

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Histórico do sistema caliceínas-cininas.....	01
1.2. Panorama atual do sistema caliceínas-cininas.....	04
1.3. Participação das cininas na produção da dor.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Medidas de parâmetros experimentais relacionados a dor.....	23
3.2.1. Hiperalgesia térmica.....	23
3.2.2. Alodínia mecânica.....	23
3.3. Modelos experimentais de dor crônica.....	24
3.3.1. Nocicepção induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA).....	24
3.3.2. Lesão parcial do nervo ciático.....	24
3.3.3. Tratamentos.....	25
3.4. Modelos experimentais de dor aguda.....	26
3.4.1. Nocicepção espontânea causada pela formalina.....	26
3.4.2. Hiperalgesia térmica espinhal causada pela bradicinina ou pela des-Arg ⁹ -bradicinina.....	26
3.5. Medidas relacionadas com o processo inflamatório.....	28
3.5.1. Medida do edema de pata.....	28
3.5.2. Medida da temperatura local.....	28
3.5.3. Medida dos níveis de interleucina-1 β	28
3.5.4. Medida dos níveis de prostaglandina E ₂	29
3.5.5. Atividade da mieloperoxidase.....	30
3.6. Drogas.....	30
3.7. Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Participação dos receptores de cininas na nocicepção crônica causada pelo CFA.....	32
4.2. Participação de receptores espinhais para cininas na transmissão da dor.....	39
4.3. Participação dos receptores para as cininas na resposta inflamatória local induzida pelo CFA.....	44
4.4. Aumento da expressão do receptor B ₁ em animais nocautes para o receptor B ₂	48
4.5. Participação dos receptores B ₁ na dor neuropática.....	52
5. DISCUSSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
7.0 SUMMARY.....	116
8.0 ANEXOS.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico do sistema caliceínas-cininas

A história das cininas inicia-se em 1909 quando os cirurgiões franceses Abelous e Bardier observaram que a injeção intravenosa de uma fração da urina humana insolúvel em álcool causava queda transitória da pressão arterial de cães anestesiados (ABELOUS e BARDIER, 1909; para revisão ver: REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992). Em 1928, os pesquisadores alemães Frey e Kraut atribuíram o efeito hipotensor da fração da urina à presença de uma substância termolábil e não-dializável. Esta substância foi denominada de substância F (para Frey) ou *Kreislaufhormon*, pois supunha-se que a mesma fosse um hormônio circulante originado fora dos rins e excretado pela urina (FREY e KRAUT, 1928). Frey e Kraut também observaram que a urina contaminada com sangue ou com soro não era capaz de produzir efeito hipotensor, o que indicava a existência de um inativador sérico para a substância F (FREY e KRAUT, 1928; para revisão ver: WERLE, 1970).

A procura da glândula de origem resultou na descoberta de um princípio hipotensor similar ao encontrado no pâncreas, motivo pelo qual esta substância foi chamada de caliceína (do grego *kallikreas*, termo para pâncreas) (FREY et al., 1930; WERLE et al., 1970). Estes achados iniciais levaram a várias descobertas importantes, como o efeito hipotensor da caliceína em várias espécies, a purificação parcial da substância e a identificação da caliceína em outros locais, incluindo glândulas salivares e sangue (REGOLI e BARABÉ, 1980; WERLE, 1970). Além disto, foi observado que extratos pancreáticos preparados de maneira

a prevenir autólise continham uma forma inativa da calicreína que poderia ser ativada pelo extrato de intestino delgado ou por tripsina, chamada de calicreinogênio (WERLE e URHAHN, 1940; WERLE, 1970).

Embora a calicreína tivesse sido empregada por Frey para o tratamento de pacientes com oclusão arterial na perna, estes queixavam-se de dor após o uso da substância, o que levou à descontinuidade desta abordagem terapêutica (REGOLI e BARABÉ, 1980).

Em 1937, Werle e colaboradores observaram que as calicreínas eram praticamente ineficazes em produzir contração em preparações isoladas de intestino de cobaia. Porém, a inubação de calicreína com soro liberava uma substância capaz de contrair a musculatura lisa. A atividade contracturante da mistura de calicreína com soro aparecia gradualmente e desaparecia lentamente, o que sugeria a formação de uma nova substância que possuía ações biológicas semelhantes a calicreína, mas que era termoestável e dializável. A nova substância parecia ser produto da clivagem de proteínas do soro e não da calicreína e foi chamada inicialmente de DK (do alemão *darmkontrahierende stoff*, termo para substância contracturante do intestino) e posteriormente de calidina (WERLE, 1937; para revisão ver: BHOOLA et al., 1992; WERLE, 1970). Sendo assim, sugeriu-se que a calicreína atuaria como uma enzima proteolítica que produzia a calidina a partir de um precursor chamado de calidinogênio (WERLE, 1948; 1970).

Paralelamente aos estudos conduzidos na Alemanha, pesquisadores brasileiros do Instituto Biológico de São Paulo produziram um grande avanço no campo do sistema calicreínas-cininas quando examinavam os mecanismos

envolvidos no choque vascular induzido pelo veneno da cobra *Bothrops jararaca* (para revisão ver: BERALDO e ANDRADE, 1997). No curso das suas experiências, Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949) demonstraram a existência de uma substância, que produzia contração lenta do íleo isolado de cobaia, presente no sangue coletado de cães inoculados com veneno de *B. jararaca*. O efeito observado não era produzido por ação direta do veneno, pois a preparação encontrava-se desensibilizada ao mesmo, e sua ação não era mediada pela histamina ou acetilcolina. Experiências realizadas *in vitro* demonstraram que a adição de pequenas quantidades de veneno de *B. jararaca* ou de tripsina ao sangue desfibrinado produzia ao fim de uma inubação de aproximadamente um minuto à 37 °C, um novo princípio capaz de produzir contração da musculatura lisa do intestino isolado de cobaia ou coelho, do útero de cobaia ou rata, entre outras preparações testadas. Além disto, a administração intravenosa deste princípio produzia hipotensão em cães, coelhos e gatos. Por produzir efeito contrátil lento quando comparado ao efeito da histamina ou da acetilcolina, a nova substância foi chamada de bradicinina (do grego *brady*, lento e *kinesia*, movimento). Nas proteínas do soro foi encontrado um precursor para a bradicinina (bradicininogênio), especialmente concentrado na fração globulina. Desta forma, a bradicinina foi definida como um peptídeo originado de um precursor inativo (bradicininogênio), liberado da fração pseudoglobulina do soro ou plasma, pela ação do veneno da *B. jararaca* ou da tripsina (ROCHA e SILVA et al., 1949).

A década de 60 foi um período de grandes descobertas envolvendo o sistema calicreínas-cininas, incluindo a identificação das estruturas da bradicinina

(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (BOISSONNAS et al., 1960) e da calidina (Lys-bradicinina) (WERLE et al., 1961), da caracterização de enzimas que degradam cininas, a cininases I (ERDOS, 1961) e a cininase II (YANG e ERDOS, 1967), e dos precursores para as cininas, os cininogênios (HABERMANN, 1963). No final da década de 70 e no início da década de 80, os receptores para cininas foram classificados farmacologicamente com o uso de agonistas e antagonistas seletivos (REGOLI e BARABÉ, 1980) e identificados em vários tecidos por ensaios de união específica (*binding*) (INNIS et al., 1981; BARABÉ et al., 1982).

1.2. Panorama atual do sistema calicreínas-cininas

O sistema calicreínas-cininas é formado por interações complexas entre vários componentes. Basicamente, o sistema calicreínas-cininas inclui enzimas formadoras de cininas (cininogenases), os precursores das cininas (cininogênios), as cininas e seus receptores e as enzimas que degradam cininas (cininases).

Os precursores das cininas são α_2 -globulinas, denominadas de cininogênios. Os cininogênios são glicoproteínas que possuem uma porção N-terminal (cadeia pesada) e uma porção C-terminal (cadeia leve) ligadas por uma ponte de dissulfeto, além de uma porção cininas que intercalada estes polipeptídeos terminais (para revisão ver: CASSIM et al., 2002). Um único gene codifica os dois tipos de cininogênio através do processamento alternativo de um RNA inicial, formando dois RNA mensageiros diferentes que codificam o cininogênio de alto (~120 KDa) ou de baixo peso molecular (~66 KDa) (para revisão ver: CAMPBELL, 2003; KAPLAN et al., 2002). Além de uma porção

formadora de cininas, os cininogênios possuem em sua estrutura vários domínios com atividades biológicas importantes como os sítios de ligação a células específicas e a macromoléculas e a inibição de cisteíno proteases (CASSIM et al., 2002). Os cininogênios são sintetizados primeiramente em hepatócitos, liberados na circulação e distribuídos por vários tecidos do organismo. Constituem o substrato para um grupo de proteases chamadas de cininogenases. Apesar de enzimas como a tripsina, a uropepsina e a plasmina possuírem atividade cininogenásica, as calicreínas tissular e plasmática são as cinogenases endógenas mais potentes. As calicreínas diferem em relação ao seu peso molecular, ponto isoelétrico, especificidade para substratos, características imunológicas, tipo de cinina liberada, gene codificador e seqüência de amino ácidos (para revisão ver: CASSIM et al., 2002; MAHABEER e BHOOLA, 2000; UENO e OH-ISHI, 2003).

A calicreína plasmática é uma serina protease codificada por um único gene e sintetizada e secretada predominantemente pelo fígado como uma proteína inativa chamada de pré-calicreína plasmática (para revisão ver: CASSIM et al., 2002; MAHABEER e BHOOLA, 2000; YOUSEF et al., 2003). Além do fígado, o RNA mensageiro para a pré-calicreína plasmática pode ser encontrado em diversos tecidos como rim, placenta e cérebro, entre outros (CASSIM et al., 2002; YOUSEF et al., 2003). Uma vez liberada no plasma, a pré-calicreína plasmática encontra-se ligada ao cininogênio de alto peso molecular e ao fator XI da cascata da coagulação (para revisão ver: CASSIM et al., 2002, KAPLAN et al., 2002; SCHMAIER, 2002; SHARIAT-MADAR te al., 2002). A pre-calicreína pode ser ativada em situações patológicas (principalmente pela ativação do fator XII ou via

de contato) ou em situações fisiológicas (independente do fator XII). O fator XII da cascata de coagulação (fator de Hageman) é auto-ativado em fator XIIa quando entra em contato com superfícies negativamente carregadas (p.ex. mucopolissacarídeos sulfatados expostos após dano vascular; silicato da parede de frascos de vidro) ou com proteínas fibrosas de certas cepas de bactérias (curli) (COLMAN, 1998; HERWARD et al., 1998; para revisão ver: CASSIM et al., 2002; KAPLAN et al., 2002). O fator XIIa transforma a pré-caliceína inativa em caliceína ativa o que inicia a produção de cininas. Além desta ação, o fator XIIa também inicia paralelamente a via intrínseca da cascata da coagulação e a cascata fibrinolítica. Em situações fisiológicas, o complexo formado pela pre-caliceína, fator XI e cininogênio de alto peso molecular liga-se em um outro complexo receptor multi-protéico em membranas de células endoteliais formado pela citoqueratina 1, o receptor gC1qR e o receptor para o ativador do plasminogênio-uroquinase uPAR (para revisão ver: SCHMAIER, 2002; SHARIAT-MADAR et al., 2002). Quando ligada a estas proteínas, a pré-caliceína é ativada pela enzima proilcarboxipeptidase (angiotensinase C) expressa por células endoteliais. Uma vez ativada, a caliceína plasmática cliva o nonapeptídeo bradicinina a partir do cininogênio de alto peso molecular.

As caliceínas tissulares humanas são uma família de serina proteases codificadas por uma família de pelo menos 15 genes em humanos e 24 em camundongos (para revisão ver: MAHABEER e BHOOLA, 2000; YOUSEF et al., 2003). Porém, somente a caliceína tissular humana (hK1, caliceína pancreática/renal) possui atividade cininogenásica (YOUSEF et al., 2003). A caliceína tissular é secretada por vários órgãos e células, incluindo pâncreas, rim,

baço, pituitária, placenta, glândulas salivares e sudoríparas, neutrófilos e cérebro (CASSIM et al., 2002; KAPLAN et al., 2002; MAHABEER e BHOOLA, 2000). Similar à forma plasmática, a calicreína tissular é processada intracelularmente a partir de uma pré-calicreína, porém a enzima responsável por esta conversão não foi ainda identificada (KAPLAN et al., 2002). O cininogênio de baixo peso molecular é clivado pela calicreína tissular formando o decapeptídeo calidina (Lisil-bradicinina) (KAPLAN et al., 2002). Apesar do cininogênio de baixo peso molecular ser o substrato preferencial para a calicreína tissular humana, esta enzima pode liberar calidina do cininogênio de alto peso molecular (CAMPBELL, 2003; CASSIM et al., 2002). Por outro lado, tanto a calicreína tissular quanto a plasmática formam preferencialmente bradicinina em roedores (CAMPBELL, 2003). Além disto, a calidina pode ser convertida em bradicinina através da clivagem do resíduo de lisina N-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973). Vias alternativas para a produção de cininas envolvendo outras enzimas além das calicreínas podem ser ativadas durante estados patológicos. Apesar de sua baixa afinidade pelo cininogênio de baixo peso molecular, a calicreína plasmática pode produzir bradicinina na presença da elastase de neutrófilos (CASSIM et al., 2003). Além disto, a triptase de mastócitos e a elastase de neutrófilos liberam bradicinina a partir de cininogênios oxidados que são resistentes às calicreínas (CAMPBELL, 2003).

A produção *in vivo* das cininas é controlada, pelo menos em parte, por inibidores endógenos das calicreínas. Os principais inibidores das calicreínas são o

inibidor C1, a α 2-macroglobulina, a antitrombina III (para a forma plasmática) e a calistatina (para a forma tissular) (CAMPBELL, 2001; 2003).

Logo depois de formadas, as cininas circulantes se difundem através da parede dos capilares ou vasos linfáticos dos tecidos e são rapidamente inativadas por um conjunto de peptidases chamadas cininases. As cininases são uma família de enzimas, cujos principais membros são as cininases do grupo I e do grupo II. O grupo das cininases I é representado pelas enzimas carboxipeptidase N (plasma) e carboxipeptidase M (membrana) que removem o aminoácido arginina da porção C-terminal das moléculas da bradicinina e da calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente (para revisão ver: CASSIM et al., 2003; ERDOS e SKIDGEL, 1997). Por outro lado, as cininases II são representadas pela enzima conversora de angiotensina e pela endopeptidase neutra 24.11. A enzima conversora da angiotensina é responsável por clivar o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ da porção C-terminal da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo (CASSIM et al., 2003; ERDOS e SKIDGEL, 1997). A des-Phe⁸-Arg⁹-bradicinina formada pode ser novamente degradada pela enzima conversora da angiotensina, liberando o dipeptídeo Ser⁶-Pro⁷ (CASSIM et al., 2003). Em alguns casos, a enzima conversora da angiotensina é capaz de clivar o tripeptídeo da extremidade C-terminal da des-Arg⁹-BK, embora este fenômeno não ocorra com frequência devido à baixa afinidade que esta enzima apresenta por metabólitos des-Arg⁹ (ERDOS e SKIDGEL, 1997). A endopeptidase neutra 24.11 (neprilisina ou encefalinase) é uma metalopeptidase capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da molécula da

bradicinina de maneira semelhante à enzima conversora de angiotensina (CASSIM et al., 2003; ERDOS e SKIDGEL, 1997). Finalmente, a aminopeptidase P, as cininases A e B e a prolilcarboxipeptidase também podem hidrolizar, e conseqüentemente inativar, as cininas (CASSIM et al., 2003; ERDOS e SKIDGEL, 1997).

A maioria das ações biológicas das cininas é mediada pela interação com receptores próprios na membrana. A existência de dois subtipos de receptores para cininas, denominados B₁ e B₂, foi proposta inicialmente com base na determinação da ordem de potência de agonistas e a sensibilidade a antagonistas em diversos tecidos isolados (para revisão ver: REGOLI e BARABÉ, 1980). A bradicinina e a calidina possuem maior afinidade pelos receptores B₂, enquanto que a des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina possuem alta afinidade pelos receptores B₁. Recentemente, a existência dos receptores B₁ e B₂ foi confirmada através da clonagem e da expressão desses receptores em diversas espécies animais (para revisão ver: PESQUERO e BADER, 1998; HESS et al., 2002).

A clonagem molecular permitiu a identificação das seqüências de DNAc para estes subtipos de receptores. Após a clonagem inicial do receptor B₂ de ratos (MCEACHERN et al., 1991), estudos empregando a clonagem baseada em homologia identificaram as seqüências codificadoras para o receptor B₂ de humanos (HESS et al., 1992; EGGERICKX et al., 1992), camundongos (MCINTYRE et al., 1993; HESS et al., 1994; MA et al., 1994), coelhos (BACHVAROV et al., 1995), cobaias (FARMER et al., 1998) e cães (HESS et al., 2001). Existe uma homologia de 82-92% entre os genes dos receptores B₂ de diferentes espécies (PRADO et al., 2002). De maneira similar, a clonagem do

receptor B₁ de humanos (MENKE et al., 1994) permitiu a determinação das seqüências para o receptor B₁ em coelhos (MACNEIL et al., 1995), camundongos (PESQUERO et al., 1996), ratos (NI et al., 1998), cães (HESS et al., 2001) e macacos (HESS et al., 2002). Em comparação, os genes dos receptores B₁ de diferentes espécies apresentam uma homologia de 68-97% (PRADO et al., 2002).

As seqüências de DNA genômico das regiões cromossômicas dos receptores B₁ e B₂ de humanos, camundongos e ratos revelaram que estes genes são co-localizados no cromossomos 14, 12 e 6 separados entre si apenas por aproximadamente 12, 8 e 10 kilobases, respectivamente (CAYLA et al., 2002; HESS et al., 2002). A estreita proximidade dos dois genes sugere que estes possam ser produtos de uma antiga duplicação gênica (HESS et al., 2002). Além dos receptores encontrados em mamíferos, um receptor para cininas foi clonado em aves (galinha; SCHROEDER et al., 1997) e peixes (*zebrafish*; DUNER et al., 2002). Analisando o alinhamento das seqüências, os receptores para cininas de não-mamíferos são similares aos receptores B₂ de mamíferos, sugerindo que este deva ser o receptor ancestral para cininas (HESS et al., 2002).

