhibited by the selectin blocker fucoidin (10 mg/kg, i.v.) (43 %) or by the anti-CD-18 antibody (1 mg/kg, i.v.) (44 %).

8 - I.d. injection of IL-1 β (1 and 5 ng/paw) produced a 5 to 10- fold increase of myeloperoxidase (MPO) activity in the rat paw, being this effect inhibited by WEB 2086 (46 %), fucoidin (68 %) or the CD-18 antibody (84 %).

9 - Des-Arg⁹-BK alone had no effect in MPO activity, but raised (in about 40 %) the response induced by IL-1 β (1 ng/paw), an effect prevented (33 %) by the B₁ receptor antagonist des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 nmol/paw).

10 - Finally, IL-1 β (5 ng/paw, 60 min)-induced increase of B₁ receptors mRNA levels in the rat paw was prevented by fucoidin (about 50 % of inhibition).

11 – Taken together, the present results suggest that up-regulation of B₁ receptors modulated by IL-1 β or TNF α in the rat paw, involves the release of other cytokines, the activation of PKC and tyrosine kinase pathways, coordinated with the activation of MAP-kinase and nuclear factor κ B, as well as, the neutrophil recruitment, dependent on adhesion molecules activation. These data reinforce the view that B₁ receptors may exert a pivotal role in modulating chronic inflammatory processes.

RESUMO E CONCLUSÕES

1- O objetivo do presente trabalho foi investigar alguns dos mecanismos envolvidos no efeito modulatório de citocinas pró-inflamatórias sobre a resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁ e B₂ para as cininas na pata de rato, através da utilização de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular.

2 - A injeção intraplantar das citocinas, IL-1 β e TNF α (5 ng/pata, 60 and 30 min) produziu um aumento marcante da resposta edematogênica mediada pelos receptores B₁, associado com o aumento da expressão destes receptores, quando avaliado pela técnica de PCR. Por outro lado, o mesmo tratamento não foi capaz de causar nenhuma alteração das respostas edematogênicas mediadas pelos receptores B₂.

3 - O edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK foi significativamente inibido pelo antagonista seletivo dos receptores B₁, o des-Arg⁹-NPC 17731, mas não pelo antagonista dos receptores B₂, o Hoe 140. A indometacina (2 mg/kg, i.p.), o meloxicam (3 mg/kg, i.p.) ou o NS 398 (500 μ g/kg, i.p.), 1 h antes, também foram capazes de reduzir de forma significativa o edema causado pela des-Arg⁹-BK nos animais tratados com IL-1 β (40, 69 e 57 %) ou TNF α (43, 53 e 61 %), respectivamente.

4 - A co-injeção dos anticorpos anti-IL-1 β , anti-TNF α e anti-IL-8 (50 ng/pata) resultou em inibição significativa do edema à des-Arg⁹-BK, nos

animais tratados com IL-1 β (65, 37 e 42 %) ou com TNF α (39, 64 e 25 %). O tratamento dos animais com o antagonista do receptor de IL-1 (IRA, 100 μ g/pata) ou com IL-10 (10 ng/pata) também inibiu o edema causado pela des-Arg⁹-BK, após o tratamento com IL-1 β (67 e 63 %) ou TNF α (46 e 35 %). Além disso, a injeção intraplantar de IL-1 β induziu um aumento marcante dos níveis de IL-1 β e de TNF α na pata de rato.

5 - O tratamento com os inibidores de PKC, estaurosporina (10 nmol/pata) ou RO 318220 (30 nmol/pata), resultou em uma redução significativa do edema à des-Arg⁹-BK (44 e 42 % para a IL-1 β e 53 e 30 % para o TNF α , respectivamente). O edema causado pela des-Arg⁹-BK também foi inibido pelo tratamento com genisteína (um inibidor da tirosina-quinase, 2,5 mg/kg, s.c.) ou pelo PD 098059 (inibidor da MAP-kinase, 30 nmol/pata), nos animais pré-tratados com IL-1 β (58 e 39 %) ou com TNF α (31 e 35 %).

6 - A dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) ou cicloheximida (1,5 mg/kg, s.c., 6 h) também inibiu de forma marcante o edema à des-Arg⁹-BK em animais tratados com IL-1 β (81 e 59 %) ou com TNF α (78 e 43 %). Da mesma maneira, os inibidores do fator de transcrição NF- κ B, o TLCK (2 mg/kg, i.p.) e o PDCT (100 mg/kg, i.p.), preveniram significativamente o edema causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β (27 e 83 %) ou com TNF α (28 e 80 %), respectivamente. Os resultados também demonstram que

a injeção intraplantar de IL-1 β resultou em ativação expressiva do fator de transcrição NF- κ B na pata de rato.

7 - A co-injeção do antagonista de PAF, WEB 2086 (15 μ g/pata), inibiu em 37 % o edema causado pela des-Arg⁹-BK em ratos pré-tratados com IL-1 β , enquanto que o antagonista LTB₄, CP105696 (30 μ g/pata), não apresentou efeito. O edema causado pela des-Arg⁹-BK nos animais tratados com IL-1 β , também foi inibido pelo tratamento sistêmico com o inibidor de selectinas, a fucoidina (10 mg/kg, e.v.) (43 %), ou pelo anticorpo anti-CD-18 (1 mg/kg, e.v.) (44 %).

8 - A injeção intraplantar de IL-1 β (1 e 5 ng/pata) produziu um aumento de 5 a 10 vezes sobre a atividade da MPO na pata de rato, sendo este efeito inibido pelo WEB 2086 (46 %), pela fucoidina (68 %) ou pelo anticorpo anti-CD-18 (84 %).

