

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

**O PAPEL DOS RECEPTORES B₁ DAS CININAS NA DIABETE
CAUSADA POR ESTREPTOZOTOCINA: UMA ABORDAGEM
FUNCIONAL E AUTORADIOGRÁFICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

ROSE MARI JACOBESSEN VIANNA

Florianópolis, 2003

VIANNA, Rose Mari Jacobesen. *O papel dos receptores B₁ das cininas na diabetes causada por estreptozotocina: uma abordagem funcional e autoradiográfica*. Florianópolis, 2003, 157 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto.

Defesa: 27/10/2003.

Estudo funcional (pleurisia) e molecular (autoradiografia) da expressão dos receptores B₁ na diabetes mellitus experimental induzida por estreptozotocina (STZ) em ratos. A hiperglicemia que se instala neste modelo de diabetes do tipo I é um componente importante no aumento da migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, após ativação dos receptores B₁ para as cininas na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ. O tratamento com antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ demonstraram que esta resposta inflamatória é mediada pelos receptores B₁, mas não pelos receptores B₂. No entanto, o antagonista seletivo para o receptor B₂ foi capaz de potencializar o efeito do agonista seletivo B₁ na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ, sugerindo que a bradicinina endógena através da ativação de receptores B₂ constitutivos, participa desta resposta inflamatória. O aumento da expressão dos receptores B₁ parece depender da liberação de IL-1 β de macrófagos e/ou de fibroblastos, de taquicinas das fibras C sensoriais e de histamina, em menor extensão, liberada dos mastócitos, além da estimulação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. O tratamento com anticorpo-antipolimorfonuclear foi capaz de diminuir a resposta inflamatória medida através da pleurisia e a densidade de receptores B₁ quantificada em secções de pulmão de ratos diabéticos, sugerindo a presença de receptores B₁ na superfície dos neutrófilos que migraram para o pulmão e para a cavidade pleural. Estes dados permitiram a caracterização, pela primeira vez, de receptores B₁ em neutrófilos de rato.

[diabetes mellitus],[bradicinina],[des-Arg⁹-BK], [inflamação], [autoradiografia], [IL-1 β],
[NF- κ B] [taquicinas], [histamina].

"A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós
percorremos livres e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens,
pelas quais nós devemos procurar nosso
caminho, perdidos e confusos,
de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé,
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual
nós mesmos nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente
se revelará boa para nós."

A.J. Cronin

Dedico este trabalho ao Pedro e ao Walter,
duas pessoas muito especiais que sempre estiveram ao meu lado,
sejam nos momentos prazerosos
como também naqueles difíceis desta caminhada. Este precioso apoio foi a
base para todas as minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Baptista Calixto, pela excepcional oportunidade de aprendizado, pela orientação, e pela paciência e compreensão durante um período pessoal bastante difícil durante o meu doutorado. Trabalhar ao lado do Prof. Calixto é muito mais do que adquirir conhecimento científico, é tornar-se um cientista.

Ao Prof. Dr. Réjean Couture, por me receber generosamente em seu laboratório na Universidade de Montréal e por depositar confiança em minha pessoa. Agradeço principalmente pelas inúmeras discussões, e pelo rigor científico e democrático com que orientou parte deste trabalho.

À Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau, pela amizade, apoio, troca de idéias e incentivo durante todo este período de doutoramento. Quando fazemos parte de um grupo temos a tendência a procurar nas pessoas os mesmos referenciais de amizade, companheirismo e apoio que trazemos do berço familiar. Na pessoa da prof. Rosa, querida amiga mineira, encontramos um desses pilares que são a base para qualquer formação.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Takahashi, pelo incentivo de retorno ao curso, respeito e aconselhamentos durante uma fase difícil do meu processo de doutoramento.

Ao Prof. Dr. Giles A. Rae, pela amizade, pelo incentivo e troca de idéias ao longo de todo período.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pelo apoio e avaliação.

A todos os professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia e do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo aprendizado, preocupação e empenho dispensados na minha formação e dos demais alunos. Durante o meu estágio no exterior foi possível constatar que nosso curso além de estar entre as melhores escolas de Farmacologia do país, também está no nível de boas escolas estrangeiras.

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia e do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo carinho e colaboração em todo esse período, em especial à Rita, Diana, Gorette, Sandra, ao Sr. Zeri, Sr. Zou e ao Pedro.

À Patrícia Vianna pelo carinho, colaboração e generosa assessoria.

Ao Prof. Dr. Eloir Schenkel, pelo aprendizado, pela amizade, apoio e incentivo desde o início de minha formação acadêmica e científica.

A todos os professores do Departamento de Farmácia e do seu Curso de Pós-Graduação, na sua maioria conterrâneos do nosso querido Rio Grande do Sul, pela amizade, carinho e apoio durante este período juntos na "ilha da Magia".

Especialmente à Prof.Dra.Mareni Farias e à Prof.Dra. Tânia Fröde Saleh, pela amizade, generosa colaboração, críticas, troca de idéias e sugestões durante a realização desta tese e de toda a minha formação.

A todos os colegas de mestrado e de doutorado em Farmacologia, especialmente ao Rubens, Beth, Michel, Juliano, Rodrigo, Cândida, Marien, Valfredo, Fernanda, Mônica, Maria, Daniela, Márcia, Renata, Sílvia, Jarbas, George, Nelson.

Aos colegas de iniciação científica, especialmente à Marina, Giuliano e Rodrigo.

Ao Dr. Paulo Mattozinho pela amizade, incentivo e carinho, ingredientes fundamentais na relação médico-paciente.

Ao professor de yoga Fernando José Fonseca, pela dedicação e seriedade dispensadas no ensinamento desta prática milenar de conhecimento e fortalecimento pessoal. Muito obrigado por me ensinar a procurar o remédio que me é necessário dentro de mim mesma.

Aos meus familiares, por terem me ensinado a arte de viver, de lutar para tornar sonhos em realidade e pelo carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELA	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Indução da pleurisia	32
3.3 Indução da diabetes mellitus com strepetozotocina em ratos	32
3.4 Contagem de leucócitos.....	33
3.5 Quantificação do exsudato.....	33
3.6 Autoradiografia	34
3.6.1 Preparação do tecido para a autoradiografia	34
3.6.2 Iodação do Peptídeo	34
3.6.3 Autoradiografia do receptor B ₁ para as cininas no pulmão de ratos controle e diabéticos por estreptozotocina.	35
3.6.4 Quantificação dos sítios de ligação do receptor	36
3.7 Protocolo Experimental	37

3.7.1	Perfil temporal da resposta causada pela des-Arg ⁹ -BK na cavidade pleural de ratos diabéticos por estreptozotocina.....	37
3.7.2	Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B ₁ para as cininas, sobre a resposta inflamatória aguda induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.	39
3.7.3	Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B ₂ para as cininas, na resposta inflamatória induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.....	39
3.7.4	Quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B ₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos por estreptozotocina e não diabéticos.	40
3.7.5	Efeito da insulina na pleurisia e na densidade de receptores B ₁ após injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.....	41
3.7.6	Efeito do anticorpo anti-polimorfonuclear na pleurisia e na densidade de receptor B ₁ após injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.	42
3.7.7	Efeito do IL-1ra na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.....	43

3.7.8	Efeito de inibidores do NF- κ B na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.	43
3.7.9	Efeito dos antagonistas taquicinérgicos NK ₁ ou NK ₃ na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.	44
3.7.10	Envolvimento de receptores histaminérgicos na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos estreptozotocina.....	44
3.8	Drogas.....	44
3.9	Análise estatística.....	47
4.	RESULTADOS	48
4.1	Infiltração de leucócitos induzida pela injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.	48
4.2	Efeito dose-resposta para a injeção intrapleural do agonista seletivo B ₁ em ratos diabéticos por estreptozotocina.	49
4.3	Efeito da injeção intrapleural do agonista seletivo para o receptor B ₁ em ratos controle sem tratamento prévio com STZ.....	52
4.4	Extravasamento plasmático após a injeção intrapleural do agonista seletivo do receptor B ₁ em ratos controle ou diabéticos por estreptozotocina.	53
4.5	Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B ₁ para as cininas para a resposta inflamatória aguda induzida pela injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.	55

4.6	Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B ₂ para as cininas sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	58
4.7	Quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B ₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ e não diabéticos.....	59
4.8	Efeito da insulina na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.	62
4.9	Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de carragenina em ratos não-diabéticos.	66
4.10	Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	66
4.11	Efeito do tratamento dos animais com insulina ou com o anti-PMN na quantificação dos sítios específicos de ligação do receptor B ₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ	70
4.12	Envolvimento da interleucina-1 β na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	73
4.13	Efeito da pirrolidina-ditiocarbamato (PDCT), na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	73
4.14	Efeito do N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona (TLCK), na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.	76

4.15	Envolvimento de neuropeptídeos na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	78
4.16	Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg ⁹ -BK em ratos diabéticos.....	81
5.	DISCUSSÃO	83
6.	SUMMARY AND CONCLUSIONS	112
7.	RESUMO E CONCLUSÕES	115
8.	TRABALHOS PUBLICADOS.....	119
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Perfil temporal da resposta causada pela des-Arg9-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ).

FIGURA 2 - Efeito dose-resposta da injeção intrapleural do agonista seletivo B1 em ratos diabéticos- (STZ).

FIGURA 3 -Efeito da injeção intrapleural do agonista seletivo B1 em ratos controle, sem tratamento prévio com STZ.

FIGURA 4 -Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B1 para as cininas, na resposta inflamatória induzida pela des-Arg9-BK em ratos diabéticos-(STZ).

FIGURA 5 -Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B2 para as cininas, na resposta inflamatória induzida pela des-Arg9-BK em ratos diabéticos-(STZ).

FIGURA 6 -Autorradiograma do binding do radioligante seletivo para o receptor B1, o [125I] HPP-des-Arg10-Hoe 140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ) e não diabéticos 4 h após a ativação dos receptores B1.

FIGURA 7-Quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B1 para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ) e não diabéticos.

FIGURA 8 -Efeito da insulina na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg9-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 9 -Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de carragenina em ratos não-diabéticos.

FIGURA 10- Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg9-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 11 -Autorradiograma do binding do radioligante seletivo para o receptor B1, o [125I] HPP-des-Arg10-Hoe 140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ) e não diabéticos 4 h após a ativação dos receptores B1 e tratados previamente com insulina ou com o anticorpo anti-PMN.

FIGURA 12 -Efeito do tratamento dos animais com insulina ou com anti-PMN na quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B1 para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ .

FIGURA 13- Envolvimento da interleucina-1 β na pleurisia induzida pela des-Arg9-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 14- Efeito da pirrolidina-ditiocarbamato (PDCT), na pleurisia induzida pela des-Arg9-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 15- Efeito do N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona (TLCK), na pleurisia induzida pela des-Arg9-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 16 -Envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK1, na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 17 -Envolvimento dos receptores taquicinérgicos NK3, na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

FIGURA 18 -Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

LISTA DE TABELA

TABELA 1 -Extravasamento plasmático após a injeção intrapleural do agonista seletivo B₁ em ratos controle ou diabéticos-STZ.

TABELA 2 - Valores de glicose (mmol/L) em amostras de sangue de ratos diabéticos tratados ou não com implante de insulina (2U/dia) durante 4 dias.

ESQUEMA-1 - Representação esquemática dos mecanismos fundamentais envolvidos no efeito pró-inflamatório do agonista seletivo B₁, a des-Arg⁹-BK, na cavidade pleural de ratos diabéticos - STZ.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre a bradicinina e das cininas relacionadas tiveram início a partir dos ensaios de Abelous e Bardier (1909) quando identificaram os efeitos do sistema de cininas demonstrando que uma fração da urina humana era capaz de produzir hipotensão ao ser administrada em indivíduos normais através da via endovenosa. Alguns anos depois Frey (1926), obteve o mesmo resultado em coelhos e em cães. Este componente com efeito hipotensor isolado da urina humana, foi então denominado de *substância F* (Frey e Kraut, 1928). Em seguida, Kraut et al. (1930) identificaram altas concentrações desta substância hipotensora no pâncreas que passou a ser denominada de *calicreína* (derivado do Grego *kallikreas* = pâncreas).

Em 1937, Werle e colaboradores demonstraram que a incubação da calicreína com plasma produzia uma substância contrátil a partir de um precursor inativo. Alguns anos mais tarde, Maurício Oscar da Rocha e Silva e colaboradores (1949) investigaram os efeitos farmacológicos do veneno proveniente da *Bothrops jararaca*, e mostraram que a incubação deste ou da tripsina com a fração da pseudoglobulina do plasma, resultou na liberação de uma substância com ações vasodilatadoras e estimulante da musculatura lisa. Os autores verificaram que no íleo isolado de cobaia, esta substância produzia contração lenta quando comparada com as respostas obtidas para a

histamina e a acetilcolina. Esta substância ativa foi identificada como de natureza polipeptídica formada a partir da proteólise controlada da fração α^2 -globulina do plasma pela ação do veneno e da tripsina e recebeu o nome de bradicinina (BK) (derivado do Grego, bradys= lento, e kinein= movimento) (Rocha e Silva et al., 1949). A partir desta descoberta, bradicinina e seus metabólitos ativos vêm sendo amplamente estudados.

A calidina ou lisil-bradicinina, é um peptídeo endógeno que apresenta homologia com a seqüência de aminoácidos da bradicinina: $Arg^1-Pro^2-Pro^3-Gly^4-Phe^5-Ser^6-Pro^7-Phe^8-Arg^9$. Estas cininas são formadas a partir da hidrólise controlada de seus precursores protéicos denominados de cininogênios. Em mamíferos, já foram descritas três formas de cininogênios que diferem entre si pelo peso molecular, estrutura e função. O maior é o cininogênio de alto peso molecular (do inglês HMWK) com massa de 88 a 115 kDa, dependendo da espécie. Outra forma de cininogênio chamado de baixo peso molecular (do inglês LMWK) tem variação de massa entre 50 a 68 kDa. A terceira forma, o T- cininogênio com peso molecular de 68 kDa foi identificado somente no rato. A hidrólise do cininogênio é realizada por um grupo de enzimas proteolíticas, denominadas calicreínas, que estão presentes em muitos tecidos e fluídos corporais (Burch et al., 1990; Bhoola et al., 1992). As calicreínas são serino-proteases e estão divididas em dois grupos de

enzimas codificadas por diferentes genes: as que estão presentes no plasma e as que estão presentes nos tecidos e glândulas. Essas enzimas diferem entre si seja pelo peso molecular, ou em função da especificidade do substrato, ou pelo tipo de cinina liberada, pelas características imunológicas, ou ainda pela função que desempenham. A pré-caliceína é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos hepatócitos, e circula no plasma formando um complexo com o cininogênio (HMWK) (Chung et al. 1986, Kaplan e Silverberg, 1987). Esta glicoproteína também circula no plasma ligada à superfície externa da membrana do neutrófilo (Bhoola et al., 1992; Henderson et al., 1994). Quando o fator de Hageman é ativado, seja pela interação com a membrana do neutrófilo ou com a membrana do endotélio, ou ainda, pela ligação com moléculas carregadas negativamente da superfície dos tecidos, ocorre a conversão enzimática da pré-caliceína em caliceína, resultando na formação de cininas a partir dos cininogênios (Bhoola et al., 1992, Hermann et al., 1999). Já foram identificadas duas regiões de ligação na pré-caliceína para o cininogênio (HMWK) e estão localizadas nos domínios A1 e A4 da enzima. Mais recentemente, foi identificada uma terceira região, o domínio A2, tendo sido caracterizada como uma importante região de descontinuidade da plataforma de ligação para o cininogênio (HMWK) na cadeia pesada da pré-caliceína (Hock et al., 1990, Herwald et al., 1996).

Uma vez ativada no plasma, a ação da caliceína é modulada principalmente pelo inibidor C1, formando um complexo estequiométrico de 1:1 molar com o cininogênio (HMWK). A α_2 -macroglobulina, a antitrombina III, e a proteína C são também responsáveis pela inibição da atividade proteolítica da caliceína (Schapira et al., 1982, Gigli et al., 1970).

Por outro lado, a caliceína presente nas glândulas e nos tecidos, também denominada de caliceína verdadeira, é uma glicoproteína ácida que apresenta alta especificidade pelos substratos polipeptídicos. A principal função desta enzima é a de hidrolisar o cininogênio de baixo peso molecular e liberar a lisil-bradicinina ou calidina: Lys¹-Arg²-Pro³-Pro⁴-Gly⁵-Phe⁶-Ser⁷-Pro⁸-Phe⁹-Arg¹⁰-OH. As caliceínas pertencem a uma família multigênica que apresentam diferentes padrões de expressão de genes específicos para cada tecido. Já foi descrita a presença do mRNA da caliceína em células da musculatura lisa não vascular, em artérias e veias no rato (para revisão ver: Blais et al., 2000, Bhoola et al., 2001).

A bradicinina e a lisil-bradicinina quando produzidas são rapidamente degradadas por metalo-peptidases denominadas genericamente de cininases. Estas enzimas tem uma característica em comum, requerem o Zn no sítio catalítico para hidrolizar o seu substrato. As cininases I estão representadas pelas carboxipeptidases N, presente no plasma e a carboxipeptidase M que é

encontrada ligada à membrana. A carboxipeptidase N é sintetizada pelo fígado e liberada na circulação como um complexo glicoprotéico tetramérico de 280 kDa. Esta enzima é capaz de remover preferencialmente o aminoácido (aa) Arg da porção C-terminal da molécula da bradicinina gerando no sangue o seu metabólito ativo, a des-Arg⁹-bradicinina. Por outro lado, a carboxipeptidase M está firmemente ligada à membrana celular através do glicosilfosfatidilinositol, e está presente também no plasma e no endotélio. Esta cininase tem a propriedade de retirar o aa Arg¹⁰ da porção C-terminal da molécula da lisil-bradicinina gerando nos tecidos o metabólito ativo, a des-Arg¹⁰-calidina. Por outro lado, a cininase II, também denominada de enzima conversora de angiotensina (do inglês, ACE), é encontrada em maior abundância no endotélio vascular, onde age sobre as cininas como uma dipeptidil carboxipeptidase, removendo o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ da porção C-terminal. Em seguida, hidrolisa a molécula no dipeptídeo Phe⁵-Ser⁶ da bradicinina (1-7) produzindo um segundo dipeptídeo Ser⁶-Pro⁷ e gerando a bradicinina (1-5) como metabólito final, que é inativo. Além disso, a ACE também degrada a des-Arg⁹-BK removendo o tripeptídeo Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸.

Outras metalo-peptidases importantes que atuam sobre as cininas são a endopeptidase neutra 24.11 (NEP) e a aminopeptidase P (APP). A endopeptidase neutra 24.11, amplamente distribuída nos tecidos, é capaz de

quebrar a ligação Pro⁷-Phe⁸- da porção C-terminal da bradicinina liberando o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹. Enquanto a aminopeptidase P (do inglês APP) que está presente na membrana celular, no plasma, nos rins e nos pulmões, cataliza a remoção da Pro² da porção N-terminal (para revisão ver: Blais et al., 2000; Couture e Lindsey, 2000). Marceau e colaboradores (1981) demonstraram que a incubação da bradicinina com o plasma humano, de rato ou de coelho leva à rápida diminuição da atividade da bradicinina e ao aumento da atividade da des-Arg⁹-BK sugerindo que a cininase I está presente no plasma destas três espécies.

As cininas têm participação importante em vários processos fisiopatológicos como por exemplo no controle da pressão sanguínea, da contração e do relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, e no aumento da permeabilidade vascular. Estes peptídeos participam de processos inflamatórios e da dor (para revisão ver: Calixto et al., 2000, 2001). Além disso, as cininas podem também estar envolvidas com a inflamação neurogênica através da ativação de fibras C sensoriais, e consequente liberação de substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Geppetti, 1993, Vianna e Calixto, 1998, Cao et al., 2000). Durante uma resposta inflamatória ou em uma lesão tecidual, ocorre a produção de bradicinina que é conhecida como um dos mais potentes mediadores

inflamatórios (Regoli e Barabé, 1980). Ela pode exercer seus efeitos indiretamente através da liberação de prostaglandinas, de citocinas, de óxido nítrico, taucinininas, produtos derivados dos mastócitos, após estimulação de receptores B₂ presentes em neurônios sensoriais, em células endoteliais, em células imunes ou em fibroblastos (Dray e Perkins, 1997, Marceau e Bachvarov, 1998a).

As cininas exercem seus efeitos biológicos através da ativação de dois receptores de membrana denominados B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980; Marceau et al., 1998b). Enquanto as cininas são agonistas endógenos que preferencialmente ligam-se ao receptor B₂ os seus metabólitos ativos, a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina, são preferencialmente agonistas para o receptor B₁. Vários mecanismos de transdução de sinal têm sido descritos para as cininas que diferem dependendo do tipo celular. Estes mecanismos incluem entre outros, a ativação da fosfolipase A₂, C e D com subsequente liberação de prostaglandinas, óxido nítrico, fosfatidil inositol e diacilglicerol dos fosfolípídeos de membrana, que por sua vez causam mobilização do cálcio intracelular [Ca⁺²]_i e ativação de várias isoformas de proteína quinase C (para revisão ver: Marceau et al., 1998b; Larrivéé et al., 1998; Couture e Lindsey, 2000; Calixto et al., 2000; Calixto et al., 2001; Prado et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrado que a estimulação dos receptores B₁ e B₂ para as cininas pode produzir ativação de uma via alternativa de transdução de sinal representada pela fosforilação de algumas quinases como a tirosina-quinase, quinase ativada por mitógeno, proteína quinase ribossomal S6 e fosfatidilinositol-3-quinase (Liebmann, et al., 2000, 2001, Blaukat et al., 2001).

Os genes para estes receptores das cininas foram clonados em humanos, e em várias espécies animais, e os seus resíduos de aminoácidos indicam que ambos os receptores B₁ e B₂ possuem sete hélices de domínio transmembrana. Esta é uma estrutura comum para todos os membros da superfamília de receptores ligados à proteína-G. O gene que codifica o receptor B₂ já foi clonado em humano, em rato, camundongo, porco, coelho, cobaia e no cão, mostrando aproximadamente 80% de identidade na seqüência de aminoácidos entre estas espécies (McIntyre et al, 1997; Hess et al., 1994; Pesquero et al., 1994; Bachvarov et al., 1995; Ni et al., 1998; Hess et al., 2001). A seqüência de aminoácidos do receptor B₂ humano têm 81 % de identidade com a do receptor B₂ no rato (McEachern et al., 1991). O gene para o receptor B₂ em humano (Ma et al., 1994a), no camundongo (Ma et al., 1994b) e no rato (Wang et al., 1994) consiste de três éxons separados por dois íntrons, e a região codificadora está localizada no terceiro éxon (Krammerer,

et al., 1995). Além disso, o gene para o receptor B₂ contém dois sítios de ligação para a proteína p53 (supressora de tumor), a qual regula a transcrição da expressão deste receptor (Schmidlin et al., 2000).

Por sua vez, o receptor B₁ foi clonado na espécie humana, no rato, coelho, camundongo e no cão (MacNeil et al., 1995; Pesquero et al., 1996; Hess et al., 1992; Hess et al., 2001). O gene para o receptor B₁ humano contém três éxons separados por dois íntrons, e sua região promotora está localizada no terceiro éxon (Yang e Polgar, 1996).

Os estudos que comparam os genes para o receptor B₁ em várias espécies como o coelho, camundongo, rato e cão demonstram uma homologia de 69 a 89% na sequência de aminoácidos entre estas espécies (MacNeil et al., 1995; Pesquero et al., 1996; Hess et al., 2001). Por outro lado, a comparação entre a sequência de aminoácidos para o receptor B₁ (353 aa) com a sequência de aminoácidos para o receptor B₂ (364 aa) em humanos, resulta somente em 36% de homologia (Hess et al., 1992). Entretanto, essa semelhança entre o receptor B₂ (366 aa) e o receptor B₁ (334 aa) em camundongos é ainda menor, somente 30% (Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996). Os receptores B₁ e B₂ para as cininas em humanos estão ambos localizados no cromossoma 14q32 o que sugere a existência de uma

regulação coordenada entre os dois tipos de receptores (Bachvarov et al., 1996; Chai et al., 1996; Yang e Polgar, 1996; Ma et al., 1994b).

A afinidade do receptor B₁ pela des-Arg⁹-BK e pela des-Arg¹⁰-calidina varia conforme a espécie. Evidências farmacológicas sugerem que o receptor B₁ encontrado em cão, rato, camundongo, é diferente do receptor B₁ encontrado em humano, coelho e porco, que apresentam preferência para o agonista des-Arg¹⁰-calidina e pelo antagonista Lys-[Leu⁸]-des-Arg⁹-bradicinina (Regoli et al., 2001; Hess et al., 2001). O receptor B₁ de coelho apresenta 150 vezes menor afinidade para a des-Arg⁹-BK do que para a des-Arg¹⁰-calidina. Entretanto, o receptor B₁ no camundongo, que possui 73% de homologia com o de coelho, possui 3 vezes maior afinidade para a des-Arg⁹-BK do que pela des-Arg¹⁰-calidina (Prado et al., 2002).

A existência de dois subtipos de receptores, B₁ e B₂ para as cininas foi inicialmente confirmada através do uso de agonistas e de antagonistas seletivos para ambos os receptores, e posteriormente através de estudos de *binding*, de clonagem do gene e de estudos da expressão do receptor (Calixto et al., 2000, Calixto et al., 2001, Couture et al., 2000).

Os primeiros antagonistas seletivos para o receptor B₁ foram sintetizados por Regoli e colaboradores (1977), quando substituíram a fenilalanina por um aminoácido alifático (leucina) na posição oito na

seqüência da des-Arg⁹-BK, gerando a Lys-[Leu⁸]-des-Arg⁹-BK e a [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK. Estes compostos ainda continuam sendo os antagonistas mais potentes e específicos para o receptor B₁, embora apresentem atividade de agonista parcial em alguns tecidos (Regoli et al., 1998). Com a estrutura baseada no protótipo [D-Phe⁷]-BK (Vavrek e Stuart,1985), foi possível obter os primeiros antagonistas seletivos e competitivos para os receptores B₂. Posteriormente, foi desenvolvida uma segunda geração de antagonistas B₂ com origem na estrutura química D-Arg-[Hip³, Tic⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (HOE 140) (Hock et al., 1991; Wirth et al., 1991). Ainda, nesta mesma classe de antagonistas foram desenvolvidos o NPC 17731 e o NPC 17761 (Kyle et al., 1991). Após o aparecimento destes compostos, outros antagonistas para o receptor B₂ foram desenvolvidos, porém com características de compostos não-peptídicos além de seletivos para os receptores B₂, incluem-se nesta classe: o WIN 64338, o FR 173657, o FR 167344, o NPC 18884 e a *bradyzide*. Estes antagonistas são bastante efetivos em vários modelos experimentais em roedores quando administrados por via oral, seja no modelo de broncoconstrição, de dor e de inflamação (Sawutz et al., 1994; Asano et al., 1997; Griesbacher et al.,1998; Saleh et al., 1998; de Campos et al., 1999; Watanabe et al., 1998; Burgess et al., 2000; Griesbacher e Legat, 2000). Além disso, derivados da *bradyzide* com maior hidrofobicidade são antagonistas

não-peptídicos com alta afinidade para o receptor B₂ humano (Dziadulewicz et al., 2002). Vale ainda destacar que já existe um novo agonista não-peptídico seletivo para os receptores B₂ das cininas, o FR 190997 (Gobeil et al., 1999). Esta nova molécula é capaz de ativar os receptores B₂ de coelhos e cobaias, causando hipotensão. Entretanto, o FR 190997 mostrou um perfil farmacológico diferente em outras preparações, agindo como agonista parcial na veia umbilical humana e na veia jugular de coelho, e como antagonista seletivo na artéria coronária de suínos (Rizzi et al., 1999). Este fato foi confirmado através de estudos de mutação pontual com receptores B₂ expressos em células CHO que demonstram diferenças entre os sítios de interação do receptor com a bradicinina e o FR190997 (Bellucci et al., 2003).

Amplios progressos têm sido feitos com os antagonistas B₁ com o aparecimento do R-715 e do B9958, os quais são antagonistas bastante seletivos para o receptor B₁ em humanos e em coelhos. Estes peptídeos mostram maior resistência à degradação pelas peptidases e possuem pequena atividade agonística residual em receptores B₁ do rato e do camundongo (Regoli et al., 1998).

Recentemente, compostos derivados das classes das benzodiazepinas e da dihidroxiquinolina foram descritos como os primeiros antagonistas não-peptídicos com alta seletividade para o receptor B₁. Estes antagonistas

possuem alta afinidade na ordem de subnanomolar para os receptores B₁ humanos ou de coelhos, mas apresentam baixa afinidade para os receptores B₁ de cães ou roedores. Ambas as classes de substâncias possuem efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória em coelhos quando administrados por via oral (Su et al., 2003; Wood et al., 2003). O desenvolvimento destes antagonistas não-peptídicos para os receptores B₁ são de importância fundamental para confirmar e entender a participação deste receptor em processos fisiopatológicos, bem como o potencial terapêutico deste grupo de drogas.