Apesar da proximidade dos genes, os receptores B₁ e B₂ divergem amplamente quanto à regulação da expressão dos receptores. Os receptores B₂ das cininas são geralmente expressos constitutivamente em vários tecidos, mediando a maioria das ações fisiológicas das cininas, tendo sido identificados nos tratos gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (para revisão ver: HALL e MORTON, 1997). Por outro lado, o nível de expressão do receptor B₁ é geralmente baixo ou mesmo ausente em situações normais, podendo ser induzido por vários estímulos,

incluindo citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β , -2, -8, fator de necrose tumoral- α), fatores de crescimento, endotoxinas, irradiação ultravioleta (para revisão ver: MARCEAU, 1997). A expressão do receptor B₁ pode ser regulada de maneira transcricional e pós-transcricional. A região regulatória do gene deste receptor possui elementos responsivos para diversos fatores de transcrição, tais como NF κ B, AP1, CREB, Oct-1, entre outros (ANGERS et al., 2000). De fato, vários estudos têm demonstrado que a ativação destes fatores de transcrição *in vivo* ou *in vitro* por citocinas ou endotoxinas aumenta a síntese *de novo* do receptor B₁ (MARCEAU, 1997). Além disto, estímulos pró-inflamatórios podem aumentar a estabilidade do RNA mensageiro que codifica este receptor, elevando a tradução do mesmo em proteína (ZHOU et al., 1998; 1999).

Os receptores para cininas pertencem à mesma família de receptores, apresentando uma estrutura com 7 domínios transmembrânicos típica de receptores acoplados à proteínas G (para revisão ver: PRADO et al., 2002). Os receptores B₁ e B₂ para as cininas são geralmente acoplados à proteína do tipo G $\alpha_{q/11}$ e na maioria das vezes suas ativações estão relacionadas com estimulação da fosfolipase C β , e conseqüente formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol (GUTOWSKI et al., 1991; BURGESS et al., 1989; para revisão ver: BLAUKAT, 2003). O aumento dos níveis de trifosfato de inositol resulta em aumento dos níveis de cálcio, enquanto que a formação de diacilglicerol promove ativação de isoformas específicas da proteína quinase C (TIPPMER et al., 1994; CESARE et al., 1999). Os eventos celulares estimulados pelos receptores de cininas podem ainda envolver a mobilização de cálcio, ativação de canais de potássio sensíveis

ao cálcio, transporte de íons cloreto, ativação da adenilato ciclase, da fosfolipase A_2 , das óxido nítrico sintases e de várias proteínas quinases (tais como, quinases ativadas por mitógeno ERK e p38, tirosina quinase, esfingosídeo quinase, Janus quinases) (para revisão ver: BHOOLA et al., 1992; BLAUKAT, 2003; PRADO et al., 2002). Em algumas células, os receptores para cininas podem ainda estar acoplados as proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$, G_{α_i} e G_{α_s} , porém o significado biológico desta ativação ainda não foi esclarecido (BLAUKAT, 2003).

Apesar do número de aminoácidos ser semelhante (o receptor B_2 humano possui 359 aminoácidos, enquanto que o receptor B_1 humano possui 353 aminoácidos), estes apresentam apenas 36% de homologia entre si (MENKE et al., 1994). Em comparação, o receptor B_1 humano possui 30% e 29% de homologia com os receptores AT_2 e AT_1 para a angiotensina, respectivamente (MENKE et al., 1994). Estes dados sugerem que estes receptores possuem mecanismos distintos para regulação de atividade e para a produção de sinais intracelulares. De fato, os sinais mediados pelo receptor B_2 são geralmente mais transitórios, enquanto que a estimulação de receptores B_1 causa respostas prolongadas (BLAUKAT et al., 2003).

A ativação do receptor B_2 por agonistas induz processos de redistribuição celular, com ciclos de endocitose e reciclagem (para revisão ver: MARCEAU et al., 2002). Após a estimulação com o agonista e ativação da sinalização celular, o receptor B_2 é auto-fosforilado na alça intracelular, ocorrendo redistribuição para as cavéolas (um microdomínio lipídico encontrado na membrana plasmática) e a formação de vesículas intracelulares (SABOURIN et al., 2002). A ativação da

endocitose pelo agonista é um mecanismo para o controle da atividade do receptor B_2 , porém é um fenômeno reversível (MARCEAU et al., 2002) . Diferente do receptor B_2 , o receptor B_1 não é auto-fosforilado, internalizado ou dessensibilizado após a estimulação com agonista. Porém, a ativação por agonista também leva a um deslocamento do receptor B_1 para as cavéolas que são seu destino estável e final (SABOURIN et al., 2002). O papel desta translocação ainda não é bem compreendido, mas sabe-se que cavéolas são enriquecidas com várias proteínas relacionadas à sinalização celular, tais como fosfolipases, subunidades de proteínas G, óxido nítrico sintases e componentes da cascata das quinases ativadas por mitógeno (OSTROM, 2002). Estes dados sugerem que a sinalização mediada pelos receptores B_1 em cavéolas representa uma interessante forma de regulação deste receptor e de suas atividades biológicas. A regulação da atividade dos receptores para cininas pode ser controlada por vários outros processos, incluindo a fosforilação pelas proteínas quinases C e A, a palmitoilação e dimerização com outros receptores (BLAUKAT et al., 1999; 2001; SOSKIC et al., 1999; ABDALLA et al., 2000; 2001).

As cininas estão envolvidas em uma ampla série de efeitos biológicos tais como regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, regulação da pressão arterial, transporte de glicose e de eletrólitos, estimulação da reabsorção óssea e proliferação celular (para revisão ver: BHOOLA, 1992; BASCANDS et al., 2003). Além destas importantes ações fisiológicas, as cininas participam de vários processos patológicos, como câncer, asma, hipertensão, choque séptico, pancreatite e artrite (BASCANDS et al., 2003; BHOOLA et al., 1992; CASSIM et al., 2002). Outra importante ação exercida pelas cininas é a produção de dor

(algotênese). Foi demonstrado que a administração de bradicinina sobre a pele lesada ou sua administração intradérmica em humanos induz dor intensa, sendo uma das substâncias algogênicas endógenas mais potentes (ARMSTRONG, 1970; para revisão ver: DRAY e PERKINS, 1997). De fato, altas concentrações de bradicinina são encontrados em amostras de líquido sinovial obtidas de pacientes com doenças inflamatórias articulares, o que está diretamente correlacionado com a produção de dor (HARGREAVES et al., 1988a; NISHIMURA et al., 2002).

1.3. Participação das cininas na produção da dor

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Em indivíduos saudáveis, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. O primeiro propósito da dor aguda é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), tais como objetos perigosamente quentes ou cortantes (para revisão ver: WATKINS e MAIER, 2002).

O componente sensorial da dor (nociceção) é formado por várias vias que ligam vários componentes do sistema nervoso de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal e que conduzem as informações

nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (para revisão ver: DRAY e PERKINS, 1997; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (WATKINS e MAIER, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetivas/motivacionais (descontentamento) da dor (para revisão ver: CRAIG, 2003; HUNT e MANTYH, 2001). A via espinotalâmica termina no tálamo ventroposterior e ventrobasal, que tem projeções para o córtex e a via espinoparabraquial termina no núcleo parabraquial e tem projeções para o hipotálamo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (CRAIG, 2003; HUNT e MANTYH, 2001). Esta percepção supraespinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas a defesa (CRAIG, 2003; WATKINS e MAIER, 2002).

A perda da capacidade de sentir este tipo de dor produz efeitos desastrosos, como pode ser observado em portadores da insensibilidade congênita à dor, uma doença hereditária rara (para revisão ver: MOGIL et al., 2000). Estes pacientes suportam estímulos dolorosos intensos sem apresentar qualquer reação de retirada, o que pode produzir queimaduras e outras lesões graves. Desta forma, fica claro que esta modalidade de dor eminentemente aguda

não deve ser inibida com o uso de analgésicos, pois possui grande valor adaptativo.

Um segundo propósito da dor é desencadear comportamentos de recuperação, em resposta à dor originada por lesões no próprio organismo (WATKINS e MAIER, 2002). Neste caso, a lesão tecidual já ocorreu e a área lesionada está inflamada ou infectada, e os reflexos espinhais não são tão importantes, pois não existe uma fonte externa de estímulo para ser evitada. Os estímulos provenientes da área lesionada chegam a centros cerebrais superiores (p.ex. tálamo e córtex) que organizam comportamentos apropriados de recuperação para proteger e facilitar a resolução da lesão. Tais comportamentos incluem desuso e proteção do membro lesionado e limpeza da ferida. Normalmente, os comportamentos dolorosos desaparecem após a resolução do processo inflamatório ou infeccioso.

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa (neuropatias). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (para revisão ver: ASHBURN e STAATS, 1999). Durante estas síndromes, o processamento sensorial é anormal. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é,

alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente, sem a necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou choque. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (para revisão ver: BESSON, 1999; WOOLF e MANNION, 1999).

Esse tipo de dor afeta centenas de milhões de pessoas por todo o mundo, alterando a função física e emocional, induzindo ansiedade e depressão, diminuindo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho. De acordo com pesquisa realizada em 1998 pela Organização Mundial da Saúde, 22% dos pacientes que procuraram serviços primários de saúde nos cinco continentes sofriam de algum tipo de dor persistente durante seu último ano de vida (ASHBURN e STAATS, 1999).

A dor crônica está associada com dano tecidual, inflamação ou neuropatologias que ocorrem modificações na sensibilidade à nocicepção, alterando a relação entre o estímulo e a resposta e afetando a modulação do estado doloroso resultante. Alguns desses eventos ocorrem em intervalos de tempo precisos durante o desenvolvimento e a consolidação do estado doloroso anormal, levando a mudanças desde a excitabilidade das fibras aferentes primárias, até alterações drásticas no fenótipo celular dessas fibras e expressão de novas moléculas (tais como neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores). Mudanças estruturais podem incluir: perda de interneurônios espinhais, rearranjos

inapropriados de processos nervosos aferentes na medula espinhal, e a proliferação de fibras simpáticas nos gânglios sensoriais. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras aferentes e da participação do sistema imune (para revisão ver: DRAY et al., 1994).

Tanto células residentes no sítio da lesão (como fibroblastos, células de Schwann, queratinócitos e mastócitos) quanto leucócitos recrutados para a região (como neutrófilos, macrófagos e linfócitos) podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais. Essa sensibilização está claramente envolvida com dores crônicas associadas com processos inflamatórios (como a artrite). Porém, trabalhos demonstram que a dor neuropática é, pelo menos em parte, decorrente da reação inflamatória local (BENNETT, 1999a; TRACEY e WALKER, 1995).

Entre os mediadores inflamatórios, a produção e ação das cininas é vista como crítica para a iniciação da dor, produção de alodínia e hiperalgesia (para revisão ver: DRAY e PERKINS, 1997). Na periferia, uma das ações mais importantes da bradicinina envolve a estimulação de terminais nervosos nociceptivos e produção de dor e inflamação. Estas respostas parecem ser mediadas pela ativação de receptores B₂. Além da ativação direta de fibras sensoriais (na pele, articulações, músculos), a bradicinina tem a capacidade de sensibilizar estas fibras para outras respostas, incluindo estímulos mecânicos e térmicos. A bradicinina também induz grande número de eventos secundários, como a liberação de prostaglandinas e de óxido nítrico, a degranulação de mastócitos e conseqüente liberação de histamina e outros agentes inflamatórios,

ativação de células imunes e excitação de fibras simpáticas pós-ganglionares (DRAY e PERKINS, 1997). A estimulação de fibras sensoriais e simpáticas pela bradicinina promove a liberação de neuropeptídeos, prostanóides e transmissores simpáticos que sensibilizam nociceptores e influenciam a nocicepção de várias maneiras (para revisão ver: WALKER et al., 1995).

Diferente de outros tecidos, estudos recentes demonstram que o receptor B_1 é expresso de maneira constitutiva em fibras aferentes nociceptivas (MA, 2001; WOTHERSPOON e WINTER, 2000). Porém, estes receptores não parecem ser funcionais, pois estudos *in vitro* demonstram que o agonista seletivo de receptores B_1 , a des-Arg⁹-bradicinina, não ativa diretamente os neurônios sensoriais (DRAY et al., 1992; DAVIS et al., 1996). Apesar disto, os receptores B_1 participam da produção de dor, principalmente durante a inflamação. Estes dados sugerem que os receptores B_1 precisam ser sensibilizados por substâncias liberadas durante o processo inflamatório para se tornarem funcionais.

De fato, os receptores das cininas parecem ser fundamentais para a nocicepção. De acordo com dados oriundos de estudos farmacológicos, os antagonistas seletivos dos receptores B_1 e B_2 são antinociceptivos em diversos modelos experimentais de nocicepção (STERANKA et al., 1988; CORRÊA e CALIXTO, 1993; CORRÊA et al., 1996; DE CAMPOS et al., 1996, 1999; SUFKA e ROACH, 1996). Além disto, a inibição da calicreína tecidual e a deficiência de cininogênio também produzem efeito antinociceptivo (EMIM et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Uma confirmação da participação das cininas na produção da dor foi obtida pelo emprego de animais nocaute para os receptores das cininas. A deleção do gene do receptor B_2 em camundongos elimina as ações da bradicinina

em tecidos musculares lisos e neuronais (BORKOWSKI et al., 1995), além de reduzir a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina (BOYCE et al., 1996). Por outro lado, a deleção gênica do receptor B₁ produz anti-nocicepção nos animais, o que é observado quando os mesmos são analisados em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulos térmicos intensos ou por estímulos químicos (PESQUERO et al., 2000). No entanto, seria de grande interesse estudar os efeitos da deleção gênica para os receptores para as cininas durante processos dolorosos crônicos.

Apesar de terem sido realizados alguns estudos na área, diversos aspectos importantes referentes à participação das cininas na dor crônica de origem inflamatória e neuropática necessitam ser melhor investigados. Um ponto interessante a ser estudado é a relação entre os efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos exercido pelas cininas. Outro ponto interessante refere-se a participação dos receptores cininérgicos não periféricos (como aqueles presentes na medula espinhal) nas ações das cininas. Tais estudos poderiam trazer informações importantes para o desenvolvimento e uso de drogas que modulam as ações das cininas, auxiliando assim no tratamento de processos dolorosos crônicos que ainda permanecem sem uma terapia adequada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação dos receptores B_1 e B_2 para cininas em modelos experimentais de dor crônica, utilizando antagonistas seletivos em associação com animais com deleção gênica para estes receptores.

2.2. Objetivos / Metas específicas

- 1) Padronizar modelos experimentais e métodos de avaliação de dor crônica em camundongos;
- 2) Investigar a influência da deleção gênica do receptor B_1 no processo inflamatório observado em um modelo de dor inflamatória crônica;
- 3) Avaliar a relação entre os possíveis efeitos antiinflamatórios e anti-nociceptivos apresentados pela inibição dos receptores para cininas em um modelo de dor inflamatória crônica;
- 4) Investigar a participação de receptores para cininas encontrados na medula espinhal na produção de dor crônica e transitória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços machos e fêmeas (25-35 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro / escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração. Também foram utilizados camundongos 129/SvJ selvagens ou com deleção gênica dos receptores B₁ ou B₂ para cininas, gentilmente cedidos pelo Prof. João Bosco Pesquero (Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo). A deleção de toda a seqüência codificadora foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Pesquero et al. (2000) e Borkowski et al. (1995). Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais empregado e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos cirúrgicos, tratamentos com drogas ou manipulações gênicas.

3.2. Medidas de parâmetros experimentais relacionados a dor

3.2.1. Hiperalgisia térmica

A latência de resposta dos animais ao estímulo térmico foi avaliada conforme a técnica descrita por Hargreaves e colaboradores (1988b), usando o teste Plantar (Ugo Basile, modelo 7371). Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (7 x 9 x 11 cm) em uma superfície elevada e aclimatizados durante pelo menos 1,5 horas antes do teste. O estímulo térmico foi direcionado para a superfície plantar dos animais. Com uma resposta de retirada de pata, o estimulador foi automaticamente desligado e a latência para a resposta foi cronometrada. A intensidade do infravermelho foi ajustada para obtenção de valores basais de retirada de pata no tempo de aproximadamente 11 segundos. A hiperalgisia térmica, nocicepção exagerada à estimulação nociva, foi caracterizada como a diminuição da latência de retirada de pata dos animais em relação a seus valores basais.

3.2.2. Alodínia mecânica

A alodínia mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (0,07-4 g; Stoelting, EUA). Cada filamento foi aplicado 10 vezes e a retirada da pata foi registrada como a porcentagem de resposta em cada sessão. Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (7 x 9 x 11 cm) sobre uma tela de metal e aclimatizados por no mínimo 1,5 horas antes do teste. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente a superfície plantar dos animais.

Curvas tensão-resposta foram realizadas para vários filamentos (0,07; 0,16; 0,6; 1; 2; 4 g) que produzem vários graus de estimulação mecânica, inócua ou nociva. Cada filamento foi aplicado 10 vezes, sendo registrada a porcentagem de resposta de retirada de pata. A alodínia mecânica, nocicepção produzida por estimulação anteriormente descrita como inócua, foi caracterizada pela retirada de pata produzida pela aplicação de filamentos não-nocivos.

3.3. Modelos experimentais de dor crônica

3.3.1. Nocicepção induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)

Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam injeção intraplantar de CFA (20 µl, 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor e diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida) na pata direita. Um grupo diferente de animais recebeu salina tamponada com fosfato (PBS, composição mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) na pata direita e foi utilizados como controle. A alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica foram avaliadas como descrito acima em vários intervalos de tempo após a injeção.

3.3.2. Lesão parcial do nervo ciático

Para a produção de neuropatia crônica, os animais foram tratados por via intraperitoneal com hidrato de cloral 7%. Foi realizada uma pequena incisão na região glútea, a musculatura entre o ilíaco e o músculo glúteo foi divulsionada e o nervo ciático foi exposto. Utilizando a agulha de um fio cirúrgico 8-0, 1/3 a 1/2 do nervo foi perfurado e amarrado, conforme a técnica descrita por Seltzer e

colaboradores (1990) para ratos e adaptada por Malmberg e Basbaum (1998) para camundongos. Nos animais falso operados, o nervo foi exposto mas não amarrado.

3.3.3. Tratamentos

Para verificar a participação dos receptores para as cininas nas respostas nociceptivas induzidas pelo CFA, os animais foram tratados com o antagonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹[Leu⁸]-bradicinina (DALBK, 150 nmol/kg, s.c., PERKINS e KELLY, 1994), ou com o antagonista seletivo do receptor B₂, o Hoe 140 (50 nmol/kg, s.c., CORRÊA e CALIXTO, 1993), imediatamente após a injeção de CFA. Grupos tratados com PBS foram utilizados como controle.