9 - A des-Arg⁹-BK não produziu qualquer alteração da atividade da MPO, quando injetada isoladamente, mas foi capaz de potencializar (em aproximadamente 40 %) a resposta causada pelo IL-1 β (1 ng/pata), um efeito prevenido pela co-injeção do antagonista seletivo dos receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (100 nmol/pata) (33 %).

10 - Finalmente, o aumento da expressão dos receptores B₁, induzido pela IL-1 β (5 ng/pata, 60 min) foi inibido de forma marcante (em aproximadamente 50 %) pelo tratamento com a fucoidina.

11 – Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento das respostas mediadas pelos receptores B_1 na pata de rato, após o tratamento intraplantar com as citocinas $IL-1\beta$ ou $TNF\alpha$, constitui um processo que envolve a produção secundária de outras citocinas, associado com a estimulação de grupos específicos de proteínas quinases, coordenada com a ativação do fator nuclear $NF-\kappa B$, bem como, com o recrutamento de neutrófilos, dependente de moléculas de adesão. Estes resultados reforçam as evidências que indicam que os receptores B_1 apresentam um papel fundamental na modulação do processo inflamatório.

A MAIORIA DOS RESULTADOS DO PRESENTE TRABALHO FORAM PUBLICADOS OU SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO:

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B. Modulation of kinin B₁, but not B₂ receptors-mediated rat paw edema by IL-1 β and TNF α . *Peptides*, 19, 1269 - 1276, 1998.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1851 - 1859, 1999.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., TEIXEIRA, M.M., CALIXTO, J.B. The role of migrating leukocytes for IL-1 β -induced upregulation of kinin B₁ receptors in rats. Submetido à publicação no *Br. J. Pharmacol.*, 2001.

OUTROS TRABALHOS SUBMETIDOS OU PUBLICADOS NO PERÍODO:

MENDES, G.L., SANTOS, A.R.S., CAMPOS, M.M., TRATSK, K.S., YUNES, R.A., CECHINEL FILHO, V., CALIXTO, J.B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci.*, 63, 369 - 381, 1998.

ALVES, R.V., CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. *Peptides* 20: 921 - 927, 1999.

FERREIRA, P.K., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B₁ agonist des-Arg⁹-BK in rats pre-treated with LPS. *Regulatory Peptides*, 89: 29 - 35, 2000.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87: 1 - 5, 2000.

CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Neurokinin mediation of pain and inflammation. *Neuropeptides*. 34: 314 - 322, 2000.

CABRINI, D.A., CAMPOS, M.M., TRATSK, K.S., MERINO, V.F., SILVA JR, J.A., SOUZA, G.E., AVELLAR, M.C., PESQUERO, J.B., CALIXTO, J.B. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B₁ receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. *Br. J. Pharmacol.* 132: 567 - 577, 2001.

CAMPOS, M.M., CABRINI, D.A., CARDOZO, A.H.M., RAE, G.A., HUIDOBRO-TORO, J-P., CALIXTO, J.B. Changes in paw oedema triggered via kinin B₁ and B₂ receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 169 - 177, 2001.

PINHEIRO, R.M., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms involved in the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in the rat pleural cavity. *Inflamm. Res.* In Press.

FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., PESQUERO, J.B., ARAÚJO, R.C., BADER, M., CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice. *Neuropharmacology.* In Press.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anesthes.* In Press.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOUS, J.E., BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. C.R. Senaces Soc. Biol., 66: 511, 1909.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M. Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leucocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. J. Immunol. 156: 269 - 274, 1996.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M. B₁ receptors as new inflammatory target. Could this B be the 1? Trend in Pharmacol. Sci. 20: 100 - 104, 1999.
- ARAÚJO, R.C., KETTRITZ, R., FICHTNER, I., PAIVA, A.C.M., PESQUERO, J.B., BADER, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B₁ receptor-deficient mice. Biol. Chem. 382: 91 - 95, 2001.
- 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 of an orally active, non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR13657. Br. J. Pharmacol. 120: 617 - 624, 1997.
- AUDET, R., PETICLERC, E., DRAPEAU, G., RIOUX, F., MARCEAU, F. Further analysis of the up-regulation of bradykinin B₁ receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. Eur. J. Pharmacol., 271: 551 - 555, 1994.
- AUSTIN, C.E., FAUSSNER, A., ROBINSON, H.E., CHAKRAVARTY, S., KYLE, D.J., BATON, J.M., PROUD, D. Stable expression of the human kinin B₁ receptor in chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 272: 11420 - 11425, 1997.
- BACHVAROV, D.R., HESS, J.F., MENKE, J.G., LARRIVÉE, J-F., MARCEAU, F. Structure and genomic organisation of the human B₁ receptor gene for kinins (BDKRB1). Genomics. 33: 374 - 381, 1996.
- BACHVAROV, D.R., SAINT-JACQUES, E., LARRIVE', J-F., LEVESQUE, L., RIOUX, F., DRAPEAU, G., MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 1623 - 1630, 1995.
- BALDWIN JR, A.S. The transcription factor NF- κ B and human diseases. J. Clin. Invest. 107: 3 - 6, 2001.