Os estudos conduzidos com as cininas marcadas continuam sendo de grande utilidade, já que os peptídeos utilizados atualmente apresentam alta atividade específica por seus respectivos receptores. Até o momento, foram realizados estudos de *binding* para os receptores B₂ em preparações teciduais ou culturas celulares distintas, tais como: duodeno 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). 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 primeiros estudos realizados por Barabé e

colaboradores (1982), com análogos da des-Arg⁹-BK marcada com trício [³H]-[des-Arg⁹]-BK foram limitados. Dez anos depois o ligante Lys-(³H)Pro1, des-Arg⁹-BK foi usado para caracterizar receptores B₁ em células mesangiais de rato. Este mesmo ligante foi também utilizado para identificar receptores B₁ em macrófagos RAW264.7 (Burch e Kyle, 1992). A distribuição de sítios de ligação específica para os receptores B₁, e especialmente para os receptores B₂, tem sido determinada através da técnica de autoradiografia utilizando radioligantes específicos para os receptores das cininas (Lopes et al., 1995; Murone et al, 1997; Couture et al., 2001; Cloutier et al., 2002). Estes estudos são vantajosos para a determinação da localização dos receptores cininérgicos em estruturas específicas do sistema nervoso central (SNC) (Couture e Lindsey, 2000), embora a utilização dessa técnica tenha sido descrita para a determinação da densidade de receptores em tecidos periféricos como na retina de ratos diabéticos (Abdouh et al., 2003) ou na epiderme de indivíduos normais (Shremmer-Danninger et al., 1995).

A maior parte dos estudos mostram que o receptor B₂ é encontrado na sua forma constitutiva funcional (para revisão ver: Böckmann e Paegelow, 2000; Calixto et al., 2000; 2001), porém alguns autores mostram que este subtipo de receptor para as cininas também pode ser induzido pela ação de

citocinas, através de um processo parcialmente mediado pela proteína quinase ativada por mitógeno p38 e pela proteína quinase A (Haddad et al., 2000).

No entanto, o receptor B_1 que em geral é encontrado de forma induzida, já foi caracterizado de forma constitutiva e funcional em vários tecidos com por exemplo: no sistema cardiovascular em cães (Nakhostine et al., 1993; Lamontagne et al., 1996), em tecidos periféricos em camundongos (ducto deferente, estômago, pulmões) (Mass et al., 1995; Nsa Allogho et al., 1995; Vianna e Calixto, 1998), no corno dorsal da medula espinhal (Wotherspoon et al., 2000; Couture e Lindsey, 2000), e em neurônios sensoriais (Ma et al., 2000; Ferreira et al. 2001, 2002). Está descrito na literatura que a expressão basal de receptores B_1 causa aumento da indução de colágeno em resposta à des-Arg⁹-BK (Ricupero et al., 2000), e migração de leucócitos para a cavidade pleural em camundongos (Vianna e Calixto, 1998).

A expressão aumentada dos receptores B_1 já foi identificada durante uma lesão tecidual, ou após vários tratamentos seja com endotoxinas, ou com citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (Marceau et al., 1995; Marceau et al., 1998a; McLean et al., 2000b, Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1996), ou com o fator agregador de plaquetas (PAF-acéter) (Fernandes et al., 2003).

A indução do receptor B_1 pelas citocinas é amplamente correlacionada com as quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinase) e pelo fator de transcrição nuclear κB (NF- κB) (Larrivéé et al., 1998; Ni et al., 1998a; Shanstra et al., 1998, Zhou et al., 1998, Campos et al., 1999; Sardi et al., 1999). Algumas diferenças existem quanto à localização do domínio de ligação do NF- κB na estrutura do receptor B_1 . Após estimulação, como por exemplo, seja por citocinas, por ativadores de proteína quinase C (PKC), bactérias ou vírus, algumas quinases específicas são capazes de fosforilar a unidade $I\kappa B\alpha$ do complexo $I\kappa B$, e do complexo p105/p65. Elas promovem a degradação rápida e completa da unidade $I\kappa B$ através de enzimas proteolíticas no citoplasma (para revisão ver: Rahman et al., 1998, Calixto et al., 2001).

A liberação do NF- κB (p65/p50) do $I\kappa B$ resulta na translocação do heterodímero ativo p65/p50 ao núcleo, onde ele liga-se a sítios específicos de regiões promotoras de genes alvos, aumentando o nível de transcrição de proteínas pró-inflamatórias como por exemplo: citocinas, enzimas (iNOS e COX-2), receptores ou moléculas de adesão, (Barnes e Adcock, 1997; Barnes e Karin, 1997; Lentsch et al., 1999; Christman et al., 1998).

Além do fator de transcrição NF- κB , outros elementos regulatórios parecem estar envolvidos com o aumento e com a diminuição da expressão do

gene para o receptor B₁. Estudos *in vivo* mostraram que a região promotora do receptor B₁ liga-se a um certo número de proteínas de ligação de seqüência específica do DNA: GATA-1, PEA3, AP-1, CAAT, Sp1, Pit-la, Oct-1 e CREB (Angers et al., 2000). A ativação de receptores B₂ é também capaz de estimular o NF-κB, o qual poderá ativar a expressão do receptor B₁ (Pan et al., 1996; Phagoo et al., 1999; Shanstra et al., 1998).

Conforme já descrito o receptor B₂ está presente nas células de forma constitutiva, e sua presença é regulada através da internalização e ressensitização. De forma diferente do receptor B₂, o receptor B₁ uma vez ativado promove a liberação persistente de fosfoinositol, sugerindo a falta de dessensibilização ou ausência de internalização e ressensitização (Austin et al., 1997; Zhou et al., 2000; Phagoo et al., 2001). A explicação para esta diferença de expressão entre os subtipos de receptores para as cininas, é que a função do receptor B₂ é controlada por mecanismos envolvendo rápida dissociação do ligante (Munoz e Leeb-Lundberg, 1992, Munoz et al., 1993; Mathis et al., 1996; Phagoo et al., 1999; Faussner et al., 1999; Marceau et al., 2001), enquanto o receptor B₁ apresenta lenta dissociação do ligante, e tem sua expressão aumentada após estar exposto por longo período ao seu agonista (Mathis et al., 1996; Austin et al., 1997; Faussner et al., 1999, Medeiros et al., 2001).

Recentemente, com o emprego de técnicas modernas de biologia molecular foi possível gerar camundongos com deleção gênica para os receptores B₁ ou B₂ para as cininas (Borkowski et al., 1995; Pesquero et al., 2000). O uso de tais animais possibilitou alcançar avanços importantes com relação a participação das cininas em processos fisiopatológicos, especialmente na dor e em estados inflamatórios. Evidências farmacológicas mostraram que as cininas estão envolvidas com o recrutamento de células inflamatórias (Ahluwalia e Perreti, 1996; Vianna e Calixto, 1998; Saleh et al., 1998; McLean et al., 2000b). Em camundongos com deleção gênica para o receptor B₁, a migração de neutrófilos para a cavidade pleural após estímulo com o agonista seletivo para o receptor B₁ foi inibida quando comparada com camundongos normais. Estes resultados mostram que o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório é mediado principalmente pelos receptores B₁ das cininas (Vianna e Calixto, 1998; Pesquero et al., 2000). Assim utilizando-se desta nova ferramenta Pesquero e colaboradores (2000) demonstraram que a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório após estímulo com a des-Arg⁹-BK não ocorre em camundongos com deleção do gene para o receptor B₁ das cininas.

De forma similar, a injeção intratecal do agonista seletivo para o receptor B₁, a des-Arg⁹-BK produziu hiperalgesia térmica em camundongos

selvagens, mas não em animais deficientes para o receptor B₁, e foi mais pronunciada em camundongos com deleção gênica para o receptor B₂, quando comparada com animais selvagens (Ferreira et al., 2001). A hipótese de que o receptor B₁ têm sua expressão aumentada após a deleção do gene para o receptor B₂ foi confirmada por Duka e colaboradores (2000) através da técnica de RT-PCR, revelando que os níveis de mRNA para o receptor B₁ são significativamente maiores do que os níveis para o receptor B₂ em camundongos com deleção gênica para o receptor B₂ quando comparados com camundongos selvagens. Além disso, a completa ausência da função dos receptores B₂ pode determinar a indução dos receptores B₁ uma vez que a resposta hiperalgésica induzida pelo agonista seletivo do receptor B₁ para as cininas foi potencializada em camundongos *knockout* para o receptor B₂, quando comparado com similar resposta observada nos animais controle (Ferreira et al., 2002).

A alteração destas duas populações de receptores induzida pelos ligantes foi demonstrada por Phagoo e colaboradores (1999), baseado em células IMR-90, onde a incubação com bradicinina suprimiu a maioria dos receptores B₂ em poucos minutos presentes em sua superfície, enquanto que os receptores B₁ tiveram sua expressão aumentada entre 2 a 3 vezes em poucas horas. Os autores também mostraram que a calidina não influenciou a

população de receptores B₂, e no entanto induziu os receptores B₁. Além disso, os agonistas seletivos para o receptor B₁ aparentemente aumentaram a expressão dos receptores B₁ através da produção autócrina de IL-1 β (Phagoo, et al., 1999). Por outro lado, a inibição da enzima conversora de angiotensina não foi capaz de induzir o aumento da expressão dos receptores B₁ em vários órgãos a nível funcional e de RNAm (Marceau, et al., 1999). Por outro lado, os receptores B₂ de coelhos, expressados em células HEK 293, são rapidamente internalizados em resposta à bradicinina, e os resultados confirmam que a endocitose foi induzida pelo agonista do receptor B₂ (Marceau et al., 2001). Outros autores demonstraram que o tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) pode induzir a expressão funcional dos receptores B₁ a nível renal e vascular, estando os receptores formados *de novo*, envolvidos com a ação hipotensiva da inibição da ECA. Porém, este mesmo tratamento não exerceu nenhum efeito sobre a expressão dos receptores B₂ em ratos (Marin-Castaño et al., 2002). Outro grupo observou que a progressiva dessensibilização do receptor B₂ e o tratamento sistêmico com lipopolissacarídeo *E. coli* é capaz de promover aumento da expressão do receptor B₁ mediando o edema de pata em ratos e a nocicepção induzida pela formalina em camundongos (Campos et al., 1995).

Todos estes estudos sugerem a possibilidade de auto-regulação da expressão dos receptores das cininas, ocorrendo um balanço entre os dois tipos de receptores, B₁ e B₂ em vários sistemas e tecidos.

Além da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB, já foi descrito na literatura que a expressão do gene para o receptor B₁ também pode ser regulada através da estabilização do mRNA. Evidências mostram que a região 3' não-traduzível participa na regulação da estabilidade do RNAm do receptor B₁ para as cininas e em última análise de sua expressão (Zhou et al., 1999). Ainda, a indução do receptor B₁ por citocinas, como a IL-1β, envolve não somente a ativação transcricional, como também aumenta a estabilidade do RNAm. O tratamento com a IL-1β mostrou ser capaz de duplicar o t_{1/2} do RNAm do receptor B₁ de 1 para 2 h em células de fibroblasto humano (IMR-90) (Zhou et al., 1998). Já foi também demonstrado que o tratamento com inibidores da síntese protéica foi capaz de aumentar a estabilidade do RNAm para o receptor B₁, bem como a resposta celular mediada por este subtipo de receptor para as cininas (Zhou et al., 1998). Estes resultados sugerem a presença de um regulador da estabilidade do RNAm pós-transcricional, que é sensível a inibidores da síntese protéica. Este fator protéico pode interagir com a região 3' não-traduzível do gene para o receptor B₁, e assim regular seletivamente a estabilidade do RNAm.

Embora o receptor B₂ esteja envolvido com a maioria dos efeitos cardinais da inflamação aguda, incluindo aumento da permeabilidade vascular, dilatação arterial e dor através da ativação de fibras C sensoriais, este receptor tem envolvimento limitado no componente celular da resposta inflamatória, ou seja, no recrutamento de leucócitos da microcirculação para o interstício (McLean et al., 2000a). Por outro lado, os efeitos pró-inflamatórios mediados pelas cininas atuando no receptor B₁ incluem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estimulação local de fibras sensoriais, e migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (Vianna & Calixto, 1998; McLean et al., 2000b, Pesquero et al., 2000).

O receptor B₁ está presente na forma constitutiva em neutrófilos de camundongos (Araújo et al., 2001), porém os agonistas deste receptor não ativam diretamente os neutrófilos *in vitro* (Ahluwalia e Perretti, 1996). Ao contrário do que acontece com os neutrófilos, os macrófagos podem liberar vários mediadores inflamatórios após estimulação pelas cininas. A bradicinina e o seu metabólito ativo a des-Arg⁹-BK, induzem liberação de citocinas como o TNF- α e a IL-1 β em linhagens de macrófagos murinos P388-D1 e RAW264.7. A produção de citocinas por parte de macrófagos foi inibida pelo antagonista do receptor B₁, a des-Arg⁹[Leu⁸]-BK (Burch et al., 1989; Tiffany e Burch, 1989), indicando que este receptor está presente na

superfície destas células. Estes resultados foram confirmados pelos experimentos de *binding* com a [³H]des-Arg¹⁰-calidina em células RAW 264.7 (Burch e Kyle, 1992). Desta forma, os macrófagos ativados são uma fonte de IL-1 β a qual pode induzir mecanismos autócrinos de ativação correlacionados com o aumento da expressão do receptor B₁. Em outros experimentos, macrófagos murinos alveolares da linhagem MH-S, a IL-1 β é capaz de induzir a transcrição do mRNA do receptor B₁ e a expressão da proteína (Tsukagoshi et al., 1999).

Em condições patológicas, o receptor B₁ é induzido e está descrito na literatura como sendo um dos principais mediadores das respostas inflamatórias das cininas após ativação pelo metabólito biologicamente ativo da bradicinina, a des-Arg⁹-BK que está aumentado no sítio inflamatório (Raymond et al., 1995; Décarie et al., 1996b). Além disso, já foi demonstrado que a ativação crônica do receptor B₁ pode ser amplificada pelo acúmulo de des-Arg⁹-BK no sítio inflamatório porque a meia-vida deste metabólito ativo da bradicinina é de 4 a 12 vezes maior do que a da BK (Décarie et al., 1996a; Marceau et al., 1998). Em alguns modelos experimentais como por exemplo o edema de pata induzido pela carragenina, os níveis de des-Arg⁹-BK são de 1.3 a 5 vezes maiores do que os da bradicinina (Burch e deHass, 1990; Décarie et al., 1996b).

O receptor B_1 está envolvido na liberação de vários mediadores inflamatórios como citocinas, peptídeos quimiotáticos e leucotrienos por parte de macrófagos (Tiffany e Burch, 1989; Sato et al., 1996) e em fibroblastos de pulmão (Koyama et al., 2000). Entretanto, a presença do receptor B_1 , seja na sua forma constitutiva ou induzida coexistindo com receptores B_2 constitutivos em macrófagos, é dependente da espécie, do tecido ou ainda do estágio de maturação celular (Böckmann e Paegelow, 2000).

Quando liberada, a $IL-1\beta$ é capaz de causar vários efeitos, entre eles o aumento da expressão do receptor B_1 (Marceau et al., 1998), e promover a migração de neutrófilos (Ahluwalia et al., 1996, Campos et al., 2000; McIntyre et al., 1991) através da liberação de substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) das fibras aferentes (Perretti et al., 1993; Ahluwalia e Perretti 1994). Em camundongos *knockout* para o receptor NK_1 , a injeção de $IL-1\beta$ não foi eficaz em causar a migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar (Ahluwalia et al., 1998), consistente com a participação da SP na adesão e na migração de neutrófilos (Kähler et al., 2001). A correlação entre a $IL-1\beta$ e o receptor B_1 já foi estabelecida em modelos murinos de inflamação, onde a migração de neutrófilos induzida pela $IL-1\beta$ ocorreu pelo aumento da expressão do receptor B_1 , cuja ativação causa a

liberação de substância P e de CGRP das fibras C sensoriais (Ahluwalia e Perretti, 1996; McLean et al., 2000 a,b; Ferreira, et al., 2000).

A indução dos receptores B₁ após o tratamento com uma dose única de estreptozotocina (STZ) foi demonstrada em diversos tecidos e modelos experimentais em roedores, incluindo medula espinhal (Cloutier et al., 2002), glomérulos renais (Mage et al., 2001; Christopher et al., 2002), edema de pata (Campos et al., 2001), e microvasos da retina (Abdouh et al., 2003).

A *diabetes mellitus*, também denominada de diabete do tipo 1, ou diabete dependente de insulina é uma doença autoimune que ocasiona destruição específica das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (Tisch et al., 1996). Análises imunohistológicas mostram que a maioria dos leucócitos que migram para as células β são linfócitos T. É provável que os linfócitos T diabetogênicos primeiramente encontram-se com o antígeno derivado das células β nas próprias células pancreáticas, e nos linfonodos que drenam as ilhotas de Langerhans (linfonodos pancreáticos) (Mathis et al., 2001). Com o aparecimento da diabete, as células β pancreáticas sofrem apoptose, com conseqüente redução na produção de insulina necessária para regular os níveis de glicose no sangue, resultando em hiperglicemia (para revisão ver: Mathis et al., 2001). A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula β pancreática, sendo a

glicose o secretagogo mais importante. Por outro lado, a insulina é também capaz de estimular o crescimento e a diferenciação celular, promovendo a estocagem de substratos no tecido adiposo, no fígado e nos músculos (Saltiel et al., 2001).

O modelo experimental mais utilizado para o estudo da diabetes mellitus é o tratamento de animais com estreptozotocina (STZ). A estreptozotocina, inicialmente isolada de culturas de *Streptomyces achromogenes* possui ação citotóxica altamente específica sobre as células β -pancreáticas (Rerup, 1970, Tomlinson et al., 1992; Lukié et al., 1998; Zimmet et al., 2001). O mecanismo de ação citotóxica da STZ depende da ligação da fração glicídica da droga aos glicoreceptores da célula β , permitindo, assim, ao componente nitrosouréia exercer sua ação destrutiva sobre o pâncreas. Esta ação caracteriza-se por ser de natureza trifásica, com um período inicial de hiperglicemia (2 a 4 horas), ao inibir a liberação de insulina; um período intermediário de hipoglicemia (7 a 9 horas) através da ação lesiva sobre a célula com liberação da insulina previamente estocada; e, por fim, o quadro irreversível de hiperglicemia, cerca de 24 horas após a administração (Rerup, 1970).

Várias evidências demonstram que as propriedades funcionais e mecânicas dos granulócitos são alteradas no indivíduo diabético. Os

granulócitos isolados de animais ou de pacientes diabéticos geram grandes quantidades de radicais tóxicos (Freedman et al., 1992). Além disso, a grande percentagem de neutrófilos circulantes é ativada em humanos diabéticos quando comparados com a população controle (Wierusz-Wysocka et al., 1987). Estas observações sugerem que os neutrófilos ativados predispõem indivíduos diabéticos à lesões teciduais mediadas por estas células. No início do desenvolvimento da diabetes, as anormalidades no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular se devem à hiperglicemia que se instala. Em indivíduos diabéticos a disfunção endotelial parece estar envolvida tanto com a resistência à insulina como com a hiperglicemia. A diabetes mellitus está também associada com a adesão de leucócitos na célula endotelial e com o extravasamento plasmático na isquemia de reperfusão (Panés et al., 1996).

Recentemente, foram descritas alterações na resposta edematogênica, com redução do edema envolvendo a ativação do receptor B_2 associado com o aumento da resposta mediada pelo receptor B_1 em ratos diabéticos por estreptozotocina após 8 a 10 semanas (Campos et al., 2001). A indução do receptor B_1 também está aumentada no estômago de animais diabéticos (Pheng et al., 1997). Na medula espinhal, a ativação do receptor B_1 é capaz de causar resposta vasopressora, mediada pelas prostaglandinas em ratos

diabéticos após 3 semanas da injeção de STZ (Cloutier e Couture, 2000). Deste modo, o receptor B₁ tem sua expressão aumentada em vários tecidos do sistema periférico e do sistema nervoso central, em ratos com diabetes induzida com STZ. Em camundongos diabéticos tratados com STZ, foi observada a indução funcional dos receptores B₁ em modelos de hiperalgesia térmica (Gabra e Sirois, 2003).

Assim, o estudo da ativação e da indução do receptor B₁ para as cininas no processo inflamatório durante a diabetes mellitus, proporciona um estudo interessante que permite avaliar a importância das cininas no componente celular da resposta inflamatória, bem como a regulação da expressão de receptores B₁ pela hiperglicemia. Desta forma, tais estudos podem contribuir para os avanços do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do processo inflamatório agudo desenvolvido durante doenças crônicas como é o caso da diabetes do tipo I.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar, através de estudos farmacológicos, e com o emprego da técnica de autoradiografia, a regulação dos receptores B₁ para as cininas, bem como o envolvimento da migração de neutrófilos neste processo utilizando o modelo de pleurisia induzida pelo agonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, em ratos diabéticos tratados com estreptozotocina (STZ).

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 - Caracterizar o perfil temporal da resposta inflamatória causada pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos tratados com STZ.

2.1.2 - Avaliar o possível envolvimento dos receptores B₁ e B₂ na migração celular induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ, através do emprego de antagonistas seletivos para estes receptores.

2.1.3 - Investigar o possível envolvimento da IL-1 β e do fator nuclear NF- κ B sobre a indução do receptor B₁ na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ.

2.1.4 - Analisar a participação da hiperglicemia na indução do receptor B₁ em ratos diabéticos-STZ.

2.1.5 - Avaliar o envolvimento dos receptores taquicinérgicos no componente celular da resposta inflamatória induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ.

2.1.6 - Analisar a participação dos receptores para histamina na migração celular induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ.

2.1.7 - Correlacionar o aumento funcional dos receptores B₁ na resposta inflamatória causada pela des-Arg⁹-BK através do modelo experimental de pleurisia com o número de sítios de ligação específica para os receptores B₁ em secções de pulmões através da técnica de autoradiografia em ratos diabéticos- STZ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar machos (pesando entre 200-250 g) provenientes do Charles River (St-Constant, Québec, Canada) e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Montréal (Québec -Canadá), acondicionados 2 animais por caixa e mantidos em ambiente com temperatura controlada (20 °C), umidade (53%) sob o ciclo claro-escuro de 12 h, com água e alimentação *ad libitum*. Outras etapas deste estudo foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Florianópolis -Brasil), utilizando ratos Wistar machos (pesando entre 200-250 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis-SC-Brasil), acondicionados 5 por caixa em biotério próprio do Dr. João B. Calixto com temperatura de 22 ± 2 °C , e respeitando os mesmos parâmetros estipulados anteriormente para a realização dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as indicações para os cuidados com animais de laboratório e recomendações éticas para experimentos com animais conscientes (Zimmerman, 1983).

3.2 Indução da pleurisia

A pleurisia foi induzida através da injeção intrapleural i.pl. de 100 μ l de PBS estéril (pH 7.4), contendo a des-Arg⁹-BK (10 a 100 nmol por sítio, n=6-10 por grupo experimental) administrado no lado direito da cavidade pleural do rato sob anestesia com halotano ou éter etílico. Um volume igual de salina tamponada estéril (PBS; composição em mmol/litro: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) foi injetado i.pl. nos animais controle. Depois da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, os animais foram sacrificados em diferentes períodos de tempo (1 a 48 h) por aspiração de halotano ou éter etílico. A cavidade pleural dos animais foi aberta e lavada com 2 ml de PBS (salina tamponada, pH 7,4, contendo 20 UI ml⁻¹ de heparina) e o volume foi coletado com pipeta automática (Búrigo et al., 1996).

3.3 Indução da diabetes mellitus com streptozotocina em ratos

Os animais foram tratados previamente com uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ) (65 mg.kg⁻¹), ou com o veículo (PBS), 4 dias antes da indução da pleurisia com a des-Arg⁹-BK. A concentração de glicose foi quantificada no sangue obtido através de punção da cauda dos animais. A gota de sangue foi imediatamente colocada sobre a

tira impregnada com glicose-oxidase, e em seguida inserida no medidor Accu-Check III, (Boehringer Mannheim, Germany) ou Precision Q.I.D. (Abbott Laboratories Company, Bedford, MA, 01730, USA). Os animais que apresentaram glicemia acima de 20 mM avaliados 4 dias após a injeção de STZ, foram considerados diabéticos (Cloutier et al., 2001).

3.4 Contagem de leucócitos

O número total de leucócitos foi quantificado no fluido pleural após diluição com solução de Turk (1:20), em câmara de Neubauer através de microcópio ótico. A contagem diferencial de células foi feita através da confecção de lâminas com amostras do exsudato em citocentrífuga (Cytospin 3), após coradas com Hema 3 Stain set, e posteriormente foi feita a análise em objetiva de imersão. Foi realizada a contagem de aproximadamente 100 células por lâmina, e os resultados foram expressos pelo número de cada população de células por 1 ml de exsudato.

3.5 Quantificação do exsudato

Para obtenção do volume real de exsudato, o volume total coletado da lavagem da cavidade pleural com (2 ml) de PBS, foi subtraído do volume injetado (Búrigo et al., 1996)

3.6 Autoradiografia

3.6.1 Preparação do tecido para a autoradiografia

Em outro grupo de animais imediatamente após a coleta de leucócitos da cavidade pleural, os pulmões foram retirados e congelados em 2-metilbutano à temperatura entre -45 °C a -70°C com nitrogênio líquido para os ensaios de autoradiografia. Após, foram feitas secções dos pulmões (40 µm) no sentido coronal em criostato em temperatura entre -11°C à -13°C . As secções adjacentes dos pulmões foram montadas em cinco lâminas (Fisherbrand), contendo três secções do pulmão esquerdo e do direito provenientes do mesmo animal. Destas lâminas três foram destinadas para a realização do binding total, enquanto que duas lâminas foram destinadas para o binding não-específico, e estes grupos de lâminas foram replicados por quatro vezes para cada animal. Um total de 80 lâminas (480 secções dos dois pulmões) foram obtidas de quatro ratos por grupo de tratamentos diferentes, e estas secções de pulmões foram mantidas em freezer à -80°C até a realização dos experimentos de autoradiografia.

3.6.2 Iodação do Peptídeo

A iodação do antagonista seletivo para o receptor B₁, o HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 foi feita com cloramina no Instituto de Pesquisas Clínicas de

Montréal, Canadá, de acordo com Hunter e Greenwood (1962). Foram incubados 5 µg de peptídeo com 0.05 M PBS por 30 s na presença de 0.5 mCi (18.5Mbq) de Na ¹²⁵I e 220 nmol de cloramina T em um volume total de 85 µl. O peptídeo monoiodado foi então imediatamente purificado em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em coluna C4 Vydac (0.4X250mm) (Separations Group, Hesperia, CA, USA) com 0.1% de ácido trifluoracético e acetonitrila como fase móvel. A atividade específica do peptídeo iodado foi calculada em aproximadamente 2000 c.p.m. fmol⁻¹ que leva à aproximadamente à 1212 Ci mmol⁻¹.

3.6.3 Autoradiografia do receptor B₁ para as cininas no pulmão de ratos controle e diabéticos por estreptozotocina.

Os experimentos foram realizados conforme a técnica descrita por Cloutier e colaboradores (2002) com algumas modificações. A densidade de receptores B₁ foi medida quantitativamente pela técnica de autoradiografia, usando o radioligante [¹²⁵I] HPPdesArg¹⁰-Hoe 140. Para quantificar o receptor B₁ das cininas, as lâminas com secções de pulmão foram depositadas em escorredores de lâminas e mergulhadas por 30 s em solução (25 mM) PIPES-NH₄OH tamponado (pH 7, 4, 4 °C). Em seguida as lâminas foram colocadas

em incubação durante 90 min à temperatura ambiente em PIPES (25 mM) pH 7.4 contendo: 1 mM 1,10-fenantrolina, 1 mM ditioneitol, 0,014% bacitracina, 0,1 mM captopril, 0,2% albumina bovina (livre de protease) , e 7,5 mM de cloreto de magnésio. Para determinar a ligação total foram adicionados nesta solução 150 pM de [¹²⁵I] HPPdesArg¹⁰-Hoe 140 e 150 pM de HPP-Hoe 140 , um antagonista B₂, para prevenir a ligação com o receptor B₂. Para determinar a ligação não-específica, 1 μM do peptídeo HPPdesArg¹⁰-Hoe 140 não marcado radioativamente foi adicionado à solução. Após o período de incubação, as secções de pulmão foram lavadas em solução PIPES-NH₄OH tamponado à 4 °C por três vezes consecutivas durante 4 minutos, e após mergulhadas em água destilada (4 °C) por 15 segundos para remover o excesso de sais. Após as lâminas foram acondicionadas em capela com ar corrente para secagem . As secções de pulmão após secagem foram expostas ao [³H]Hyperfilm (Amersham) na presença de [¹²⁵I] microescalas durante 3 dias. Os filmes foram revelados com revelador D-19 (Kodak) e fixado com Ektaflo (Kodak).