Para verificar a participação dos receptores para as cininas presentes na medula espinhal nas respostas nociceptivas causadas pelo CFA, as drogas foram administradas por via intratecal (i.t.), como descrito anteriormente (HYLDEN e WILCOX, 1980). Os camundongos foram anestesiados levemente com éter e um volume de 5 µl de PBS, Hoe 140 (3-30 pmol/sítio) ou DALBK (3-30 pmol/sítio) foi injetado no espaço subaracnóide da medula espinhal (entre as vértebras L5 e L6), com o auxílio de uma agulha conectada a um tubo de polietileno e uma microseringa. A correta localização da administração intratecal foi verificada com a observação da retirada de cauda quando a agulha atingia o espaço subaracnóide na medula espinhal dos animais (HYLDEN e WILCOX, 1980).

3.4. Modelos experimentais de dor aguda

3.4.1. Nocicepção espontânea causada pela formalina

O procedimento foi realizado conforme procedimentos descritos por Dubuisson e Dennis (1977) para ratos e adaptada para camundongos por Takahashi e colaboradores (1984) e Hunskaar e colaboradores (1985). Vinte μ l de formalina (2,5%) foram injetados na superfície plantar direita de camundongos. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados em funis de vidro e o tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como índice de nocicepção. Os antagonistas seletivos de receptores para cininas foram administrados 10 minutos antes ou 5 minutos após a administração de formalina. A formalina produz duas fases distintas de nocicepção. A primeira fase é transitória e é avaliada até 5 minutos após a injeção. Logo após uma interfase onde não é observado comportamento nociceptivo, observa-se uma segunda fase persistente que é avaliada de 15 a 30 minutos após a injeção da formalina.

3.4.2. Hiperalgisia térmica espinhal causada pela bradicinina ou pela des-Arg⁹-bradicinina

Um aparelho de placa quente foi usado para medir a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico, de acordo com método descrito anteriormente (FERREIRA et al., 1999; 2000). Nesse experimento a placa quente (Ugo Basile, modelo DS 37) foi mantida a 50 ± 1 °C. Os animais foram colocados sobre a placa aquecida, circundada por um cilindro de acrílico de 24 cm de diâmetro, e o tempo

dispendido entre a exposição à placa e a reação de lambar ou agitar as patas dianteiras ou traseiras foi registrado como latência ao estímulo térmico. Um tempo máximo de exposição de 30 segundos ao estímulo térmico foi utilizado para evitar qualquer dano tecidual aos animais. Cada camundongo foi testado 60 minutos antes da administração das drogas para a determinação da latência basal de resposta. A hiperalgesia térmica foi induzida pela injeção intratecal de bradicinina (5 nmol/sítio) ou pela des-Arg⁹-bradicinina (10 nmol/sítio). Após a administração das substâncias hiperalgésicas, a latência na placa quente foi medida em intervalos de tempo apropriados (10-60 minutos para bradicinina e 10-120 minutos para des-Arg⁹-bradicinina). Para evitar a degradação das cininas, o inibidor da cininase II captopril (5 mg/kg, s.c.) foi administrado 1 hora antes da administração de bradicinina ou des-Arg⁹-bradicinina (CORRÊA e CALIXTO, 1993).

O efeito hiperalgésico máximo possível, em porcentagem (%EMP), induzido pelos mediadores foi estimado para cada animal e foi calculado pela seguinte equação: $\%EMP = [(pós-droga - pré-droga)/(30 - pré-droga)] \times 100$

Na qual:

pós-droga = latência de reação dos animais após a administração das drogas

pré-droga = latência basal de reação dos animais (antes da administração de qualquer droga)

30 = é o tempo máximo de exposição dos animais ao estímulo térmico, correspondente à 100% de analgesia, e inversamente proporcional à hiperalgesia.

3.5. Medidas relacionadas com o processo inflamatório

3.5.1. Medida do edema de pata

Um importante sinal do processo inflamatório é a formação de edema. O edema da pata dos animais foi medido com o uso de um pletismômetro (Ugo Basile) como anteriormente descrito (DE CAMPOS et al., 1996). O volume das patas direita e esquerda foi medido em intervalos apropriados após a injeção intraplantar de CFA. Os resultados foram expressos em μl como a diferença de volume entre as patas.

3.5.2. Medida da temperatura local

Um dos sinais clássicos da inflamação é o aumento da temperatura da área lesada (calor). Doze horas após a administração de CFA ou PBS, a temperatura da pele das patas dos animais foi medida com um termômetro de radiação (Pro Check, Itália), como descrito anteriormente (FERREIRA et al., 2004).

3.5.3. Medida dos níveis de interleucina-1 β

Vários mediadores auxiliam no desenvolvimento e na manutenção da nocicepção observada durante o processo inflamatório. Para a medida da interleucina-1 β , foi utilizada a metodologia previamente descrita por Campos e colaboradores (2002). Seis horas após a administração de CFA, os animais foram sacrificados e a pele das suas patas foi removida e colocada em tampão fosfato, contendo: tween 20 0,5%, cloreto de benzametônio 0,1 mM, etilenodiamina

tetracetato 10 mM, aprotinina A 2 µg/ml, fenilmetilsulfonil fluoreto 0,1 mM e albumina sérica bovina 0,5%. Os tecidos foram homogeneizados e centrifugados a 3000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio. A concentração de proteínas foi medida pelo *Kit* BioRad®. Os níveis de interleucina-1β foram medidos através de *Kit* de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems®). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 2 vezes. As respostas foram expressas em pg/mg de proteína na amostra.

3.5.4. Medida dos níveis de prostaglandina E₂

A prostaglandina E₂ auxilia no desenvolvimento da sensibilização do nociceptores e é um dos principais mediadores liberados pela ativação dos receptores para cininas. Para sua medida, camundongos foram sacrificados 6 horas após administração de CFA. As patas injetadas foram perfundidas de acordo com o método descrito por Rocha e Silva e Antônio (1960), com pequenas modificações. Um tubo de polietileno duplo foi inserido no espaço subcutâneo da pata e 200 µl de PBS foram perfundidos pelo tubo mais delgado a uma taxa de 100 µl/ min e o lavado foi coletado através do tubo mais grosso. O lavado foi utilizado para a quantificação dos níveis de prostaglandina E₂ através de *Kit* de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems®). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 2 vezes. As respostas foram expressas em pg/ml.

3.5.5. Atividade da mieloperoxidase

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada em polimorfonucleares e a medida da sua atividade pode ser utilizada como índice de acumulação de neutrófilos em tecidos. Seis horas após a administração de CFA ou PBS, os animais foram sacrificados e a pele das suas patas foi removida. A atividade da mieloperoxidase foi avaliada como anteriormente descrito (DE YOUNG et al., 1989). Os tecidos foram homogeneizado em 0,5 ml de tampão fosfato (80 mM, pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado 12000 g, por 15 min, a 4 °C. Trinta µl de sobrenadante de diversas amostras foram pipetados em poços de uma microplaca. A concentração de proteína foi medida em alíquotas de sobrenadante utilizando o *Kit* BioRad®. Para o ensaio, 200 µl de uma solução contendo 100 µl PBS (80 mM pH 5,4), 85 µl de PBS (0,22 M, pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio (0,017%) foram adicionados em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µl de tetrametilbenzidina (18,4 mM, em 8% de dimetilformamida). A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi terminada pela adição de 30 µl de acetado de sódio (1,46 M, pH 3,0). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente em um leitor de placas regulado para medir a absorvância a 630 nm e foi expressa como mDO/mg proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos 2 vezes.

3.6. Drogas e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas: adjuvante completo de Freund, bradicinina, des-Arg⁹-bradicinina, des-Arg⁹[Leu⁸]-bradicinina, tabletes de PBS,

albumina sérica bovina, aprotinina, Tween 20, cloreto de benzametônio, etilenodiamina tetracetato, aprotinina A, fenilmetilsulfonil fluoreto, brometo de hexadeciltrimetilamônio, tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). O Hoe 140 foi gentilmente doado pela Hoechst (Frankfurt Main, Alemanha). O peróxido de hidrogênio, a dimetilformamida e o fosfato de sódio foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil) As soluções estoque foram diluídas com PBS, preparadas em tubos plásticos siliconizados, armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongeladas somente no momento da utilização e mantidas em gelo durante os experimentos.

3.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida dos testes de múltipla comparação de Student-Newman-Keuls ou Dunnett quando apropriado. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Participação dos receptores de cininas na nocicepção crônica causada pelo CFA

Na ausência de inflamação periférica, as latências para as repostas reflexivas de retirada de pata, utilizando o método descrito por Hargreaves e colaboradores (1988b), foram semelhantes nos animais selvagens ou naqueles com deleção gênica dos receptores B₁ ou B₂ (Figura 1). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que não demonstraram diferença nas respostas de retirada de cauda entre animais selvagens e nocautes para o receptor B₁ (PESQUERO et al., 2000). Além disto, estes resultados demonstram que os receptores para cininas parecem não ser importantes para a transmissão da nocicepção térmica aguda.

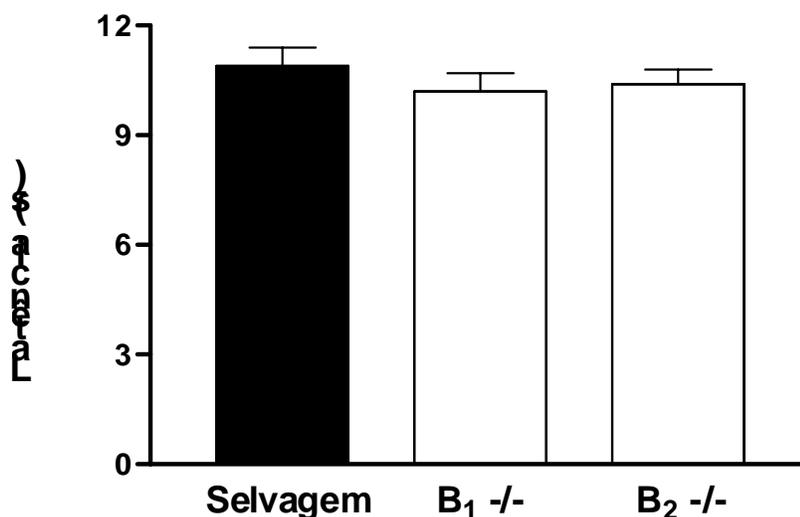


Figura 1 – Nocicepção aguda produzida pela estimulação térmica das patas posteriores de animais 129/SvJ selvagens e nocautes para o receptor B₁ ou B₂. Cada ponto representa a média+erro padrão de 4-6 animais.

A injeção intraplantar de CFA produziu hiperalgesia térmica de longa duração em camundongos, caracterizada por redução significativa na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo térmico. A hiperalgesia pôde ser observada em ambas as patas traseiras: ipsilateral (injetada) e contralateral (não-injetada) (Figura 2A e B). Uma hiperalgesia mais intensa foi observada na pata ipsilateral (diminuição da latência basal de $74\pm 3\%$) em comparação à pata contralateral (diminuição da latência basal de $47\pm 6\%$). Além disso, a hiperalgesia térmica medida na pata ipsilateral foi observada em todo o período avaliado (de 2 até 72 horas após a injeção), enquanto que a hiperalgesia da pata contralateral foi transitória (significativa de 6 a 24 horas após a injeção de CFA) (Figura 2A e B).

A deleção gênica do receptor B_1 causou redução parcial ($48\pm 13\%$, calculada 12 h após a injeção de CFA), porém significante, da hiperalgesia térmica observada na pata ipsilateral (Figura 2A). Este efeito anti-nociceptivo foi também observado a partir de 6 horas e durou por até 72 horas após a injeção de CFA. Além disso, os animais nocautes para o receptor B_1 também apresentaram marcante redução da hiperalgesia térmica causada pelo CFA na pata contralateral ($91\pm 22\%$, calculada 12 horas após CFA) (Figura 2B).

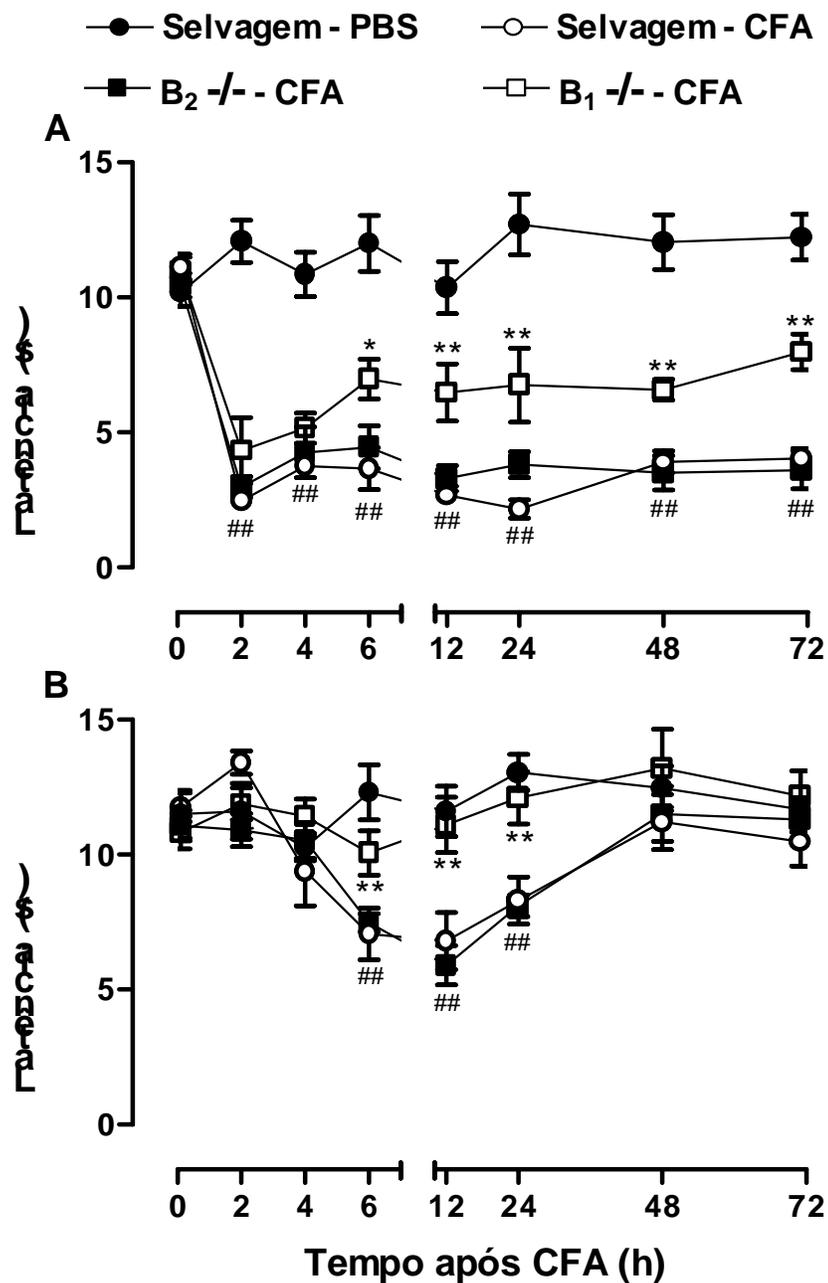


Figura 2 – Hiperálgia térmica dependente do tempo causada por CFA nas patas ipsilateral (A) e contralateral (B) em animais 129/SvJ selvagens e nocautes para o receptor B₁ ou B₂. Cada ponto representa a média±erro padrão de 4-6 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com CFA; ## $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

O envolvimento do receptor B₁ na resposta hiperalgésica induzida pelo CFA foi confirmado com o tratamento sistêmico dos animais com o antagonista seletivo para os receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (150 nmol/kg, s.c.), que também foi capaz de reduzir, ainda que parcialmente, a hiperalgesia térmica avaliada nas patas ipsi e contralateral (43±9% e 96±13%, respectivamente) (Figura 3), 6 horas após a injeção de CFA.

Ao contrário do que ocorreu com o receptor B₁, a deleção gênica do receptor B₂ não produziu efeito anti-hiperalgésico quando avaliado nas patas ipsi e contralateral (Figura 2). Entretanto, o tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do receptor B₂ o Hoe 140 (50 nmol/kg, s.c.) produziu redução discreta, porém significativa, da hiperalgesia térmica avaliada na pata ipsilateral (23,7±4,8%, Figure 3), mas não na pata contralateral, avaliada 6 horas após a injeção do CFA. De maneira semelhante ao observado em animais selvagens, o tratamento sistêmico com a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina reduziu a hiperalgesia térmica nas patas ipsi e contralateral em animais nocautes para o receptor B₂ (resultados não demonstrados).

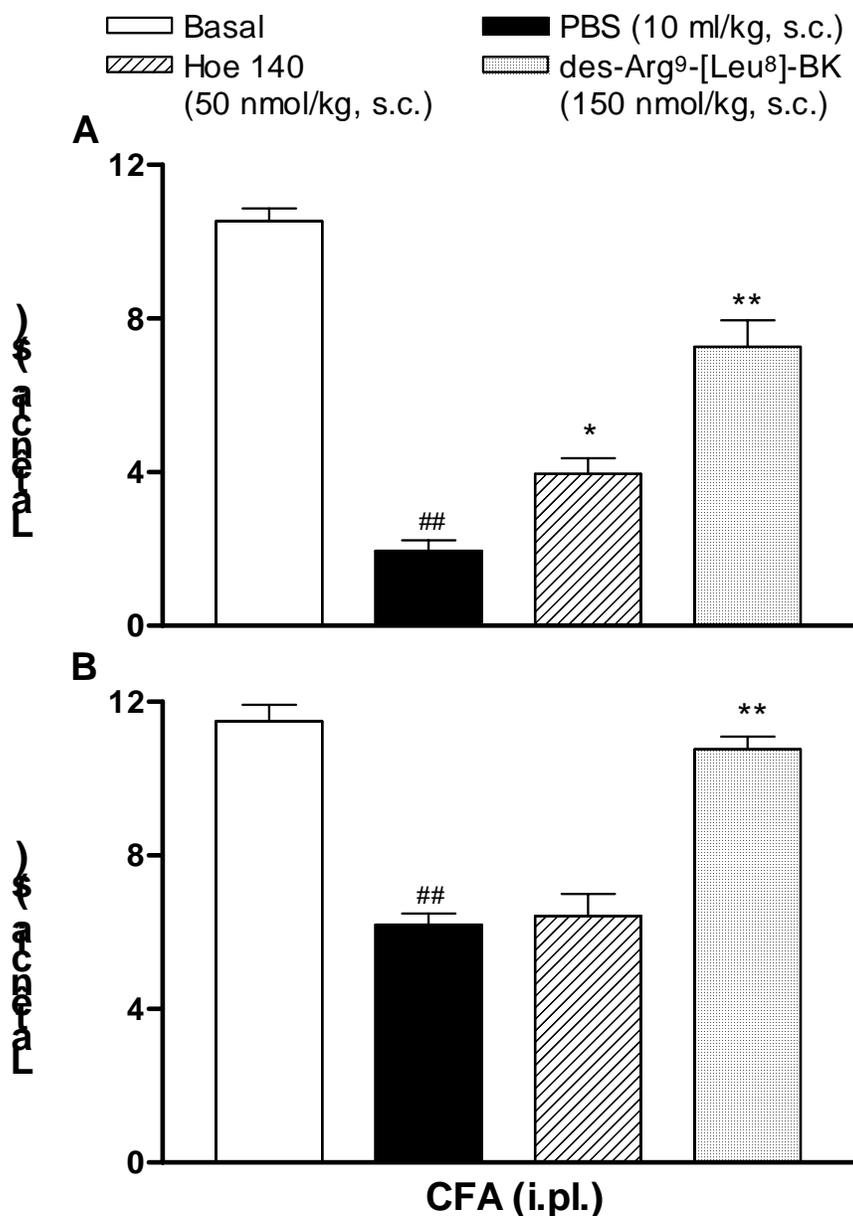


Figura 3 – Efeito do tratamento sistêmico com os antagonistas seletivos do receptor B₁ des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (150 nmol/kg, s.c.) ou do receptor B₂ Hoe 140 (50 nmol/kg, s.c.) na hiperalgesia térmica avaliada nas patas ipsilateral (A) e contralateral (B) 6 horas após a injeção intraplantar de CFA em camundongos 129/SvJ. Cada ponto representa a média+erro padrão de 4 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS; ## $P < 0,01$ representa nível de significância quando comparado com valores basais (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Em condições basais, os limiares para que o estímulo mecânico produza retirada da pata são semelhantes em animais selvagens e nocautes para o receptor B_1 (Figura 4). A estimulação mecânica com filamentos de von Frey de baixa tensão (0,07 e 0,16) não produziu retirada da pata mesmo após 10 estimulações sendo, portanto, consideradas estímulos inócuos. Estes dados sugerem que os receptores B_1 não são importantes para a transmissão de estímulos mecânicos inócuos ou nocivos.