- BATHON, J.M., MANNING, D.C., GOLDMAN, D.W., TOWNS, M.C., PROUD, D. Regulation of kinin receptors on human synovial cells and up-regulation of receptor number by interleukin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 384-392, 1992.
- BARNES, P.J., CHUNG, K.F., PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 50: 517 - 572, 1998.
- BARNES, P. J., KARIN, M. Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Eng. J. Med.*, 336, 1066 - 1071, 1997.
- BASCANDS, J-L., PECHER, C., ROUAUD, S., EMOND, C., TACK, J.L., BASTIE, M.J., BURCH. R., REGOLI, D., GIROLAMI. J-P. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 264: F548 - F556, 1993.
- BASTIAN, S., PAQUET, J-L., CREMERS, B. LOILLIER, B., LARRIVÉE, J-F., BACHVAROV, D.R., MARCEAU, F., PRUNEAU, D. Interleukin 8 (IL-8) induces the expression of kinin B₁ receptor in human lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253: 750 - 755, 1998.
- BÉLICHARD, P., LANDRY, M., FAYE, P., BACHVAROV, D.R., BOUTHILLIER, J., PRUNEAUS, D., MARCEAU, F. Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. *Immunopharmacology*, 46: 139 - 147. 2000.
- BÉLICHARD, P., LOILLIER, B., PAQUET, J.L., LUCCARINI, J.M., PRUNEAU, D. Haemodynamic and cardiac effects of kinin B₁ and B₂ receptor stimulation in conscious instrumented dogs. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1565 - 1571, 1996.
- BENY, J.L., BRUNET, P., HUGEL, H. Interaction of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin with isolated pig coronary arteries: mechanical and electrophysiological events. *Regul Pept.* 17: 181, 1987.
- BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D., WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44: 1 - 80, 1992.
- BLAIS JR, C., MARCEAU, F., ROULEAU, J-L., ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides.* 21: 1903 - 1940, 2000.

- BLAUKAT A, DIKIC I. Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B₂ receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. *Biol. Chem.* 382: 135–139, 2001.
- BÖCKMANN, S., PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 587 - 592, 2000.
- BOISSONAS, R.A., GUTTMANN, S., JAQUENOUD, P.A. Synthèse de la L-arginyl -L - propyl - L - propyl - glycil - L - phénylalaninyl - L - arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta*, 43: 1349 - 1358, 1960.
- BORKOWSKI, J.A., RANSON, R.W., SEABROOK, E.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.E., STRADER, C.D., HESS, J.F. Target disruption of bradykinin B₂ receptor gene eliminates bradykinin action in smooth muscles and neurons. *J. Biol. Chem.* 270: 1370 - 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.
- BOYCE, S., RUPNIAK, N.M.J., CARLSON, E.J., WEBB, J., BORKOWSKI, J.A., HESS, J.F., STRADER, C.D., HILL, R.G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ kinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology.* 33: 333 - 335, 1996.
- 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., KYLE, D. J., Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.* 50: 829 - 838, 1992.
- 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.

BURGESS G. M., PERKINS, M.N., RANG, H.P., CAMOBELL, E.A., BROWN, M.C., MCINTYRE, P., URBAN, L., DZIADULEWCZ, E.K., RITCHIE, T.J., HALLET, A., SNELL, C.R., WRIGLESWORTH, R., LEE, W., DAVIS, C., PHAGOO, S.B., DAVIS, A.J., PHILLIPS, E., DRAKE, G.S., HUGHES, G.A., DUNSTAN, A., BLOOMFIELD, G.C. Bradyzide, a potent non-peptide receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 129: 77 - 86, 2000.

CABRINI, D.A., CAMPOS, M.M., TRATSK, K.S., MERINO, V.F., SILVA, J.A., SOUZA, G.E., AVELLAR, M.C., PESQUERO, J.B., CALIXTO, J.B. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B₁ receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. *Br. J. Pharmacol.* 132: 567 - 577, 2001.

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. Ther.*, 277: 299 - 307, 1996.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1 - 5, 2000.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anesthesiol.* In Press., 2001.

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.

CAMPOS, M.M., CABRINI, D.A., CARDOZO, A.M., ERA, G.A., CALIXTO, J.B. Changes in paw oedema triggered via bradykinin B₁ and B₂ receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 169 - 177, 2001.

- CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br. J. Pharmacol.*, 114, 1005 - 1013, 1995.
- CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Neurokinin mediation of pain and inflammation. *Neuropeptides*. 34: 314 - 322, 2000.
- CAMPOS, M.M., HENRIQUES, M.G.M.O., CALIXTO, J.B. The role of B₁ and B₂ receptors in oedema formation after long-term treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Br. J. Pharmacol.* 120: 502 - 508, 1997.
- CAMPOS, M.M., MATA, L.V., CALIXTO, J.B. Expression of B₁ receptors mediating paw oedema and formalin induced-nociception. Modulation by glucocorticoids. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 812 - 819, 1995.
- CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B. Up-regulation of B₁ mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J. Pharmacol.*, 117, 793 - 798, 1996.
- CAO, Z., HENZEL, W.J., GAO, X. IRAK: a kinase associated with interleukin-1 receptor. *Science*. 271: 1128 - 1131, 1996.
- CHAI, K.X., NI, A., WANG, D., WARD, D.C., CHAO, J., CHAO, L. Genomic DNA sequence, expression and chromosomal localization of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB₁. *Genomics*. 31: 51 - 57, 1996.
- 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.*, 1987: 41: 1225 - 1232, 1987.
- CLARKE, C.J.P., HALES, A., HUNT, A., IL-10 mediated suppression of TNF α production is independent of its ability to inhibit NF- κ B activity. *Eur. J. Immunol.* 28: 1719 - 1726, 1998.
- CLOUTIER, F., COUTURE, R. Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B₁ and B₂ receptor agonists in the spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 130: 375 - 385, 2000.