3.6.4 Quantificação dos sítios de ligação do receptor

Os autoradiogramas foram quantificados por densitometria utilizando o sistema de análise de imagem (MCIDTM, Imaging Research, Ontário,

Canadá). A ligação específica foi determinada por subtração da imagem digital da ligação não-específica subtraída da imagem digital da ligação total quantificadas nas secções adjacentes dos pulmões. Os resultados representam a média \pm e.p.m. das ligações específicas das secções de pulmões de quatro animais por grupo de tratamento, e são expressos pela converção da densidade dos sítios de ligação em fentomol por miligrama de tecido, através das curvas-padrão das [125 I] microescalas autoradiográficas.

3.7 Protocolo Experimental

3.7.1 Perfil temporal da resposta causada pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos por estreptozotocina.

Para verificar o influxo de células inflamatórias induzido pela injeção intrapleural (i.pl.) de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) com glicose no sangue >20 mM após 4 dias da injeção i.p. de estreptozotocina, vários grupos de animais foram sacrificados em diferentes períodos de tempo após a injeção i.pl. do agonista seletivo B₁ ou de salina (1 h até 48 h) para análise da migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais. Para observar a existência de extravasamento plasmático na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) ou não diabéticos

que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK ou de salina,, foi quantificado o exsudato pleural em diferentes períodos de tempo (1 a 12 h). Deste modo, foi observado discreto aumento da exsudação em 4 h , e um pico de 4 h para a migração de neutrófilos para a cavidade pleural em animais diabéticos-(STZ) ou não diabéticos.

A partir da caracterização do pico de neutrófilos em (4 h), e sendo este um importante parâmetro de estabelecimento do processo inflamatório agudo, escolhemos este período para a realização de todos os experimentos, ou seja, todos os animais foram sacrificados 4 h após a injeção i.pl. do agonista seletivo do receptor B₁ ou de salina.

A fim de verificar o efeito do agonista seletivo do receptor B₁ na cavidade pleural de animais controle e comparar com o grupo de animais diabéticos-(STZ), grupos de animais controle com glicose plasmática entre 5mM e 6 mM, ou seja, sem tratamento por estreptozotocina, receberam injeção intraperitoneal de salina 4 dias antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK ou somente de salina para indução da pleurisia , e foram sacrificados após (4h). Em outro grupo de ratos diabéticos-(STZ) foi realizada curva dose-resposta para o agonista seletivo do receptor B₁ (10, 50 e 100 nmol por sítio) admininstrado na cavidade pleural destes animais.

3.7.2 Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B₁ para as cininas, sobre a resposta inflamatória aguda induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Com o objetivo de caracterizar a participação do receptor B₁ para as cininas na resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. do agonista seletivo B₁, a des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ), foram utilizados antagonistas seletivos para os receptores B₁, a des-Arg¹⁰-Hoe 140 (10, 50 e 100 nmol por sítio) e o R-715 (100 nmol por sítio), sendo que ambos foram administrados 5 minutos antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio). Para avaliar o envolvimento dos receptores B₁ nos valores basais de leucócitos em animais diabéticos -(STZ) que receberam injeção i.pl. da salina, foi administrado nestes animais o R-715 (100 nmol por sítio).

3.7.3 Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B₂ para as cininas, na resposta inflamatória induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocian.

Para analisar a possível participação dos receptores B₂ na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) em animais diabéticos-(STZ), os animais receberam o antagonista seletivo para o receptor B₂, o Hoe 140 na dose de 10 nmol por sítio, 5 minutos antes da indução da pleurisia pelo

agonista seletivo do receptor B₁. Foi também utilizado o antagonista seletivo não-peptídico, o NPC18884 na dose de 10 nmol por sítio administrado 5 minutos antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK. Visando avaliar a participação do receptor B₂ na migração basal de células inflamatórias para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), o Hoe 140 (10 nmol por sítio) foi administrado 5 minutos antes da que injeção i.pl. de salina.

3.7.4 Quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos por estreptozotocina e não diabéticos.

Com o objetivo de quantificar a densidade dos sítios de ligação específica do receptor B₁ das cininas nas secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ) e não-diabéticos que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK ou de salina, foi utilizado o radioligante [¹²⁵I]-HPP-des-Arg¹⁰-Hoe 140, nos experimentos *ex vivo* utilizando a técnica de autoradiografia. Estes grupos foram denominados de (SAL+DABK) e (SAL+SAL) para os animais que receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina 4 dias antes da indução da pleurisia com injeção intrapleural (i.pl.) de des-Arg⁹-BK (50 e 100 nmol) ou salina, respectivamente, e sacrificados após 4 h. Outros grupos de animais foram denominados de (STZ+SAL) e (STZ+DABK) onde os animais

receberam injeção i.p. de estreptozotocina (65 mg.kg^{-1} i.p.) 4 dias antes da injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK (50 e 100 nmol) ou salina, respectivamente e sacrificados após 4 h.

3.7.5 Efeito da insulina na pleurisia e na densidade de receptores B₁ após injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Vizando caracterizar a participação da hiperglicemia que ocorre na diabetes mellitus, na resposta inflamatória e na quantificação dos sítios de ligação específica para o receptor B₁ em secções de pulmões, observados 4 h após a injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) em ratos diabéticos-(STZ), os animais receberam tratamento sistêmico com insulina através de implante por via subcutânea com liberação de 2 U por dia durante 4 dias. O implante de insulina foi administrado imediatamente após a injeção i.p. de estreptozotocina.

3.7.6 Efeito do anticorpo anti-polimorfonuclear na pleurisia e na densidade de receptor B₁ após injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Para observar o possível envolvimento dos neutrófilos na pleurisia e na quantificação dos sítios de ligação específica para o receptor B₁ em secções de pulmões de animais que receberam des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio), 4 h após a injeção i.pl. em ratos diabéticos-(STZ), os animais receberam injeção de 0.1 ml de solução de 1:20, conforme indicação do fabricante, do anticorpo anti-polimorfonuclear (anti-PMN), por via intrapleural, 5 minutos antes da indução da pleurisia. Esta via de administração foi escolhida após a realização de experimentos preliminares, utilizando o modelo de pleurisia induzida pela injeção i.pl. de carragenina (1%) em ratos, que causa migração de células inflamatórias para a cavidade pleural dos animais, principalmente de neutrófilos (98% dos leucócitos) 4 h após sua administração. Para tanto, testamos duas vias de administração do anti-PMN neste modelo: a via intraperitoneal (30 minutos) e a via intrapleural (5 minutos) antes da indução da pleurisia com a carragenina.

O efeito do anticorpo anti-PMN também foi observado na quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B₁ em secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ) ou não diabéticos (controle), através de

injeção i.pl. de 0.1 ml de solução 1:20 de anticorpo anti-PMN, administrado 5 minutos antes da injeção i.pl. do agonista seletivo para o receptor B₁.

3.7.7 Efeito do IL-1ra na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Para verificar a possível participação da interleucina-1 β na pleurisia induzida pelo agonista seletivo B₁ em ratos diabéticos, os animais receberam injeção i.pl. do antagonista da interleucina-1 β , o IL-1ra na dose de 1 μ g por sítio, 1 h antes da indução da pleurisia com a des-Arg⁹-BK.

3.7.8 Efeito de inibidores do NF- κ B na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Com o propósito de analisar a participação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), na indução do receptor B₁ na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ0, foram utilizados dois inibidores do NF- κ B, a pirrolidinaditiocarbamato, (PDCT) (100 mg.kg⁻¹, i.p.) (Liu, et al., 1999) e o (N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona), (TLCK) (2 mg.kg⁻¹, i.p.), ambos administrados 1 h da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio).

3.7.9 Efeito dos antagonistas taquicinérgicos NK₁ ou NK₃ na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Com o objetivo de verificar a possível participação das fibras C e liberação de neurocininas na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ), os animais receberam injeção i.pl. do antagonista seletivo taquicinérgico NK₁, o LY303870 (10 e 30 nmol por sítio) ou do antagonista seletivo taquicinérgico NK₃, o SB22220 (10 e 30 nmol por sítio), 5 minutos antes da injeção i.pl. do agonista seletivo para o receptor B₁.

3.7.10 Envolvimento de receptores histaminérgicos na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos estreptozotocina.

Para verificar a possível ativação dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ), os animais receberam por via intraperitoneal (i.p.) difenidramina (10 mg.kg⁻¹) ou cimetidina (10 mg.kg⁻¹), 30 minutos antes da indução da pleurisia através da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio).

3.8 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas neste trabalho: estreptozotocina (Zanosar) (Pharmacia & Upjohn, On, Canadá), heparina, Piperazina-N,N'-bis[ácido-2-etanosulfônico](PIPES), 1,10-fenantrolina, ditiotreitól, bacitracina,

captopril, carragenina, PBS (solução de fosfato tamponado), albumina bovina (livre de protease), PDCT (pirrolidinaditiocarbamato), TLCK (N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona), difenidramina e cimetidina, foram adquiridas da Sigma Company (St.Louis, MO, U.S.A.). O antagonista para o receptor de interleucina-1 β (IL-1 β), o IL-1ra foi adquirido da R & D Systems (MN, USA). A des-Arg⁹-BK (agonista B₁) e a des-Arg¹⁰-Hoe 140 (antagonista B₁, Wirth et al.,1991) foram adquiridos da Bachem Bioscience Inc., (King of Prússia, PA, U.S.A.). O antagonista B₁, R-715 (AcLys[D- β Nal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) (Gobeil et al., 1996) e o ligante para o receptor B₁, HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) foram sintetizados no laboratório do Dr. Domenico Regoli (Departamento de Farmacologia da Univerdade de Sherbrooke, Sherbrooke, Canadá). O antagonista B₂, Hoe 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) (Hock et al., 1991) foi obtido da Aventis Pharma Deutschland GmbH. O antagonista B₂ não peptídico NPC 18884 (Chakravarty et al., 1996) foi sintetizado e obtido da Scios Nova (Sunnyvale, CA, U.S.A.) . O implante de insulina bovina foi adquirido da LinShin Canada Inc. (Scarborough, ON, Canadá). O anti-soro de coelho (Cat number AI-AD51140), anti - polimorfonuclear (PMN) neutrófilos para ratos, foi adquirido da Accurate Chemical & Scientific Corp. , NY, U.S.A. O corante (Hema 3 Stain Set) para

coloração das lâminas foi adquirido da Biochemical Sciences Inc. O antagonista taquicinérgico NK₁ LY 303870 (R-1[N-(2-methoxybenzyl)acetyl-amino]-3-(1H-indol-3-yl)-2-[N-(2-(4-peperidin-1-yl) (peperidin-1-yl) acetyl)amino]-propane), foi fornecido pela Eli Lilly & Company Indianápolis, IN, USA) e o antagonista taquicinérgico NK₃ SB222200[(S)-(-)-N-(α -ethyl-benzyl)-3-methyl-2-phenylquinoline-4 carboxamide] foi fornecido pela (Glaxo Smith Kline, PA, USA). Esses peptídeos foram previamente dissolvidos em dimetilssulfóxido 0.5% e estocados em tubos de Eppendorffes de polietileno siliconizados. As demais drogas foram preparadas extemporaneamente com solução de PBS estéril. Para verificar a quantidade de glicose nas amostras de sangue dos animais, foram utilizadas fitas testes impregnadas com glicose-oxidase e inseridas em medidor de glicose da Accu-Check III, Boehringer Mannheim, German. As soluções estoques de todos os peptídeos foram preparadas com PBS estéril. A maioria das drogas foi mantida à -18 °C em soluções -estoque e diluídas conforme a concentração desejada imediatamente antes do uso. As demais drogas utilizadas neste trabalho foram preparadas para cada experimento com solução estéril de PBS. As microescales (20 μ m) autoradiográficas [¹²⁵I] e o [³H]-hiperfilme (24X30 cm) foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech, Canadá.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A significância estatística entre os diferentes grupos foi analisada pelo Student's t-teste. Para comparações múltiplas com o mesmo grupo controle, a significância estatística foi realizada pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de teste Dunnett ou Newmann Keuls quando necessário. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Infiltração de leucócitos induzida pela injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina.

A Figura-1 mostra que a injeção intrapleural (i.pl.) do agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK (DABK), (100 nmol por sítio) foi capaz de causar resposta inflamatória caracterizada pela migração de leucócitos (mononucleares e neutrófilos) para a cavidade pleural em ratos pré-tratados com estreptozotocina (STZ) (65 mg.Kg⁻¹, i.p.) 4 dias antes da indução da pleurisia . Assim, a infiltração de neutrófilos para a cavidade pleural, alcançou o pico de 4 h após a injeção do agonista seletivo para o receptor B₁ (P<0,001), e retornou aos valores normais 8-12 h após. O influxo de neutrófilos correspondeu a 20,0± 5,0% do total de células que migrou para a cavidade pleural em resposta à des-Arg⁹-BK, enquanto que as células mononucleares (macrófagos e linfócitos) representam os restantes 80,0±3,0% . As células mononucleares migraram de forma significativa a partir de 1 h com um pico máximo em 8 h após a injeção do agonista B₁, permanecendo elevado por até 24 h após (P<0,01). A migração de células mononucleares retornou ao valor basal 48 h após a injeção de des-Arg⁹-BK. Após a

caracterização do perfil temporal da migração das células inflamatórias após injeção do agonista seletivo para o receptor B₁ para a cavidade pleural de ratos diabéticos -STZ, escolhemos o pico de 4 h (pico da migração de neutrófilos) para a realização dos experimentos subsequentes.

4.2 Efeito dose-resposta para a injeção intrapleural do agonista seletivo B₁ em ratos diabéticos por estreptozotocina.

A injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK nas doses de 50 e 100 nmol por sítio, foram capazes de aumentar a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos ratos diabéticos -(STZ) de maneira significativa e dose-dependente (P<0,001), 4 h após a injeção i.pl. do agonista seletivo do receptor B₁, quando comparado aos valores do grupo de animais diabéticos-STZ que receberam injeção i.pl. de salina. Por outro lado, a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK na dose de 10 nmol por sítio não causou alteração na migração de polimorfonucleares. O aumento das células mononucleares foi máximo na dose de 50 nmol por sítio e foi significativo na dose de 10 nmol por sítio (Figura-2).

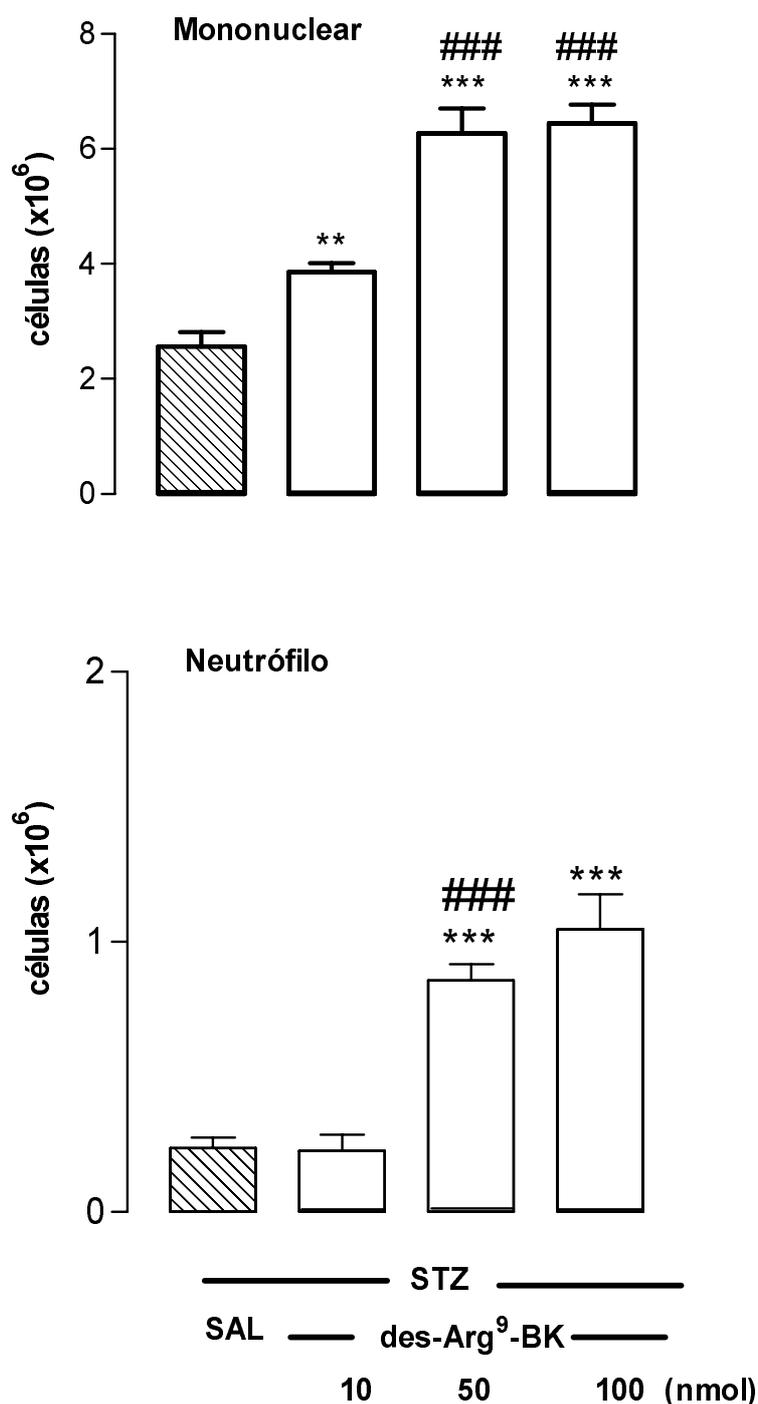


Figura-2 Migração de células A) mononucleares, e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (10-100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos (STZ), (glicose sanguínea > 20 mM). O grupo controle recebeu injeção i.pl. de salina estéril. Os dados representam a média \pm o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de ANOVA de uma via e post-hoc Newmann Keuls indicado por ***P<0.001, ** P < 0.01 em relação ao controle e ###P<0.001, #, P < 0.01 entre os grupos.

4.3 Efeito da injeção intrapleural do agonista seletivo para o receptor B₁ em ratos controle sem tratamento prévio com STZ.

Neste trabalho observamos que a migração de leucócitos (mononucleares e neutrófilos) também foi aumentada em animais controle não diabéticos, ou seja, ratos da mesma espécie que não receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina. Neste grupo de animais a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) grupo (SAL+DABK), causou aumento do influxo de células inflamatórias, compreendendo mononucleares e neutrófilos (P<0,001), quando comparado com o respectivo grupo controle, ou seja, animais que receberam a injeção i.p. e a injeção i.pl. de salina (SAL+SAL). Por outro lado, a migração de células mononucleares e de neutrófilos causada pelo agonista seletivo do receptor B₁ no grupo (SAL+DABK) foi significativamente menor (P<0,01) do que a migração causada pela des-Arg⁹-BK, nos animais diabéticos grupo (STZ+DABK). Os valores basais dos leucócitos quantificados na cavidade pleural dos animais que não receberam injeção i.pl. (células residentes) foram: mononucleares ($2,05 \pm 0,30 \times 10^6$) e para neutrófilos (0,0) em ratos controle, enquanto que para os animais que receberam tratamento prévio com STZ foram: mononucleares ($2,62 \pm 0,20 \times 10^6$) e neutrófilos ($0,25 \pm 0,10 \times 10^6$). Estes valores não foram significativamente diferentes quando estes grupos de animais receberam

apenas injeção i.pl. de salina. Os valores do grupo (STZ+SAL) para células mononucleares foram similares aos do grupo (SAL+DABK). Entretanto, com relação aos neutrófilos, os valores foram significativamente maiores nos animais diabéticos ($P < 0,01$), (Figura-3).

4.4 Extravasamento plasmático após a injeção intrapleural do agonista seletivo do receptor B_1 em ratos controle ou diabéticos por estreptozotocina.

Os resultados da Tabela-1 mostram que a injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK aumentou a permeabilidade vascular na cavidade pleural nos animais controle (0 a 1h em $100 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ até 4 h, $P < 0,05$) e para os animais diabéticos-STZ (0 a 1h em $200 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ (1 até 4 h) e $100 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ até 8 h, $P < 0,001$). Embora a injeção de salina não tenha produzido extravasamento plasmático nos animais controle, foi observado aumento de $100 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ em 4 h e 8 h após a injeção de salina em ratos diabéticos-STZ ($P < 0,05$).

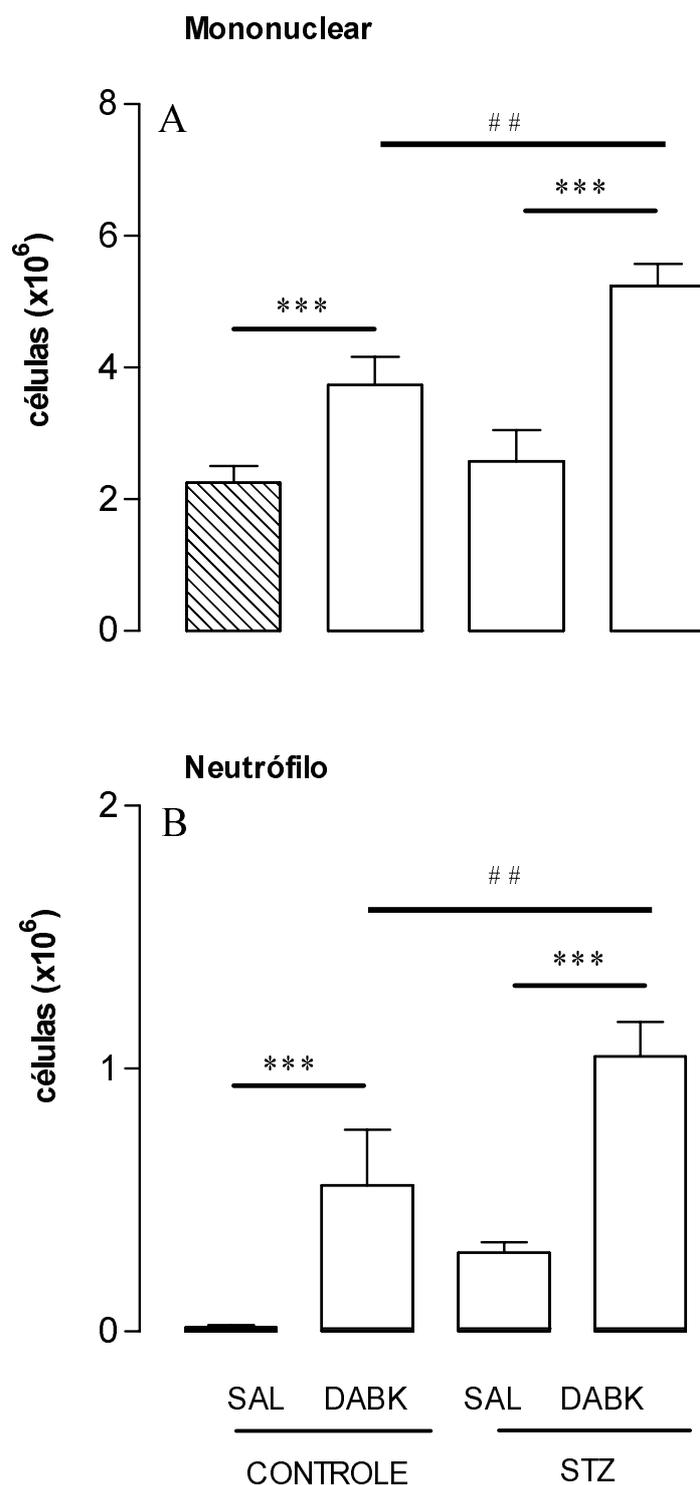


Figura-3 Migração de células A) mononucleares, e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), (glicose sanguínea > 20 mM) ou em animais normais (glicose sanguínea= 5.8 mM). Os grupos controle receberam injeção i.pl. de salina estéril. Os dados representam a média \pm o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste "t" Student's indicado por ***P<0.001, ##, P < 0.01 .

Tabela-1 Extravasamento plasmático: valores em μl por cavidade em ambos, grupo controle e grupo de ratos diabéticos-(STZ) :

Grupos	n	1 h	4 h	8 h	12 h
controle+salina	5	00,0 \pm 0,0	00,0 \pm 0,0	-	-
controle+des-Arg ⁹ -BK	5	00,0 \pm 0,0	100,0 \pm 10*	-	-
STZ+salina	6	00,0 \pm 0,0	100,0 \pm 10,0	100,0 \pm 10,0	00,0 \pm 0,0
STZ+des-Arg ⁹ -BK	6	00,0 \pm 0,0	200,0 \pm 20,0**	100,0 \pm 20,0	00,0 \pm 0,0

Os dados representam a média \pm e.p.m..(n)=animais. A comparação estatística foi realizada através de teste “t” Student’s indicado por *P<0,05, ** P<0,01.

4.5 Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B₁ para as cininas para a resposta inflamatória aguda induzida pela injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

Através do uso de antagonistas seletivos para o receptor B₁, a des-Arg¹⁰-Hoe 140 e o R-715 (Regoli et al, 1998), foi confirmada a participação do receptor B₁ na resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos experimentalmente com estreptozotocina (STZ). Assim, a migração de células mononucleares e de neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK ,

foi significativamente reduzida pela administração do antagonista seletivo B_1 , a des-Arg¹⁰-Hoe 140 (50 e 100 nmol por sítio), administrado 5 min antes do agonista B_1 . A administração de outro antagonista seletivo para o receptor B_1 , o R-715 (100 nmol por sítio), 5 min antes da indução da pleurisia com a des-Arg⁹-BK, foi capaz de inibir de forma mais eficaz do que a des-Arg¹⁰-Hoe 140 a migração de neutrófilos em resposta à des-Arg⁹-BK, chegando próximo aos valores basais. Por outro lado, os valores basais para leucócitos quantificados nos animais diabéticos injetados com salina não foram modificados pela injeção i.pl. de R-715 (Figura-4).

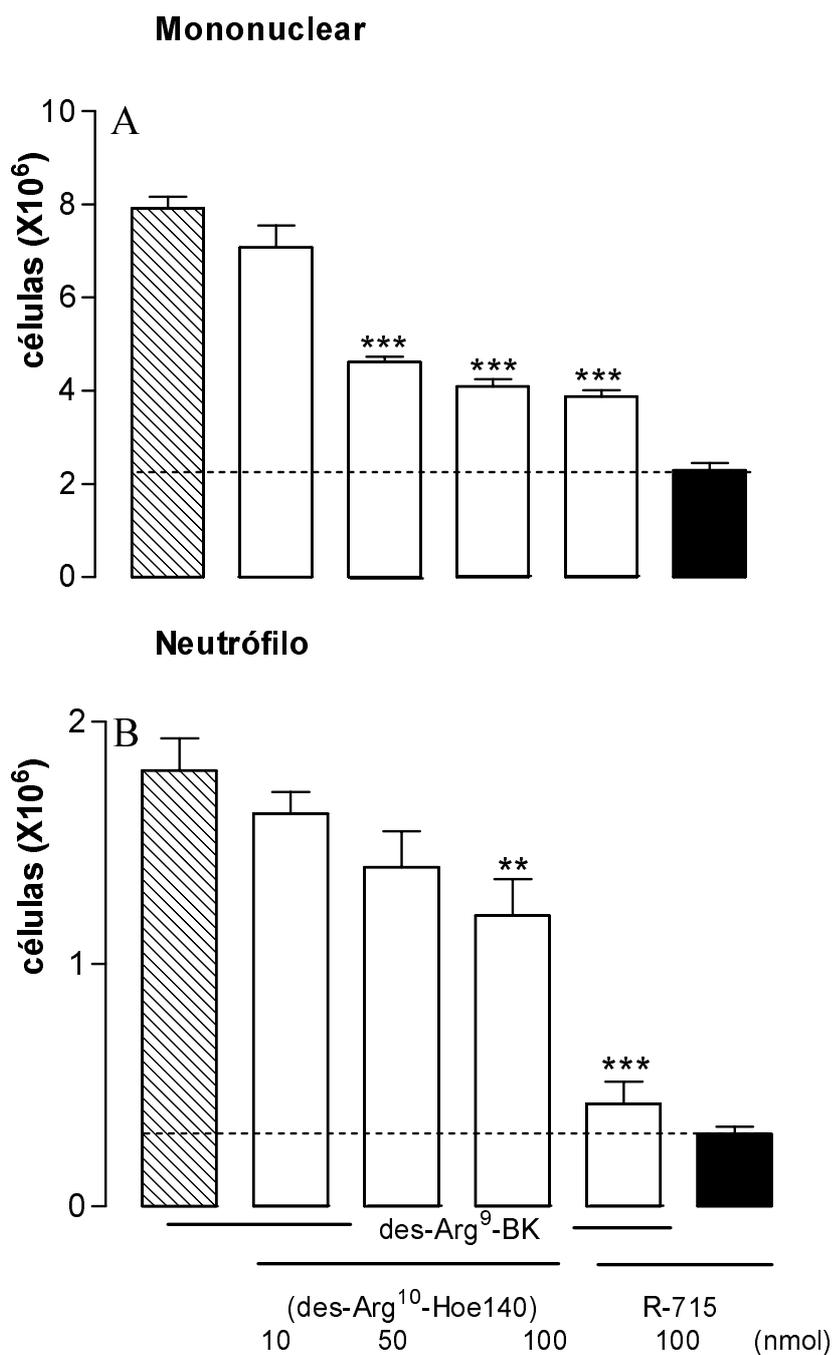


Figura 4 - Efeito de dois antagonistas seletivos para o receptor B₁ sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). As colunas representam os dados na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de des-Arg¹⁰-Hoe140 (10-100 nmol por sítio) ou do R-715 (100 nmol por sítio). O efeito direto do R-715 sobre a migração basal de células é representado na coluna fechada. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média ± o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de ANOVA de uma via e teste post-hoc Dunnett indicado por ** P < 0.01; ***P<0.001.