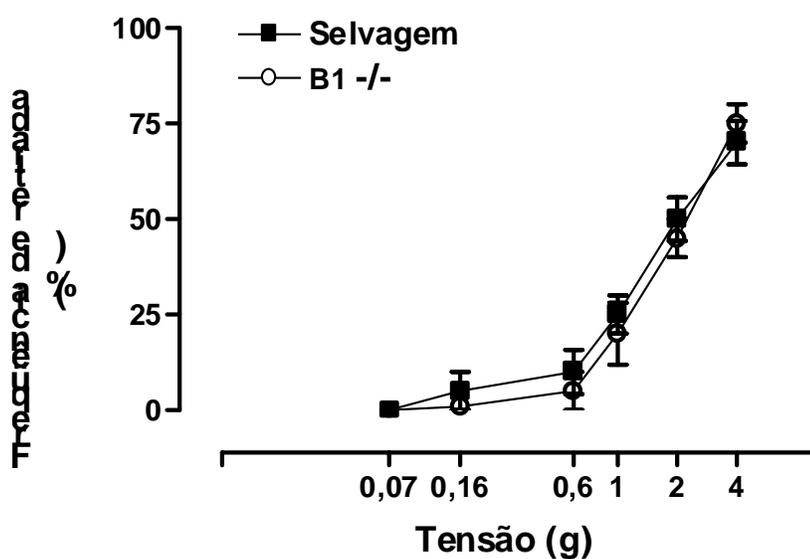


Figura 4 – Curva de resposta à tensão causada por filamentos de von Frey em animais 129/SvJ selvagens ou nocautes para o receptor B_1 . Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 4-6 animais.

A injeção intraplantar de CFA produziu alodínia mecânica indicada como alta frequência de retirada das patas ipsi e contralateral frente ao estímulo mecânico de 0,16 g (Figura 5). A deleção gênica do receptor B_1 produziu redução na alodínia mecânica, avaliada em ambas as patas traseiras 6 horas após a injeção do CFA (Figura 5A e B).

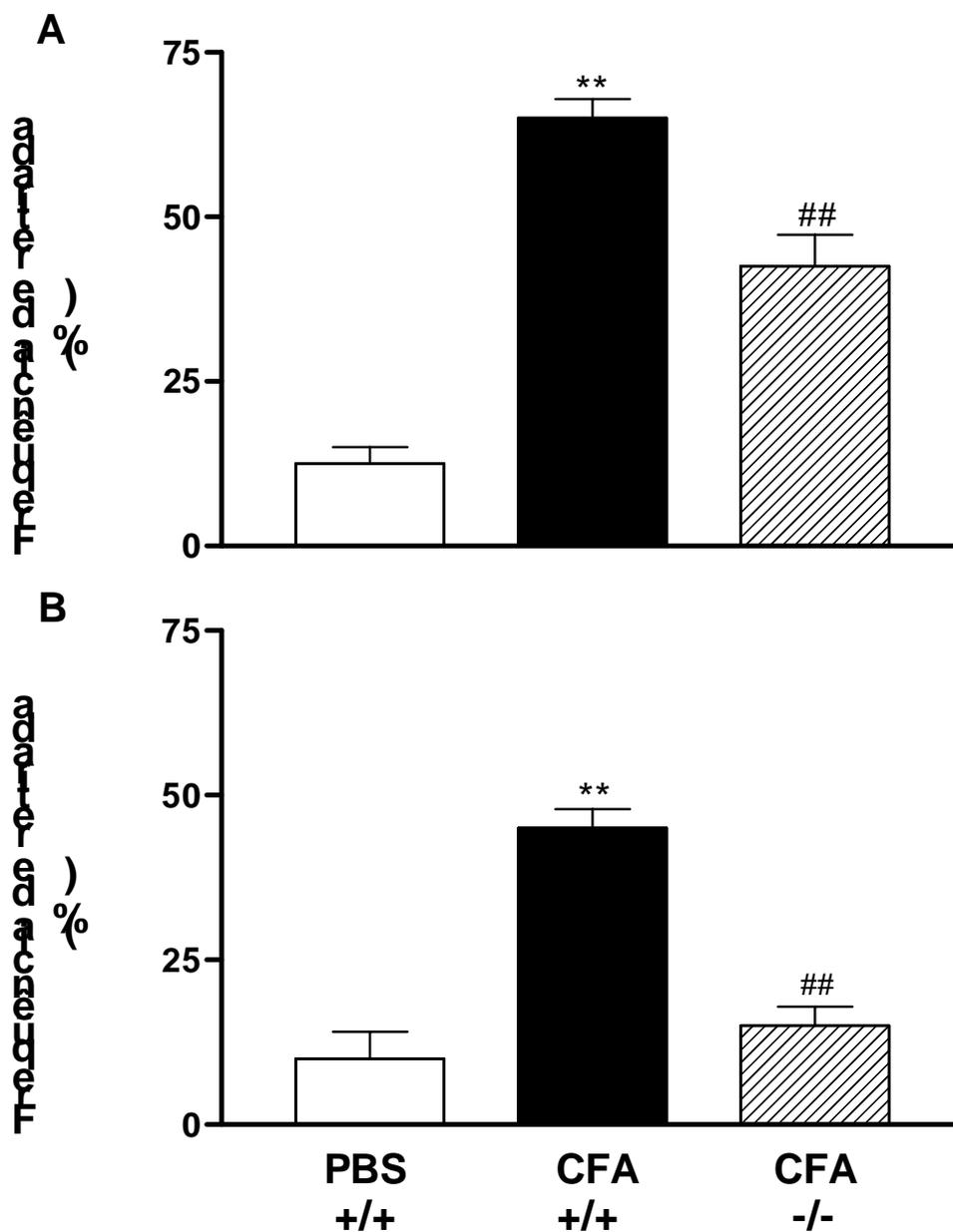


Figura 5 – Alodínia mecânica observada 6 horas após injeção de CFA nas patas ipsilateral (A) e contralateral (B) em animais 129/SvJ selvagens (+/+) e nocautes para o receptor B₁ (-/-) avaliada com o filamento de von Frey 0,16 g. Cada ponto representa a média+erro padrão de 4-6 animais. ** $P < 0,01$ representa o nível de significância quando comparado à animais selvagens tratados com PBS; ## $P < 0,01$ representa nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com CFA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

4.2. Participação de receptores espinhais para cininas na transmissão da dor

A medula espinhal é um importante centro responsável pela transmissão da informação nociceptiva e pela modulação do estímulo nociceptivo. Como ambos os receptores para cininas são expressos na medula espinhal, investigamos a participação destes receptores medulares na nocicepção crônica causada pelo CFA. O pós-tratamento (6 horas após a injeção do CFA) com o antagonista de receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (10 pmol/sítio) inibiu a hiperalgisia térmica observada nas patas ipsi e contralateral (Figura 6A e B), com inibições de 62±17% e 100%, respectivamente. Entretanto, o pós-tratamento com o antagonista de receptores B₂ o Hoe 140 (100 pmol/sítio) não foi capaz de inibir a hiperalgisia térmica causada pelo CFA (Figura 6A e B).

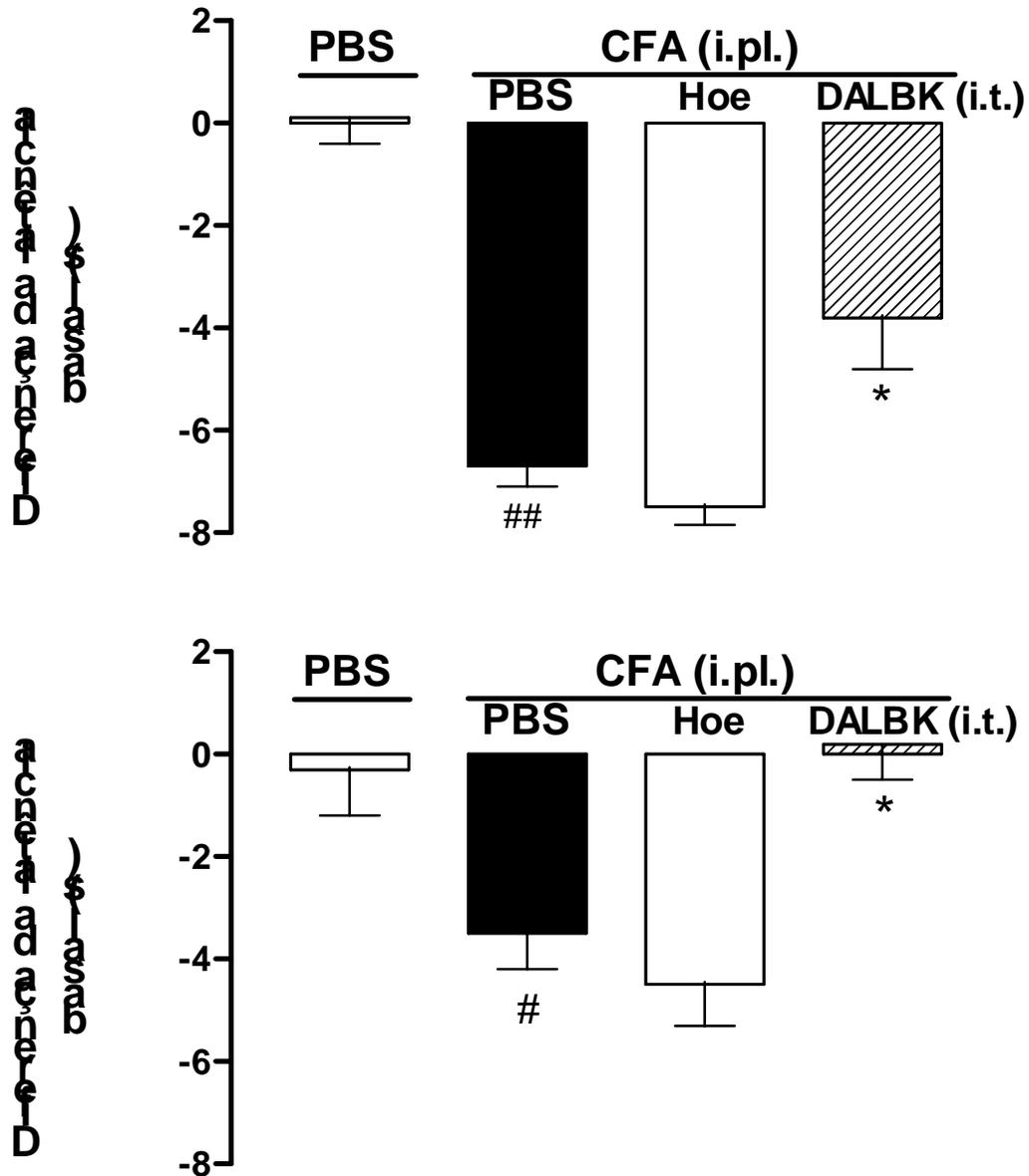


Figura 6 – Efeito do tratamento intratecal (i.t.) (6 horas após a injeção intraplantar do CFA) com os antagonistas seletivos do receptor B₂ (Hoe 140, 100 pmol/sítio) ou B₁ (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina, DALBK, 10 pmol/sítio) na hiperalgesia térmica causada pelo CFA nas patas ipsilateral (A) e contralateral (B) em camundongos Suíços. Cada coluna representa a média ± erro padrão de 4 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ comparado com animais tratados com PBS intraplantar (i.pl.) * $P < 0,05$ comparado com animais tratados com PBS intratecal (i.t.) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Estudos da literatura sugerem que os receptores B_1 para as cininas estão envolvidos na manutenção da dor crônica, enquanto os receptores B_2 parecem mediar a produção de dor aguda (DRAY e PERKINS, 1997). Para avaliar a participação dos receptores para cininas presentes na medula espinhal durante a nocicepção aguda, o efeito de antagonistas seletivos para os receptores de cininas foi verificado na nocicepção causada pela formalina.

A administração intratecal prévia do antagonista de receptores B_2 o Hoe 140 (10-300 pmol/sítio, 10 minutos antes) inibiu a primeira (nocicepção transitória) e a segunda fase (nocicepção persistente) da dor espontânea produzida pela injeção intraplantar de formalina (Figura 7A e B). As inibições máximas foram de $23\pm 5\%$ e $51\pm 4\%$, para a primeira e segunda fase, respectivamente. O pré-tratamento (10 minutos antes da formalina) com o antagonista seletivo de receptores B_1 a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (3-30 nmol/site) inibiu a segunda ($44\pm 8\%$), mas não a primeira fase da nocicepção causada pela formalina (Figura 7C e D).

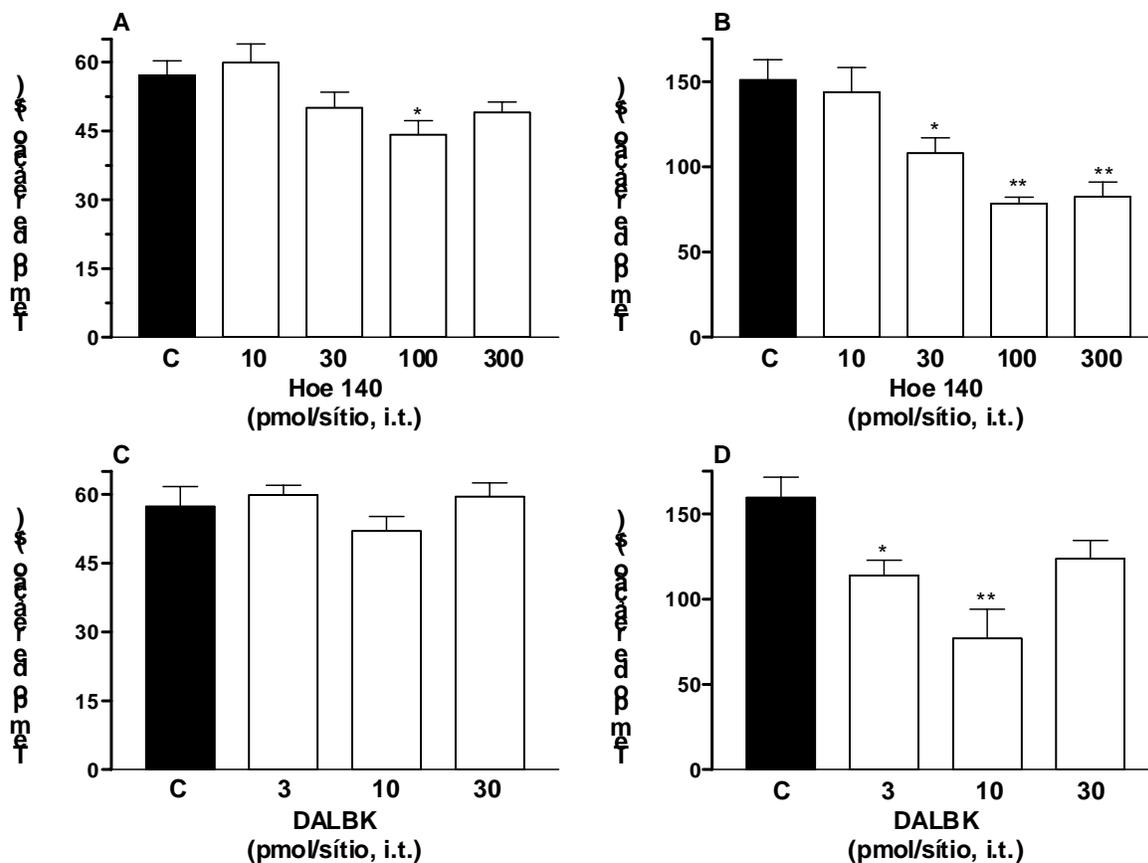


Figura 7 – Efeito do pré-tratamento intratecal (10 minutos antes da formalina) com os antagonistas seletivos para o receptor B₂ (Hoe 140, A e B) ou B₁ (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina, DALBK, C e D) na primeira (A e C) ou segunda fase (B e D) da nociceção induzida pela formalina em camundongos Suíços. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais demonstram o erro padrão. C (controle) indica os animais tratados com PBS por via intratecal. Os asteriscos denotam os níveis de significância em comparação aos valores controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

De modo semelhante ao pré-tratamento, a administração intratecal de Hoe 140 (100 pmol/sítio) ou de des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (10 pmol/sítio) 5 minutos após a injeção de formalina também inibiu a segunda fase do comportamento nociceptivo. As inibições máximas observadas foram 49±9% e 65±4% para o Hoe 140 e des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina, respectivamente. Estes dados demonstram que parece existir liberação endógena de cininas na medula espinhal e que a ativação dos receptores B₂ parece estar envolvida com fases mais agudas da transmissão da informação nociceptiva, enquanto que a ativação de receptores B₁ parece estar envolvida com fases mais crônicas.