- 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.
- COUTURE, R., MIZRAHI, J., CARANIKAS, S., REGOLI, D. Acute effects of peptides on the rat colon. *Pharmacology*. 24: 230 - 242, 1982.
- COUTURE, 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.
- CYR, M., LAPAGE, Y., BLAIS JR, C., GERVAIS, N., CUGNO, M., ROULEAUS, J.L., ADAM, A. Bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H275 - H283, 2001.
- 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. Induction of B₁ receptors *in vivo* in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacol.*, 33: 127 - 133, 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. 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., HORLICK, R.A. Endotoxin sensitization to kinin B₁ receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br. J. Pharmacol.* 132: 327 - 335, 2001.
- DE CAMPOS, R.O.P., ALVES, R.V., FERREIRA, J., KYLE, D.J., CHAKRAVARTY, S., MAVUNKEL, B.J., CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884 a non-peptidic B₂ receptor antagonist. *Naunyn-Schimiedberg's Arch. Pharmacol.* 360: 278 - 286, 1999.

- DÉCARIE, A., RAYMOND, P., GERVAIS, N., COUTURE, R., ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]-BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 270: H1340 - H1347, 1996.
- DENDORFER, A., WOLFRUM, S., DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 403 - 426, 1999.
- DEREVIANKO, A., GRAEBER, T., D'AMICO, R., SIMMS, H.H. The role of neutrophil-derived oxidants as second messengers in interleukin-1 β -stimulated cells. *Shock*, 10: 54 - 61, 1998.
- DIMARTINO, M.J., WOLFF, C.E., CAMPBELL, G.K., HANNA, N. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat PMN leukocyte infiltration. *Agents and Actions*, 27: 325, 1989.
- DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118: 503 - 508, 2000a.
- DINARELLO, C.A. The role of the interleukin-1 receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl. J. Med.* 343: 732 - 734, 2000b.
- DIXON, B.S. Cyclic AMP selectively enhances bradykinin receptor synthesis and expression in cultured arterial smooth muscle: inhibition of angiotensin II and vasopressin response. *J. Clin. Invest.* 93: 2535 - 2544, 1994.
- DIXON, B.S., SHARMA, R.V., DENNIS, M.J. The bradykinin B₂ receptor is a delayed early response gene for platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 271: 13324 - 13332, 1996.
- DONALDSON, L. F., HANLEY, M.R., VILLABRANCA, A.C. Inducible receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18, 171 - 181, 1997.
- EGGERICKX, 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.
- ELLIOT, D.F., LEWIS, G.P., HORTON, E.W. The structure of bradykinin. *Biochem. J.* 76: 16, 1960.

- EMANUELI, C., CHAO, J., REGOLI, D. CHAO, L., NI, A., MADEDDU, P. The bradykinin B₁ receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1769 - 1776, 1999.
- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas of kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: S20 - S24, 1990.
- ERDÖS, E.G., SKIDGEL, R.A. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, 111 - 141, 1997.
- FARMER, S.G., BURCH, R.M., MEEKER, S.A., WILKINS, D.E. Evidence for a pulmonary B₃ receptor. *Mol. Pharmacol.*, 36: 1 - 8, 1989.
- FARMER, S.G., BURCH, R.M., KYLE, D.J., MARTIN, J.A., MEEKER, S.N., TOGO, J. Evidence that cultured airway smooth muscle cells contain bradykinin B₂ and B₃ receptors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 4: 273 - 277, 1991.
- FAUSSNER, A., BATHON, J.M., PROUD, D. Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology.* 45: 13 - 20, 1999.
- FAUSSNER, A., PROUD, D, TOWNS, M., BATHON, J.M. Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B₁ and B₂ kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 273: 2617 - 2623, 1998.
- 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 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.
- FIEBICH, B.L.; MUEKCH, B.; BOERINGER, M.; HULL, M. Interleukin-1 β induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ synthesis in human

neuroblastoma cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *J. Neurochem.* 75: 2020 – 2028, 2000.

FIRESTEIN, G. S., ZVAIFLER, N. J. Anticytokine therapy in rheumatoid arthritis. *N. Eng. J. Pharmacol.* 337, 195 - 197, 1997.

FONG, D., SMITH, D.I., HSIEH, W.T.. The human kininogen gene (KNG) mapped to chromosome 3q26-qter by analysis of somatic cell hybrids using the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 87: 189 - 192, 1991.

FRANCISCHI, J.N., YOKORO, C.M., POOLE, S., TAFURI, W.L., CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 399: 243, 2000.

FREY, E.K. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Langenbecks Arch Klin Chir.* 142: 663 - 669, 1926.

FREY, E.K., KRAUT, J.I. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Naunyn-Schmidbergs Arch Exp. Pathol. Pharmacol.* 133: 1 - 56, 1928.

FRÖDE, T.S., SOUZA, G.E., CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF α and IL-1 β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 13: 162 - 168, 2001.

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.

GEPPETTI, P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.* 47: 1 - 23, 1993.

GOLDBERG, M.R., CHAPNOCK, B.M., JOINER, P.D., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J. Influence of inhibitors of prostaglandin synthesis on vasoconstrictor responses to bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198: 357 - 365, 1976.

GRANOWITZ, E.V., CLARK, B.D., MANCILLA, J. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to type II interleukin receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 14147 - 14150, 1991.

GRIESBACHER, T., AMANN, R., SAMETZ, W., DIETHART, S., JUAN, H., The non-peptide B₂ receptor antagonist FR173657: inhibition of

effects of bradykinin related to its role in nociception. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1328 - 1334, 1998.

GRIESBACHER, T., LEGAT, F.J. Effects of the non-peptide B₂ receptor antagonist FR173657 in models of visceral and cutaneous inflammation. *Inflamm. Res.* 49: 535 - 540, 2000.