4.6 Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B₂ para as cininas sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

Foram utilizados dois antagonistas seletivos para o receptor B₂ em relação aos efeitos inflamatórios induzidos pela des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio). Enquanto o NPC 18884 (10 nmol por sítio) administrado 5 minutos antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, não foi capaz de modificar a resposta inflamatória induzida pelo agonista B₁ na cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ, surpreendentemente o Hoe 140 (10 nmol por sítio) aumentou significativamente o influxo de células mononucleares e de neutrófilos para a cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ 4 h após a injeção i.pl. do agonista seletivo B₁. Este efeito do Hoe 140 não foi inibido pela co-injeção do antagonista seletivo B₁, o R-715 (100 nmol por sítio). A administração de Hoe 140 (10 nmol por sítio) 5 minutos antes da injeção i.pl. de salina em ratos diabéticos-STZ, foi capaz de inibir os níveis basais para a migração de ambas as células inflamatórias (mononuclear e neutrófilo) após a injeção i.pl. de salina (Figura- 5).

4.7 Quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ e não diabéticos.

No presente estudo, através do emprego da técnica de autoradiografia com secções de pulmões de ratos, foi possível quantificar o aumento da expressão do receptor B₁ em ratos controle e principalmente naqueles que foram tratados previamente com estreptozotocina-(STZ), e que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio). O autoradiograma mostrado na Figura -6 permite visualizar a densidade de receptores B₁ marcados através do radioligante seletivo para este receptor, o [¹²⁵I] HPP-des-Arg¹⁰-Hoe 140, em secções de 40 µm de pulmões do grupo que recebeu injeção intraperitoneal (i.p.) de salina e injeção intrapleural (i.pl.) de des-Arg⁹-BK, sendo este grupo denominado de (SAL+DABK), ou injeção i.pl. de salina, denominado grupo (SAL+SAL). Outros grupos de animais receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), (65 mg.kg⁻¹) 4 dias antes da

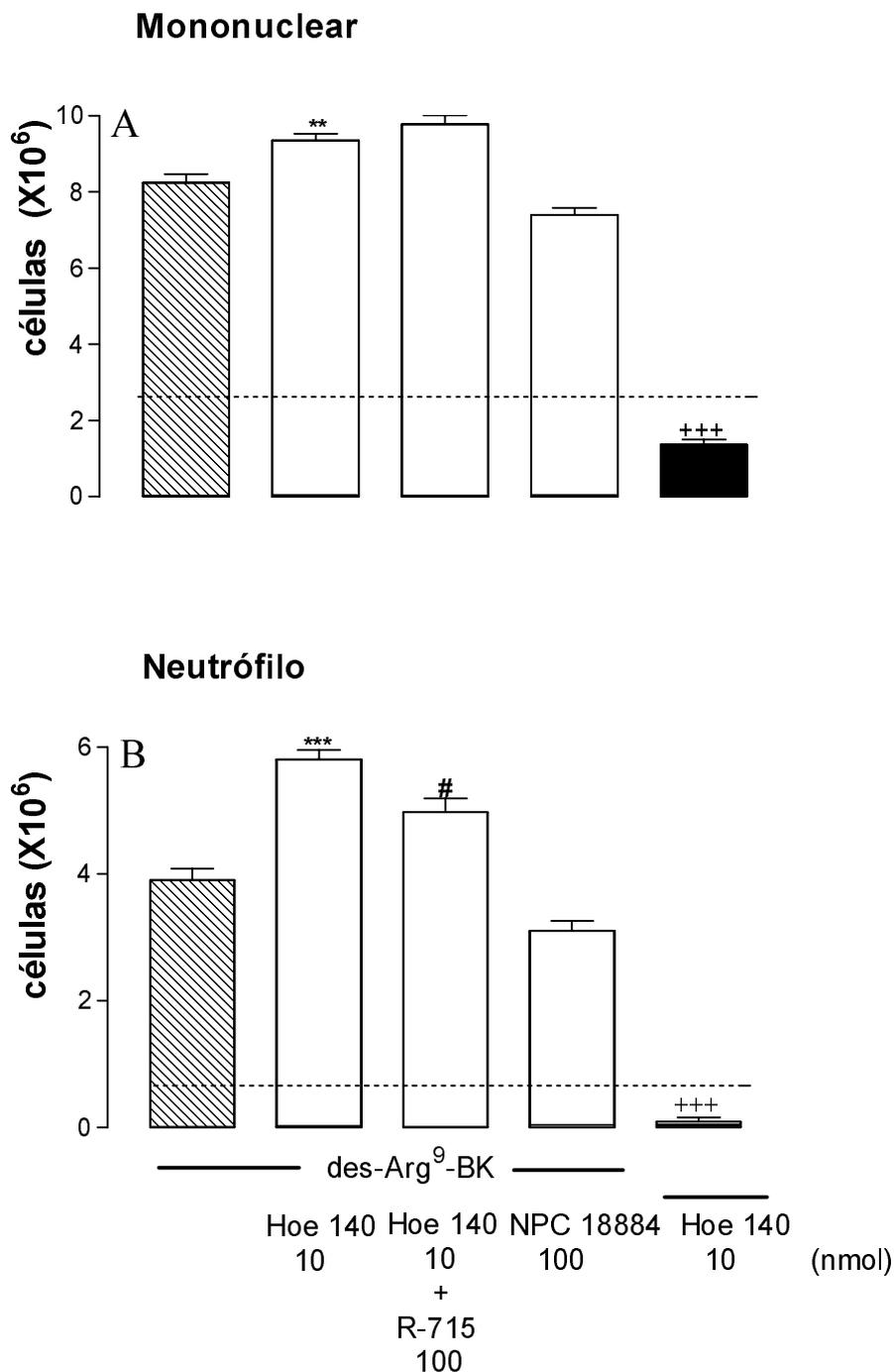


Figura 5- Efeito de dois antagonistas seletivos para o receptor B₂ sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). As colunas representam os dados na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) do Hoe140 (10 nmol por sítio) , ou do Hoe140 10 nmol co-injetado com o R-715 100 nmol por sítio) , ou do NPC 18884 (100 nmol por sítio). O efeito direto do Hoe140 sobre a migração basal de células é representado na coluna fechada. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média ± o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's # P<0.05, **P<0.01, ***, +++ P<0.001.

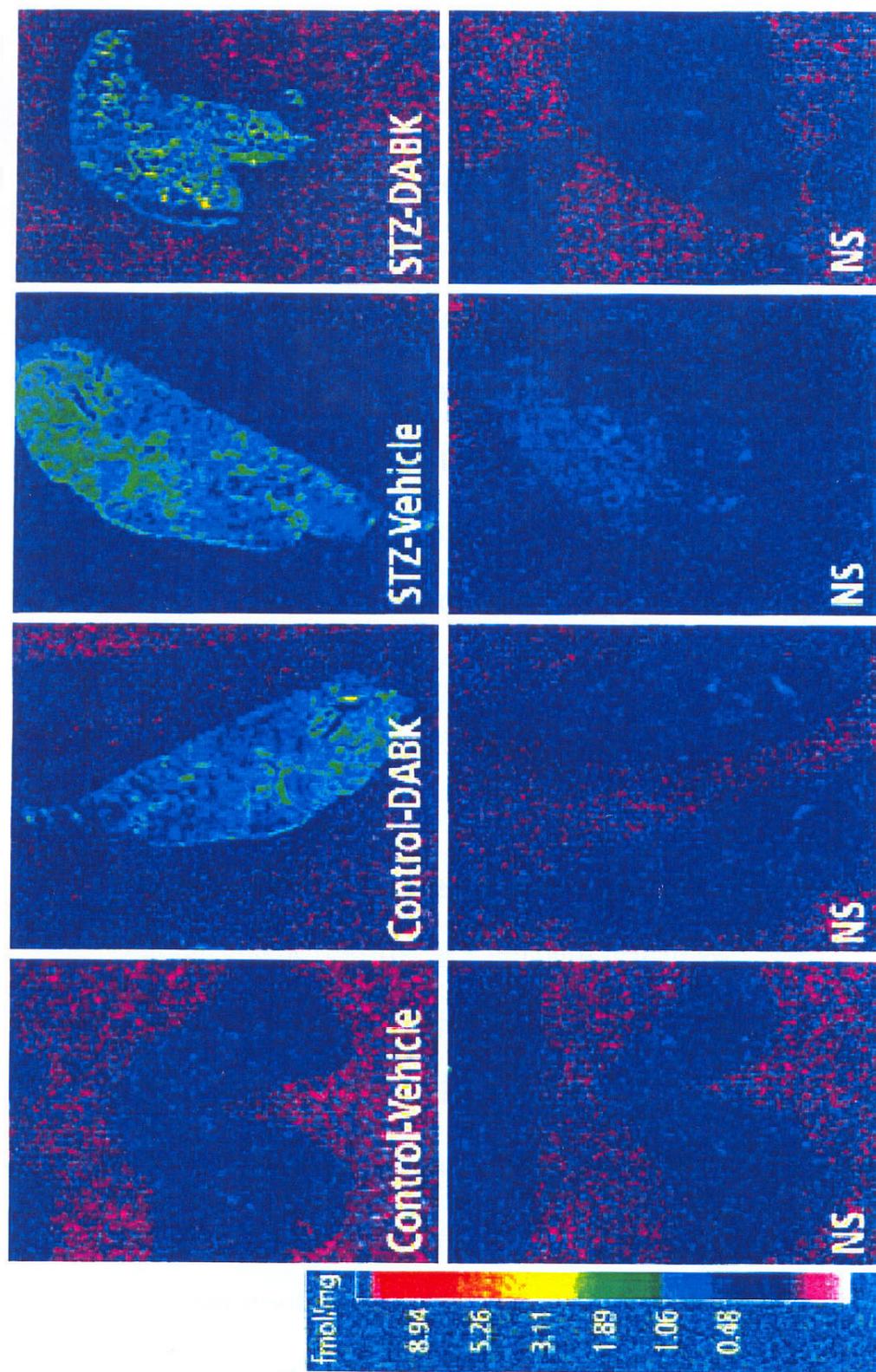


Figura 6- Autoradiograma dos sítios de ligação específica para o radioligante [¹²⁵I] HPP-desArg¹⁰-Hoe140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ (glicose sanguínea > 20 mM) ou de ratos normais (glicose sanguínea= 5.8 mM), que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) ou de salina estéril. A ligação não-específica (NS) na presença de 1 μM de HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 está representada nos painéis inferiores. Observar a alta densidade de sítios de ligação específica nas secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ que receberam injeção i.pl. do agonista seletivo do receptor B₁.

injeção i.pl. de salina, e foi denominado de grupo (STZ+SAL), ou injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio), e foi denominado de grupo (STZ+DABK). A densidade dos sítios de ligação específica para o receptor B₁, foi significativamente maior nas secções de pulmões provenientes dos animais do grupo (STZ+DABK) (P< 0.001), quando comparada às amostras do grupo (STZ+SAL). Nos pulmões de animais do grupo (SAL+DABK), o agonista seletivo B₁ também foi capaz de aumentar a densidade dos sítios de ligação específica do receptor B₁ para as cininas, de forma significativa (P<0.01), porém em menor extensão quando comparado ao grupo (STZ+DABK). A Figura-7 (A e B) mostra a quantificação dos sítios de ligação específica do receptor B₁ em todos os grupos de animais.

4.8 Efeito da insulina na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

Em nossos resultados observamos que o tratamento sistêmico de ratos diabéticos-(STZ) durante 4 dias com insulina, através de implante por via subcutânea com liberação de (2 U por dia), foi capaz de prevenir a hiperglicemia causada pela injeção de estreptozotocina (Tabela-2). O implante com insulina foi capaz reduzir de forma significativa a infiltração de células mononucleares, bem como a infiltração de neutrófilos induzida

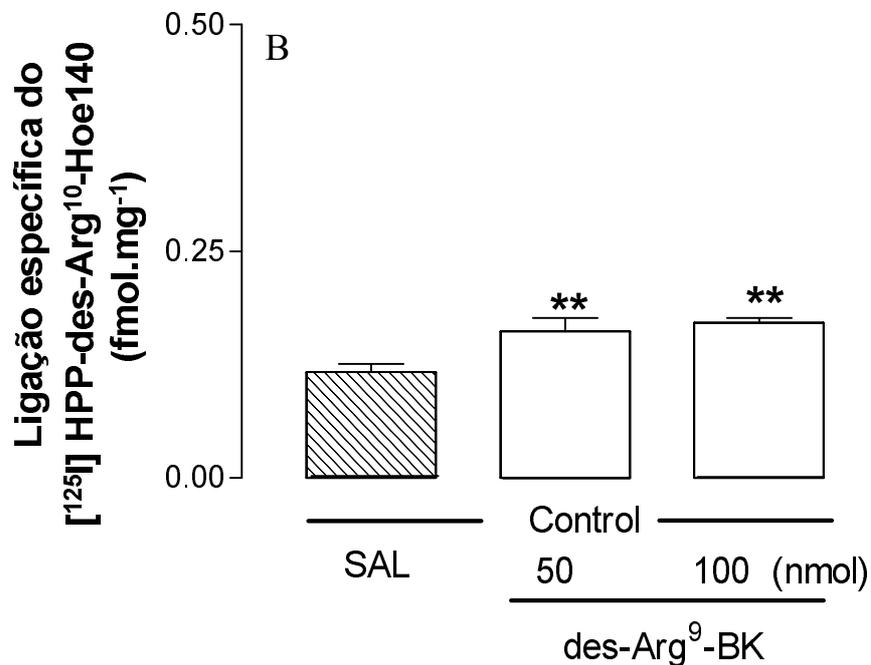
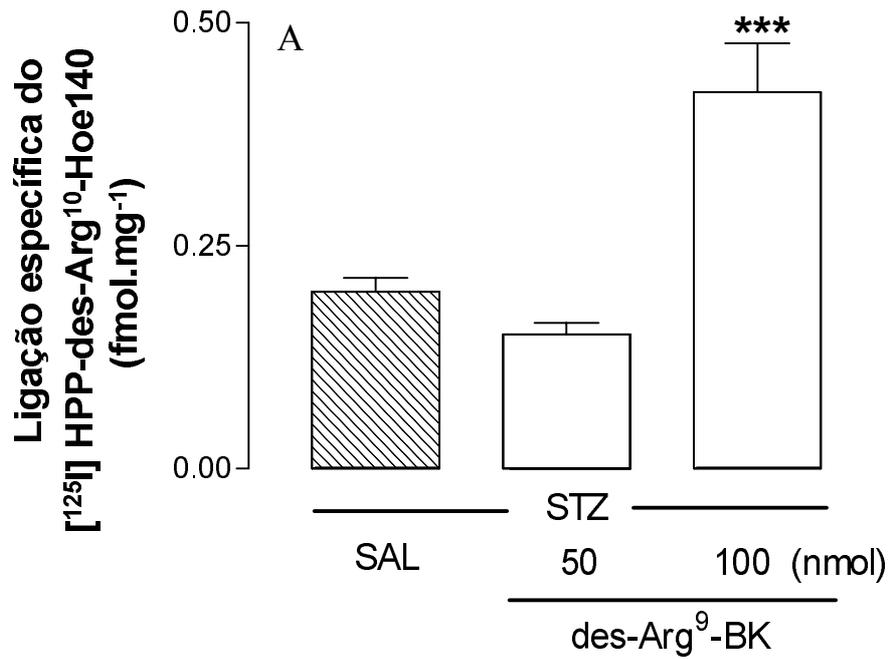


Figura 7 - Quantificação dos sítios de ligação específica marcados com o radioligante $[^{125}\text{I}]$ HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ (glicose sanguínea > 20 mM) ou de ratos normais (glicose sanguínea= 5.8 mM), que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (50 ou 100 nmol por sítio) ou de salina estéril. Os dados representam a média \pm o e.p.m de 120 secções de pulmões por animal em cada grupo de 4 ratos. A comparação estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de teste Dunnett indicado por ** P < 0.01; ***P<0.001.

pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos, que ficou reduzida aproximadamente ao valor do grupo (SAL+DABK) ($0,55 \pm 0,15 \times 10^6$, $P > 0,05$) (Figura-8).

Tabela-2: Valores de glicose (mmol/L) em amostras de sangue de ratos diabéticos tratados ou não com implante de insulina (2U/dia) durante 4 dias.

Grupos	n	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
STZ	14	6,3±0,2	6,0±0,2	21,9±0,2###	26,8±0,2###	29,3±0,2###
STZ+ insulina	10	6,4±0,2	1,7±0,1***	## 2,6±0,1***	##4,6±0,1***	### 4,5±0,1***

Estes dados representam a média e o e.p.m. do (n) de animais. A comparação estatística foi realizada no dia 0 (#) ou do grupo STZ sem insulina (*), calculado através de ANOVA de uma via e post-hoc Dunnett e teste “t” Student’s respectivamente indicado por *· # $P < 0,05$, **· # # $P < 0,01$, ***· # # # $P < 0,001$.

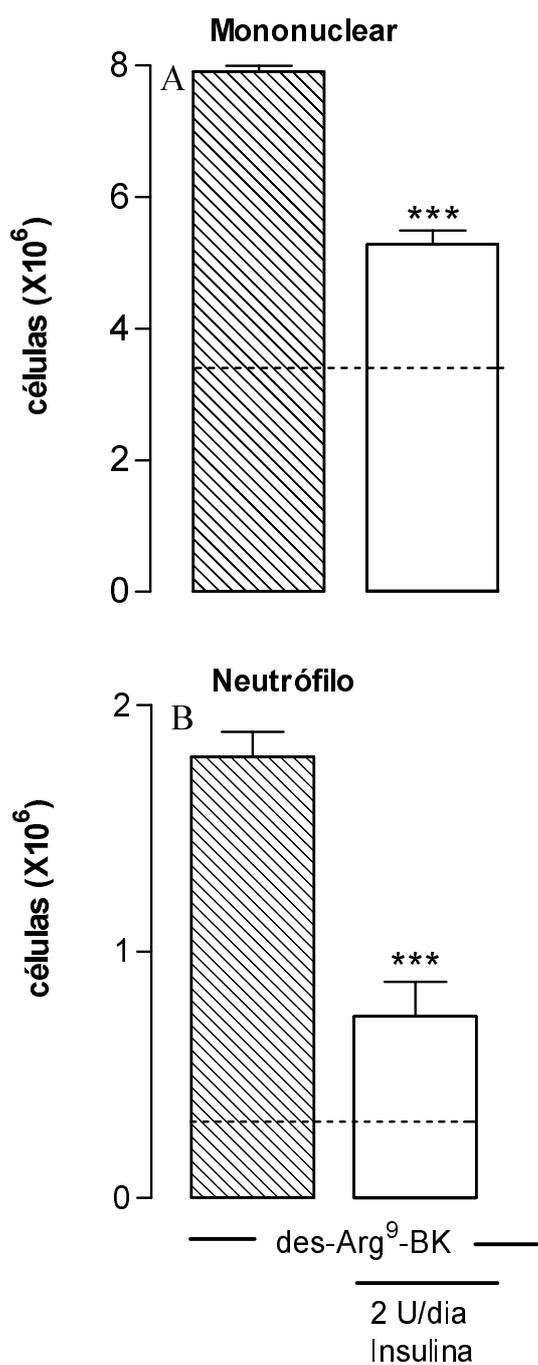


Figura 8- Efeito do tratamento prévio com insulina sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), (glicose sanguínea > 20 mM). As colunas representam os dados na ausência (coluna listrada) ou na presença de insulina (2 U/dia, durante 4 dias) (coluna aberta). A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média \pm o e.p.m de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's ***P<0.001.

4.9 Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de carragenina em ratos não-diabéticos.

A Figura-9 mostra os resultados do tratamento prévio de animais não-diabéticos com o anticorpo monoclonal anti-PMN com 0.1 ml de (solução de 1:20, segundo indicação do fabricante), através de duas vias de administração: intraperitoneal (i.p.) 30 min ou intrapleural (i.pl.) 5 min antes da indução da pleurisia com carragenina (1%). O tratamento prévio pela via i.p. com o anticorpo anti-PMN foi capaz de inibir em $70,8 \pm 1,3$ % a migração de neutrófilos ($P < 0,001$), enquanto que o tratamento prévio pela via i.pl. causou inibição $91,1 \pm 1,5$ % ($P < 0,001$).

4.10 Efeito do anticorpo anti-PMN na resposta inflamatória induzida pela injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

O tratamento prévio dos animais com o anticorpo monoclonal anti-PMN administrado por via i.pl. de 0.1 ml (solução de 1:20, segundo definição do fabricante), 5 minutos antes da indução da pleurisia por des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) em ratos diabéticos-(STZ), foi capaz de reduzir significativamente a migração de neutrófilos em ($51,0 \pm 2,0\%$) que migraram para a cavidade pleural 4 h após a injeção i.pl. do agonista seletivo B₁ (Figura-10). O tratamento por via intrapleural com o anticorpo anti-PMN foi

escolhido para o tratamento deste grupo de animais, tendo em vista que foi mais efetivo do que a via peritoneal em inibir a infiltração de neutrófilos na pleurisia induzida pela carragenina (1%) em ratos controle (Figura-9).

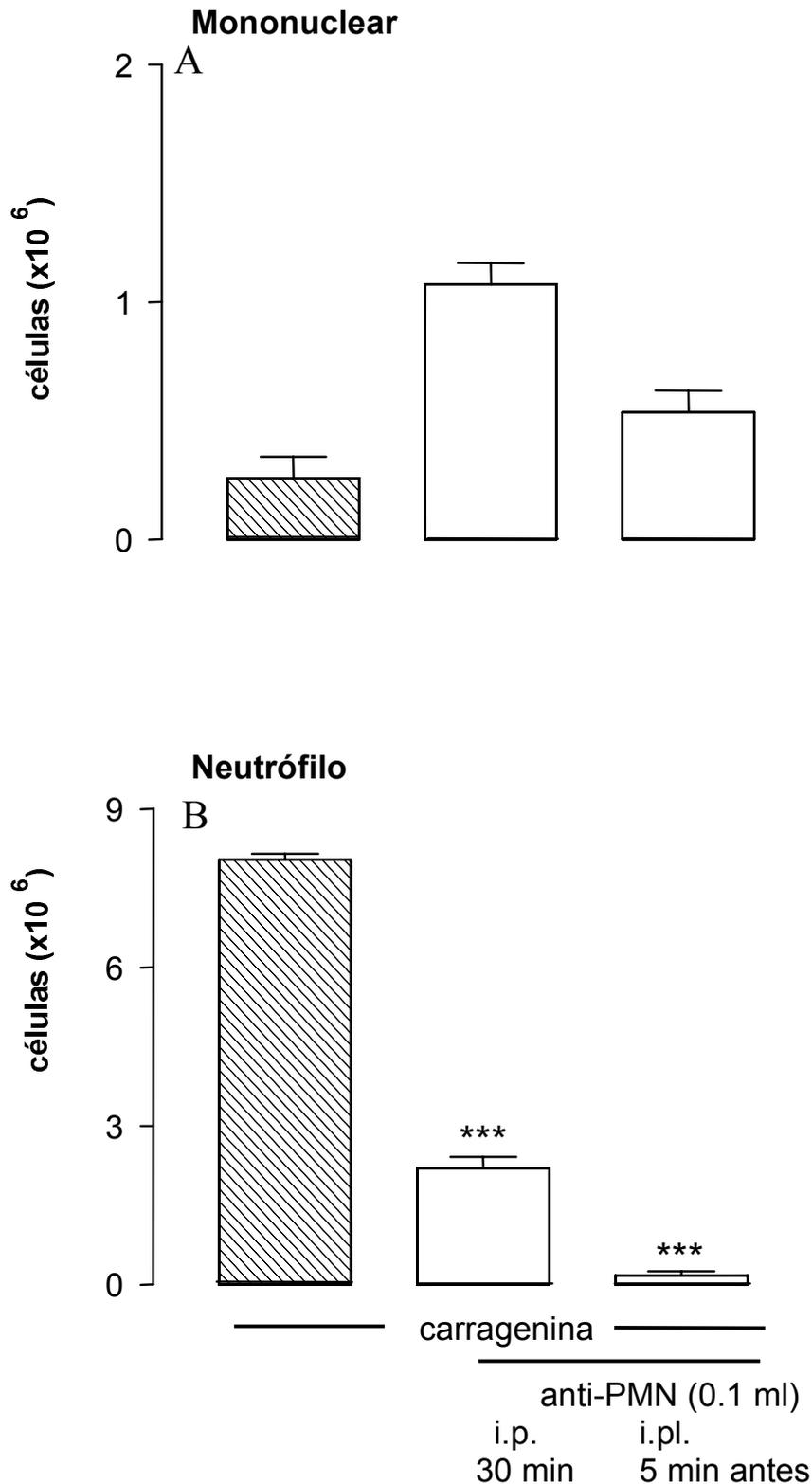


Figura 9- Migração de leucócitos mononucleares (A) e neutrófilos (B) induzida pela injeção i.pl. de carragenina (1%) através de injeção i.pl. na cavidade pleural em ratos normais (glicose sanguínea= 5.8 mM). Os dados mostram o efeito inflamatório da carragenina em animais controle (coluna listrada) ou tratados (coluna aberta) com o anticorpo anti-PMN, 0.1 ml de solução 1:20, por via intrapleural, ou por via intraperitoneal, 5 ou 30 minutos antes, respectivamente da indução da pleurisia. Os dados representam a média \pm o e.p.m de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's ***P<0.001.

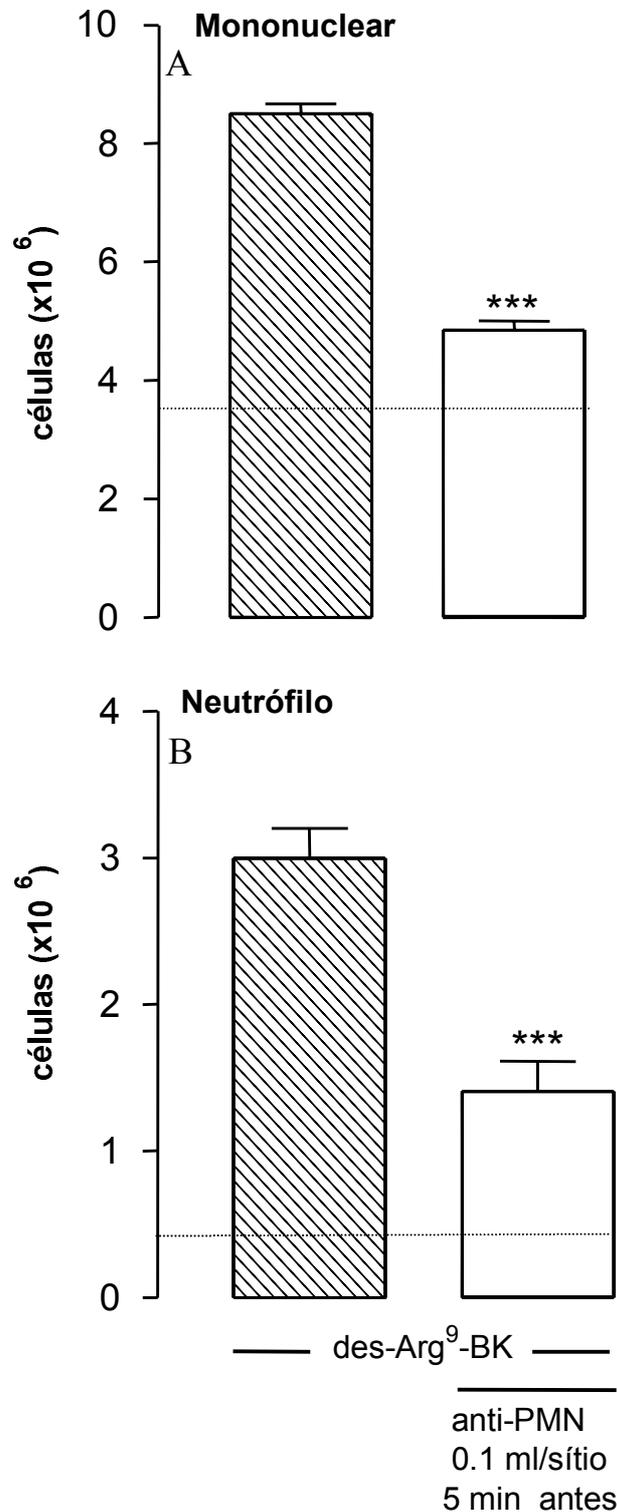


Figura 10- Efeito do tratamento prévio com o anticorpo anti-PMN sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) do anticorpo anti-PMN, 0.1 ml por sítio de solução 1:20, 5 minutos antes da indução da pleurisia. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média \pm o e.p.m de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's ***P<0.001.