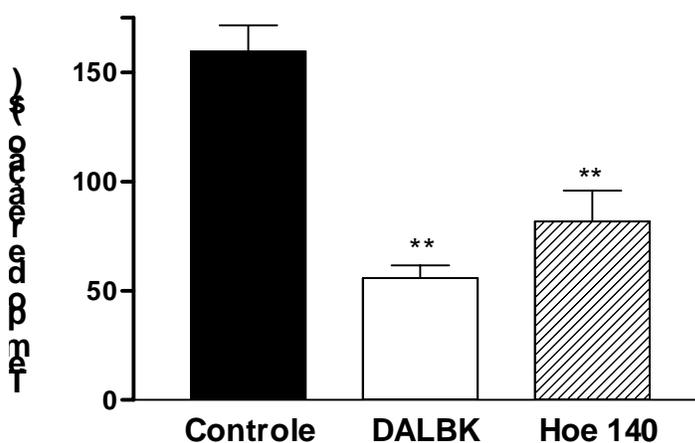


Figura 8 - Efeito do pós-tratamento intratecal (5 minutos após a formalina) com os antagonistas seletivos para o receptor B₂ (Hoe 140, 100 pmol/sítio) ou B₁ (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina, DALBK, 10 pmol/sítio) na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos Suíços. Cada coluna representa a média de 6 animais e as linhas verticais demonstram o erro padrão. Controle indica os animais tratados com PBS por via intratecal. Os asteriscos denotam os níveis de significância em comparação aos valores controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett). ** $P < 0,01$.

4.3. Participação dos receptores para as cininas na resposta inflamatória local induzida pelo CFA

O CFA produz intensa reação inflamatória que pode auxiliar na produção e manutenção da nocicepção crônica observada neste modelo. Desta forma, investigamos a possibilidade do efeito antinociceptivo produzido pelo antagonista ou pela deleção gênica do receptor B₁ ser decorrente de uma ação antiinflamatória.

De fato, a administração intraplantar de CFA induz aumento da temperatura da pata injetada, leva a infiltração de neutrófilos e elevação nos níveis teciduais da interleucina-1 β e da prostaglandina E₂ (Figura 9 e 10). No entanto, a deleção gênica do receptor B₁ para cininas não reduziu significativamente nenhum dos parâmetros inflamatórios avaliados 6 horas após a administração do CFA (Figura 9 e 10). Estes dados sugerem que o efeito anti-hiperalgésico e anti-alodínico observados em animais nocautes para o receptor B₁ não estão relacionados com a redução da produção de mediadores inflamatórios.

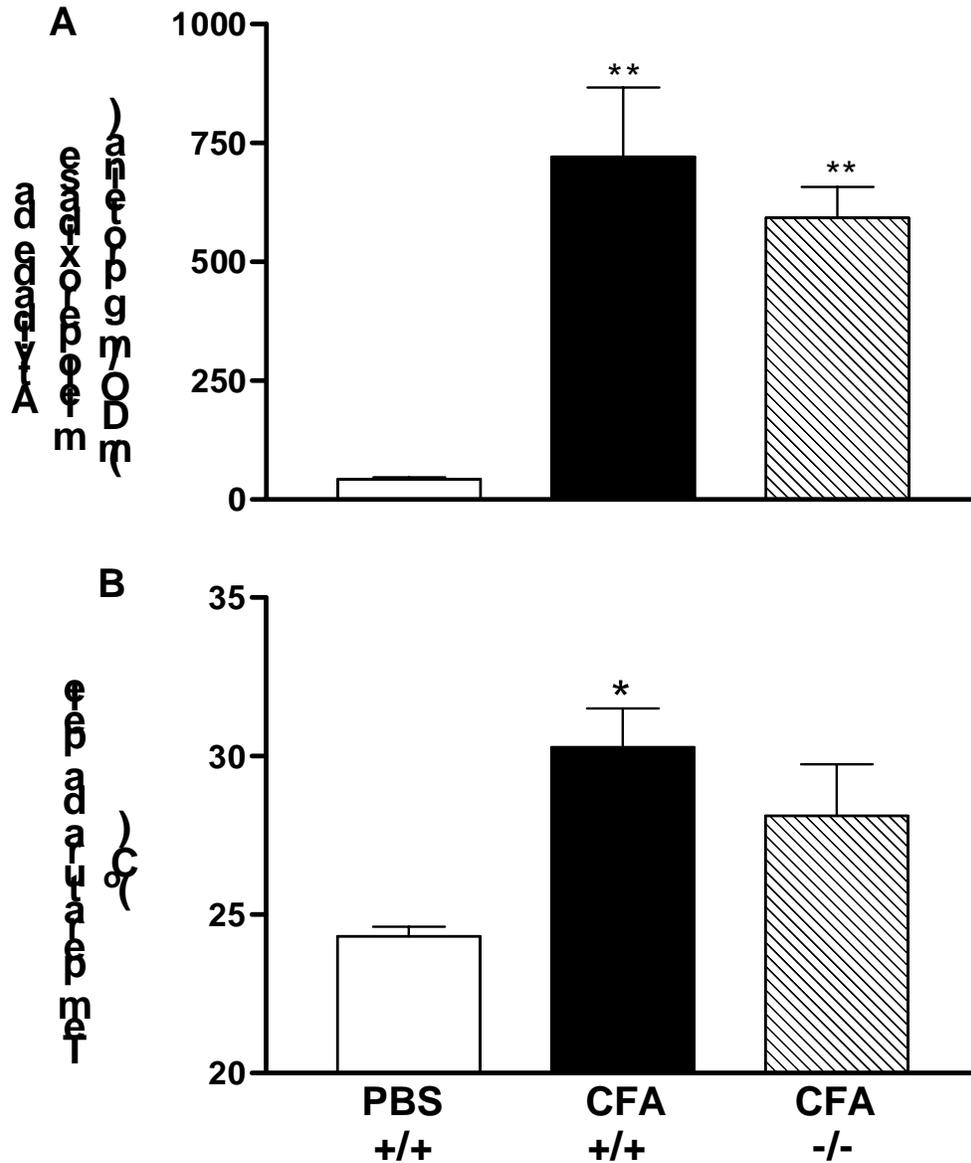


Figura 9 – Infiltração neutrofílica (A) e aumento da temperatura local causado pela injeção intraplantar de CFA em animais 129/SvJ selvagens e nocautes para o receptor B₁. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

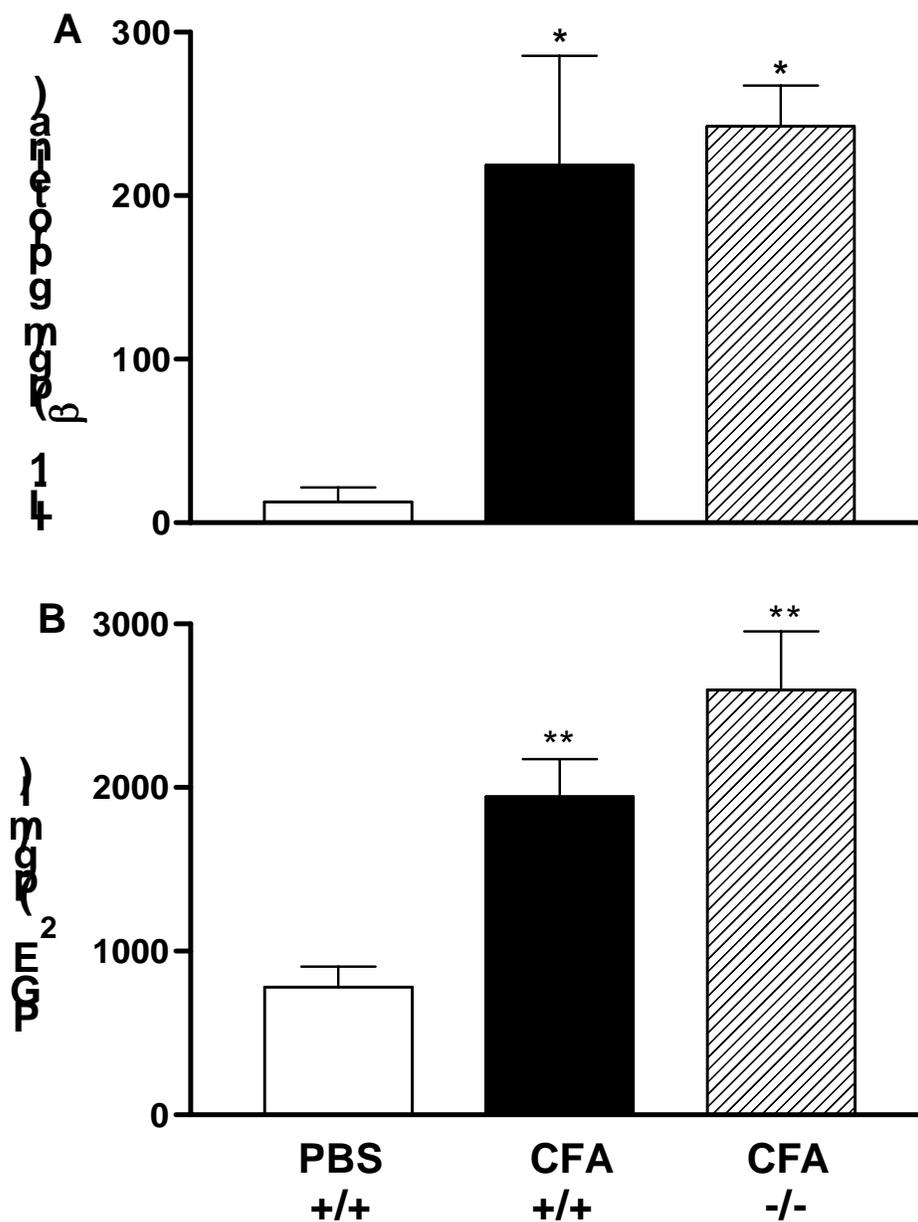


Figura 10 – Elevação nos níveis teciduais de interleucina-1 β (IL-1 β , A) e prostaglandina E₂ (PGE₂, B) causado pela injeção intraplantar de CFA em animais 129/SvJ selvagens e nocautes para o receptor B₁. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 4 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Um outro sinal inflamatório pelo CFA é a indução de edema de pata. A injeção intraplantar de CFA produziu aumento duradouro do volume da pata (Figura 11). O edema pode ser observado em 2 horas, foi máximo em 24 horas ($85 \pm 6 \mu\text{l}$) e diminuiu 72 horas após a injeção do CFA ($53 \pm 2 \mu\text{l}$). A deleção gênica do receptor B_1 não alterou significativamente o edema de pata causado pelo CFA quando comparado aos animais selvagens (Figura 11). Por outro lado, de 2 a 6 horas após a administração de CFA foi observado um significativo aumento na formação de edema em animais nocautes para o receptor B_2 quando comparado aos animais selvagens (Figura 11).

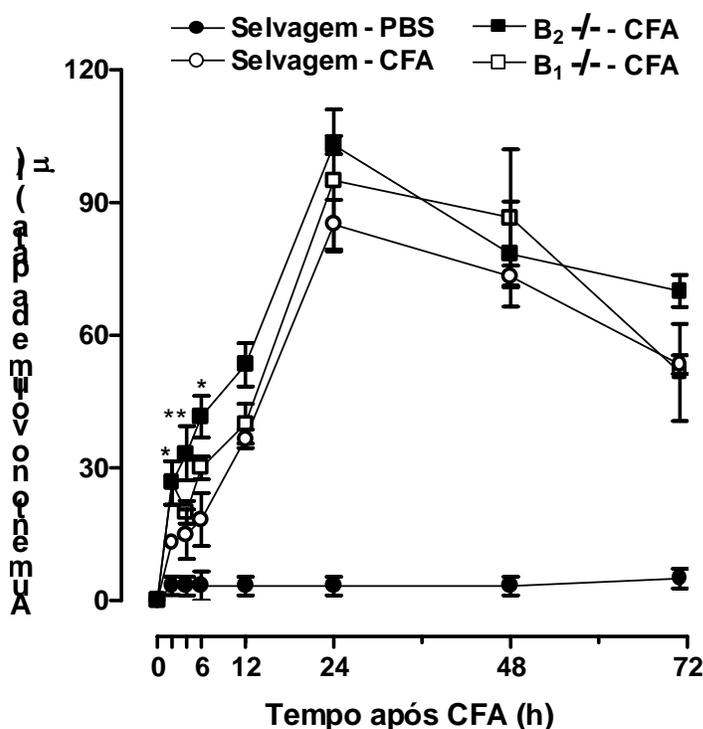


Figura 11 – Aumento do volume da pata dependente do tempo induzido pelo CFA em animais 129/SvJ selvagens ou nocautes para o receptor B_1 ou B_2 . Os dados representam a média \pm erro padrão de 4-6 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância comparado aos animais selvagens injetados com CFA (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

4.4. Aumento da expressão do receptor B₁ em animais nocautes para o receptor B₂

Estudos prévios da literatura demonstram aumento compensatório na expressão do receptor B₁ em animais nocautes para o receptor B₂ (Duka et al., 2001; Madeddu et al., 1997; Marin-Castaño et al., 2002). Para verificar um possível envolvimento da expressão do receptor B₁ na exacerbação do edema de pata causado pelo CFA em animais nocautes para o receptor B₂, estes foram tratados com o antagonista de receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (150 nmol/kg, s.c.). Os resultados da Figura 12 demonstram que este tratamento sistêmico reverteu significativamente ($76\pm 5\%$) o aumento exagerado do volume da pata observado 6 horas após a injeção CFA em animais nocautes para o receptor B₂ quando comparado com animais selvagens. O tratamento com o antagonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina não foi capaz de reduzir o edema de pata em animais selvagens (Figura 12).

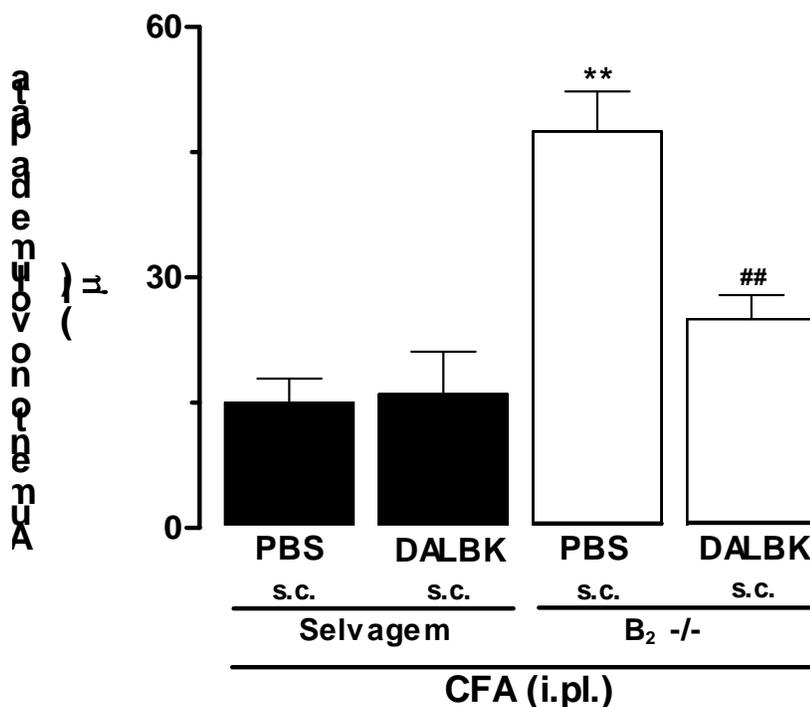


Figura 12 – Efeito do tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do receptor B₁ des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina (150 nmol/kg, s.c.) sobre o edema de pata observado 6 horas após a injeção intraplantar de CFA em camundongos 129/SvJ. Os dados representam a média+erro padrão de 4-6 animais. **P<0,01 representam o nível de significância comparado aos animais selvagens injetados com CFA; ##P<0,01 representa o nível de significância comparado aos animais nocautes para o receptor B₂ tratados sistemicamente com PBS (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Estes dados sugerem que o aumento nas respostas mediadas pelo receptor B₁ pode estar relacionado com a ausência de analgesia em animais nocautes para o receptor B₂ observada anteriormente. Para avaliar esta idéia e sabendo da relevância da ativação de receptores espinhais para as ações nociceptivas das cininas, utilizamos um modelo anteriormente padronizado de hiperalgesia térmica causada pela injeção intratecal de cininas (FERREIRA, 2000). A injeção intratecal

agonista de receptores B₂, a bradicinina (10 nmol/sítio, i.t.), produziu hiperalgisia térmica em animais selvagens, mas não em animais nocautes para o receptor B₂ (Figura 14A). Além disso, a deleção gênica do receptor B₁ reduziu os estágios tardios (30 e 60 minutos após a injeção) da hiperalgisia induzida pela bradicinina, sem no entanto reduzir os estágios iniciais (10 a 20 minutos após a injeção) (Figura 13B). Por outro lado, a hiperalgisia térmica causada pela injeção intratecal do agonista de receptores B₁ a des-Arg⁹-bradicinina (50 nmol/sítio, i.t.) foi ausente em animais nocautes para o receptor B₁ (Figura 14A). Porém, a hiperalgisia causada pela des-Arg⁹-bradicinina foi significativamente pronunciada em animais nocautes para o receptor B₂, quando comparada à resposta de animais selvagens (Figura 14B).