GRUTKOSKI, P.S., D'AMICO, R., AYALA, A., SIMMAS, H.H. IL-1 β stimulation induces paracrine regulation of PMN function and apoptosis. *Shock.*, 12: 373 - 381, 1999.

GUIMARÃES, J.A., BORGES, B.R., PRADO, É.S., PRADO, J.L. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem. Pharmacol.*, 22: 3157 - 3152, 1973.

HADDAD, E-B., FOX, A. J., ROUSELL, J., BURGESS, G., MCINTYRE, P., BARNES, P.J., CHUNG, K.F. Post-transcriptional regulation of bradykinin B₁ and B₂ receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor α . *Mol. Pharmacol.* 57: 1123 - 1131, 2000.

HALL. J.M., MORTON, I.K.M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, 9 - 43, 1997.

HAN, J., ULEVITCH, J. Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat. Cell. Biol.* 1: E39 - E40, 1999.

HARGREAVES, K.M., TROULLOS, E.S., DIONNE, R.A., SCHMIDT, E.A., SCHAFER, S.C., JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 44: 613 - 621, 1988.

HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; SUGIYAMA, S. Bradykinin stimulates interleukin-8 production by human lung fibroblasts. *Immunology.* 95: 507 - 511, 1998.

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, 99 - 108, 1997.

- 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.
- HESS, J.F., HEY, P.J., CHEN, T-B., O'BRIEN, J., OMALLEY, S.S., PETTIBONE, D.J., CHANG, R.S.L. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B₁ and B₂ bradykinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 123 - 129, 2001.
- 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.
- HUERRE, M.R., GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. *Res. Immunol.* 147: 417 - 434, 1996.
- 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 the rat. *Neurosci.* 69: 685 - 690, 1995.
- 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.
- KRAUT, H., FREY, E.K., WERLE, E. Der Nachweis eines krieslaufhomons in der pankreasdrüse. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 189: 97 - 106, 1930.
- LAGNEUX, C., RIBUOT, C. *In vivo* evidence for B₁-receptor synthesis induction by heat stress in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1045 - 1046, 1997.
- LAGNEUX, C., LEBRIN, F., DEMENGE, P., GODIN-RIBUOT, D., RIBUOT, C. MAP-kinase dependent activation of kinin B₁ receptor gene-induced transcription after heat stress in rat vascular smooth muscle cells. *Int. Immunopharmacol.* 1: 533 - 538, 2001.

- LAL, M. A., PROULX, P. R., HEBERT, R. L. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. *Am. J. Physiol.*, 43, 728 - 735, 1998.
- LASA, M., BROOK, M., SAKLATVALA, J., CLARK, A.R. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol. Cell. Biol.* 21: 771 - 780, 2001.
- LARRIVÉE, J-F., BACHVAROV, D. R., HOULE, F., LANDRY, J., HUOT, J., MARCEAU, F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B₁ receptors induced by tissue injury. *J. Immunol.*, 160, 1419 - 1426, 1998.
- LEVESQUE, L., DRAPEAU, G., GROSE, J.H., RIOUX, F. MARCEAU, F. Vascular mode of action of kinin B₁ receptors and development of a cellular model for investigation of these receptors. *Immunopharmacology*, 29: 141 - 147, 1995.
- LEVY D, ZOCHODNE DW. Increased mRNA expression of the B₁ and B₂ bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain.* 86: 265 – 271, 2000.
- LEWIS, G.P. Plasma kinin and other vasoactive compounds in acute inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 116: 847 - 854, 1964.
- LIAO, J.K., HOMCY, C.J. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J. Clin Invest.* 92: 2168 - 2172, 1993.
- LIBBY, P., ORDOVAS, J.M., BIRINY, L.K., AUGER, K.R., DINARELLO, C.A. Inducible interleukin-1 gene expression in smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 78: 1432 - 1438, 1986.
- LIEBMANN C. Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol. Chem.* 382: 49–55, 2001.
- LIEBMANN C, BÖHMER F-D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. *Curr. Med. Chem.* 7: 911- 943, 2000.

- LIEBMANN, C., REISSMANN, S., ROBBERECHT, P., AROLD, H. Bradykinin action in the rat duodenum: receptor binding and influence on the cyclic AMP system. *Biomed. Biochim. Acta.* 46: 469 - 478, 1987.
- LIU, S.F., YE, X., MALIK, A.B. Inhibition of NF- κ B prevents activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *in vivo* expression of pro-inflammatory genes. *Circulation.* 100: 1330 - 1337, 1999.
- MA, J.X., SONG, Q., HATCHER, H.C., CROUCH, R.K., CHAO, L., CHAO, J. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp. Eye Res.* 63: 19 - 26, 1996.
- MA, J., WANG, D., CHAO, L., CHAO, J. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse B₂ receptor gene. *Gene.* 149: 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. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Express.* 1264: 223 - 228, 1995.
- MAHABEER, R., BHOOLA, K.D. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol. Ther.* 88: 77 - 89, 2000.
- MAKAROV, S.S. NF- κ B as therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med. Today.* 6: 441 - 448, 2000.
- MANNING, D.C., VAVREK, R., STEWART, J.M., SNYDER, S.H. Two bradykinin sites with picomolar affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237: 504 - 512, 1986.
- MANSSON, P., ZHANG, X.W., JEPPSSON, B., JOHNELL, O., THORLACIUS, H. Critical role of P-selectin-dependent rolling in tumor necrosis factor α -induced leukocyte adhesion and extravascular recruitment *in vivo*. *Naunyn-Shmiedrberg's Arch. Pharmacol.*, 362: 190 - 196, 2000.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptor induction and inflammation. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press., 143 - 156, 1997.

- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacol.* 30:1 – 26, 1995.
- MARCEAU, F., BACHVAROV, D.R.. Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Inflamm.* 16, 385 - 401, 1998.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 50:357 - 386, 1998.
- MARCEAU, F., LARRIVÉE, J-F., BOUTHILLIER, J., BACHVAROVA, M., HOULE, S., BACHVAROV, D.R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B₁ and B₂ receptor expression in the rabbit. *Am J. Physiol.*, 46: R1568 - R1578, 1999.
- MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D., GIROUD, J.P. 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.
- MARCEAU, F., ST-PIERRE, S., REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 58: 536 - 542, 1980.
- MCCAFFERTY, D.M.; SIHOTA, E.; MUSCARA, M.; WALLACE, J.L.; SHARKEY, K.A. KUBES, P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrintest. Liver Physiol.* 279: 90 –99, 2000.
- MCEACHERN, A.E., SHELTON, E.R., BHAJTA, S., OBERNOLT, R., BACH, C., ZUPPAN, P., FUJISAKI, J., ALDRISH, R.W., JARNAGIN, K. Expression cloning of rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 7724-7728, 1991.
- MCINTYRE, T.M., MODUR, V., PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thromb. Haem.* 78: 302 - 305, 1997.

- MCLEAN, P.G., PERRETTI, M., AHLUWALIA, A. Inducible expression of the kinin B₁ receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹-bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 128: 275 - 282, 1999.
- MCLEAN, P.G., AHLUWALIA, A., PERRETTI, M. Association between kinin B₁ receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J. Exp. Med.* 192: 367 - 380, 2000b.
- MCLEAN, P.G., PERRETTI, M., AHLUWALIA, A. Kinin B₁ receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc. Res.* 48: 194 - 210, 2000a.
- MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 10: 27 - 39, 1999.
- MEDEIROS, R., CABRINI, D.A., CALIXTO, J.B. The *in vivo* and *ex vivo* roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul. Pept.* 97: 121 - 130, 2001.
- MENKE, J.G., BOROWSKI, J.A., BIERILKO, K.K., MACNEIL, T., DERRIC, A.W., SCHENECK, K.A. RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L., HESS, J.F. Expression of cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21583-21586, 1994.
- MERCURIO, F., MANNING, A.M. Multiple signals converging on NF- κ B. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 226 - 232, 1999.
- MODÉER, T., ANDURÉN, I., YUCEL-LINDBERG, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumor necrosis factor α . *Cytokines.* 10: 26 - 31, 1998.
- MÜLLER-ESTERL, W. Immunological probes for the bradykinin B₂ receptor. In *The Kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, 99 - 108, 1997.
- MUZIO, M., NI, J., FENG, P., DIXIT, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signalling. *Science.* 278: 1612 - 1615, 1997.

- NAKAO, S., OGATA, Y., MODÉER, T., SEGAWA, M., FURUYAMA, S., SUGGIYA, H. Bradykinin induces a rapid cyclooxygenase-2 mRNA expression and Ca^{2+} mobilization in human gingival fibroblasts primed with IL-1 β . *Cell Calcium*. 29: 446 - 452, 2001.
- NAKAO, S.; OGATA, Y.; SHIMIZU-SASAKI, E.; YAMAZAKI, M.; FURUYAMA, S.; SUGIYA, H. Activation of NF- κ B is necessary for IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem*. 209: 113 – 118, 2000.
- NI, A., CHAI, K.X., CHAO, L., CHAO, J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1442: 177 – 185, 1998a.
- NI, A., CHAO, L. , CHAO, J. Transcription factor nuclear factor κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.*, 273, 2784 - 2791, 1998b.
- NIKOLAUS, S., BAUDITZ, J., GIONCHETTI, P., WITT, C., LOCHS, H., SCHREIBER, S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 42, 470 - 476, 1998.
- NOURSHARGH, S., LARKIN, S.W., DAS, A., WILLIAMS, T.J. Interleukin-1-induced leukocyte extravasation across rat mesenteric microvessels is mediated by platelet-activating factor. *Blood.*, 85: 2553 - 2558, 1995.
- 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.
- OPAL, S.M., DEPALO, V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 117: 1162 - 1172, 2000.
- PAN, Z.K., YE, R.D., CHRISTIANSEN, S.C., JAGELS, M.A., BOKOCH, G.M., ZURAW, B.L. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1 β gene expression in cultured human epithelial cells. *J. Immunol*. 160: 3038 – 3045, 1998.
- PAN, Z.K., YE, R.D., CHRISTIANSEN, S.C., PTASZNIK, A. ZURAW, B.L. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for bradykinin stimulation of NF- κ B activation in cultured human epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 274: 9918 - 9922, 1999.

- PAUL, A., WILSON, S., BELHAM, C.M., ROBINSON, C.J., SCOTT, P.H., GOULD, G.W., PLEVIN, R. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.*, 9, 403 - 410, 1997.
- PERKINS, M.N., CAMPBELL, E, DRAY, A. Antinociceptive 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., ARAUJO, R.C., HEPPENSTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA JR, J.A., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8140 - 8145, 2000.
- 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.
- PHAGOO, S.B., POOLE, S., LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Auto-regulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 56: 325 - 333, 1999.
- PHAGOO, S.B., REDDI, K., ANDERSON, K.D., LEEB-LUNDBERG, L.M. WARBURTON, D. Bradykinin B₁ receptor up-regulation by interleukin-1 β agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 77 - 85, 2001.
- PHAGOO, S.B., YAQOUB, M., MCINTYRE, P., JONES, C., BURGESS, G.M. Cytokines increase B₁ bradykinin receptor mRNA and protein levels in human lung fibroblasts. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 43S, 1997.