4.11 Efeito do tratamento dos animais com insulina ou com o anti-PMN na quantificação dos sítios específicos de ligação do receptor B₁ para as cininas em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ .

O tratamento prévio dos animais diabéticos-(STZ) com insulina (2 U por dia) durante 4 dias foi capaz de reduzir significativamente a densidade de sítios específicos de ligação para o receptor B₁ das cininas nas secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ), 4 h após injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol) (P<0,001). De forma semelhante, o tratamento prévio de ratos diabéticos-(STZ) com anticorpo anti-PMN (0.1 ml da solução de 1:20) por via i.pl. , 5 minutos antes da injeção i.pl. do agonista seletivo B₁, também foi eficaz em reduzir a densidade de sítios de ligação específica para o receptor B₁ das cininas nas secções de pulmões de ratos diabéticos-(STZ). Estes resultados estão apresentados no autoradiograma (Figura-11) e pela quantificação dos sítios de ligação para o [¹²⁵I] HPP-des-Arg¹⁰-Hoe 140 em secções de pulmões de ratos diabéticos- (STZ) tratados previamente com o anticorpo anti-PMN (Figura- 12) .

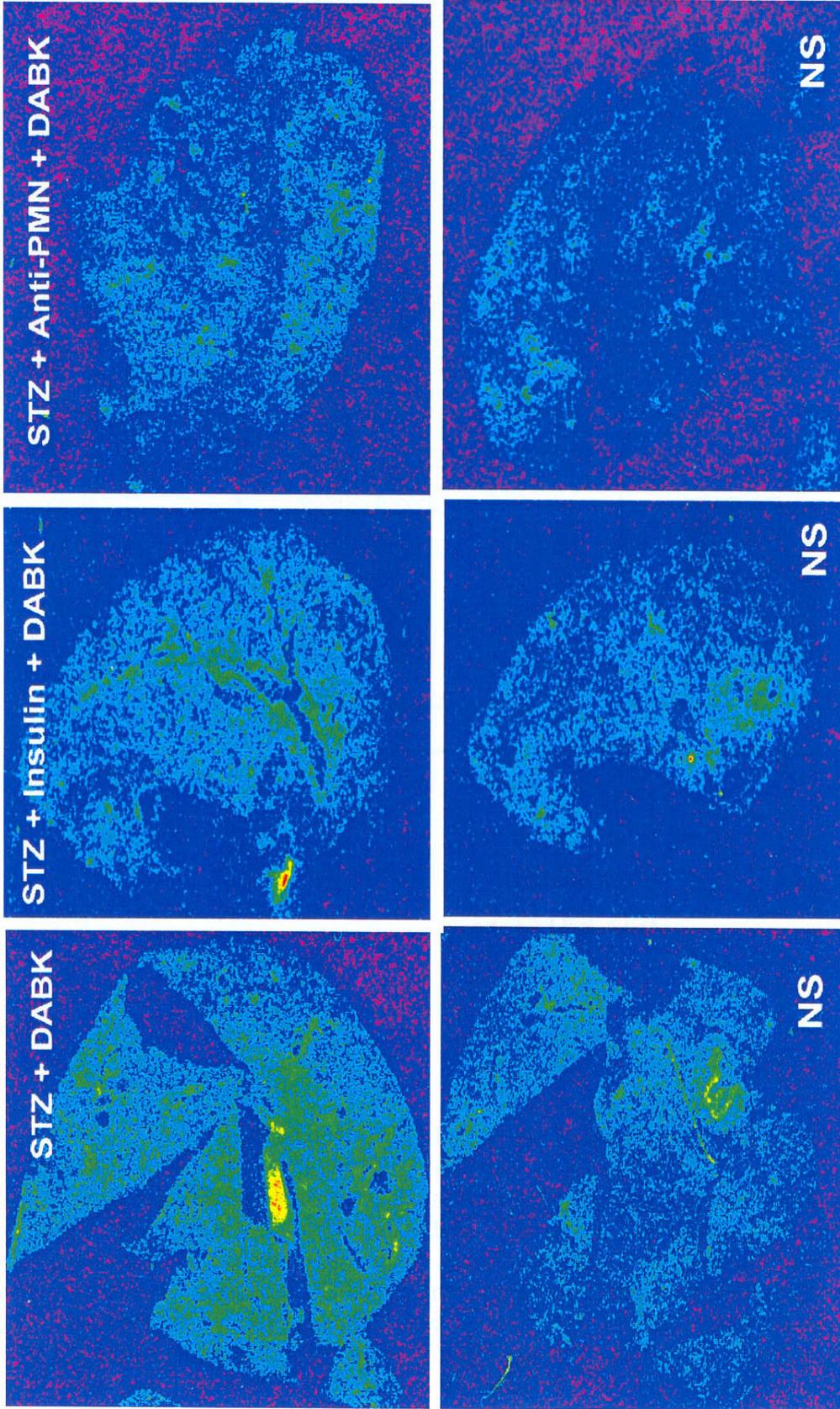


Figura 11- Autoradiograma dos sítios de ligação específica para o radioligante [125 I]-HPP-des-Arg 10 -Hoe140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ (glicose sanguínea > 20 mM), que receberam injeção i.pl. de des-Arg 9 -bradisinina (100 nmol por sítio) na ausência ou na presença de tratamento prévio com insulina (2U/dia, durante 4 dias), ou com o anticorpo anti-PMN (0.1 ml por sítio de solução 1:20, i.pl.) 5 minutos antes da indução da pleurisia. A ligação não-específica (NS) na presença de 1 μ M de HPP-des-Arg 10 -Hoe140 está representada nos painéis inferiores. Observar a alta densidade de sítios de ligação específica nas secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ que receberam injeção i.pl. do agonista seletivo do receptor B $_1$ e a marcada redução sob o tratamento prévio com insulina ou anti-PMN.

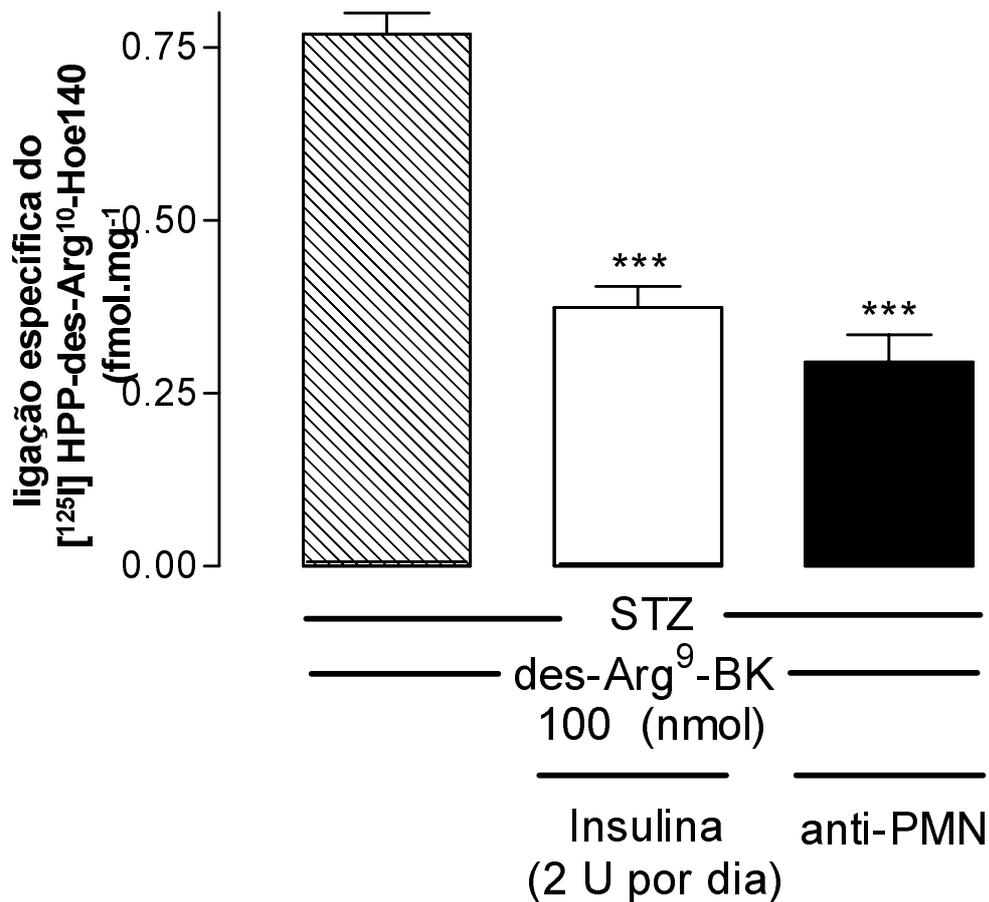


Figura 12 - Quantificação dos sítios de ligação específica marcados com o radioligante $[^{125}\text{I}]$ HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 em secções de pulmões de ratos diabéticos-STZ (glicose sanguínea > 20 mM), que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) 4 h antes. Os dados mostram o efeito da insulina (2 UI/dia, durante 4 dias) (coluna aberta), e do anticorpo anti-PMN (0.1 ml por sítio de solução 1:20, i.pl., 5 minutos antes) (coluna fechada) sobre o aumento dos sítios de ligação específica para o receptor B₁ induzido pela des-Arg⁹-bradicinina. Os dados representam a média \pm o e.p.m de 120 secções de pulmões por animal em cada grupo de 4 ratos. A comparação estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de teste Dunnett indicado por ***P<0.001.

4.12 Envolvimento da interleucina-1 β na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

Os resultados da Figura-13 mostram que o tratamento dos animais diabéticos-STZ com uma injeção i.pl. do antagonista para interleucina-1, o IL-1ra (1 μ g por sítio), 1 hora antes da indução da pleurisia com a des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio), foi capaz de inibir de forma significativa a migração de células mononucleares, bem como de neutrófilos para a cavidade pleural destes animais, (P<0,001).

4.13 Efeito da pirrolidina-ditiocarbamato (PDCT), na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

Os resultados da Figura-14 mostram que a migração de células inflamatórias (mononucleares e neutrófilos) induzida 4 horas após a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) em ratos diabéticos (STZ), foi significativamente reduzida pelo tratamento prévio dos animais com pirrolidina-ditiocarbamato (PDCT), administrado 100 mg.kg⁻¹ (Campos et al, 1999), 1 h antes da indução da pleurisia. A inibição observada foi de 30 \pm 1,5% (P<0.01) e de 60 \pm 1,7% (P<0.001) para as células mononucleares e para os neutrófilos, respectivamente.

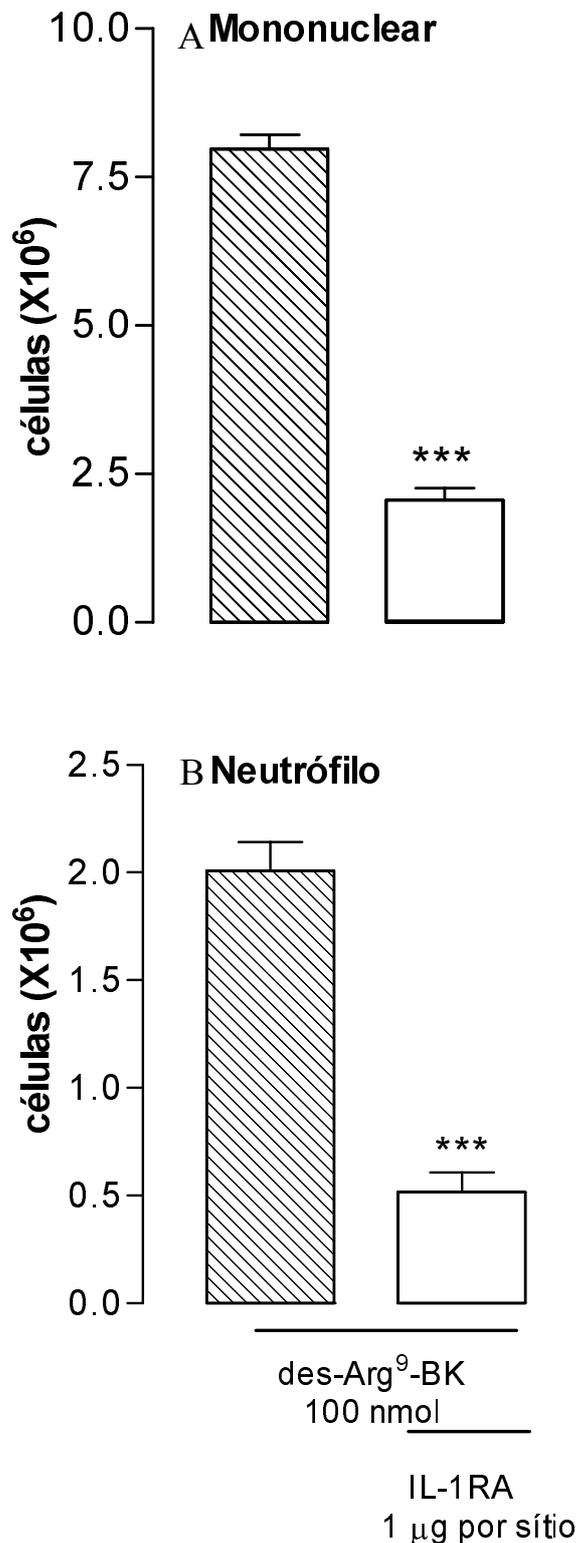


Figura 13- Efeito do IL-1ra sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de IL-1ra 1 (1 µg por sítio), 1 h antes da indução da pleurisia. Os dados representam a média ± o e.p.m de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi calculada através de teste -t Student's ***P<0.001.

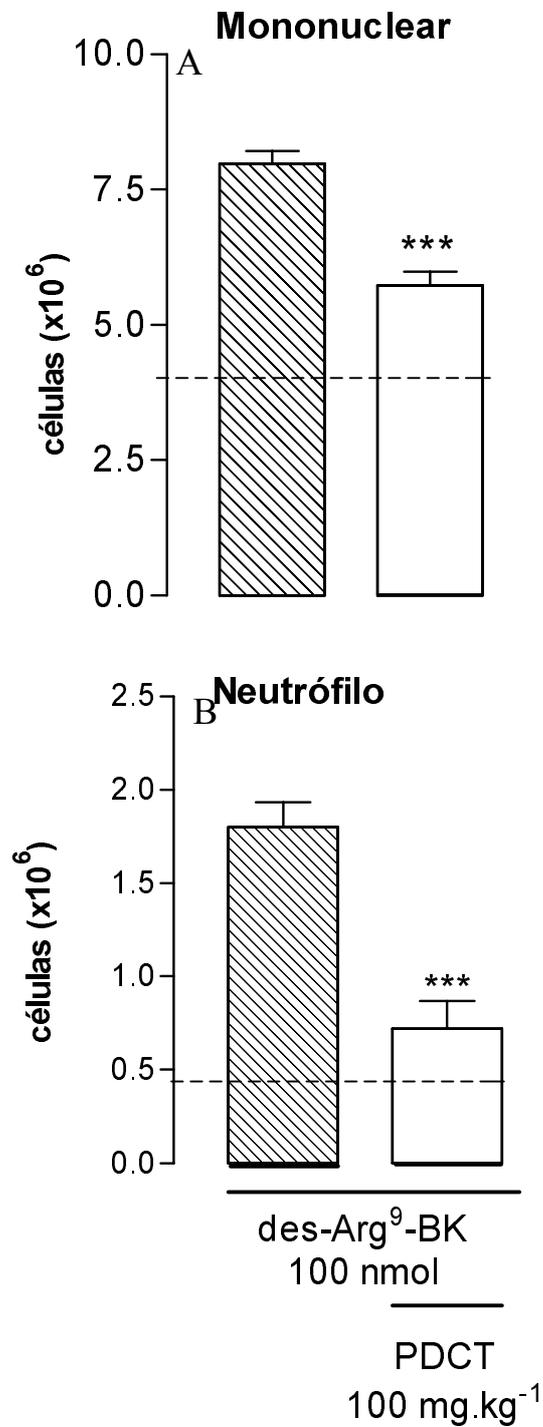


Figura 14- Efeito do pirrolidinaditiocarbamato (PDCT) sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) do PDCT (100 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, 1 h antes da indução da pleurisia. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média \pm o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi calculada através de teste -t Student's ***P<0.001.

4.14 Efeito do N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona (TLCK), na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

A migração de células inflamatórias (mononucleares e neutrófilos) induzida 4 horas após a injeção i.pl. do agonista seletivo B₁ (100 nmol por sítio), na cavidade pleural de ratos diabéticos (STZ), foi reduzida de forma significativa pela administração por via intraperitoneal 1 antes da indução da pleurisia, com o N-p-tosyl-L-lysina cloro-methyl cetona (TLCK) (2 mg.kg⁻¹), outro inibidor do fator de transcrição nuclear κB (NF-κB). Estes resultados estão apresentados na Figura-15, demonstrando que o influxo de células mononucleares foi inibido em 35±1,5%, (P<0.001), e o de neutrófilos foi inibido em 72.5±1,7% (P<0.001) pelo tratamento prévio com TLCK.

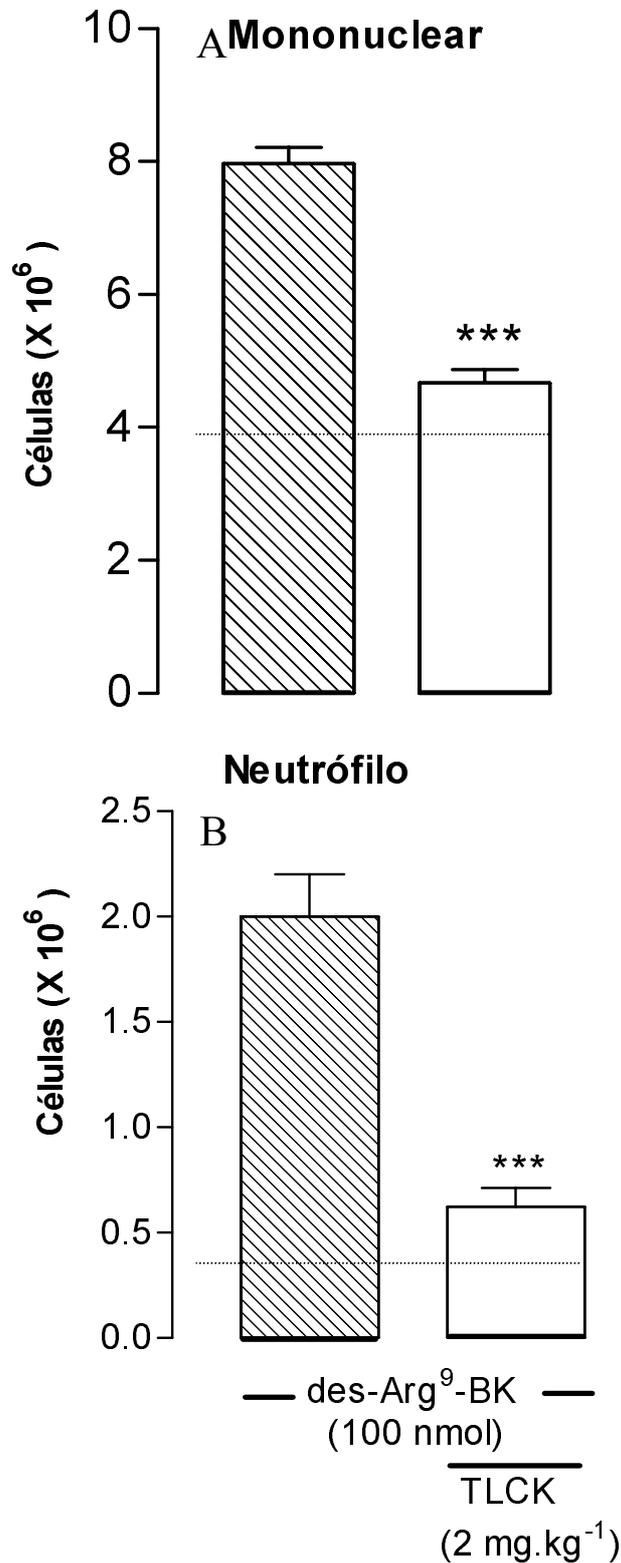


Figura 15- Efeito do N-p-tosil-L-lisina cloro-metil cetona (TLCK) sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de TLCK (2 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, 1 h antes da indução da pleurisia. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média ± o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi calculada através de teste - t Student's ***P<0.001.

4.15 Envolvimento de neuropeptídeos na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

A administração do antagonista seletivo para o receptor taquicinérgico NK₁, o LY 303870 nas doses de (10 nmol e 30 nmol por sítio, i.pl.), administrado 5 minutos antes da indução da pleurisia com a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, foi capaz de inibir de forma significativa a migração de células mononucleares (35,0±1,8%) e (40,1±1,5%) (P<0,01), como também dos neutrófilos (31,8±2,2%) (P<0,05) e (45,4±2,0%) (P<0,001), respectivamente para as doses de 10 e 30 nmol por sítio, na cavidade pleural após 4 h da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) em ratos diabéticos- (STZ) (Figura-16).

A administração do antagonista taquicinérgico seletivo para o receptor NK₃, o SB22220 nas doses de (10 nmol e 30 nmol por sítio, i.pl.), administrado 5 minutos antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio), também interferiu de forma significativa com a migração de leucócitos para o sítio inflamatório inibindo a migração das células mononucleares (17,9±2,0%) (P<0,01) e (31,6±1,2%) (P<0,01), e dos neutrófilos (27,2±2,1%) (P<0,05) e (40,9±1,9%) (P<0,01), respectivamente para as doses de 10 e 30 nmol por sítio (Figura-17).

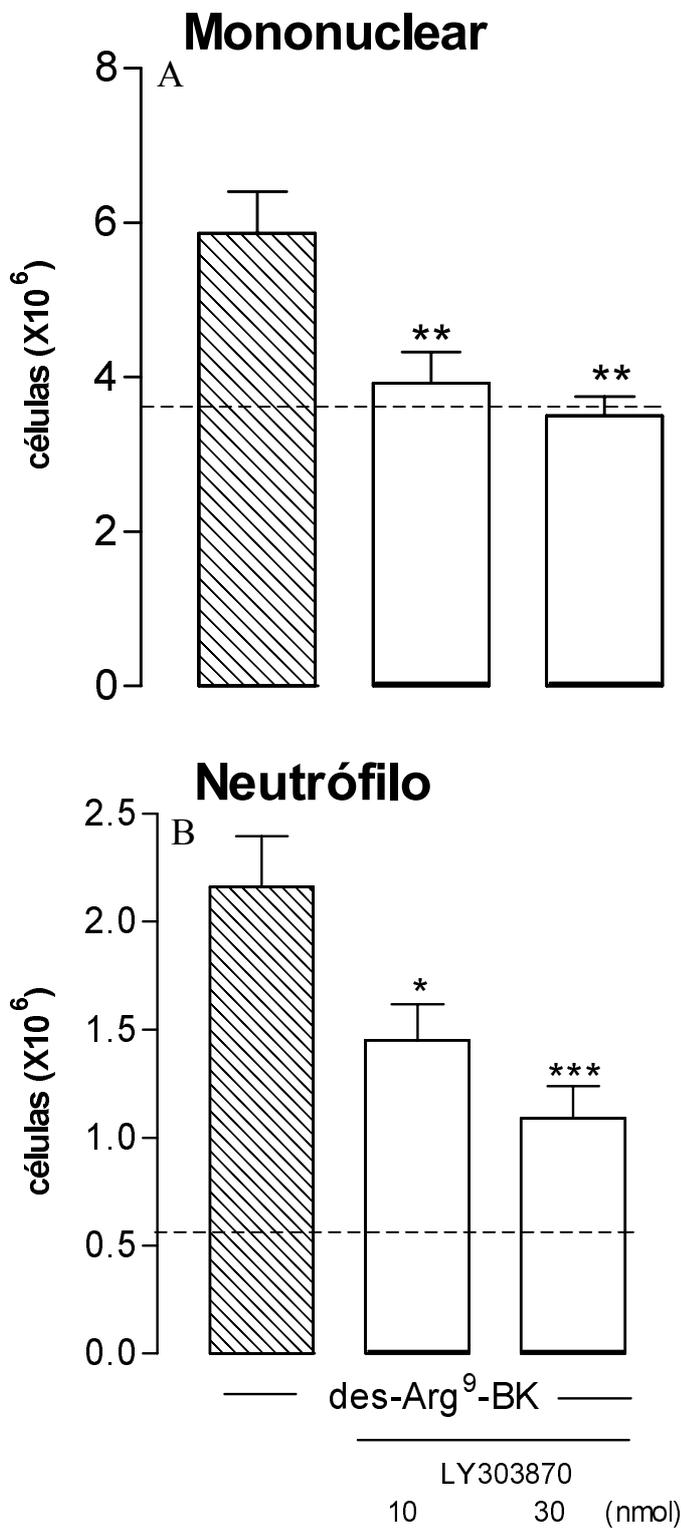


Figura 16- Efeito do antagonista seletivo taquicinérgico NK₁, sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de LY303870 (10 ou 30 nmol por sítio), 5 min antes da indução da pleurisia. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média ± do e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's, * P < 0.05; **P<0.01. ***P<0.001.

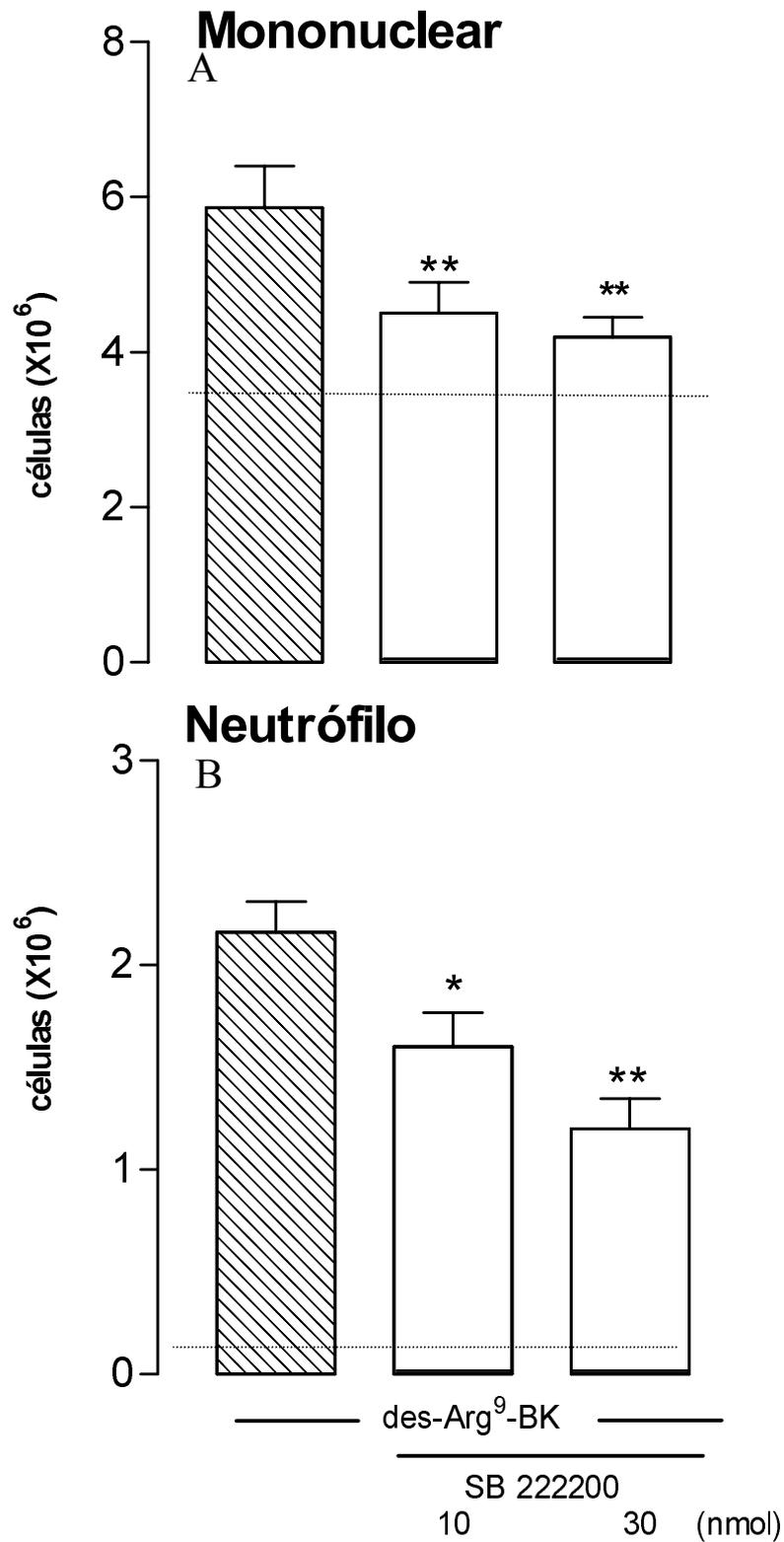


Figura 17- Efeito do antagonista seletivo do receptor taquicinérgico NK₃, sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de SB222200 (10 e 30 nmol por sítio), 5 min antes da indução da pleurisia. A linha pontilhada representa os valores basais da migração celular em ratos diabéticos-(STZ). Os dados representam a média ± do e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's * P < 0.05; **P<0.01.