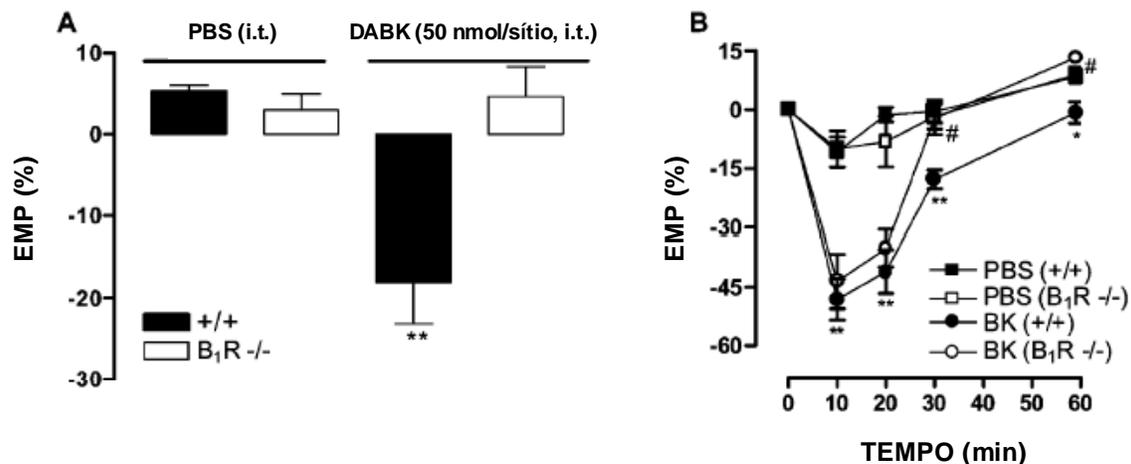


Figura 13 - Hiperalgisia causada pela injeção intratecal de des-Arg⁹-bradycinin (DABK, A) ou bradycinin (BK, B) em animais 129/SvJ selvagens (+/+) ou nocautes para o receptor B₁ (B₁R^{-/-}). O efeito hiperalgésico é expresso como EMP (%). Cada linha ou coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais representam o erro padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS; # $P < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com bradycinin (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

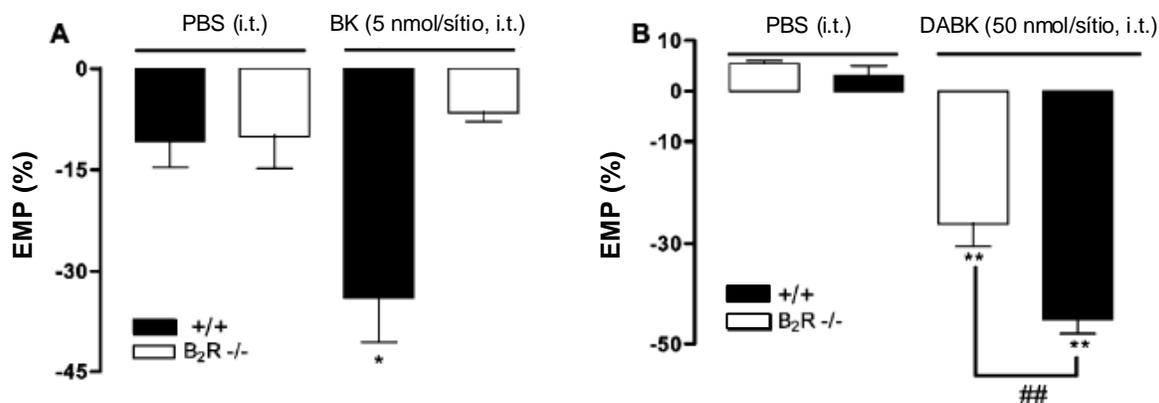


Figura 14 - Hiperalgisia causada pela injeção intratecal de bradicinina (BK, A) ou des-Arg⁹-bradicinina (DABK, B) em animais 129/SvJ selvagens (+/+) ou nocautes para o receptor B₂ (B₂R^{-/-}). O efeito hiperalgésico é expresso como EMP (%). Cada linha ou coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais representam o erro padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens tratados com PBS; ## $P < 0,01$ representa o nível de significância quando comparado com animais nocautes para o receptor B₂ tratados com des-Arg⁹-bradicinina (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

4.5. Participação dos receptores B₁ na dor neuropática

Outra modalidade de dor crônica comum e clinicamente relevante é a dor neuropática. Como o receptor B₁ parece estar envolvido com a gênese da dor crônica, avaliamos o efeito da deleção gênica do receptor B₁ em um modelo experimental de dor neuropática. A dor neuropática é iniciada ou causada por disfunção ou lesão primária no sistema nervoso (MERSKEY e BOGDUK, 1994).

As neuropatias possuem várias etiologias, podendo ser causadas por traumas (compressão), distúrbios metabólicos (ex. diabetes), drogas neurotóxicas (ex. quimioterápicos), infecções (ex. herpes) e entre outras. Existem vários modelos experimentais de dor neuropática em animais, sendo que os mais utilizados são aqueles que produzem lesão nervosa por compressão (Hogan, 2002; Bennett, 1999b). Estes modelos produzem uma série de efeitos que estão relacionados com um tipo particular de dor neuropática que acomete humanos, as síndromes dolorosas sistêmicas complexas. Estas síndromes são caracterizadas por dor descrita como em queimação, de ocorrência espontânea e persistente, alodínia, hiperalgesia, edema, mudanças de fluxo sanguíneo e atividade sudomotora anormal (KINGERY, 1997; MENDELL e SAHENK, 2003).

As figuras 15 e 16 demonstram que a lesão parcial do nervo ciático de camundongos selvagens produziu vários sintomas relacionados à dor, incluindo alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, observados de 1 a 42 dias após a lesão. A lesão parcial do nervo ciático induziu hiperalgesia térmica transitória observada de 1 até 21 dias após a cirurgia (Figura 15A e B). Esta hiperalgesia somente pôde ser verificada na pata ipsilateral à lesão, mas não na pata contralateral. A deleção gênica do receptor B_1 reduziu significativamente a hiperalgesia térmica, com inibição de $74 \pm 3\%$ quando avaliada 14 dias após a lesão. De maneira semelhante ao observado no modelo de dor inflamatória produzida pelo CFA, a deleção gênica do receptor B_2 não reduziu a hiperalgesia térmica causada pela lesão neural (dados não demonstrados).

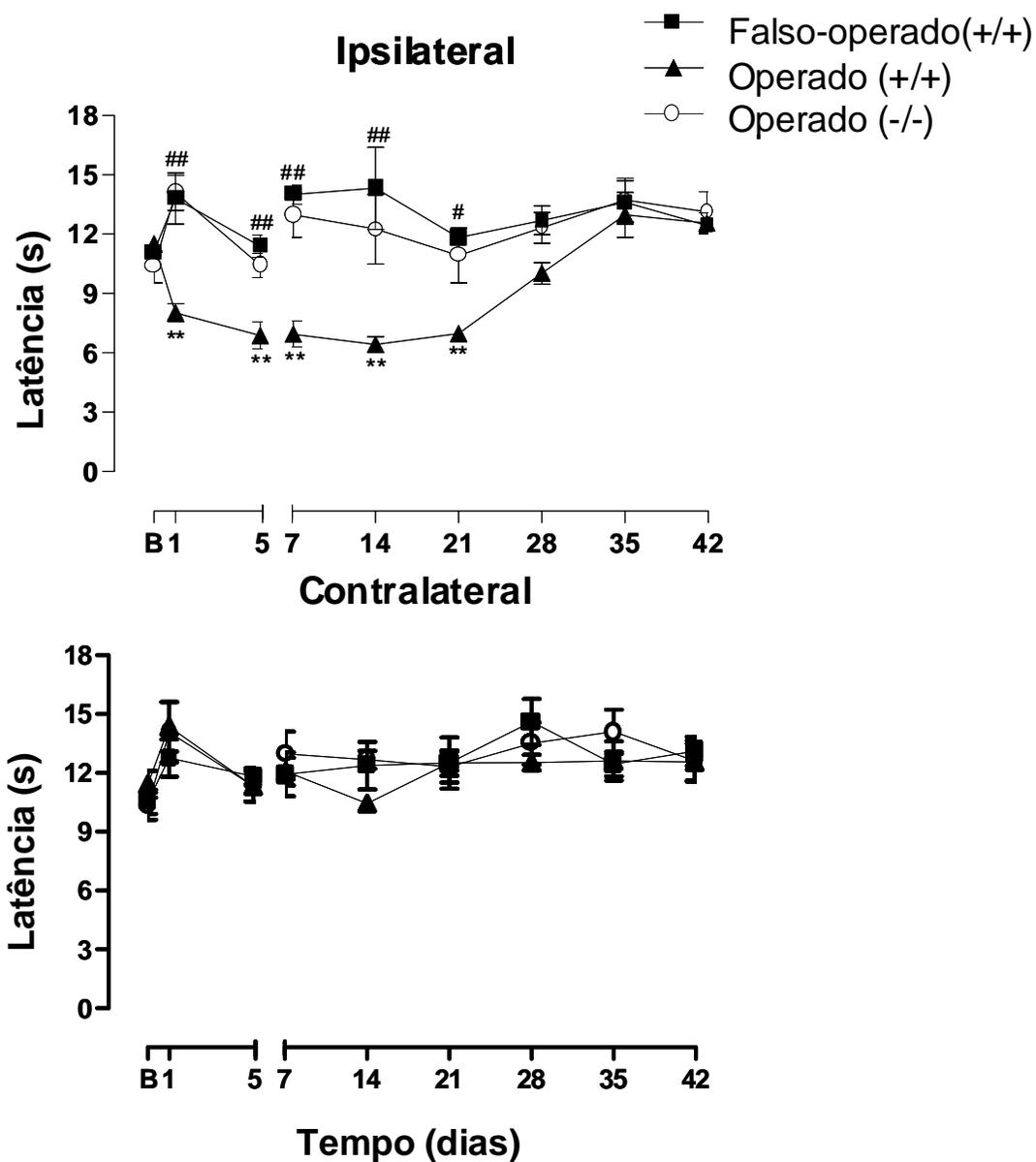


Figura 15 – Hiperalgisia térmica ao calor, dependente do tempo, causada pela lesão parcial do nervo ciático na pata ipsilateral, mas não contralateral, em animais 129/SvJ selvagens e nocautes para o receptor B₁. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 4-6 animais. B = Basal. ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens falso operados; ### $P < 0,01$; # $P < 0,05$ nível de significância quando comparado com animais selvagens operados (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Além da hiperalgesia térmica, a lesão do nervo ciático produziu alodínia mecânica avaliada com o filamento de von Frey de 0,16 g. Esta alodínia foi observada somente na pata ipsilateral à lesão, sendo evidente já no primeiro dia após a lesão e perdurou durante os 42 dias de observação dos animais (Figura 16). A deleção gênica do receptor B₁ praticamente bloqueou o desenvolvimento da alodínia mecânica por até 28 dias após a lesão. Porém, este efeito começou a ser reduzido no 35º dia, com perda total do efeito anti-alodínico 42 dias após a cirurgia.

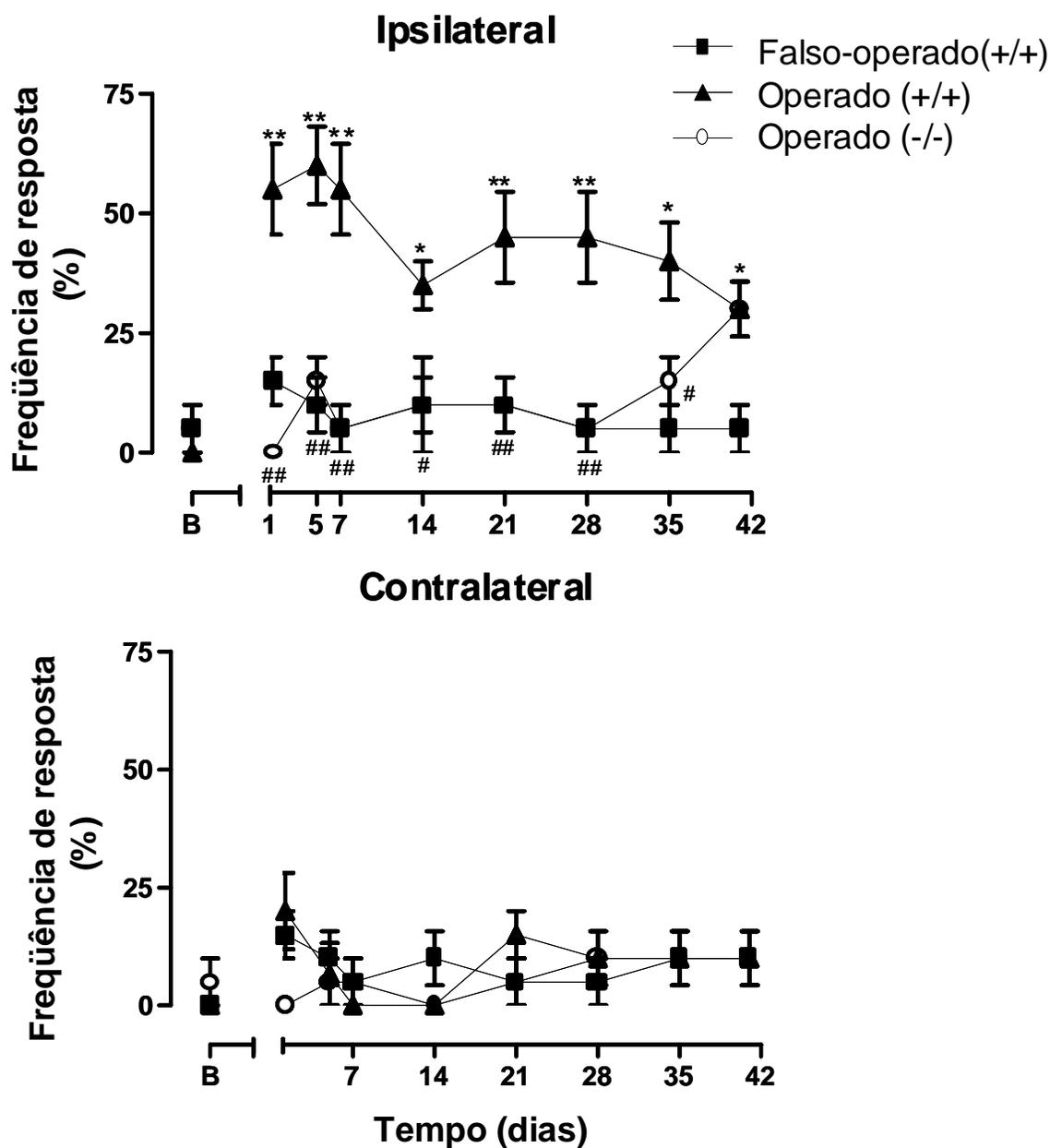


Figura 16 - Alodínia mecânica produzida pela lesão parcial do nervo ciático direito de camundongos 129/SvJ selvagens (+/+) ou nocautes para o receptor B₁ (-/-) observada na pata ipsilateral, mas não contralateral à lesão. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 6 animais B = Basal. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens falso operados; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais selvagens operados (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

O envolvimento do receptor B₁ na alodínia mecânica causada pela lesão parcial do nervo ciático também foi confirmado após o tratamento sistêmico com o antagonista seletivo para receptores B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradiginina (150 nmol/kg, s.c.). Este tratamento foi capaz de reduzir a alodínia estabelecida 7 dias após a cirurgia (Figura 17). O efeito anti-alodínico do antagonista foi de curta duração, tendo efeito máximo 1 hora após a administração e sendo significativo por até 3 horas.

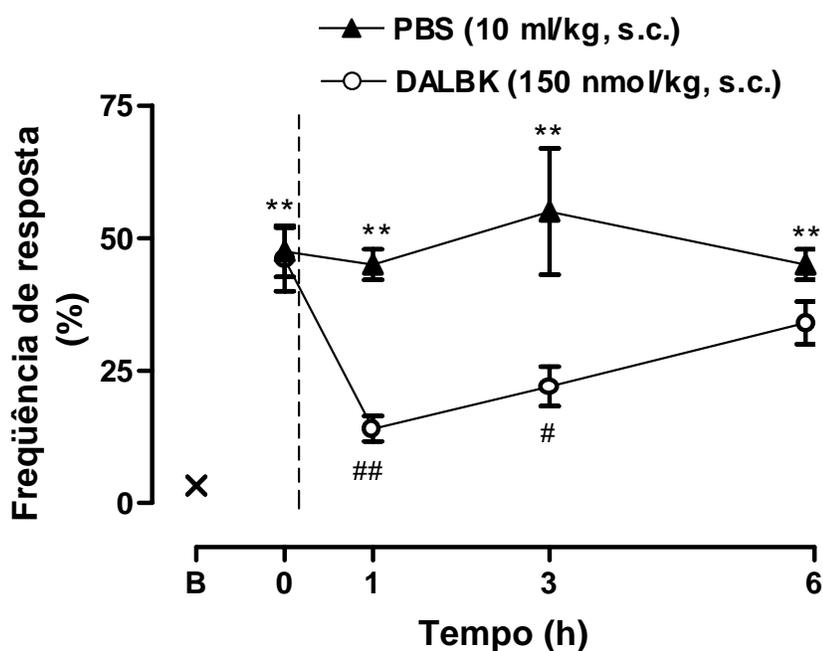


Figura 17 – Efeito do tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do receptor B₁ des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradiginina (DALBK, 150 nmol/kg, s.c.) na alodínia mecânica causada pela lesão parcial do nervo ciático em camundongos Suíços. Cada ponto representa a média ± erro padrão de 6 animais. ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com os valores basais antes da cirurgia (B); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com animais tratados com PBS; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ representam o nível de significância quando comparado com a frequência basal (B) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Após a descoberta da bradicinina, grande parte dos estudos conduzidos sobre o sistema caliceínas-cininas foi concentrado na participação dos receptores B_2 no controle da pressão arterial e nos processos inflamatórios. Como várias evidências experimentais demonstravam que níveis tissulares elevados de bradicinina eram encontrados em processos inflamatórios, existiu grande interesse na descoberta de substâncias que pudessem antagonizar as ações da bradicinina. Porém, foi somente em 1985 que os primeiros antagonistas para o receptor B_2 foram descritos (VAVRECK e STEWART, 1985). Estes antagonistas possuíam várias limitações de uso, tais como a atividade agonística parcial em vários tecidos, degranulação inespecífica de mastócitos e seletividade limitada para o receptor B_2 (REGOLI et al., 1990). O desenvolvimento do Hoe 140, um antagonista peptídico com alta afinidade, auxiliou na delineação do papel fisiopatológico dos receptores B_2 em modelos animais de doenças humanas (HOCK et al., 1991; WIRTH et al., 1991). Porém, a utilização clínica dos antagonistas peptídicos para os receptores B_2 não produziu efeitos satisfatórios em pacientes com asma, rinite ou sepse (HIRAYAMA e KAYAKIRI, 2002). O esclarecimento sobre a possibilidade do uso de antagonistas de receptores B_2 em processos inflamatórios crônicos foi otimizada com a descoberta de vários antagonistas destes receptores não-peptídicos e ativos por via oral, incluindo o WIN64338, o NPC18884 e a bradizida (SAWUTZ et al., 1994; DE CAMPOS et al., 1999; BURGESS et al., 2000). Porém, o uso clínico futuro dos antagonistas de receptores B_2 para cininas deve ser prejudicado pelo fato deste estar envolvido em

várias atividades fisiológicas (p. ex. controle da pressão arterial), além de possuir atividade protetora em algumas situações patológicas (p.ex. hipertrofia do ventrículo esquerdo) (BRULL et al., 2001; ZURAW, 2001)

Apesar de ter sido o primeiro receptor para cininas caracterizado farmacologicamente, a relevância do receptor B₁ no controle dos processos patofisiológicos foi prejudicada por suas características complexas de expressão e pela limitada atividade de seus antagonistas peptídicos. Os receptores B₁ para cininas fazem parte de uma complexa família de receptores, chamados receptores induzíveis, que incluem vários outros membros como os receptores para a interleucina-1, para o fator ativador de plaquetas e para a progesterona (DONALDSON et al., 1997). Isto significa que os receptores induzíveis têm baixo padrão de expressão em condições normais, mas que têm sua transcrição induzida em situações fisiológicas (p. ex. angiogênese) ou em situações patológicas (p. ex. por trauma tecidual). A clonagem e o estudo da estrutura do gene que codifica o receptor B₁ para cininas permitiu o aparecimento de um conjunto de informações que têm auxiliado a compreensão do funcionamento deste receptor, principalmente em culturas celulares *in vitro* (MARCEAU, 1997; MARCEAU et al., 2002). Organismos geneticamente modificados estão sendo cada vez mais utilizados como ferramenta para definir ou esclarecer as funções *in vivo* de moléculas que têm sido estudadas *in vitro*. Um exemplo são as vantagens do uso de camundongos nocautes ou transgênicos, pois o efeito da alteração de um único gene envolvido em um comportamento complexo pode ser estudado mais objetivamente (PICCIOTTO e WICKMAN, 1998). Neste contexto, o desenvolvimento de animais com superexpressão ou com deleção gênica do

receptor B_1 permitiu avanços inequívocos na compreensão a respeito da participação destes receptores em algumas funções fisiológicas e em várias patologias (PESQUERO et al., 2000; NI et al., 2003).