- PHAGOO, S.B., YAQOOB, M., HERRERA-MARTINEZ, E., MCINTYRE, P., JONES, C., BURGESS, G.M. Regulation of bradykinin receptor gene expression in human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* 397: 237 - 246, 2000.
- PINHEIRO, R.M., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms involved in the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in the rat pleural cavity. *Inflamm. Res.* In Press., 2001.
- POOLE, S., CUNHA, F.Q., SELKIRK, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br. J. Pharmacol.* 115: 684 - 688, 1995.
- POWELL, 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.
- PRAT, A., WEINRIB, L., BECHER, B., POIRIER, J., DUQUETTE, P., COUTURE, R., ANTEL, J.P. Bradykinin B₁ receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. *Neurology.* 53: 2087 - 2092.
- PRIBRAM, H., HERNHEISER, G. Zur Kennits der adialysablen Bestandteile des menschenharnes. *Biochem Z.* 111: 30, 1920.
- 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.
- PYNE, N.J., TOLAN, D., PYNE, S. Bradykinin stimulates cAMP synthesis via mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of cytosolic phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ release in airway smothth muscle. *Biochem. J.* 328: 689 - 694, 1997.
- RAO, K.M.K. MAP kinase activation in macrophages. *J. Leuk. Biol.* 69: 3 - 10, 2001.
- REGOLI, D., ALLOGHO, S.N., RIZZI, A., GOBEIL, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 1 - 10, 1998.

- 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.
- RHALEB, N.E., DION, S., BARABÉ, J., ROUISSI, N., JUKIC, D., DRAPEAU, G., REGOLI, D. Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 162: 419, 1989.
- RITCHIE, R.H., MARSH, J.D., SCHIEBINGER, R.J. Bradykinin-stimulated protein synthesis by myocytes is dependent on the MAP kinase pathway and p70^{S6K}. *Am. J. Physiol.* 276: H1393 - H1398, 1999.
- 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 tripsin. *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., FAUSSNER, A., MÜLLER-ESTERL, W. Regulation of bradykinin action at the receptor level. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: S39 - S43, 1990.
- ROTHWARF, D.M., KARIN, M. The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE.* 5: 1 - 16, 1999.
- ROSS, D., JOYNER, W.L. Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. *Endothelium.* 5, 321 - 332, 1997.

- SAIFUDEEN, Z., DU, H., DIPP, S., EL-DAHR, S.S. The bradykinin type 2 receptor is a target for p53-mediated transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 275: 15557 - 15562, 2000.
- SAKLTVALA, J., DEAN, J., FINCH, A. Protein kinase cascades in intracellular signalling by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Biochem. Soc. Symp.* 64: 63 - 67, 1999.
- SANTIAGO, J.A., GARRISON, E.A., CHAMPION, H.C., SMITH, R.E, DEL RIO, O., KADOWITZ, P.J. Analysis of responses to kallidin, DABK and DAK in feline hindlimb vascular bed. *Am. J. Physiol.* 269: H2057 - H2064, 1995.
- SARDI, S.P., ERRASTI, A.E., REY-ARES, V., ROGINES-VELO, M.P., ROTHLIN, R.P. Bradykinin B₁ receptor in isolated human umbilical vein: an experimental model of the *in vitro* up-regulation. *Acta Pharmacol. Sinica.* 21: 105 - 110, 2000.
- SARDI, S.P., PEREZ, H., ANTÚNEZ, P., ROTHLIN, R.P. Bradykinin B₁ receptors in human umbilical vein. *Eur. J. Pharmacol.* 321: 33 - 38, 1997.
- 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. Sci. USA*, 91: 4693 - 4697, 1994.
- SHAMES, B.D., MELDRUM, D.R., SELZMAN, C.H., PUIDO, E.J., CAIN, B.S., BANERJEE, A., HARKEN, A.H., MENG, X. Increased levels of myocardial I-kappa B-alpha protein promote tolerance to endotoxin. *Am. J. Physiol.*, 275: 84 - 91, 1998.
- SCHANSTRA, J. P., ARLIC, C., MARIN-CASTANO, M.B., GIROLAMI, J., BASCANDS, J. Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. *Int. J. Mol. Med.* 3: 185 - 191, 1999.
- SCHANSTRA, J. P., BATAILLÉ, E., CASTAÑO, M. E. M., BARASCUD, Y., HIRTZ, C., PESQUERO, J.B., PECHER, C., GAUTHIER, F., GIROLAMI, J-P., BASCANDS, J-L. The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-κB and induces homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 101, 2080 - 2091, 1998.