4.16 Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos.

A Figura-18 mostra os resultados obtidos após a co-injeção por via intraperitoneal dos antagonistas seletivos histaminérgicos H₁ difenidramina (10 mg.kg⁻¹), e H₂ cimetidina (10 mg.kg⁻¹), 30 min antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio). O tratamento prévio dos animais com os anti-histamínicos H₁ e H₂, foi capaz de inibir de maneira significativa a migração de células mononucleares (20,0±2,3%) (P < 0,05) e de neutrófilos (25,6±2,1%) (P<0,01), na cavidade pleural dos ratos diabéticos-(STZ) após 4 horas da indução da pleurisia.

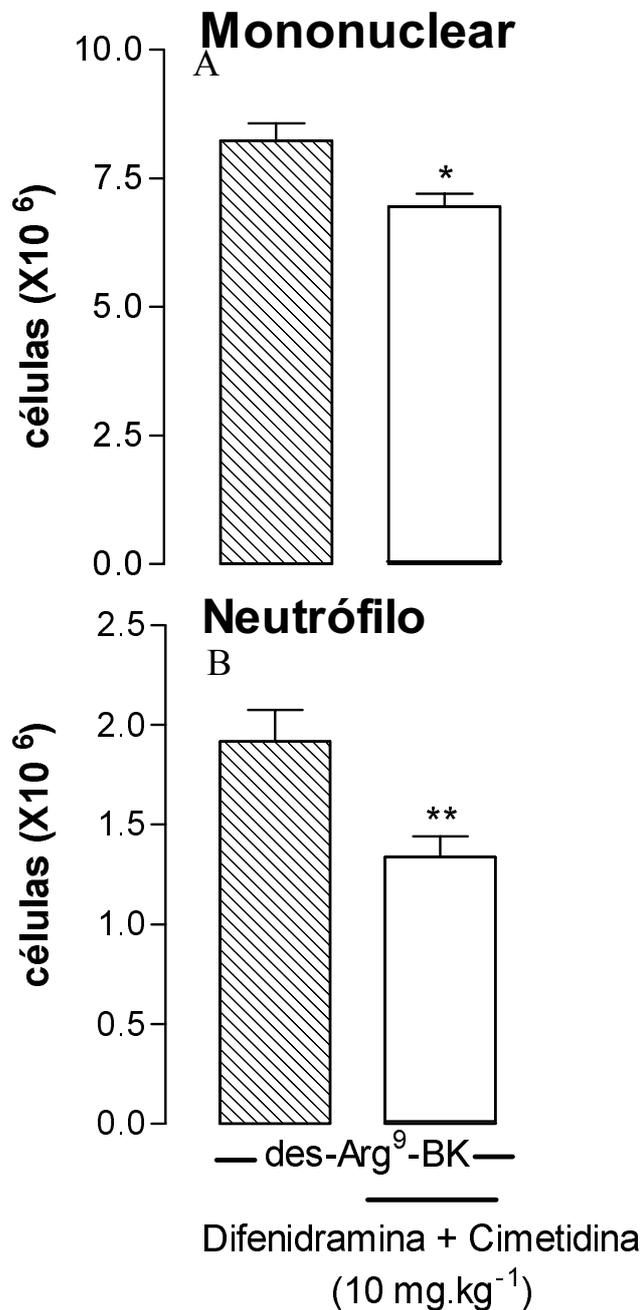


Figura 18- Efeito dos antagonistas seletivos histaminérgicos H₁ e H₂ sobre a migração de células A) mononucleares e B) neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-bradicinina (100 nmol por sítio) na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) (glicose sanguínea > 20 mM). Os dados mostram o efeito do agonista B₁ na ausência (coluna listrada) ou na presença (coluna aberta) de difenidramina (10 mg.kg⁻¹), e de cimetidina (10 mg.kg⁻¹) administradas juntamente por via intraperitoneal 30 min antes da indução da pleurisia. Os dados representam a média ± o e.p.m. de 6-10 animais em cada grupo. A comparação estatística foi realizada através de teste -t Student's * P < 0.05; **P<0.01.

5. DISCUSSÃO

A diabete mellitus ou diabete do tipo 1, é uma doença inflamatória autoimune caracterizada pela intolerância à glicose devido à diferença no processo de secreção e/ou ação da insulina. A disfunção do endotélio vascular e as mudanças na permeabilidade micro e macrovascular em decorrência da hiperglicemia que se instala na diabete mellitus são responsáveis por muitas complicações desta doença crônica incluindo: nefropatia, retinopatia, neuropatia, hipertensão e hiperalgesia (Steil, 1999).

Recentemente foi demonstrado que o receptor B_1 para as cininas está induzido durante o desenvolvimento da diabete, e parece estar envolvido com as complicações da doença. Assim, o antagonista do receptor B_1 das cininas foi capaz de normalizar a glicemia e a função renal em camundongos diabéticos-(STZ), sugerindo que a insulite provocada pela injeção de estreptozotocina nestes animais é uma reação inflamatória mediada pelo menos em parte pelo receptor B_1 (Zuccollo et al., 1996, 1999). Também já foi observado em animais tratados com estreptozotocina, 24 horas antes da injeção intratecal com o agonista seletivo do receptor B_1 , significativa resposta hiperalgésica quando comparados com o grupo controle (Couture et al., 2001). Outros estudos demonstraram que o tratamento prévio de ratos com estreptozotocina (8 a 10 semanas) foi capaz de provocar marcado

aumento na resposta edematogênica induzida pela injeção intraplantar da des-Arg⁹-BK (Campos et al., 2001). Além disso, está descrito na literatura que o tratamento com estreptozotocina 3 semanas antes da injeção intratecal do agonista seletivo B₁ exerce significativa resposta cardiovascular em ratos (Cloutier e Couture, 2000). Deste modo, várias evidências demonstram que o receptor B₁ para as cininas participa de uma série de respostas no modelo experimental de diabetes-dependente de insulina em roedores tratados com estreptozotocina.

A propriedade do receptor B₁ de ter sua expressão aumentada foi descrita pela primeira vez por Regoli et al. (1977), quando esses autores demonstraram o aumento tempo-dependente da reatividade contrátil da aorta isolada de coelho à des-Arg⁹-BK, um efeito que sugere a necessidade de síntese protéica. Através do modelo experimental de edema de pata em ratos induzido pela des-Arg⁹-BK, foi também demonstrado que o receptor B₁ para as cininas tem pronunciado aumento de sua expressão, em várias condições, seja na completa dessensibilização do receptor B₂ após 7 dias, ou através do tratamento prévio sistêmico com lipopolissacarídeo de *E.coli*, bem como através do tratamento sistêmico e crônico com *Mycobacterium bovis*, o bacilo Calmette-Guérin (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1995, 1996, 1997). Além destes procedimentos, outros estímulos também são capazes de

aumentar a expressão dos receptores B₁, como por exemplo após a injeção intradérmica de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina -1 β e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ou ainda através da injeção do fator de agregação plaquetária (PAF-acéter) (Campos et al., 1998; Fernandes et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que o tratamento prévio com endotoxina de *E.coli* também é capaz de induzir o receptor B₁ na formação de edema de pata em primatas (deBlois e Horlick, 2001).

O receptor B₁, as calicreínas e os cininogênios são encontrados na superfície de neutrófilos, o qual representa uma efetiva via de liberação de cininas no sítio inflamatório. Além disso, em vasos sanguíneos, a liberação local de cininas por este processo pode induzir a diapedese de neutrófilos pela abertura dos espaços juncionais entre as células endoteliais (Bockman e Paegelow, 2000, Bhoola et al., 2001). Já foi descrito na literatura que a liberação de cininas pelos neutrófilos são capazes de controlar a permeabilidade vascular (Figuroa et al., 1999).

No presente estudo mostramos que a injeção intrapleural (i.pl.) do agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK foi capaz de promover pronunciado aumento da infiltração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos diabéticos (STZ). Esta resposta foi caracterizada pelo aumento do influxo de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos com um pico

em (4 h), e de mononucleares com um pico em (8 horas), respectivamente após a injeção do agonista seletivo B₁. A migração de leucócitos induzida pela des-Arg⁹-BK para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) foi reduzida pela injeção i.pl. de antagonistas seletivos para o receptor B₁ das cininas, a des-Arg¹⁰-Hoe 140 ou pelo R- 715, porém não foi inibida pelos antagonistas seletivos para o receptor B₂ das cininas, o Hoe 140 ou o NPC 18884. Estes dados sugerem que a resposta celular causada pelo agonista seletivo do receptor B₁ na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) é mediada exclusivamente pela ativação dos receptores B₁ para as cininas.

O antagonista para o receptor B₁, o R-715 foi mais efetivo do que o antagonista des-Arg¹⁰-Hoe 140 em inibir a infiltração de leucócitos. Estes resultados são consistentes com os descritos na literatura que demonstra maior eficácia e maior resistência do antagonista R-715 à degradação pela ação de peptidases quando comparado ao antagonista des-Arg¹⁰-Hoe 140 (Regoli et al., 1998).

O tratamento prévio dos animais com o antagonista para o receptor B₂ das cininas, o Hoe 140 inesperadamente aumentou a migração de neutrófilos e de células mononucleares para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK. Este fenômeno não foi observado com o antagonista não-peptídico seletivo para o receptor B₂

das cininas, o NPC 18884, utilizado em uma dose capaz de antagonizar os efeitos mediados pela BK *in vivo* (Saleh et al., 1998). Por outro lado, o aumento da resposta inflamatória exercida pelo Hoe 140 na infiltração de leucócitos após a injeção i.pl. do agonista seletivo B₁ em ratos diabéticos-STZ, continuou presente durante o bloqueio dos receptores B₁ com o antagonista R-715, sugerindo que este efeito exercido pelo Hoe 140 neste modelo parece ser mediado por outros mecanismos independentes da ativação dos receptores B₁ ou B₂. Entretanto, o aumento do efeito inflamatório exercido pelo Hoe 140 não pode ser atribuído à atividade agonística residual porque este mesmo antagonista foi capaz de reduzir de maneira significativa os valores basais da migração de leucócitos nos animais diabéticos-(STZ). Estes resultados também sugerem que o receptor B₂ das cininas pode ser ativado pela BK endógena, e parece estar envolvido com a migração basal de neutrófilos quantificados nos animais diabéticos-(STZ) que receberam injeção i.pl. de salina. Este dado pode ter relevância clínica, uma vez que é descrito na literatura que elevados níveis de cininogênio tanto de alto como de baixo peso molecular, bem como de pré-caliceínas, foram encontrados em ratos diabéticos-(STZ), e que a insulina pode modular a liberação de bradicinina (Rothschild et al., 1999). Em geral a bradicinina está associada com a vasodilatação e com o aumento da permeabilidade vascular, mas não é

comum estar envolvida com o componente celular durante a resposta inflamatória. Porém, existem relatos na literatura indicando que a bradicinina endógena atuando através dos receptores B_2 , está envolvida com o influxo de neutrófilos induzido pelo LPS no modelo de bolsas de ar em ratos, num processo dependente da ativação de selectinas (Santos et al., 2003).

Está descrito na literatura que ocorre marcada diminuição do edema mediado pelo receptor B_2 após 6 semanas, associado com aumento do edema mediado pelo receptor B_1 após 8 semanas da indução da diabetes do tipo I experimental através da injeção i.p. de estreptozotocina, sugerindo que a ativação do sistema de cininas-caliceína participa da dessensibilização dos receptores B_2 , bem como no aumento da expressão dos receptores B_1 em ratos diabéticos (Campos et al., 2001).

A diabetes induzida por estreptozotocina também altera a atividade renal do sistema das cininas-caliceínas, causando um padrão diferente de expressão dos receptores das cininas em glomérulo isolado de ratos diabéticos. Enquanto a expressão dos níveis de RNAm dos receptores B_1 está induzida a partir do 3º dia e com pico no 7º dia e mantendo-se aumentada até o 21º dia, a expressão dos receptores B_2 é constitutiva e está significativamente aumentada no 3º dia retornando ao normal no 7º dia e novamente aumentada no 21º dia em ratos diabéticos (Christopher et al.,

2002). Desta forma, os autores mostram um balanço nos níveis de expressão dos dois tipos de receptores para as cininas em glomérulo de ratos diabéticos com estreptozotocina.

Da mesma forma, com base em nossos resultados no modelo de pleurisia em ratos diabéticos-(STZ), é possível postular que a bradicinina endógena é capaz de causar a dessensibilização dos receptores B₂, e dessa forma contribuir para a indução dos receptores B₁, uma vez que o sistema cinina-caliceína está ativado na diabete-dependente de insulina (Rothschild et al., 1999). Essa conclusão se baseia nos seguintes resultados: 1) o antagonista seletivo para o receptor B₂, o Hoe 140 administrado no grupo (STZ+SAL), foi capaz de inibir de forma significativa a migração basal de células inflamatórias para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ) que receberam injeção i.pl. de salina estéril, porém não foi capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural no grupo (STZ+DABK); e 2) o antagonista seletivo para o receptor B₁, o R-715 não foi capaz de exercer qualquer efeito sobre o influxo basal de células inflamatórias do grupo (STZ+SAL), porém foi eficaz em reduzir a migração de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos para a cavidade pleural do grupo (STZ+DABK). Assim, estes resultados mostram que o agonista seletivo para o receptor B₁, aumenta de forma significativa a infiltração de células

inflamatórias (mononucleares e neutrófilos) para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ). Estes resultados também sugerem que esta resposta celular está sendo mediada inicialmente pelo receptor B₂ constitutivo, e posteriormente pelo receptor B₁ induzido em ratos diabéticos-(STZ). Assim, confirmando dados descritos na literatura nossos resultados permitem inferir sobre o aumento do efeito das cininas durante o processo de inflamação crônica como é o caso da diabetes mellitus.

Já foi também demonstrado em outros modelos experimentais que o efeito das cininas parece ser inicialmente mediado pelos receptores B₂ constitutivos, com posterior indução dos receptores B₁ após várias horas ou mesmo dias do início do processo inflamatório, num mecanismo de regulação dos receptores B₂ sobre os receptores B₁ seja pela liberação de citocinas e/ou desensibilização dos receptores B₂ após sua ativação (Perkins et al., 1993; Campos et al., 1995, 2001; Christopher et al., 2002). Em condições patológicas a indução do receptor B₁ pode estar amplificada pelo acúmulo de des-Arg⁹-BK, o metabólito ativo decorrente da degradação da bradicinina no sítio inflamatório, uma vez que o t_{1/2} do agonista seletivo do receptor B₁ das cininas é de 4 a 12 vezes maior quando comparado ao t_{1/2} do peptídeo BK (Décarie et al., 1996a,b; Marceau et al., 1998). Além disso, o aumento da expressão da carboxipeptidase M (cininase I) pode também contribuir para o

aumento endógeno dos níveis de des-Arg⁹-BK durante o processo inflamatório (Schremmer-Danninger et al., 1998).

Os resultados do presente estudo mostram que o agonista seletivo para o receptor B₁ também foi capaz de causar migração de leucócitos, especialmente de neutrófilos para a cavidade pleural dos ratos controle, ou seja, dos animais que receberam injeção i.p. de salina seguido da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, grupo (SAL+DABK), sugerindo a presença de expressão basal funcional dos receptores B₁ nestes animais. Esta hipótese é amplamente sustentada pelos resultados obtidos através da técnica de autoradiografia, o qual revela aumento significativo na quantidade de sítios de ligação específica para o receptor B₁ em secções de pulmões de ratos normais que receberam injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, ou seja, do grupo (SAL+DABK), quando comparado com os animais controle, grupo (SAL+SAL), ou seja, ratos não-diabéticos que receberam injeção i.pl. de salina.

O recrutamento de neutrófilos mediado pelo receptor B₁ foi demonstrado pela primeira vez no modelo de bolsas de ar em camundongos tratados localmente com interleucina-1 β , 4 h antes da administração do agonista seletivo B₁ (Ahluwalia e Perretti, 1996). Neste trabalho os autores demonstraram ainda que o acúmulo de neutrófilos foi parcialmente inibido pela des-Arg⁹-Leu⁸-BK, mas não pelo Hoe 140. Entretanto, em camundongos

sem tratamento prévio com citocinas, a injeção intrapleural do agonista seletivo para o receptor B₁ produziu acúmulo de leucócitos, principalmente de neutrófilos com o pico em 4 h, um efeito que foi inibido pelo tratamento com a des-Arg⁹-Leu⁸-BK, sugerindo que esta resposta é mediada pela ativação do receptor B₁, e que este receptor está presente nesta espécie de forma constitutiva (Vianna e Calixto, 1998). Algumas evidências mostram que em fibroblastos de pulmão humano, células (IMR-90), também ocorre o aumento da expressão do receptor B₁ estimulado pelo seu próprio agonista seletivo, a des-Arg⁹-BK, envolvendo a ativação de proteína quinase C e do fator de transcrição nuclear kappa -B (NF-κB) (Shanstra et al., 1998). Outros estudos mais recentes utilizando a técnica de imunohistoquímica, mostraram a existência de expressão basal de receptores B₁ na medula espinhal, em gânglios sensoriais, e nas terminações periféricas de fibras sensoriais primárias (fibras Aδ e fibras-C) de rato. Estas descobertas mostram a importância do receptor B₁ nos mecanismos centrais da dor, bem como na inicialização da resposta inflamatória (Wotherspoon e Winter, 2000; Ma et al, 2000).

Além disso, a presença do receptor B₁ de maneira constitutiva também já foi detectada em macrófagos de várias espécies (Bockmann & Paegelow, 2000), e em fibroblastos de pulmão humano (Schanstra et al.,

1998; Koyama et al., 2000) e sua ativação leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (Tiffany e Burch, 1989). Embora o receptor B₁ tenha sido detectado de maneira constitutiva na superfície de neutrófilos murinos (Araújo et al., 2001), sua estimulação não parece exercer efeito direto *in vitro* (Ahluwalia e Perretti, 1996).

Desta forma, é possível sugerir a partir de nossos resultados que os receptores B₁ estão presentes de forma constitutiva na cavidade pleural de ratos controle e que uma vez ativados são capazes de promover o influxo de células inflamatórias, inclusive de neutrófilos. Oposto a estes resultados Pinheiro e colaboradores (2001) demonstraram que a migração de células inflamatórias induzidas pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos normais, ocorre através de mecanismo independente da ativação do receptor B₁ ou do receptor B₂ para as cininas, uma vez que esta resposta inflamatória não foi inibida pelos antagonistas para os receptores B₁ ou B₂ e sendo inibida pelo tratamento com ciproheptadina ou com o agente degranulador de mastócitos, o composto 48/80. Embora nossos resultados tenham sugerido a presença dos receptores B₁ de forma constitutiva nas vias aéreas destes animais, conforme demonstram os resultados autoradiográficos não foi possível identificar a localização e o mecanismo de expressão destes receptores.

Por outro lado, a neutralização dos polimorfonucleares (PMN) através da administração do anticorpo específico anti-PMN, 5 minutos antes da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ), produziu significativa diminuição da infiltração de neutrófilos para a cavidade pleural e significativa diminuição dos sítios de ligação específica para o receptor B₁ quantificados em secções de pulmões destes animais. Assim, nossos resultados sugerem fortemente que a maior parte da densidade de receptores B₁ quantificados em secções de pulmões de ratos diabéticos- (STZ) estejam localizados nos neutrófilos que migraram para o tecido pulmonar. De fato, o anticorpo anti-PMN não foi capaz de inibir até os níveis basais os efeitos da des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos podemos inferir sobre outras prováveis localizações dos receptores B₁ podendo estar distribuídos em outras estruturas como por exemplo: nas células endoteliais, nos macrófagos residentes, nos fibroblastos e também nas fibras sensoriais primárias presentes na cavidade pleural e nos pulmões de ratos diabéticos-(STZ). Além disso, o anticorpo anti-PMN foi capaz de inibir a migração de células mononucleares induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos, sugerindo a participação dos neutrófilos na migração das células mononucleares neste grupo de animais. Estes resultados também sugerem, pela primeira vez a presença de receptores B₁ na superfície de neutrófilos de rato.

Em outro grupo de experimentos o anticorpo anti-PMN mostrou especificidade para neutrófilos abolindo apenas a migração destas células e não interferindo com a migração de células mononucleares na pleurisia induzida pela injeção i.pl. de carragenina (1%) em ratos normais.

O aumento funcional do receptor B_1 também foi obtido através de estímulos com eicosanóides como o PAF-acéter. Este mediador inflamatório é capaz de induzir este receptor através de um fenômeno que está relacionado com a síntese local de proteínas, como também pelo aumento tempo-dependente da expressão do RNAm para o receptor B_1 no modelo de edema de pata no rato. Os autores também mostraram que o tratamento prévio dos animais com o anti-PMN foi capaz de inibir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, sugerindo o envolvimento dos neutrófilos na ativação deste fator de transcrição nuclear (Fernandes et al., 2003). É possível que em nossos estudos os neutrófilos que migram para a cavidade pleural de ratos diabéticos-STZ sejam estimulados e através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL- 1β e o TNF- α , promovam a ativação do NF- κ B no modelo de pleurisia em ratos diabéticos-STZ.

Tiffany e Burch (1989), demonstraram a possibilidade de liberação de citocinas como a IL- 1β e o TNF- α de macrófagos após a ativação de

receptores B₁ presentes na superfície destas células. Deste modo, é possível que estas citocinas sejam liberadas destas células e promovam posterior aumento da expressão do receptor B₁ em neutrófilos, como também em outras células alvo. Assim, a indução da expressão do receptor B₁ em ratos diabéticos-(STZ) foi evidenciada pela alta densidade de receptores B₁ em secções de pulmões, seja na ausência ou na presença de estimulação com o agonista seletivo B₁, quando comparado com os ratos controle. Conforme descrito na literatura os receptores B₁ para as cininas participam de maneira decisiva na transmigração endotelial dos neutrófilos para o sítio inflamatório (Araújo et al., 2001). Pesquero e colaboradores (2000) demonstraram a participação dos receptores B₁ na inicialização da resposta inflamatória, uma vez que na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK com pico em (4h) ou pela carragenina também com pico em (4h), em camundongos deficientes para o receptor B₁, foi observada grande redução na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Tais resultados indicam que o recrutamento de polimorfonucleares em tecidos inflamados pode ser mediado pelas cininas, principalmente através da ativação dos receptores B₁. No entanto, o extravasamento plasmático e a infiltração de células mononucleares não foram afetados pela ausência do receptor B₁ no modelo de pleurisia em camundongos, embora estes parâmetros inflamatórios sejam também

estimulados pela injeção do agonista seletivo para o receptor B₁ na cavidade pleural de camundongos normais. Estes dados sugerem que o receptor B₁ medeia preferencialmente a migração de neutrófilos durante o processo inflamatório (Pesquero et al., 2000).

Já foi descrito na literatura que ativação do receptor B₁ induz as três fases do processo de migração de leucócitos (correspondendo a mais de 90%): rolamento, adesão e migração das células (McLean et al., 2000 a,b,). Além disso, o receptor B₁ controla também a apoptose de neutrófilos, um processo importante para a resolução da inflamação (Araújo et al., 2001). Assim, nossos resultados reforçam os descritos na literatura mostrando a importância dos receptores B₁ no componente celular do processo inflamatório, especialmente na migração de neutrófilos.

A indução do receptor B₁ já foi demonstrada também em vários modelos *in vitro* e *in vivo* através de estímulos por citocinas específicas incluindo a IL-1 β e o TNF- α , em situações de trauma ou estresse (Regoli et al., 1981; Marceau et al., 1998; McLean et al., 1999; Medeiros et al., 2001, Schanstra et al., 2000, Campos et al., 1998, 2002) ou ainda após a liberação de interferon- γ (IFN- γ) em células endoteliais no cérebro humano (Prat et al., 2000). Phagoo e colaboradores (2001), demonstraram que o aumento da expressão do receptor B₁ em fibroblastos de pulmão humano ocorre através

de sinergismo entre a IL-1 β e a des-Arg⁹-BK após (4h) de incubação, atuando diretamente em nível de transcrição do gene, e não através da síntese de proteínas intermediárias (Ni et al., 1998b; Schanstra et al., 1998; Zhou et al., 1998). Por outro lado, a injeção intradérmica de IL-1 β ou de TNF- α (1h e 30 min, respectivamente) antes do agonista seletivo para o receptor B₁ na pata de ratos, resultou em pronunciado aumento da resposta mediada pelo receptor B₁, sendo este efeito sensível ao tratamento sistêmico com dexametasona ou com ciclohexamida (Campos et al., 1998). A participação das citocinas no efeito pró-inflamatório mediado pelo receptor B₁ é sustentada pela ativação destes receptores, e conseqüente liberação de IL-1 β e de TNF- α , além de peptídeos quimiotáticos e leucotrienos de macrófagos (Tiffany e Burch, 1989; Sato et al., 1996). Entretanto, a presença de receptores B₁, seja constitutivo ou induzido, coexistindo com receptores B₂ constitutivos em macrófagos, é dependente da espécie, tecido ou ainda do estágio de maturação da célula (Bockmann e Paegelow, 2000).

Existem vários relatos na literatura indicando que a diabete mellitus ou diabete-dependente de insulina envolve uma resposta autoimune associada com aumento da produção de citocinas, incluindo a IL-1 β e o TNF- α , que por sua vez causam destruição das células β - pancreáticas (Hussain et al., 1996; Rabinovitch e Suarez-Pinzon, 1998; Rabinovitch, et al., 1999). Deste modo,

em nossos estudos ficou evidenciada a participação da IL-1 β na resposta inflamatória mediada pelo receptor B₁ na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), uma vez que a injeção i.pl. de IL1-ra, foi capaz de inibir de forma significativa as células inflamatórias que migraram para o sítio inflamatório. Assim, no nosso modelo de pleurisia na diabetes-dependente de insulina é também provável que a liberação de IL-1 β possa contribuir com a indução da expressão do receptor B₁ em neutrófilos, bem como em outras células alvo.

Um dos sinais de transdução pelo qual a hiperglicemia poderia contribuir para as complicações na diabetes mellitus é a ativação do NF- κ B, o qual é induzido em elevadas concentrações de glicose e pelo estresse oxidativo (Hoffmann et al., 1998). Em pacientes obesos a infusão de insulina diminui a concentração intracelular de NF- κ B em células mononucleares e aumenta o I κ B, diminuindo a geração de espécies oxidativas (Undurti et al., 2002). Booth e colaboradores (2001), demonstraram que a glicose induz alguns eventos envolvidos na inflamação aguda em ratos incluindo o aumento do rolamento, adesão e transmigração de leucócitos através de veias mesentéricas. Por outro lado, a hiperglicemia também é capaz de promover a adesão de leucócitos no endotélio, em parte mediada pela indução de moléculas de adesão dependente da ativação do NF- κ B, o que implica em continuada ativação do NF- κ B em leucócitos e em células endoteliais

(Bierhaus et al., 2001). Em nossos estudos, o tratamento sistêmico dos animais diabéticos-(STZ) com insulina foi capaz de normalizar a glicemia (Tabela-2) e inibir a resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK. Além disso, este tratamento causou a redução dos sítios de ligação específica para o receptor B₁ em secções de pulmão de ratos diabéticos-(STZ). Em conjunto estes resultados sugerem que a hiperglicemia que se instala na diabetes mellitus, contribui para o aumento da expressão do receptor B₁ observado com a migração de neutrófilos para a cavidade pleural e com o aumento da densidade de receptores B₁ em secções de pulmões após estímulo com a des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-STZ. Assim, nossos resultados são consistentes com dados descritos na literatura, uma vez que a hiperglicemia presente na diabetes mellitus, e o resultante estresse oxidativo, podem estimular o fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB) (Yerneni et al., 1999), o qual é conhecido por participar na indução do receptor B₁ *in vivo* (Marceau et al., 1998; Campos, et al., 1999; 2002). O NF-κB parece ser ativado em muitas células, o que sugere a possibilidade de ocorrer longos períodos de ativação *in vivo*, e esta ativação sustentada está relacionada com o aumento da subunidade p65 em células mononucleares em pacientes diabéticos (Bierhaus et al., 2001). No presente estudo a infiltração de células mononucleares e de neutrófilos induzidas pela des-Arg⁹-BK para a cavidade pleural de ratos

diabéticos-(STZ), foi significativamente reduzida pelo tratamento sistêmico com inibidores do fator de transcrição nuclear (NF- κ B), a pirrolidinaditiocarbamato (PDCT) e o TLCK.