Os resultados obtidos confirmam e estendem os dados da literatura e revelam ainda que a deleção gênica dos receptores para cininas é uma importante ferramenta para o estudo da participação do sistema caliceína-cininas na nocicepção. Como grande parte dos antagonistas para os receptores das cininas é de origem peptídica, o estudo da participação de receptores B_1 e B_2 em situações crônicas é prejudicado pela baixa estabilidade destas substâncias quando administradas em animais experimentais. Desta forma, o desenvolvimento de animais com deleção gênica para os receptores das cininas torna-se adequado e permite caracterizar com maior precisão a participação destes receptores em modelos crônicos de doenças inflamatórias e dolorosas.

Lesões em tecidos periféricos, como pele, articulações e vísceras, levam à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios que podem ativar e sensibilizar nociceptores para outros estímulos. A ativação dos nociceptores na periferia produz mensagens que convergem para o corno dorsal da medula espinhal que processa a informação nociceptiva e a projeta para várias estruturas supraespinhais. Em locais como o tálamo, hipocampo, amígdala, córtex cerebral, substância cinzenta periaquedutal ocorrem os processos de percepção, aprendizado, proteção e controle endógeno da dor (WOOLF e SALTER, 2000; CRAIG, 2003).

Dados obtidos em vários estudos, principalmente como o uso de agonistas e antagonistas seletivos, demonstraram que os receptores B_1 e B_2 para cininas

estão implicados em vários processos dolorosos e inflamatórios (DRAY e PERKINS, 1997). Na periferia, uma importante ação da bradicinina é estimular os terminais nervosos nociceptivos e causar dor espontânea, hiperalgesia e alodínia tanto em animais experimentais quanto em humanos (ARMSTRONG, 1970; TAIWO e LEVINE; 1989; MANNING et al., 1991; FERREIRA et al., 1993; NEGUS et al., 1995; FERREIRA et al., 2004). Além da ativação direta de fibras sensoriais, a bradicinina sensibiliza estas fibras para outras respostas, incluindo estímulos térmicos e mecânicos (DRAY e PERKINS, 1997).

A ativação de receptores B_2 pela bradicinina em neurônios sensoriais produz imediata despolarização por estimular a hidrólise de fosfolídeos da membrana celular catalisada pela fosfolipase $C\beta$. Segue-se então uma mobilização do cálcio intracelular e extracelular e ativação da proteína quinase C, especialmente a do tipo ϵ ($PKC\epsilon$) (CESARE et al., 1999; DRAY e PERKINS, 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001). Parte das ações da bradicinina em fibras sensoriais é mediada pela ativação da fosfolipase A_2 , seguida da formação de produtos derivados da cicloxigenase e da lipoxigenase (DRAY e PERKINS, 1997). De fato, a injeção intraplantar de bradicinina em camundongos produz dor espontânea mediada pela ativação da fosfolipase C, proteína quinase C, fosfolipase A_2 e liberação de produtos derivados da lipoxigenase (FERREIRA et al., 2004).

Além disto, dados recentes da literatura demonstram que a hiperalgesia mecânica e a dor espontânea causada pela administração periférica da bradicinina são medidas pela ativação de receptores vanilóides (SHIN et al., 2002; FERREIRA et al., 2004). Tetrâmeros destes receptores formam canais catiônicos não

seletivos expressos intensamente nos nociceptores e parecem ser um alvo comum para a produção de dor causada por vários estímulos nocivos, tais como aquecimento excessivo, baixo pH e mediadores lipídicos (CATERINA e JULIUS, 2001). A resposta nociceptiva produzida pela bradicinina é de curta duração e rapidamente desensibilizada (FERREIRA et al., 2004). Por outro lado, a administração intraplantar de des-Arg⁹-bradicinina não é capaz de produzir dor espontânea ou hiperalgesia em camundongos (FERREIRA et al., 2004). Estes resultados sugerem que a ativação do receptor B₂ periférico, mas não do receptor B₁, produz nocicepção quando estimulado agudamente. Por outro lado, a ativação do receptor B₁ parece não ser um mecanismo importante para a produção da dor aguda. Porém, o receptor B₁ pode ser induzido após vários estímulos que são produzidos em situações inflamatórias crônicas ou após lesões teciduais que são acompanhadas por dor intensa, como ocorre por exemplo na artrite reumatóide. Além da indução do receptor B₁, pode ocorrer aumento na produção e redução da degradação de cininas durante processos inflamatórios. De fato, a atividade da carboxipeptidase N e a conseqüente produção de des-Arg⁹-bradicinina é elevada amostras de líquido sinovial obtido de pacientes artríticos (CHERCUITTE et al., 1987). Além disto, ocorre uma correlação positiva entre o aumento da atividade da carboxipeptidase N e a intensidade da inflamação nestes pacientes. Desta forma, o estudo da participação dos receptores para cininas em modelos experimentais de dor crônica é de grande interesse.

A nocicepção persistente causada pela administração de CFA é um dos modelos de dor crônica melhor caracterizado experimentalmente. O CFA é composto por *Mycobacterium* destruído por aquecimento e suspenso em parafina

e tensoativo. Sua administração na base da cauda ou nas patas de ratos, camundongos ou coelhos produz um processo inflamatório intenso, que se desenvolve rapidamente e pode persistir por semanas (para revisão ver: BILLIAU e MATTHYS, 2001). O *Mycobacterium* inteiro ou vários de seus componentes (incluindo a lipoproteína de 19 Kdaltons, a lipidoarabinomanana e a fosfatidilinositolmanana) são reconhecidos por receptores reconhecedores de padrão expressos em várias células do sistema imune inato, conhecidos como receptores semelhantes ao Toll, especialmente os subtipos 2 e 4 (para revisão ver: MADZHITOV, 2001; STERGER e MODLIN, 2002). A estimulação de células dendríticas por componentes do *Mycobacterium* ativam a imunidade inata e promovem respostas imunes específicas mediadas por linfócitos T auxiliares 1 (STERGER e MODLIN, 2002; BILLIAU e MATTHYS). Desta forma, a ativação do sistema imune inato e específico é importante para a produção dos processos inflamatórios e nociceptivos induzidos pelo CFA. Evidências apontam para o envolvimento de cininas nestes processos, já que seus receptores são capazes de ativar células responsáveis pela imunidade inata, tais como macrófagos e neutrófilos (para revisão ver: BOCKMANN e PAEGELOW, 2000). Além disso, a ativação de receptores B₂ para cininas em células dendríticas leva à produção de interleucina-12, que estimula a polarização de respostas em linfócitos do tipo T auxiliar 1 (ALIBERTI et al., 2003). Estes relatos indicam que os receptores para cininas podem participar do desenvolvimento da inflamação e da nocicepção causadas pelo CFA.

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento sistêmico com antagonistas de receptores B₁, e em menor intensidade com antagonistas de

receptores B₂, inibe a hiperalgesia mecânica causada pela administração do CFA em ratos, camundongos ou coelhos (BURGUESS et al., 2000; PANESAR et al., 1998; PERKINS et al., 1993; MASON et al., 2002). Os resultados do presente estudo confirmam os dados de Rupniack e colaboradores (1997), indicando que o animal deficiente em receptores B₂ apresentou essencialmente a mesma intensidade de hiperalgesia térmica após a injeção intraplantar de CFA. Por outro lado, antagonistas seletivos do receptor B₂ inibem parcialmente a hiperalgesia térmica (presente estudo) e mecânica (PANESAR et al., 1998) causada pelo CFA em camundongos. Estudos realizados em ratos demonstram que as terminações periféricas são o principal sítio de ação de antagonistas do receptor B₂ (PERKINS et al., 1993), já que a injeção intraplantar de CFA promove aumento tissular de bradicinina (GARRY et al., 1999). De fato, experimentos eletrofisiológicos *in vitro* mostraram aumento da sensibilidade de fibras C às ações excitatórias da bradicinina na pele extraída de animais portadores de artrite (BANIK et al., 2001). Porém, estes resultados contrastam com os dados de experimentos eletrofisiológicos *in vivo* (KELLY et al., 2001). Este estudo demonstrou que a ativação de fibras C produzida pela injeção intra-arterial de bradicinina é reduzida em animais portadores de artrite, efeito esse que é reduzido pela inibição da óxido nítrico sintase. Analisados em conjunto, estes dados indicam que a ativação do receptor B₂ não parece ser um mecanismo essencial para o desenvolvimento da hiperalgesia e alodínia induzida por CFA. Por outro lado, os resultados do presente estudo estendem os dados existentes na literatura e demonstram que o receptor B₁ está envolvido na hiperalgesia térmica e na alodínia mecânica que se desenvolvem na pata ipsilateral, e particularmente na pata contralateral, após

inflamação causada pela injeção intraplantar de CFA. Além disso, os receptores B₁ encontrados na medula espinhal parecem ser responsáveis por mediar os efeitos pró-nociceptivos quando estimulados por agonistas endógenos deste receptor.

Além da nocieção, a administração intraplantar de CFA produz reação inflamatória local caracterizada por eritema, aumento da temperatura local, extravasamento plasmático, infiltração de células inflamatórias, associado com a produção de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos tais como citocinas, neurotrofinas e eicosanóides (WOOLF et al., 1997; GANJU et al., 2001). O presente trabalho também demonstra que o efeito anti-hiperalgésico causado pela deleção gênica ou pelo uso do antagonista seletivo do receptor B₁ não parece estar relacionado com a redução no processo inflamatório no local da lesão. Assim, o edema, o aumento da temperatura local, a infiltração de neutrófilos, bem como a elevação na produção de interleucina-1 β e de prostaglandina E₂ causados pela injeção intraplantar de CFA não foram reduzidos significativamente em animais nocautes para o receptor B₁. Esses achados contrastam com vários resultados da literatura que demonstraram que a administração intraplantar do agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-bradicinina, produz edema na pata de ratos pré-tratados com o fator de necrose tumoral- α ou com a interleucina-1 β (CAMPOS et al., 1998; 1999; 2002). Além disto, vários estudos demonstraram que a deleção gênica do receptor B₁ foi capaz de reduzir o edema, o aumento de permeabilidade vascular e a infiltração de células pró-inflamatórias produzidos por diferentes estímulos, tais como carragenina (PESQUERO et al., 2000), caseinato de sódio

(ARAÚJO et al., 2001) e formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (TODOROV et al., 2003). Estes dados demonstram que os receptores B₁ não são essenciais para o desenvolvimento da resposta inflamatória causada pelo CFA, mas são relevantes para outras substâncias inflamatórias.

O efeito anti-hiperalgésico e anti-alodínico causado pela deleção gênica do receptor B₁ no modelo de inflamação causada pelo CFA parece ser mediado diretamente por alteração da transmissão dos estímulos dolorosos. Estudos recentes demonstraram que o receptor B₁ é expresso de maneira constitutiva em fibras aferentes de pequeno diâmetro, peptidérgicas e não-peptidérgicas, principalmente as do tipo C e A δ (WOTHERSPOON e WINTER, 2000; MA, 2001). Porém, estes receptores não parecem ser funcionais, pois agonistas dos receptores B₁ não são capazes de ativar diretamente as terminações periféricas de fibras sensoriais ou os neurônios do gânglio da raiz dorsal *in vitro* (DRAY et al., 1992; SEABROOK et al., 1997). De fato, a des-Arg⁹-bradicinina não produz nocicepção ou hiperalgesia quando administrada intraplantarmente em camundongos ou ratos em situação basal (PERKINS e KELLY, 1994; KHASAR et al., 1995; GANJU et al., 2001; FERREIRA et al., 2004). Porém, a des-Arg⁹-bradicinina é capaz de produzir resposta nociceptiva quando administrada em animais pré-tratados intraplantarmente com interleucina-1 β ou com ésteres de forbol, ou ainda, após receberem irradiação ultravioleta (PERKINS e KELLY, 1993; 1994; J.B. CALIXTO, resultados não publicados). De seis a doze horas após a injeção intraplantar de CFA ocorre elevação nos níveis tissulares de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo a interleucina-1 β , interleucina-1 α , fator de

necrose- α , fator de crescimento do nervo e prostaglandina E_2 (WOOLF et al., 1997; GANJU et al., 2001; presente estudo). De maneira interessante, o efeito anti-hiperalgésico produzido pela deleção gênica do receptor B_1 em camundongos é somente observado 6 horas após a administração do CFA. Estes resultados sugerem que os receptores B_1 necessitam ser sensibilizados por substâncias endógenas liberadas durante o processo inflamatório para se tornarem funcionais.

Além da periferia, a medula espinhal parece ser um importante sítio para a produção dos efeitos nociceptivos causados pelas cininas. Os resultados obtidos no presente estudo com a administração de antagonistas dos receptores para cininas demonstram que estes receptores são importantes na transmissão e na modulação da informação nociceptiva no sistema nervoso central. De fato, os receptores B_1 e B_2 são encontrados em terminações espinhais de fibras aferentes primárias e em interneurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos, ratos, macacos e humanos (STERANKA et al., 1988; LOPES et al., 1993; RAIDOO e BHOOLA, 1997; COUTURE e LINDSEY, 2000; MA et al., 2000; WOTHERSPOON e WINTER, 2000; MA, 2001; MA e HEAVENS, 2001; FOX et al., 2003; SHUGHRUE et al., 2003). Além disto, os receptores B_1 e B_2 são também encontrados nos corpos celulares das fibras aferentes primárias, localizados no gânglios da raiz dorsal (STERANKA et al. 1988; WOTHERSPOON e WINTER, 2000; SHUGHRUE et al., 2003). Como a síntese de receptores para cininas pode ocorrer nos gânglios da raiz dorsal, o transporte axonal direcionado para as terminações centrais das fibras aferentes pode ser responsável, pelo menos em

parte, pela presença de receptores para cininas observados na medula espinhal (STERANKA et al., 1988).

Experimentos eletrofisiológicos *in vitro* demonstram que a bradicinina, mas não a des-Arg⁹-bradicinina, é capaz de ativar terminações medulares de fibras aferentes primárias de ratos (DUNN e RANG, 1990). Por outro lado, a des-Arg⁹-bradicinina é capaz de potencializar a despolarização de terminações medulares de fibras C produzida pela estimulação elétrica da raiz dorsal (PESQUERO et al., 2000). Desta forma, os receptores B₁ para as cininas parecem estar quiescentes na medula espinhal, sendo necessário estímulos nociceptivos para sua ativação. Concordando com os resultados *in vitro*, os resultados obtidos por Laneuville e colaboradores (1987; 1989) demonstraram que a injeção intratecal na região torácica de bradicinina, mas não da des-Arg⁹-bradicinina, produziu resposta nociceptiva transitória em ratos, seguida por uma aparente ação antinociceptiva causada por uma interação pré-sináptica em terminais de fibras noradrenérgicas bulboespinhais. Por outro lado, a injeção intratecal de des-Arg⁹-bradicinina não causa hiperalgesia quando injetada em ratos controle, porém produz hiperalgesia transitória quando administrada em ratos diabéticos (COUTURE et al., 2001). Similar a estas observações, estudos *in vivo* realizados em nosso laboratório demonstraram que a injeção intratecal de cininas produz hiperalgesia térmica em camundongos tratados com captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina (FERREIRA, 2000). Os dados obtidos no presente estudo utilizando animais com deleção gênica nos receptores para cininas confirmam os resultados anteriores demonstrando que a bradicinina produz hiperalgesia térmica mediada pelo receptor B₂ e, em menor extensão, pelo receptor B₁ enquanto que a

hiperalgesia térmica causada pela des-Arg⁹-bradicinina é mediada exclusivamente pela ativação de receptores B₁.

O presente estudo estende também os resultados obtidos com a administração exógena de cininas. O efeito anti-nociceptivo produzido pela injeção intratecal de antagonistas para receptores B₁ e B₂ sugere que existe produção endógena de cininas na medula espinhal durante a produção de nocicepção. De fato, todos os componentes para a síntese de cininas são encontrados no sistema nervoso central (HALL e GEPETTI, 1995; WALKER et al., 1995). A presença da caliceína tissular tem sido demonstrada no cérebro por diversas técnicas (POWERS e NASJLETTI, 1983; SCICLI et al., 1984; CHAO et al., 1987). O cininogênio é encontrado em várias lâminas da medula espinhal de ratos (LI et al., 1999). As cininas foram encontradas no líquido de humanos na concentração de 53 pg/ml (SCICLI et al., 1984) e a bradicinina foi encontrada em valores de 600 pg/g em tecido cerebral total de ratos (PERRY e SNYDER, 1984). Uma ampla imunoreatividade para a bradicinina foi identificada em várias regiões do SNC, incluindo a medula espinhal (CORREA et al., 1979; PERRY e SNYDER, 1984; KARIYA et al., 1985). Além disto, várias cininases foram identificadas no tecido cerebral, incluindo a encefalinase (CAMARGO et al., 1972; SCHWARTZ et al., 1981) e as cininases (CAMARGO et al., 1973).