- SCHINDLER, R., MANCILA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S.C., DINARELLO, C.A. Correlation and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 e tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 75: 40 - 47, 1990.
- SCHIMIDLIN, F., SCHERRER, D., DAEFFLER, L., BERTRAND, C., LANDRY, Y., GIES, J.P. Interleukin-1 β induces bradykinin B₂ receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 53: 1009 - 1015, 1998.
- SCHNECK, K.A., HESS, J.F., STONESIFER, G.Y., RANSOM, R.W. Bradykinin B₁ receptors in rabbit aorta muscle cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.* 266: 277 - 282, 1994.
- SEROU, M.J., DECOSTER, M.A., BAZAN, N.G. Interleukin-1 β activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J. Neurosci. Res.*, 58: 593 - 598, 1999.
- SEYEDI, N., WIN, T., LANDER, H.M., LEVI, R. Bradykinin B₂-receptor activation augments norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. Mediation by autocrine/paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 81: 774 - 784, 1997.
- SHOWELL, H.J., CONKLYN, M.J., ALPERT, R., HINGORANI, G.P., WRIGHT, K.F., SMITH, M.A., STAM, E., SALTER, E.D., SCAMPOLI, D.N., MELTZER, S., REITER, L.A., KOCH, K., PISCOPIO, A.D., CORTINA, S.R., LOPEZ-ANAYA, A., PETTIPHER, E.R., MILICI, A.J., GRIFFITHS, R.J. The preclinical pharmacological profile of the potent and selective leukotriene B₄ antagonist CP 195543. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285: 946 - 954, 1998.
- SIEBECK, M., SCHORR, M., SPANNAGL, E., LEHNER, M., FRITZ, H., CHERONIS, J.C., WHALLEY, E.T. B₁ kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. *Immunopharmacology*. 40: 49 - 55, 1998.
- SOUZA, D.G., COUTINHO, S.F., SILVEIRA, M.R., CARA, D.C., TEIXEIRA, M.M. Treatment with a leukotriene B₄ receptor antagonist

inhibits local and remote reperfusion injury after transient ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 403: 121 - 314, 2000.

SRIDHAR, R., HANSON-PAINTON, O., COOPE, D.R. Protein kinases as therapeutic targets. *Pharm. Res.* 17: 1345 - 1353, 2000.

STASZEWSKA,-WOOLLEY, J., WOODMAN, O.L. Kinin receptors mediating the effects of bradykinin on the coronary circulation in anaesthetized greyhounds. *Eur. J. Pharmacol.* 196: 9 - 14, 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.

STERNBERG, E.M. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J. Endocrinol.* 169: 429 -435, 2001.

STEWART, J.M., FERREIRA, S.H., GREENE, L.J. Bradykinin-potentiating peptide Pca-Lys-Tryp-Ala-Pro. *Biochem Pharmacol.*, 20: 1557 - 1567, 1971.

STEWART, J.M., GERA, L. YORK, E.J., CHAN, D.C., BUNN, P. Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology.* 43: 155 - 161, 1999.

STYLIANOU, E., SAKLATVALA, J. Interleukin-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30: 1075 - 1079, 1998.

TAK, P.P., FIRESTEIN, G.S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107: 7 - 11, 2001.

TCHÖPE, C., HERINGER-WALTHER, S., KOCH, M., SPILLMANN, F., WENDORF, M., LEITNER, E., SCHULTEISS, H-P., WALTHER, T. Up-regulation of bradykinin B₁-receptor expression after myocardial infarction. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1537 - 1538, 2000.

TSUKAGOSHI, H., SHIMIZU, Y., HORIE, T., FUKABOI, Y., SHIMIZU, Y., IWAMAE, S., HISADA, T., ISHIKUKA, T., IIZUKA, K., DOBASHI, K., MORI, M. Regulation by interleukin-1 β of gene expression of bradykinin B₁ receptor in MH-S murine alveolar

macrophagē cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 259: 476 - 482, 1999.

THORLACIUS, H. LINDBOM, L., RAUD, J. Cytokine-induced leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles is P-selectin dependent. *Am. J. Physiol.*, 272: H1725 - H1729, 1997.

TIFFANY, C.W., BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages, *FEBS Lett.* 247: 189-192, 1989.

VAVREK, R., STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides*, 6: 161 - 164, 1985.

WALZOG, B., GAEHTGENS, P. Adhesion molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. *News. Physiol. Sci.* 15: 107 - 113. 2000.

WATANABE, M., YOSHIHARA, S., ABE, T., OYAMA, M., ARISAKA, O. Effects of the orally active non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR173657, on plasma extravasation in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 367: 373 - 378, 1999.

WEN, F.Q., WATANABE, K., YOSHIDA, M. Eicosanoid profile in culture human pulmonary artery smooth muscle cells treated with IL-1 β and TNF α . *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 59:71 - 75, 1998.

WERLE, E., GÖTZE, W., KEPLER, A. Über die Wirkung des kallikreins auf den isolierten darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem Z.* 289: 217 - 233, 1937.

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.

WHITMARSH, A.J., DAVIS, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 74, 589 - 607, 1996.

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.

YAMAKAWA, T., EGUCHI, S., YAMAKAWA, Y., MOTLEY, E.D., NUMAGUCHI, K., UTSUNOMIYA, H., INAGAMI, T. Lysophosphatidylcholine stimulates MAP kinase activity in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.*, 31, 248 - 253, 1998.

YANG, C-M., CHIEN, C-S., WANG, C-C., HSU, Y-M., CHIU, C.T., LIN, C-C., LUO, S-F. Interleukin-1 β enhances bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization in canine tracheal smooth-muscle cells: involvement of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) MAPK pathway. *Biochem. J.* 354: 439 - 446, 2001.

YANG, X., POLGAR, P. Genomic structure of the human bradykinin B₁ receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 18 - 725, 1996.

YANG, X., TAYLOR, L., POLGAR, P. Mechanisms in the transcription regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 273: 10763 - 10770, 1998.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 6: 109, 1983.

ZUZACK, J.S., BURKARD, M.R., CUADRADO, D.K., GREER, R.A., SELIG, W.M. WHALLEY, E.T. Evidence of a bradykinin B₁ receptor in human ileum: pharmacological comparison to the rabbit aorta B₁ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1337 - 1343, 1996.