Os mecanismos relacionados à rápida indução do receptor B₁ em condições de inflamação crônica não são ainda bem conhecidos. No entanto, recentemente foi mostrado que agonistas dos receptores das cininas são capazes de ativar vários fatores reguladores de transcrição, incluindo o NF- κ B em fibroblastos e células epiteliais de pulmão (Pan et al., 1996; Schanstra et al., 1998). O fator transcricional NF- κ B parece ser um componente crucial na mediação de respostas inflamatórias e alérgicas, promovendo a indução de vários genes e de proteínas pró-inflamatórias como as citocinas, enzimas e receptores. Além disso, a análise da seqüência do gene para o receptor B₁ das cininas em ratos e em humanos, revelou a presença de um sítio regulador para o fator de transcrição nuclear NF- κ B na região promotora deste receptor (Bachvarov et al., 1996; Ni et al., 1998 a,b). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento da expressão do receptor B₁ induzido *in vivo* pelo agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, em ratos diabéticos - (STZ), depende da via de ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Podemos também inferir que a produção aumentada de citocinas e a hiperglicemia existentes durante a diabetes mellitus experimental, podem atuar

de forma conjunta para o aumento da expressão do receptor B_1 , através de um mecanismo mediado pelo NF- κ B.

A inflamação pulmonar compreende uma reação extensiva de várias interações celulares. A estimulação das fibras C sensoriais nos pulmões, induz reflexos que ativam mecanismos de defesa tais como: tosse, broncoconstrição, vasodilatação, exudação de fluídos provenientes da circulação, aumento de secreção das vias aéreas e o recrutamento de células inflamatórias (Advenier et al., 1997). As células estruturais residentes como os fibroblastos, também contribuem no processo inflamatório nos pulmões.

A substância P e outras taquicinininas apresentam em geral ações pró-inflamatórias e medeiam a inflamação neurogênica. A inflamação neurogênica é definida como um processo capaz de causar vasodilatação arteriolar, aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares e a adesão de células inflamatórias observados após estimulação dos neurônios sensoriais e consequente liberação de neuropeptídeos (Geppetti, 1993; Cao et al., 2000, Campos e Calixto, 2000).

A SP é um potente mediador da inflamação conhecida por causar aumento da permeabilidade microvascular atuando principalmente via ativação do receptor NK_1 , mais comumente situado nas células endoteliais pós-capilares ou também via interação direta com componentes da membrana

dos mastócitos independente da ativação do receptor e consequente liberação de histamina (Holzer, 1998). Estes efeitos microvasculares geralmente são observados na formação do edema (Cao et al., 2000; Campos e Calixto, 2000). Já é bem aceito que as ações pró-inflamatórias das cininas ocorrem por ativação de várias vias distintas. Entre estes sinais pode ser detectada a ativação direta das fibras C sensoriais, as quais por sua vez liberam a SP e outras taquicinininas (Geppetti, 1993).

Assim, Cao e colaboradores (2000), mostraram que os antagonistas B₁ e B₂ das cininas foram capazes de inibir o acúmulo de neutrófilos após a administração de carragenina na pele de camundongos normais, mas ao contrário, não foram capazes de causar redução da resposta em camundongos com deleção do gene para o receptor NK₁.

Utilizando agonistas naturais e sintéticos ou antagonistas seletivos dos três subtipos de receptores taquicinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃, Alves e colaboradores (1999) demonstraram a participação das neurocininas endógenas a substância P, a neurocinina A e a neurocinina B na formação do edema induzido pela injeção intradermal destes peptídeos na pata de rato, sugerindo uma função relevante destes peptídeos no controle do extravasamento plasmático e na formação do edema de pata em rato. Além disso, esses mesmos autores mostraram a pouca seletividade dos peptídeos

endógenos para um subtipo particular de receptor taquicinérgico, como também a possibilidade de que todos os três subtipos de receptores contribuem para as ações pró-inflamatórias das neurocininas.

O envolvimento de neuropeptídeos como a substância P na inflamação foi demonstrado no modelo de pleurisia em camundongos a partir da injeção intrapleural deste neuropeptídeo que provocou uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias, principalmente de células mononucleares para a cavidade pleural destes animais (Fröde-Saleh et al., 1999). Os autores também mostraram que o efeito inflamatório induzido pela substância P foi reduzido pelo tratamento dos animais com antagonistas seletivos para os receptores taquicinérgicos NK₁ e NK₃, sugerindo que esta resposta foi mediada por ambos os receptores. Além disso, as ações da substância P na cavidade pleural de camundongos foram mediadas pela liberação secundária de diferentes mediadores inflamatórios tais como a bradicinina, a histamina, o óxido nítrico além de produtos derivados da via do ácido araquidônico (Fröde-Saleh et al., 1999)

Portanto, vários estudos confirmam a interrelação entre as cininas e os neuropeptídeos durante a resposta inflamatória. Deste modo, a administração de pequenas doses de bradicinina ou de des-Arg⁹-BK com a substância P resultou em aumento da resposta edematogênica na pata de ratos (Campos e

Calixto, 1995; Campos et al., 1996). Além disso, a administração de antagonistas seletivos taquicinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃ produziu significativa inibição da pleurisia induzida pelo agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK em camundongos, sugerindo que a resposta inflamatória induzida pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de camundongos envolve a ativação de neurônios sensoriais, e consequente liberação de neuropeptídeos (Vianna e Calixto, 1998).

Recentemente, foi demonstrada a presença do receptor B₁ também em fibras sensoriais A- δ e C no rato (Ma et al., 2000; Wotherspoon and Winter, 2000). Além disso, a expressão do receptor B₁ em neurônio sensorial murino parece exercer um papel fisiológico (Pesquero et al., 2000). Deste modo, é bem aceito que agonistas B₁ atuem diretamente em fibras aferentes sensoriais C e liberem substância P. A SP é capaz de influenciar na migração de neutrófilos através do endotélio que expressa receptores taquicinérgicos (Vianna e Calixto, 1998; Ahluwalia e Perretti, 1999). A liberação de substância P por parte das fibras sensoriais pode amplificar os eventos e perpetuar o mecanismo de retroalimentação positivo da inflamação, pelo aumento da liberação de citocinas dos macrófagos, a IL-1 β e o TNF- α , através da ativação do receptor taquicinérgico NK₁ (Ho et al., 1997).

No presente estudo demonstramos que os antagonistas seletivos dos receptores taquicinérgicos NK₁ (LY 303870) e NK₃ (SR 222200) foram capazes de inibir a migração de células inflamatórias induzidas pela des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), sugerindo a participação de neuropeptídeos endógenos na migração de células mononucleares e de neutrófilos para o sítio inflamatório. Além disso, está descrito na literatura que a resposta edematogênica mediada pelo agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK em ratos tratados previamente com LPS, é também parcialmente dependente da liberação de taquicininas atuando via receptores taquininérgicos NK₁ e NK₂, bem como pela liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) das fibras nervosas aferentes primárias (Ferreira et al., 2000).

Por outro lado, a SP é também capaz de induzir rápida expressão de moléculas de adesão do endotélio como a E-selectina, P-selectina e molécula de adesão intercelular-I, as quais participam do processo de rolamento e da adesão de neutrófilos circulantes (Matis et al., 1990; Sung et al., 1992; Smith et al., 1993; Nakagawa et al., 1995). Está descrito na literatura que camundongos *knockout* para a P-selectina (Johnson et al., 1995) ou para ambas a P-selectina e a E-selectina (Frenette et al., 1996), possuem discreta mobilização de neutrófilos. Deste modo, os resultados do presente estudo

confirmam dados da literatura e sugerem que os neuropeptídeos contribuem de maneira efetiva no componente celular da resposta inflamatória induzida pelo agonista seletivo para o receptor B_1 , a des-Arg⁹-BK na cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ).

A resposta inflamatória aguda caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos, edema e aumento da permeabilidade vascular na microvasculatura. Estes eventos acontecem geralmente pela liberação de mediadores químicos derivados da lesão tecidual ou induzidos por agente flogístico. Entre as células que iniciam este processo, os mastócitos também contribuem para o início e amplificação da resposta inflamatória aguda (para revisão ver: Metcalfe et al., 1997).

A bradicinina é também conhecida por liberar histamina por parte dos mastócitos, através de um mecanismo comum a outros peptídeos catiônicos como a SP, ou através de interação direta com os componentes da membrana dos mastócitos, independente da ativação de receptores (Hall e Morton, 1997; Holzer, 1998). Porém, existem dúvidas se a quantidade de cininas geradas no tecido inflamado ou lesionado requerida para a liberação de histamina ocorre em concentração suficiente para ativar os mastócitos (para revisão ver: Geppetti et al., 1993). A atividade de alguns agonistas e antagonistas das cininas sugerem que a potência das cininas na liberação de histamina dos

mastócitos aumenta paralelamente com o número de aminoácidos carregados positivamente (Lys, Arg) presentes na estrutura das cininas, ou também através de mecanismos não mediados pelos receptores das cininas (Devillier et al., 1988). Os mastócitos têm sido demonstrados como células efetoras importantes na reação inflamatória relacionada à hiperreatividade imediata, como no caso da asma extrínseca, ou asma alérgica. Entretanto, várias observações apontam também para a possibilidade destas células participarem ativamente de muitos outros processos inflamatórios, como o influxo de neutrófilos em respostas mediadas pelo sistema imune, e fisiológicos (para revisão ver: Galli, et al., 1995, Metcalfe, et al., 1997).

No presente estudo, o tratamento prévio dos animais com os antagonistas seletivos histaminérgicos H_1 , difenidramina e H_2 , a cimetidina, foi capaz de inibir de maneira significativa o influxo de células mononucleares e de neutrófilos na pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ). Estes resultados sugerem a participação da histamina liberada dos mastócitos neste modelo experimental .

A resposta inflamatória induzida pela BK na cavidade pleural de camundongos mostrou a participação da histamina (Saleh et al., 1998). No entanto, as respostas mediadas pelo receptor B_1 das cininas no edema de pata em ratos tratados previamente com LPS (Ferreira et al., 2000), bem como na

cavidade pleural em camundongos normais (Vianna e Calixto, 1998), não foram afetadas pelo tratamento dos animais com antagonistas histaminérgicos.

Em conclusão, os estudos funcionais (pleurisia) e moleculares (autoradiografia) realizados no presente trabalho, sugerem que o receptor B_1 tem sua expressão aumentada no pulmão de ratos diabéticos-(STZ). A ativação do receptor B_1 causou a migração de células inflamatórias (mononucleares) e de (neutrófilos) para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ). Além disso, ficou demonstrado que a hiperglicemia é um importante componente envolvido na indução do receptor B_1 , principalmente na superfície de neutrófilos. É possível que o receptor B_1 quando induzido pode ter sua expressão aumentada nas fibras C sensoriais primárias presentes nos pulmões de ratos diabéticos-(STZ) e sua ativação seja capaz de causar a liberação de SP e subsequente ativação dos receptores NK_1 nas células endoteliais, promovendo de forma rápida a expressão de moléculas de adesão no endotélio. Alternativamente, podemos inferir sobre a ativação dos receptores B_1 presentes no endotélio vascular através de seu agonista contribuindo para a migração de neutrófilos. A produção de IL- 1β e a hiperglicemia presentes na diabete mellitus parecem exercer ações conjuntas ou separadamente, mas certamente fundamentais para a indução do receptor

B₁ através de um mecanismo mediado pelo fator de transcrição nuclear κ B em ratos diabéticos-(STZ) (Esquema-1).

Os resultados apresentados neste estudo contribuem para aumentar os conhecimentos relativos ao papel relevante exercido pelo receptor B₁ das cininas em processos inflamatórios e reforça a noção de que os antagonistas do receptor B₁ para as cininas podem apresentar interesse no tratamento de doenças inflamatórias. Finalmente o modelo experimental desenvolvido neste trabalho pode ser de utilidade para a investigação da função e da expressão do receptor B₁ na resposta celular de processos inflamatórios.

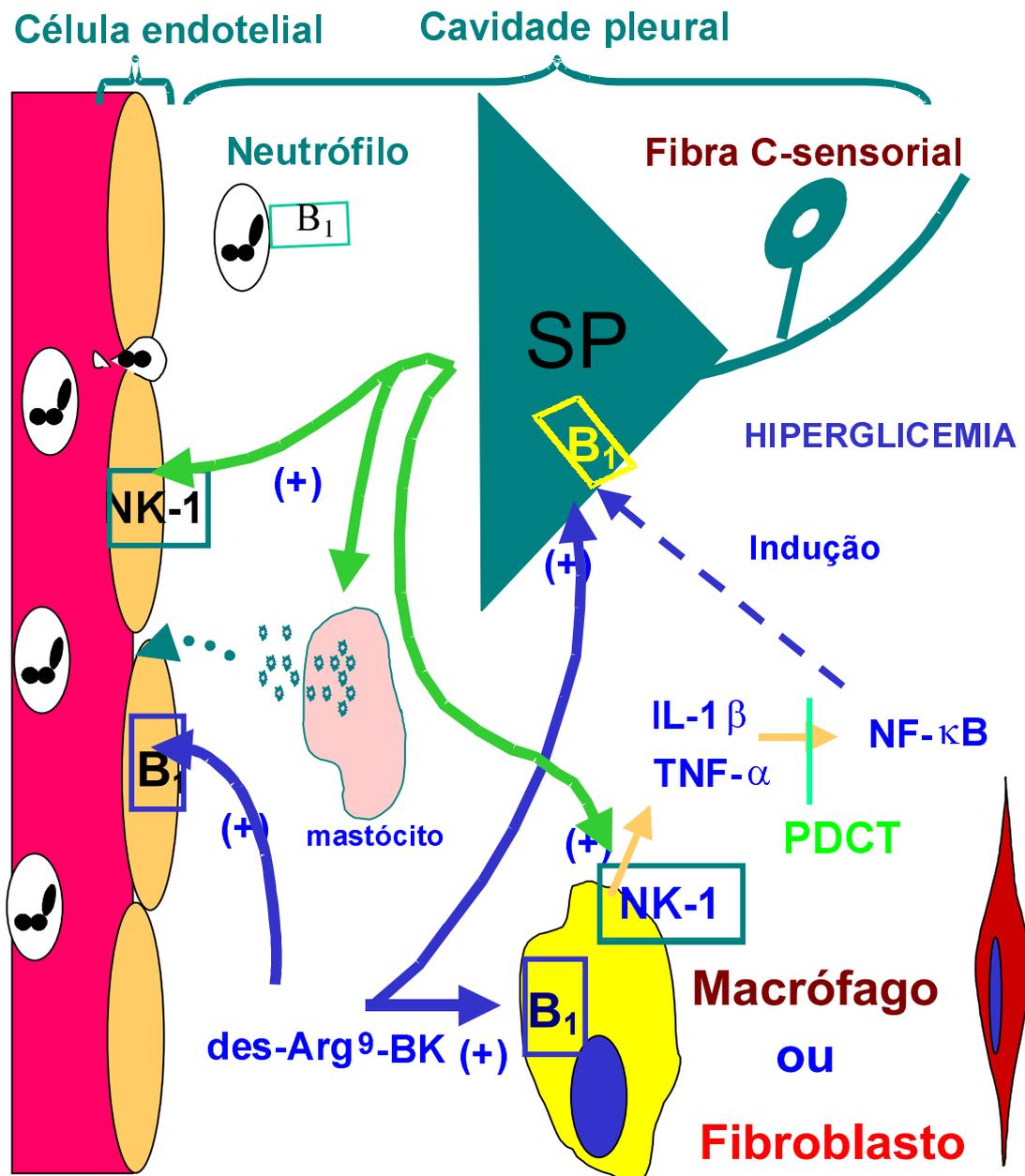


Figura-19-Representação esquemática dos mecanismos fundamentais envolvidos no efeito pró-inflamatório do agonista seletivo B_1 , a $des-Arg^9-BK$, na cavidade pleural de ratos diabéticos (STZ). É proposto que o agonista B_1 promove a infiltração de neutrófilos seja indiretamente, após a estimulação das fibras C sensoriais levando à liberação da substância P (SP), e a subsequente ativação do receptor NK_1 nas células endoteliais, ou sobre ativação direta dos receptores B_1 no endotélio. Por outro lado, as citocinas podem ser liberadas por macrófagos ou por fibroblastos após ativação de receptores B_1 e/ou NK_1 . A produção de citocinas e a hiperglicemia que se instala na diabetes mellitus podem promover a indução do receptor B_1 através de um mecanismo mediado pelo $NF-\kappa B$.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. We demonstrated by autoradiographic and functional studies that the B₁ receptors is up-regulated in the lung of Streptozotocin (65 mg.kg⁻¹) (STZ)-treated rats 96 h before induction of pleurisy, and its activation leads to the migration of mononuclear and neutrophil cells into pleural cavity. In addition, we investigated the underlying mechanisms involved in the inflammatory response elicited by intrapleural (i.pl.) injection of des-Arg⁹-BK (100 nmol per site) in (STZ)-diabetic and control rats.
2. The intrapleural injection (i.pl.) of des-Arg⁹-bradykinin, (des-Arg⁹-BK) (50 and 100 nmol per site) , a selective B₁ receptor agonist, increased time-dependently the mononuclear and neutrophil cells influx in the pleural cavity of rats treated with STZ (65 mg.kg⁻¹, i.p., 4 days earlier). This effect was significantly less in control rats.
3. The influx of mononuclear and polymorphonuclear neutrophil cells induced by des-Arg⁹-BK was significantly inhibited by two selective B₁ antagonists (des-Arg¹⁰-Hoe 140 or R-715, 100 nmol per site, 5 min earlier), but not by two selective B₂ antagonists (Hoe 140, 10 nmol or NPC 18884, 100 nmol per site, 5 min earlier). However, Hoe 140 prevented the higher basal leukocyte influx seen in STZ-diabetic rats.

4. Leucocyte infiltration induced by des-Arg⁹-BK in STZ-diabetic rats was significantly reduced after treatment with insulin (2 U per day, s.c. over 4 days) or with an anti-PMN antibody (0.1 ml of a 1:20 dilution, i.pl. 5 min earlier).
5. Specific B₁ receptor binding sites were seen in lung sections from both control and STZ-diabetic rats, yet the density of labelling was much greater in diabetic rats and particularly after intrapleural injection of des-Arg⁹-BK. Treatment with insulin or with the anti-PMN antibody markedly reduced B₁ receptor binding sites occurring after the injection of des-Arg⁹-BK in STZ-diabetic rats.
6. The co-injection of IL-1RA (1 µg per site), the interleukin 1 receptor antagonist, with des-Arg⁹-BK (100 nmol per site) significantly inhibited both mononuclear and neutrophil cells migration induced by i.pl. injection of des-Arg⁹-BK in the Streptozotocin (STZ)-diabetic rats.
7. Both the mononuclear and neutrophil cells migration elicited by i.pl. injection of des-Arg⁹-BK (100 nmol per site), was inhibited by two inhibitors of the transcriptional nuclear factor-κB (NF-κB), the antioxidant pyrrolidinedithiocarbamate (PDCT), administered by intraperitoneal (i.p.) injection (100 mg.kg⁻¹, 1 h before pleurisy induction

- ($P < 0.001$) or N^α -p-tosyl-L-lysine (TLCK (2 mg.kg^{-1} , i.p.), administered 1 h before the pleurisy induction in the (STZ)-diabetic rats.
8. The i.t. injection of the selective NK_1 tachykinin receptor antagonist, LY 303870 (10 and 30 nmol per site), administered 5 min before pleurisy induction, significantly antagonised mononuclear and neutrophil cell migration caused by i.pl. injection of des-Arg⁹-BK ($P < 0.05$) by dose-response manner. In addition, the NK_3 receptor antagonist SB 222200 (10 and 30 nmol per site), administered 5 min before pleurisy induction, significantly prevented the mononuclear and neutrophil cells migration in response to i.pl. injection of des-Arg⁹-BK.
 9. The selective antagonists H_1 diphenhydramine (10 mg.kg^{-1}) and H_2 cimetidine (10 mg.kg^{-1}), when administered simultaneously by intraperitoneal injection, 30 min before induction of pleurisy by des-Arg⁹-BK, were effective in inhibited the mononuclear and neutrophil cells influx ($P < 0.05$).
 10. Together these dates suggest that the B_1 receptor is up-regulated in the lungs of STZ-diabetic rats, and its activation increases leukocyte infiltration into the pleural cavity. The overexpression of B_1 receptors seems to depend on neutrophils influx and appears to be associated with hyperglycaemia.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

1. No presente estudo demonstramos através de ensaios autoradiográficos e funcionais que o receptor B_1 para as cininas tem sua expressão aumentada em pulmões de ratos tratados com estreptozotocina -(STZ) (65 mg.kg^{-1}) 96 h antes da indução da pleurisia, e sua ativação leva ao influxo de células mononucleares e de neutrófilos para a cavidade pleural destes animais. Investigamos também os mecanismos fundamentais envolvidos na resposta inflamatória causada pela injeção intrapleural (i.pl.) de des-Arg⁹-BK (100 nmol per site) em ratos diabéticos- (STZ).
2. A injeção intrapleural (i.pl.) de des-Arg⁹-BK (50 and 100 nmol por sítio) , um agonista seletivo do receptor B_1 , aumentou de forma tempo-dependente o influxo de células mononucleares e de neutrófilos para a cavidade pleural de ratos tratados previamente com STZ (65 mg.kg^{-1} , i.p., 4 dias antes). Este efeito foi significativamente menor em ratos diabéticos injetados com salina.
3. O influxo de células mononucleares e de neutrófilos induzido pela des-Arg⁹-BK foi significativamente inibido por dois antagonistas seletivos para o receptor B_1 das cininas (des-Arg¹⁰-Hoe 140 ou R-715, 100 nmol por sítio, 5 min antes), porém não foi inibido por dois antagonistas do receptor B_2 para as cininas (Hoe 140, 10 nmol ou NPC 18884, 100 nmol

por sítio, 5 min antes). Entretanto, o Hoe 140 foi capaz de prevenir os leucócitos na cavidade pleural de ratos diabéticos injetados com salina.

4. A infiltração de leucócitos induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos- (STZ) foi significativamente reduzida pelo tratamento com insulina (2 U por dia, s.c. durante 4 dias) ou com o anticorpo anti-PMN (0.1ml de uma solução de 1:20 , i.pl. 5 min antes).
5. Foram quantificados os sítios de ligação específica para o receptor B₁ das cininas em secções de pulmões de ratos controle e de diabéticos-(STZ), sendo que a densidade de receptores foi muito maior em ratos diabéticos do que em ratos controle, particularmente depois da injeção intrapleural de des-Arg⁹-BK. O tratamento com insulina ou com o anticorpo anti-PMN reduziu marcadamente os sítios de ligação específica para o receptor B₁ para as cininas quantificados 4 h após a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos- (STZ).
6. A co-injeção de IL-1ra (1 µg por sítio), um antagonista do receptor para a interleucina-1, com a des-Arg⁹-BK (100 nmol por sítio) inibiu significativamente ambos, células mononucleares e neutrófilos que migraram para a cavidade pleural após a injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos-(STZ).

7. A migração de ambos, células mononucleares e neutrófilos induzida pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK (100 nmol per site), foi inibida pelo tratamento com dois inibidores do fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB), um antioxidante pirrolidina-ditiocarbamato (PDCT), administrado através de injeção intraperitoneal (i.p.) (100 mg.kg⁻¹, 1 h antes da pleurisia (P<0.001) ou N^α-p-tosil-L-lisine (TLCK (2 mg.kg⁻¹, i.p.) , administrada 1 h antes da pleurisia induzida em ratos diabéticos-(STZ).
8. A injeção i.pl. do antagonista seletivo para o receptor traquicinérgico NK₁, LY 303870 (10 and 30 nmol per site), administrado 5 min antes da indução da pleurisia, antagonizou significativamente as células mononucleares e os neutrófilos causados pela injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK de maneira dose-dependente. Ainda, o antagonista seletivo do receptor traquicinérgico NK₃ SB 222200 (10 e 30 nmol por sítio), administrado 5 min antes da indução da pleurisia, foi capaz de prevenir a migração de células mononucleares e dos neutrófilos em resposta à injeção i.pl. injection de des-Arg⁹-BK (P< 0.05).
9. Os antagonistas seletivos para o receptor H₁ difenidramina (10 mg.kg⁻¹) e para o receptor H₂ , cimetidina (10 mg.kg⁻¹), quando administrados simultaneamente por via intraperitoneal, 30 min antes da indução da

pleurisia através da injeção i.pl. de des-Arg⁹-BK, foram efetivos em inibir o influxo de células mononucleares e de neutrófilos ($P < 0.05$).

10. Analisados em conjunto esses resultados sugerem que o receptor B₁ tem sua expressão aumentada em pulmões de ratos diabéticos (STZ), e que sua ativação aumenta a infiltração de leucócitos na cavidade pleural destes animais. A indução do receptor B₁ parece depender do influxo de neutrófilos e está amplamente relacionada com a hiperglicemia que se instala na diabetes mellitus. Além disso, este trabalho demonstra pela primeira vez, a presença de receptores B₁ em neutrófilos de rato.

8. TRABALHOS PUBLICADOS

- COUTURE, R., HARRISSON, M., VIANNA, RM, CLOUTIER, F.
Review: Kinin receptors in pain and inflammation. Eur. J. Pharmacol.
429: 161-176, 2001.

- VIANNA, R.M.J., ONGALI, B., REGOLI, D., CALIXTO, J.B. and
COUTURE, R.**Up-regulated of kinin B₁ receptor in the lung of
streptozotocin-diabetic rat:autoradiographic and functional evidence.**
Br. J.Pharmacol. , 138:13-22, 2003.

- VIANNA, R.M.J., REGOLI, D., CALIXTO, J.B. and COUTURE, R.. **The
in vivo role of SP, IL-1 β and nuclear factor- κ B pathways in the up-
regulation of B₁ receptor-mediated pleurisy in streptozotocin-diabetic
rats.** (em preparação)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOUH, M., KHANJARI, A., ABDELAZZIZ, ONGALI, B., COUTURE, R., HASSÉSIAN, H.M. Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 140: 33-40, 2003.
- ABELOUS , J.E., BARDIER, E. Les substances hypotensives de l' urine humaine normale. *C.R. Senaces Soc. Biol.*, 66: 511, 1909.
- ADVENIER, C., LAGENTE, V., BOICHOT, E. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur. Respir. J.* 10: 1892-1906, 1997.
- AHLUWALIA, A. e PERRETI, M. Calcitonin gene-related peptides modulate the acute inflammatory response induced by interleukin-1 β in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 264: 407-415, 1994.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M. . Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polimorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. *J. Immunol.* 156: 269-274, 1996.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M.. B₁ receptors as a new inflammatory target. Could this B be the 1?. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 100-104, 1999.
- ALTAMURA, MEINI, S., QUARTARA , L. and MAGGI, C.A.. Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regul. Pept.* 80: 13-26, 1999.
- 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.
- ANGERS, M., DROUIN, R. BACHVAROVA, M., PARADIS, I., MARCEAU, F., BACHVAROV, D.R. in vivo protein-DNA interactions at the kinin B1 receptor gene promoter: No modification on interleukin-1 β por lipopolisacharide induction. *J. Cell .Biochem.* 78: 278-396., 2000.
- ARAUJO, 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., FUJOWARA, T., KATAYAMA, A., KAYAKIRI, H., SATOH, S., 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.
- AUSTIN, A. , FAUSSNER, H.E., ROBINSON, S. , CHAKRAVARTY, D.J., KYLE, J.M. BATHON and D. PROUD . Stable expression of the human kinin B₁ receptor in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272: 11420-11425, 1997.
- BACHVAROV, D.R., SAINT-JACQUES, E., LARRIVÉE, J.F., LEVESQUE, L., RIOUX, F., DRAPEAU, G. e MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 1623-1630, 1995.
- BACHVAROV, D.R., HESS., J.F., MENKE, J.G., LARRIVÉE, J.F., MARCEAU, F. Structure and genomic organization of the human B₁ receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics*, 33: 374-381, 1996.
- BARABÉ, J., BABIUK, C., REGOLI, D. Binding of [³H]des-Arg⁹-Bk to rabbit anterior mesenteric vein. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 60:1551-1555, 1982.
- BARNES, P.J., ADCOCK, I.M. NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol., Sci.* 18: 46-50, 1997.
- BARNES, P.J., KARIN, M. Nuclear factor - κ B, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Eng. J. Med.*, 366: 1066-1071, 1997.
- BASCANDS, K-L., PECHER, C. ROUAUD, S., EMOND, C., TACK, J.L. BATIE, 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.

- BIERHAUS, A., SHIEKOFFER, S., SHUANINGER, M., ANDRASSY, M., HUMBERT, P.M., CHEN, J., HONG, M., LUTHER, T., HENLE, T., KLOTING, I., HOFFMAN, M., MORCOS, M., TRITSCHELER, H., WEIGLE, B., KASPER, M., SMITH, M., GEORGE, P., SCIMMIDT, A., STERN, D., HARING, H.U., SCHLEICHER, E., NAUROTH, P. Diabetes-associate sustained activation of the nuclear transcription factor NF-kB. *Diabetes*, 50: 2792-2808, 2001.
- BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D. and WORTHY, K. R.S.L. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44:1-80, 1992.
- BHOOLA, K., RAMSAROOP, R., PLENDL, J., CASSIM, B., DLAMINI, Z. and S. NAICKER. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol. Chem.* 382:77-89, 2001.
- BLAIS, C., Jr., MARCEAU, F., ROULEAU J.L. e 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.
- BOCKMANN, S., PAEGELOW, I., Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J. Leukocyte Biol.* 68, 587-592, 2000.
- BOCKMANN, S., MOHRDIECK, K., PAEGELOW, I. Influence of interleukin-1 on bradykinin- induced responses in guinea pig macrophages. *Inflamm. Res.* 48: 56-62, 1999.
- BOOTH, G., STALKER, T.J., LEFER, A.M. ESCALIA ,R. Elevated ambient glucose induces acute inflammatory events in the microvasculature: effects of insulin. *AJP Endocrinology and Metabolism*, 6:848-856, 2001.
- BORKOWSKI, J.A., RANSOM, R.W., SEABROOK, G.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.G., STRADER, C.D., HESS, J.F. Targeted disruption of a B₂ bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J.Biol. Chem* 270:13706-13710, 1995.

- BURCH, R.M., CONNOR, J.R.r., TIFFANY, C.W. The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation. *Agents Actions* 27:258-26, 1989.
- BURCH, R.M. and DeHASS, C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 189-193, 1990.
- BURCH, R.M., KYLE, D.J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.*, 50: 829-838, 1992.
- BURGESS, G.M., PERKINS, M.N., RANG, H.P. CAMPBELL, E. A., BROWN M.C., McINTYRE P., URBAN, L, DZIADULEWICZ, E.K., RITCHIE, T.J., HALLETT, A., SNELL, C.R., WRIGLESWORTH, R, LEE, W., DAVIS, C, PHAGOO, S.B., DAVIS, A.J., PHILLIPS, E., DRAKE G.S., HUGHES, G.A., DUSNTAN A., BLOONFIELD, G.C.. Bradizide, a potent non-peptide B₂ bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*128:77-86, 2000.
- BÚRIGO, A.C., CALIXTO, J.B. e MEDEIROS, Y.S.. Pharmacological profile of the rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. *J.Pharm.Pharmacol.*, 48: 48-52, 1996.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA , J. e CAMPOS, M.M.. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87:1-5, 2000.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA , J. e CAMPOS, M.M., Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Current Option in Anaesthesiology*, 14: 519-526, 2001.
- CAMPBELL , D.J.Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 665-677, 2000.
- CAMPOS, M.M. e CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M. SOUZA, G.E.P. e 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.

- CAMPOS, M.M, HENRIQUES, M.G.M.O. e CALIXTO , J.B. The roles 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, SOUZA , G.E.P. e CALIXTO , J.B. (Modulation of kinin B₁- but not B₂-receptors mediated rat paw edema by IL-1 and TNF. *Peptides* 19:1269-1276, 1998.
- CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P. e CALIXTO, J.B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor B pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1851-1859, 1999.
- CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Neurokinin mediaton of edema and inflammation. *Neuropeptides*, 34 (5), 314-322, 2000.
- CAMPOS, M.M., CABRINI, D.A., CARDOZO, A.H.M., RAE, G.A., HUIDOBRO TORO , J.-P. e J.B. CALIXTO. 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., SOUZA, G.E.P. RICCI, N.D., PESQUERO, J.L., TEIXEIRA, M., e CALIXTO, J.B. The role of migrating leukocytes in IL-1 β - induced up-regulation of kinin B₁ receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 135:1107-1114, 2002.
- CAO, T., PINTÉR, E., AL-RASHED, S., GERARD, N., HOULT, J.R. e BRAIN, S.D., Neurokinin-1 receptor agonist are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J. Immunol.* 164: 5424-5429, 2000.
- CHAI, K.X., NI, A, WANF, D., WARD, D.C., CHAO, J. e CHAO, L. Genomic DNA sequence, expression and chromosomal localization of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics*, 31:51-57, 1996.
- CLOUTIER, F., COUTURE, R. Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B₁ and B₂ receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 130: 375-385, 2000.

- CLOUTIER, F., de SOUSA BUCK, ONAGLI, B., COUTURE, R. Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B2 receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1641-1654.
- COUTURE, R. e LINDSEY, C.J. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: R. Quirion, A. Björklund and T. Hökfelt, Editors, *Handbook of Chemical Neuroanatomy Peptide Receptors, Part I* 16: 241-300, 2000.
- COUTURE, R., HARRISSON, M., VIANNA, RM, CLOUTIER, F. Review: Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 161-176, 2001.
- CHRISTOPHER, J., JAFFA, A.A. Diabetes modulates the expression of glomerular kinin receptors. *International Immunopharmacology* 2: 1771-1779, 2002.
- DEBLOIS, D. e 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.
- DÉCARIE ,A., RAYMOND, A.P. GERVAIS, N., COUTURE, R. , ADAM. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹] BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 270: H1340-H1347, 1996a.
- DÉCARIE ,A., ADAM, A., COUTURE, R. Effects of captopril and icatibant on bradykinin (BK) and [des-Arg⁹]-BK in carrageenan-induced edema *Peptides* 17:1009-1015, 1996b.
- DEVILLIER, P.; RENOUX, M.; RAPEAU, G. REGOLI, D. Histamine release from rat peritoneal mast cells by kinin antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 149 (1-2): 137-140, 1988.
- DRAY, A. and M.N. PERKINS. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16: 99-104, 1993.
- DRAY, A. and M.N. PERKINS, Kinins and pain. In: S. Farmer, Editor, *The Kinin System*, Academic Press, San Diego 157-172, 1997.

- DUKA I., KINTSURASHVILI, E., GAVRAS, I., JONS, C., BRESNAHAN, M., GAVRAS, H. Vasoactive potential of the B₁ bradykinin receptor in normotension and hypertension . *Circ. Res.* 88:275-281, 2001.
- 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. and PROUD, D. Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology* 45:13-20, 1999.
- FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., CAMPOS, ARAÚJO, G.V.C.J., PESQUERO, J.L., AVELLAR, M.C., TEIXEIRA, M.M., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B₁ receptors in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* : 1-9, 2003.
- FERREIRA, P.K.; CAMPOS, M.M. e J.B. CALIXTO. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B₁ agonist des-Arg⁹-BK in rats pre-treated with LPS. *Regul. Pept.* 89: 29-35, 2000.b
- 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* 41: 1006-1012, 2001.
- FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., ARAÚJO, R.C., BADER, M. PESQUERO, J.B., CALIXTO, J.B. The use of kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinin at the spinal level. *Neuropharmacol.* 43: 1188-1197, 2002.

- FIGUEROA, C.D., STUARDO, M., GONZALEZ, C.B., NUALART, F., CORTHORN, J., BORIC, M., BHOOLA, K.D. Hydrolysis of kininogens by degranulated human neutrophils and analysis of bradykinin as chemotactic factor for cells isolated from peripheral blood. *Immunopharmacology* 43: 211-217, 1999.
- FRENETTE, T.N., MAYADAS, H., RAYBURN, R.O., HYNES, D.D., WAGNER. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84: 563-574, 1996.
- 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-SALEH, T.S., CALIXTO, J.B., MEDEIROS, Y.S. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*, 20 (2) 259-265, 1999.
- GABRA, B.H., SIROIS, P.. Kinin B₁ receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 37: 34-44, 2003
- GALLI, S.J., COSTA, J.J. Mast cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy* : 851-862, 1995.
- GEPPETTI, P., Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.*, 47: 1-23, 1993.
- GIGLI, I., MASON, J.W., COLMAN, R.W., AUSTEN, K.F. Interaction of plasma kallikrein with C1 inhibitor. *J. Immunol.* 104: 574-81, 1970.
- 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. e 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.

- HADDAD, E.-B., FOX, A.J., ROUSELL, J., BURGESS, G., McINTYRE, P., BARNES, P., CHUNG, K.F. post-transcriptional regulation of bradykinin B₁ e B₂ receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor α . *Mol. Pharmacol.* 57: 1123-1131, 2000.
- HALL, J.M Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles, *Pharmacol. Ther.* 56: 131-190, 1992.
- HALL, J. e MORTON, I.K.M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In the System. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, 9-43, 1997.
- HENDERSON, L.M., FIGUEROA, C.D., MÜLLER-ESTERL, W, STRAIN, A., BHOOLA, K.D. Immunovisualization of plasma prekallikrein in hepatocytes and on neutrophils. *Agents Actions* 38:590-594.
- HERMANN, A, ARNHOLD, M., KRESSE, H., NETH, P., FINK, E. Expression of plasma prekallikrein mRNA in human nonhepatic tissues and cell lines suggests special local functions of the enzymes. *Biol. Chem.* 380: 1097-1102, 1999.
- HERWALD, H. RENÉE, T. MEIJERS, J.C.M., CHUNG, D.W., PAGE, J.D., COLMAN R.W., MULLER-ESTERL. W. Mapping of the discontinuous kininogen binding site of prekalikrein. A distal binding segment is located in the heavy chain domain A4. *J. Biol. Chem* 271: 13061-7, 1996.
- HESS, J.F.BORKOWSKI, J.H. YONG, G. S., STRADER, C.D., e RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 260-268, 1992.
- HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., MACNEIL, T., STONESIFER, G.Y., FRAHER, J. E STRADER, C.D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 1-8, 1994.
- HESS J.F., HEY, P.J., CHEN, T.-B., O'BRIEN, J., Omalley, S.S., Pettibone, D.J. and Chang, R.S.L. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B₁ and B₂ bradykinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 123-129, 2001.

- HO, W.-Z., LAI, J.-P., ZHU, X.-H., UVAYDOVA, M. e DOUGLAS, S.D.. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.* 159: 5654-5660, 1997.
- HOCK, J., VOGEL, R., LINKE, RP., MÜLLER,-ESTERL, W., High molecular weight kininogen-binding site of prekallikrein probed by monoclonal antibodies. *J. Biol Chem* 265: 12005-11, 1990.
- 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.
- HOLZER ,P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen. Pharmacol.* 30: 5-11, 1998.
- HUSSAIN, M.J., PEAKMAN, M., GALLATI, H. , LO, S.S.S., HAWA, M. , VIBERTI, G.C. , WATKINS, P.J. , LESLIE , R.D.G. e VERGANI, D. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 39: 60-69, 1996.
- JOHSON, R.C., MAYADAS, T.N., FRENETT, P.S., MEBIUS, R.E. SUBRAMANIAM, M., LACASCE, A., HYNES, R.O., WAGNER, D.D. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood* 86(3):, 1106-1114, 1995.
- KÄHLER, C.M., PISCHEL., KAUFMANN, WIEDERMANN, J. Influence of neuropeptides on neutrophil adhesion and transmigration through a lung fibroblast barrier in vitro. *Exp. Lung Reser.* 27: 25-46, 2001.
- KAPLAN, A.P. e SILVERBERG, M. The coagulation –kinin pathway of human plasma. *Blood* 70, 1-16, 1987.
- KOYAMA, S., SATO., E., NUMANAMI, H, KUBO, K., NAGAI, S., IZUMI, T.. Bradykinin stimualuates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am. J. Resp. Cell Mo., Biol.*, 22: 75-84, 2000.
- KRAUT, H., FREY, E.K., WERLE, E. Der Nachweis krieslaufhomons in der pankreasdruse. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , 189: 97-106, 1930.

- KRAMMERER, S. BRAUM, H., ARNOLD, N. e ROSCHER, AA. 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.
- 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.
- LARRIVÉ, 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.
- LAMONTAGNE, D., NAKHOSTINE, N. COUTURE, R. NADEAU, R. (). Mechanisms of kinin B₁- receptor-induced hypotension in the anesthetized dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 28, 645-650, 1996.
- LENTSCH, A .B., WARD, P.A . Activation and regulation of NF- κ B during acute inflammation. *Clin Chem Lab Med*, 37(3): 205-208, 1999.
- LIANG, YF. HAAKE, B., REEH, P.W., Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J. Physiol* 532:228-239, 2001.
- LIEBMANN, C. REISSAMANN, S., ROBBERECHT, P. e AROLD, H. Bradykinin in the rat duodenum: receptor binding and influence on the cyclic AMP system. *Biomed. Biochim. Acta* 46: 469-478, 1987.
- LIEBMANN, C. BOMER, F-D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross talk with receptors tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. *Curr Med Chem* 7: 911-943, 2000.
- LIEBMANN, C., Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem* 382: 49-55, 2001.
- 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.

- LOPES, P., KAR, S., CHRÉTIEN, L., REGOLI, D., QUIRION, R., COUTURE, R. Quantitative autoradiographic localization of [125 I-Tyr 8] bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 68:867- 881.
- LUCKIÉ, M.L., STOSIÉ-GRUJIÉ, S. e SHAHIN, A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev. Immunol.* 6:119-129, 1998.
- MA, J.X., WANG, D.Z., CHAO, J., e CHAO, L. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B $_2$ receptor. *Gene* 149: 283-328, 1994a.
- MA, J.X., WANG, D.Z., WARD, D.C., CHEN, L., DENAI, T., CHAO, J., e CHAO, L. Structure, and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B $_2$ receptor. *Genomics* 23:362- 369, 1994b.
- MA., P HILL, R. e SIRINATHSINGHJI, D. Basal expression of bradykinin B $_1$ receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *NeuroReport* 11: 4003-4005, 2000.
- MACNEIL, T., BIERILLO, K.K., MENKE, J.G. HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B $_1$ receptor. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expres.*, 1264: 223-228, 1995.
- MAGE, M., PÉCHER, C., CELLIER, E., COUTURE, R., SCHANSTRA, J.P., BASCANDS, J.L., GIROLAMI, J.P., Induction of B $_1$ and B $_2$ receptors in streptozotocin diabetic rats; involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular MAP-kinases. International Symposium on Reptide Receptors, Montreal, Canada, Abstract, 2001
- MAHABEER, R., BHOOLA, K.D. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol. Ther.* 88: 77-89, 2000.
- MANNING, D.C., VAVREK, E., STEWART, J.M., SNYDER, S.H. Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 237:504-512, 1986.

- MARCEAU, F., GENDREAU, M., BARABÉ, J. ST-PIERRE, S., REGOLI, D. The degradation of bradykinin (BK) and of des-Arg⁹-BK in plasma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59: 131-8, 1981.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptors: review. *Immunopharmacology* 30: 1-26, 1995.
- MARCEAU, F., BACHVAROV, D.R., Kinin receptors . *Clin. Rev. Allergy Inflammation* 16: 385-401, 1998a.
- MARCEAU, F., HESS, J.F., BACHVAROV, D.R., The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386, 1998b.
- MARCEAU, F., LARRIVÉE, J.-F. , BOUTHILIER, J. ,BACHVAROVA, M. , HOULE, S. e BACHVAROV, D.R.,.Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B₁ and B₂ receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 277 : R1568-R1578., 1999.
- MARCEAU, F., ADAM, A., HOULE, S.,, BOUTHILLIER, J. , BACHVAROVA, M. e BACHVAROV, D.R., Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol. Chem.* 382: 131-133, 2001.
- MASS,J., RAE, A.G., HUIDOBRO-TORO, J., CALIXTO, J.B. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1471-1477, 1995.
- MATHIS, S.A., CRISCIMAGNA, N.L. and LEEB-LUNDBERG, L.M.F. B₁ and B₂ kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signalling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 50: 128-139, 1996.
- MATHIS, D., VENCE, L. e BENOIST, C. β-cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414: 13, 792-798, 2001.
- MATIS, L., LAVKER R.M e MURPHY , G.F. Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. *J. Invest. Dermatol.* 94: 492-495, 1990.

- McEACHERN, A, SHELTON, E., BHAKTA, S. OBERNALTE, R.BACH, C., ZUPPAN, P, FUJISAKI, J. ALDRICH, R., JARNAGIN, K. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (New York), 88: 7724-7728, 1991.
- McINTIRE, K.W., STEPAN, G.J., KOLINSKY, K.D., BENJAMIN, W.R., PLOCINSKI, J.M., KAFFKA, K.L., CAMPEN, C.A, CHIZZONITE, R.^a, KILIAN, P.L. Inhibition of interleukin -1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti IL-1 receptor monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 173: 931-939, 1991.
- McINTIRE, T.M., MODUR, V., PRECOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thromb. Haem.* 78:302-305, 1997.
- McLEAN, P.G., PERRETTI, M e AHULUWALIA, A. Kinin B₁ receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc.Res.* 48: 194-210, 2000a.
- McLEAN, P.G., AHULUWALIA, A. e PERRETTI, M. Association between kinin B₁ receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J. Exp. Med.* 192, 367-380, 2000b.
- MEDEIROS, R., CABRINI, D.A., CALIXTO, J.B. The “in vivo”and ex vivo” roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor-κB and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor-mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul.Pept.* 97:121-130, 2001.
- MEIJERS, J.C.M., KANTERS, D.H.A.J.. VLOOSWIJK , R.A.A. van ERP. H.E., HESSING, M. BOUMA, B.N. Inactivation of human plasma kallikrein and fator XIa by protein C inhibitor. *Biochemistry*, 27: 4231-7, 1988.
- MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERILO, K.K., MacNEIL, T., DERRICK, A.W. SCHNECK, K.A. RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L. e HESS , J.F.. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269:21583-21586, 1994.
- METCALFE, D.D., BARAM, D., MEKORI, Y, A,. Mast cells. *Physiol Ver.* 77:, 1033-1079, 1997.

- MUNOZ, C.M., CPTECCHIA, S. e LEEB-LUNDBERG, L.M.F. B₂ kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 336-344, 1993.
- MUNOZ, C.M. e LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Receptor-mediated internalization of bradykinin DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J. Biol. Chem.* 267: 303-309, 1992.
- MURONE, C., PAXINO, G., MCKINLEY, M.J., OLDFIELD, B.J., MÜLLER-ESTERL, W., MEDELSON F. Distribution of bradykinin B₂ in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J. Comp Neurol* 381: 203-218.
- NAKAGAWA, H. SANO e I. IWAMOTO. Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. *Peptides* 16: 721-725, 1995.
- NAKHOSTINE, N., RIBUOT, C., LAMONTAGNE, D., NADEAU, R., COUTURE, R. Mediation by B₁ and B₂ receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* 110: 71-76, 1993.
- NAVARRO, M., FRONTERA, M., ZUCOLLO, A., CATANZARO, O. Nitric oxide (NO) changes accompanying the progression from early insulinitis to diabetes. International Symposium on Peptide Receptors, Montreal, Canada, July 29-August 2, Abstract, 2001.
- NI, A., CHAO, L. e CHAO, J. Transcription factor nuclear factor NF- κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 2784-2791, 1998a.
- NI, A., CHAI, KX., CHAO, L. e CHAO J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochem. Biophys. Acta* 1442: 177-185, 1998b.
- NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F., PERRON, S.I., HESS., J.F., R REGOLI, D. Kinin B₁ and B₂ receptors in the mouse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1759-1764, 1995.

- NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F., PERRON, S.I., HESS., J.F., R REGOLI, D. Effects of kinin on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor mice. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 191-196, 1998.
- ONGALI, B., BUCK,, H.S., CLOUTIER, F., LEGAULT, F., REGOLI, D. LAMBERT, C., THIBAUT, G., COUTURE, R.,. Up-regulation of spinal B₂ kinin receptors by ACE inhibitors in spontaneously hypertensive rat. International Symposium on Peptide Receptors, Montreal, Canada, July 29-August 2, Abstract, 2001.
- PAN, Z.K., ZURAW, B.L., LUNG C.C., PROSSNITZ, E.R., BROWNING, D.D.e YE, R.D. Bradykinin stimulates NF-B activation and interleukin 1 gene expression in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 98: 2042-2049, 1996.
- PANÉS, J., KUROSE, I., RODRIGUES-VACA, M.;ANDERSON, D.C.; MYASAKA, M.; TSO , P.; GRANGER, N. Diabetes Exacerbates Inflammatory Response to Ischemia-Reperfusion. *Circ.* 93: 162-167, 1996.
- PERKINS , M.N. e 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.
- PERRETTI, A. AHLUWALIA, R.J. FLOWER e S. MANZINI , Endogenous tachykinins play a role in IL-1-induced neutrophil accumulation: involvement of NK-1 receptors. *Immunology* 80: 73-77, 1993.
- PESQUERO, J.B. , PESQUERO, J.L.,. OLIVEIRA, S.M, ROSSCHER, A.A., METZGER, R. , GANTEN, D. and BADER , M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 219-225, 1996.
- PESQUERO, J.B., ARAÚJO, R.C., HEPPESTALL, P.A., STUCKY, J.A. SILVA, C.L. , WALTHER, T. ,. OLIVEIRA, S.M, PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C.M., CALIXTO, J.B., Lewin, G.R. e Bader, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 8140-8145, 2000.

- PHAGOO, S.B., POOLE, S. e LEEB-LUNDBERG , L.M.F. (). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 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.F. , WARBURTON, D. Bradykinin B₁ receptor up-regulation by interleukin-1 β and B₁ agonist occurs through independent and synergistic intracelular signaling mechanisms in human lung fibroblasts *J.Pharmacol.Exp.Ther*, 298 (1): 77, 2001.
- PHENG, L.H., NGUEYN-LE, X.K., NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F. e REGOLI , D. Kinin receptors in the diabetic mouse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 609-611, 1997.
- 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. *Inflammation Research* 50: 570-576, 2001.
- PRADO, N.G., TAYLOR, L, ZHOU, X., RICUPERO, D. MIERKE, D.F., POLGAR, P.. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1. *J. Cel. Physiol.*, 193: 275-286, 2002.
- 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, 1999.
- PRIBRAM, H., HERNHEISER, G. Zur Kennits der adialysablen Bestandteile des menschenharnes. *Biochem Z.* 111- 30, 1920.
- RAHMAN, I. e MACNEE , W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, 53: 61-612, 1998.
- RAYMOND, P., DRAPEAU, G., RAUT, R., AUDET, R., MARCEAU, F., ONG, H., ADAM, A. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J. Immunol. Methods.* 180: 247-257, 1995.

- REGOLI, D. & BARABÉ, J. e PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 855-867, 1977.
- REGOLI, D. & BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 32, 1-46, 1980.
- REGOLI, D., Nsa ALLOGHO, S., RIZZI, A. and GOBEIL, F. Jr. (). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348:1-10, 1998.
- REGOLI, D., RIZZI, A., PERRON, S.I. and GOBEIL, F. Classification of kinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 31-35, 2001.
- RENÉE, T. DEIO, J. MEIJERS, J.C.M., CHUNG, D.W., MULLER-ESTERL, W. Mapping of the discontinuous H-kininogen binding site of plasma prekallikrein. Evidence for a critical role of apple domain-2. *J. Biol. Chem.*, 274:25777-84, 1999.
- RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of de insulin secreting cells. *Pharmacol. Ver.* 22(4):485-518, 1970.
- ROCHA E SILVA, M.O, BERALDO, W.T. ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasmaglobulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol*, 156: 261-73, 1949.
- ROTHSCHILD, A.M., MELO, V.L., REIS, M.L., FOSS, M.C., GALLO, L. J. Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro. *Arch. Pharmacol.*, 360, 217-220, 1999.
- SALEH, S.F., VIANNA, R.M.J., CRECZINSKI-PASA, T., CHAKRAVARTY, S., MAVUNKEL., B.J., KYLE, D., CALIXTO, J.B. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol* 363: 179-187, 1998.
- SALTIEL, A.R., KAHN, R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- SANTOS, D.R., CALIXTO, J.B. & SOUZA, G.E.P., Effect of a kinin B₂ receptor antagonist on LPS- and cytokine- induced neutrophil migration in rats. *Br. J. Pharmacol.* , 139: 271-278, 2003.

- SATO, F., KOYAMA, S., NOMURA, H., KUBO, K. e SEKIGUCHI, M. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. *J. Immunol.* 157: 3122-3129, 1996.
- 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.
- SHAPIRA, M. SCOTT, C.F., COLMAN, R.W. Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallidrein in plasma. *J.Clin. Invest.* 69: 462-468, 1982.
- SCHMIDLIN F., LOEFFER, S. BERTRAND, C. PLA2 phosphorylation and cyclooxygenase-2 induction, through p38 MAP kinase pathway, is involved in the IL-1 β induced bradykinin B₂ receptor gene transcription. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* , 361: 247-254, 2000.
- SCHREMMER-DANNINGER, E., HEINZ-ERIAN, P, TÖPFER-PETERSEN, ROSCHER, A.A. Autoradiographic localization and characterization of bradykinin receptors in human skin. *Eur. J. Pharmacol* 207-216, 1995.
- SHANSTRA, J.P., BATAILLE, E., MARIN CASTANO., M.E., 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-kB and induces homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J.Clin.Invest.* 101: 2080-2091, 1998.
- SCHANSTRA, J. MARIN-CASTAÑO, M.E., PRADDAUDE, F., TACK, I., ADER, H., GIROLAMI, J.P., BASCANDS, J.L. Bradykinin B₁ receptor-mediated changes in renal hemodynamics during endotoxin – induced inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1208-1215, 2000.
- SMITH, C.H. BARKER, J.N.W.N.. MORRIS R.W MacDONALD D.M. e LEE , T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J. Immunol.* 151: 3274-3282, 1993.

- SUNG, C.P ARLETH, A.J. AIAR, N. BHATNAGAR, P.K. LYSKO, P.G. e FEUERSTEIN, G. CGRP stimulates the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells. *Peptides* 13: 429-434, 1992.
- TIFFANY, W e BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 247: 189-192, 1989.
- TISH, E e McDEVITT.H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297, 1996.
- TOMLINSON, S.M. GARDINER, R.A. HEBDEN e T. BENNETT. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.* 44: 103-150, 1992.
- TSUKAGOSHI, H., HADDAD, EL-B., BARNES, P., CHUNG, F. Bradykinin receptor subtypes in rat lung: effect of interleukin-1 β . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 1257-1263, 1995.
- TUOMILEHTO, J., TUOMILEHTO-W., ZIMMET, P., ALBERTI, e KNOWLER, W. in International Textbook of Diabetes Mellitus 2nd ed, Alberti, K, Zimmet, P., FeFronzo, R. e Keen, H., eds, 1799-1827 Wiley, Chicester, 1997.
- UNDURTI, N. Insulin and inflammation: further evidence and discussion. *Nutrition*, 18 (6): 526-527, 2002.
- VAVREK, R., STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptide* 6: 161-164, 1985.
- VIANNA, R.M.J. e CALIXTO., J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 281-291, 1998.
- WANG, D.Z., MA, J-X, CHAO, L. e CHAO, J. Molecular cloning and sequence analysis of rat bradykinin B2 receptor gene. *Biochem. Biophys Acta*, 1219: 171-174, 1994.

- WATANABE, M., YOSHIHARA, S., ABE, T., OYAMA, M. ARISAKA, °
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, 1998.
- WERLE, E. GOTZE, W., KEPLER., A. Uber die Wirkung des kallikreins auf den isolierten darm un uber eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem Z.* 289: 217-233, 1937.
- WIERUSZ-WYSOCKA ,B., WSOCKI, H., SIEKIERKA, H., WYKRETOWICZ, A., SXCZEPANIK, A., LIMAS, R. Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with insulin-dependent diabete mellitus. *J.Leukoc.Biol.* 42: 519-523, 1987.
- WIRTH, K., BREIPOHL, G. STECHL, J., KNOLLE, L., HENKE, S. SCHÖLKENS, B.A. Des-Arg⁹-D-Arg-[Hyp³,Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (des-Arg¹⁰-[Hoe 140) is a pontet bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 205: 217-218, 1991
- WOTHERSPOON, G. e WINTER, J. Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neuroscience Lett.* 294, 175-178, 2000.
- YANG, X e POLGAR, P. Genomic structure of the human bradykinin B1 receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 718-725, 1996.
- YERNEMI, K.K.V., BAI, W., KHAN, B.V., MEDFORD, R.M., NATARAJAN, R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 48: 855-864, 1999.
- ZIMMET, P., ALBERTI, K.G.M.M. e SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414:13, 782-787, 2001.
- ZIMMERMANN, N. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.
- ZHOU, X., POLGAR , P. e TAYLOR , L. Role for interleukin-1, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem. J.* 330: 361-366, 1998.

ZUCCOLLO, A., NAVARRO, M. e CATANZARO, O. Effects of B₁ and B₂ kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 586-589,1996.

ZUCCOLLO, A., NAVARRO, M. FRONTERA, F. CUEVA, M. CARATTINO e O.L. CATANZARO, The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulitis). *Immunopharmacology* 45: 69-74, 1999.