A possível produção endógena de cininas e a conseqüente ativação dos receptores B₁ e B₂ na medula espinhal foi avaliada neste estudo utilizando diferentes modelos de nocicepção transitória e persistente (formalina) ou crônica (CFA). Confirmando achados anteriores (CORRÊA e CALIXTO, 1993; HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989), a injeção intraplantar de

formalina induziu comportamento nociceptivo com duas fases distintas. A primeira fase reflete a ativação direta de nociceptores e a segunda fase está relacionada com a sensibilização espinhal causada pelos impulsos periféricos produzidos pela primeira fase (JI e WOOLF, 2001). Na transmissão normal, a ativação de fibras aferentes primárias do tipo C ou A δ por estímulos intensos produz nocicepção transitória e localizada que independe de mudanças fenotípicas nestes nociceptores (WOOLF e COSTIGAN, 1999). Por outro lado, a entrada de estímulos nociceptivos repetidos na medula espinhal origina mudanças pós-transcricionais (como fosforilações de receptores e canais iônicos pela proteína quinase C e pela ERK MAP quinase) (JI e WOOLF, 2001; WOOLF e COSTIGAN, 1999). Estas mudanças produzem alterações na excitabilidade neuronal, aumentando a sensibilidade para estímulos periféricos de alta e baixa intensidade, um fenômeno conhecido como sensibilização central. Assim, os receptores B₂ espinhais estão envolvidos na transmissão espinhal da nocicepção transitória e durante períodos iniciais da sensibilização, ou seja, durante a primeira e a segunda fase do teste da formalina.

Em algumas horas após a lesão tecidual, ocorre a ativação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, observa-se alteração na expressão de vários genes que codificam proteínas que auxiliam na perpetuação do estado de hiperexcitabilidade neuronal, tais como, canais de sódio e cálcio, neurotrofinas, dinorfina e substância P (JI e WOOLF, 2001; WOOLF e COSTIGAN, 1999). Estes fenômenos estão envolvidos com o desenvolvimento e a manutenção da hiperalgesia e da alodínia que acompanham a inflamação causada pelo CFA. De

fato, vários fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear κ B e a proteína ativadora-1, são ativados na medula espinhal de ratos após a injeção intraplantar de CFA (CHAN et al., 2000). Ambos fatores de transcrição podem promover aumento na expressão do receptor B_1 (PRADO et al., 2002). Desta forma, os receptores B_1 para as cininas parecem estar envolvidos no processo de transmissão de estímulos dolorosos, durante condições de sensibilização espinhal tanto aguda como crônica. Dando suporte a esta sugestão, Pesquero e colaboradores (2000) demonstraram que a deleção gênica do receptor B_1 reduziu a facilitação dependente do uso dos neurônios espinhais (*wind up*), caracterizada por despolarizações cumulativas não-lineares destes neurônios induzidas por estímulos repetidos em fibras C. Por outro lado, os receptores B_2 parecem não estar envolvidos neste fenômeno (CHAPMAN e DICKENSON, 1992). O *wind up* provavelmente reflete um sistema ativado na medula espinhal após impulsos nociceptivos intensos e persistentes (HERRERO et al., 2000), indicando que a antinocicepção observada nos animais nocautes para o receptor B_1 pode ser atribuída, pelo menos em parte, à deficiência na plasticidade neuronal de neurônios espinhais.

Além das células neuronais, outros tipos celulares podem participar da ação nociceptiva mediada pelas cininas. As células imunes são recrutadas e ativadas, enquanto as células da glia (principalmente a micróglia e astrócitos) parecem ter um importante papel imuno-efetor no SNC, inclusive nas reações inflamatórias e nociceptivas (MELLER et al., 1994; PERRY et al., 1993; WALKER et al., 1995; WATKINS e MAIER, 2003). Células da glia ativadas podem liberar vários

mediadores pró-nociceptivos, tais como prostaglandinas, aminoácidos excitatórios, ATP, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, interleucinas 1 β e 6, além do fator de necrose tumoral- α (WATKINS e MAIER, 2003). Diversos estudos demonstram que os receptores B₂ são encontrados na micróglia do SNC (CHOLEWINSKI et al., 1991; HOSLI et al., 1992; HOSLI e HOSLI, 1993a,b; STEPHENS et al., 1993). Os astrócitos e os oligodendrócitos são ativados pela bradicinina, que induz a produção de fosfoinosítídeos e aumenta a concentração de cálcio intracelular (RITCHIE et al., 1987; GIMPL et al., 1992; HOSLI et al., 1992; LIN e CHUANG, 1992; STEPHENS et al., 1993). A des-Arg⁹-bradicinina também é capaz de induzir correntes iônicas e aumentar o cálcio intracelular em astrócitos (GIMPL et al., 1992). A estimulação das células da glia pela bradicinina causa liberação de ácido araquidônico e de glutamato (BURCH e KNISS, 1988; BURCH e TIFFANY, 1989; PARPURA et al., 1994; 1995). O cininogênio também é encontrado em células da glia na medula espinhal de ratos (LI et al., 1999). Apesar da ativação da glia ser um mecanismo relevante para a produção da dor crônica (WATKINS e MAIER, 2003), estudos devem ser realizados para confirmar a participação destas células nas ações nociceptivas produzidas pelas cininas.

Outro resultado interessante obtido no presente estudo foi a eficiência da deleção gênica e também do tratamento com o antagonista do receptor B₁ para cininas em inibir a alodínia e a hiperalgesia causadas pelo CFA na pata contralateral à injeção. Vários processos inflamatórios ocorrem de maneira bilateral e simétrica em humanos, tais como a artrite reumatóide e a osteoartrite (SHENKER et al., 2001). Este fenômeno não é completamente entendido, porém

sabe-se que tanto mecanismos neuronais quanto imunes são responsáveis pelo desenvolvimento de efeitos contralaterais à lesão. De maneira semelhante, o modelo experimental de artrite induzida pelo CFA em animais produz diminuição do anabolismo da cartilagem e aumento nos níveis de neuropeptídeos na articulação contralateral (BILEVICIUTE et al., 1993; DECARIS et al., 1999). Outros experimentos eletrofisiológicos demonstraram a ocorrência de reflexos bilaterais da raiz dorsal (isto é, despolarizações de fibras aferentes primárias originadas nas terminações espinhais destas fibras) na artrite causada por adjuvante (REES et al., 1996). Confirmando a participação neurogênica neste processo, vários destes efeitos podem ser reduzidos pela secção de nervos periféricos ou pela lesão de fibras aferentes primárias e simpáticas (LEVINE et al., 1985; DECARIS et al., 1999).

Mecanismos imunes também podem participar no desenvolvimento de fenômenos contralaterais à lesão inflamatória. A artrite induzida por CFA é acompanhada por aumento plasmático de interleucina-6, o que poderia desencadear processos sistêmicos (PHILIPPE et al., 1997). O nível de fator de necrose tumoral- α é aumentado na pata contralateral à tratada com CFA (WOOLF et al., 1997). Recentemente, Samad e colaboradores (2001) demonstraram que a injeção intraplantar de CFA em ratos induz aumento nos níveis de interleucina-1 β no líquido cérebro espinhal. A interleucina-1 β , por sua vez, aumenta a expressão da cicloxigenase-2 na medula e no tálamo bilateralmente, e eleva o nível de prostaglandina E₂ no líquido cérebro espinhal podendo desta forma causar hiperalgesia sistêmica.

A hiperalgesia e a alodínia contralaterais observadas nos animais tratados com CFA podem também decorrer de um aumento na expressão e na atividade do receptor B_1 , causada por aumento na liberação de citocinas (como a interleucina- 1β), que são importantes reguladoras da função do receptor B_1 (CAMPOS et al., 1998; 1999). Ratos tratados intra-articularmente com interleucina- 1β desenvolvem hiperalgesia ipsi e contralateral após injeção endovenosa de um agonista do receptor B_1 (PERKINS and KELLY, 1994). Finalmente, fibras simpáticas também parecem estar envolvidas neste processo, pois Khasar e colaboradores (1995) demonstraram que a injeção intraplantar contralateral de agonista de receptores B_1 produziu hiperalgesia mecânica em ratos pré-tratados com CFA, efeito amplamente reduzido pela simpatectomia pós-ganglionar cirúrgica.

Os resultados do presente estudo foram recentemente confirmados em ratos. Fox e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção sistêmica ou intratecal do antagonista de receptores B_1 , o des-Arg¹⁰-Hoe140, inibiu a hiperalgesia térmica e mecânica produzida pela injeção do CFA em ratos. Além disto, experimentos de imunohistoquímica demonstraram que a injeção de CFA na pata esquerda de ratos produziu aumento na expressão dos receptores B_1 nos gânglios da raiz dorsal ipsilateral e contralateral à injeção (FOX et al., 2003).

Para avaliar a participação de receptores para cininas em outras modalidades de dor crônica, foi verificado o efeito da sua deleção gênica em um modelo experimental de dor neuropática causada pela lesão parcial do nervo ciático. A dor neuropática possui várias similaridades com a dor inflamatória, pois vários sinais inflamatórios estão associados à sua manifestação (TRACEY e

WALKER, 1995; BENNETT, 1999a). Além do edema, uma característica importante das neuropatias periféricas é a infiltração de células (como neutrófilos e macrófagos) e a produção de mediadores pró-inflamatórios (como interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, fator de crescimento do nervo). Convém destacar que, além de axônios, o nervo periférico é constituído de vasos sanguíneos, terminações neuronais, mastócitos, células de Schwann e outras células satélites que podem participar ativamente na produção de mediadores inflamatórios (ZOCHODNE, 1993). Após a lesão nervosa, todas estas células e mediadores irão ser ativados em conjunto, formando um neuroma na região lesada.

Após a lesão de nervos periféricos, as células de Schwann mudam seu fenótipo, deixando de produzir mielina e passando a sintetizar fatores de crescimento, que têm profundos efeitos não somente nos neurônios lesionados mas também em neurônios vizinhos intactos (CAMPBELL, 2001). Desta maneira, inicia-se a acumulação anormal de canais iônicos e de receptores na região do neuroma, especialmente de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina e de α_1 -adrenoceptores, que produzem hiperexcitabilidade local e potenciais de ação ectópicos no axônio e no corpo celular dos neurônios lesionados e intactos (WOOLF e MANNION, 1999; MILLAN, 1999). Estas descargas produzem sensibilização contínua de neurônios do corno dorsal da medula espinhal e mantêm o estado de hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais centrais.

As terminações espinhais das fibras aferentes primárias A β de baixo limiar normalmente se localizam em lâminas profundas do corno dorsal da medula,

enquanto que as terminações de nociceptores se localizam em lâminas superficiais como a lâmina II. A lesão de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro ocasiona um brotamento de terminais das fibras A β para lâmina II. Desta forma, neurônios de segunda ordem na lâmina II da medula espinhal que fazem sinapse exclusivamente com fibras de alto limiar, passam a ser ativados por estímulos inócuos. Este parece ser um dos principais substratos anatômicos para explicar a alodínia mecânica, comum nas neuropatias (WOOLF e MANNION, 1999). Por outro lado, a estimulação excessiva de fibras aferentes e a consequente liberação exagerada de mediadores citotóxicos como o glutamato na medula espinhal leva a morte de interneurônios inibitórios opioidérgicos e gabaérgicos, amplificando ainda mais o processo doloroso (MILLAN, 1999).

Diversas evidências sugerem a participação das cininas e de seus receptores na dor neuropática. Altos níveis de bradicinina são encontrados no plasma de pacientes com dor neuropática (BLAIR et al., 1998). Estudos *ex vivo* demonstraram que após a indução de neuropatia em ratos, ocorre aumento na produção de bradicinina e diminuição da densidade de receptores B₂ na medula espinhal (LOPES et al., 1995; LOPES e COUTURE, 1997). Por outro lado, foi observado ainda aumento na quantidade de RNAm e no número de receptores B₁ e B₂ no gânglio da raiz dorsal após lesão do nervo ciático em ratos (ECKERT et al., 1999; LEVY e ZOCHODNE, 2000; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003). O aumento da expressão do receptor B₂ após lesão nervosa parece ser dependente do fator de crescimento do nervo (NGF) (LEE et al., 2002). Além disto, a administração sistêmica de antagonistas B₁ e B₂ reduziu a hiperalgesia térmica e

mecânica produzida pela lesão do nervo ciático em ratos (LEVY e ZOCHODNE, 2000; MCNAIR et al., 2001; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003).

Os resultados do presente trabalho não só confirmam, mas também estendem os estudos descritos na literatura e demonstram que a deleção gênica do receptor B₁ para as cininas reduz a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica causada pela lesão parcial do nervo ciático em camundongos. Estudos da literatura reforçam a idéia da participação do receptores B₁ na produção da dor neuropática, demonstrando que antagonistas do receptor B₁ para cininas reduzem a hiperalgesia térmica induzida por neuropatia diabética em camundongos (GABRA e SIROIS, 2002; 2003). Estes resultados sugerem, portanto, que os receptores para cininas, especialmente o receptor B₁, são um alvo terapêutico interessante para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da dor neuropática de diversas origens, que ainda permanecem sem tratamento farmacológico adequado.

Em trabalho publicado recentemente, Rashid e colaboradores (2004) demonstraram que a nocicepção causada pela injeção intraplantar de bradicinina é mediada pelo receptor B₂ em camundongos controle. Porém, em animais que tiveram o nervo ciático lesionado a bradicinina produz nocicepção mediada pela ativação do receptor B₁. Por outro lado o agonista seletivo dos receptores B₁ des-Arg¹⁰-calidina, não foi capaz de produzir nocicepção em camundongos controle, mas no entanto, produziu comportamento nociceptivo em animais com lesão nervosa. Além disto, a administração intraplantar de cininas em animais com neuropatia causa ativação da proteína quinase ativada por mitógeno do tipo ERK em neurônios de pequeno diâmetro e em células satélite do gânglio da raiz

dorsal. A ativação desta quinase tem sido associada com a manutenção da dor crônica inflamatória e neuropática, por mecanismos que envolvem a modificação regulação do funcionamento e expressão de canais iônicos, receptores e proteínas do citoesqueleto (FERNYHOUGH et al., 1999; BABA et al., 2003; BRON et al., 2003; DINA et al., 2003; OBATA et al., 2003).

Apesar de ocorrer aumento na expressão dos receptores B₁ e B₂ para cininas no gânglio da raiz dorsal durante a dor crônica e do fato da administração periférica de cininas causar nocicepção, o local exato da ativação destes receptores durante a dor crônica permanece por ser esclarecido. Além dos nervos periféricos e da medula espinhal, já foi demonstrada a expressão constitutiva dos receptores B₁ e B₂ para as cininas em várias regiões do sistema nervoso central que estão envolvidas com a nocicepção, incluindo córtex cerebral, tálamo, hipotálamo e amígdala (RAIDOO e BHOOLA, 1997; CASEY, 1999; CHEN et al., 2000; ONGALI et al., 2003; SHUGHRUE et al., 2003). Curiosamente, a injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo da parede de *E. coli* produz hiperalgesia mediada pela ativação de receptores B₁ e B₂ (DRAY e PERKINS, 1997). É interessante ressaltar que a bradicinina pode causar efeito antinociceptivo, principalmente quando injetada no locus coeruleus (COUTO et al., 1998; PELÁ et al., 1996) ou, ao contrário, causar efeito hiperalgésico, quando injetada na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (BURDIN et al., 1992). Estes efeitos aparentemente paradoxais das cininas parecem ser mediados principalmente pela ativação de receptores B₂ (PELÁ et al., 1996).

Outro sistema que pode estar envolvido com a produção da dor neuropática mediada pelo receptor B₁ é o sistema nervoso simpático. O RNAm do receptor B₁

foi encontrado em culturas de neurônios do gânglio cervical superior (predominantemente simpático) de camundongos (SEABROOK et al., 1995; 1997). Porém, os agonistas do receptor B₁ promoveram despolarização neuronal somente após a exposição das células à IL-1 β e captopril, um fenômeno que foi inibido pela indometacina (SEABROOK et al., 1995). O sistema simpático também possui importância na manutenção de alguns tipos de dor neuropática, ocorrendo brotamento de fibras simpáticas que envolvem o gânglio da raiz dorsal. Desta forma, as catecolaminas circulantes e a noradrenalina liberada de terminais simpáticos pós-ganglionares podem auxiliar na manutenção da dor neuropática, pois já foi demonstrado que a simpatectomia pode reduzir seus sintomas em humanos, bem como em animais (MENDELL e SAHENK, 2003).

Um dado interessante observado no presente estudo foi a exacerbação da resposta edematogênica e o desenvolvimento normal da hiperalgesia induzida pelo CFA em animais nocaute para o receptor B₂. Estas respostas podem ser explicadas por aumento compensatório do receptor B₁, induzido pela deleção gênica do receptor B₂. De fato, o tratamento sistêmico com o antagonista do receptor B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina reverteu praticamente todo o aumento do edema causado pelo CFA em animais nocaute para o receptor B₂. Interessantemente, camundongos transgênicos que superexpressam o receptor B₁ possuem resposta edematogênica exagerada à carragenina (NI et al., 2003). Além disso, o presente estudo demonstrou aumento na hiperalgesia causada pela administração intratecal do agonista do receptor B₁ em animais nocaute para o receptor B₂. De maneira interessante, tem sido demonstrada indução

compensatória do receptor B₁ após a deleção gênica do receptor B₂ em estudos funcionais (MADDEDU et al., 1997) e moleculares (DUKA et al., 2001; MARIN-CASTAÑO et al., 2002). Em condições normais, camundongos possuem níveis mínimos de expressão de receptor B₁ em vários tecidos, tais como neurônios sensoriais, medula espinhal, traquéia, bexiga, íleo, rim, estômago e pulmão (TREVISANI et al., 1999; SEABROOK et al., 1997; COUTURE e LINDSEY, 2000; PESQUERO et al., 1996; 2000). No entanto, a deleção gênica do receptor B₂ causa aumento na expressão do receptor B₁ no corno dorsal da medula espinhal, nos gânglios da raiz dorsal e superior cervical e no rim desses animais (SEABROOK et al., 1997; COUTURE e LINDSEY, 2000). A auto-regulação na expressão dos receptores para cininas foi proposta em estudos realizados *in vivo* (CAMPOS e CALIXTO, 1995) e *in vitro* (PHAGOO et al., 1999).

Possivelmente ocorre um balanço entre as duas populações de receptores: enquanto que o receptor B₂ medeia as fases agudas da resposta inflamatória, os receptores B₁ parecem estar envolvidos em estados inflamatórios crônicos. Desta forma, a ausência completa de função do receptor B₂ poderia levar a um aumento na expressão do receptor B₁. Evidências farmacológicas e moleculares confirmam que os receptores B₁ e B₂ são entidades protéicas distintas. Enquanto os receptores B₂ apresentam alta afinidade pela bradicinina e pela calidina e são rapidamente dessensibilizados e internalizados após sua ativação, os receptores B₁ possuem alta afinidade pelos metabólitos ativos des-Arg⁹-bradicinina e des-Arg¹⁰-calidina e não são dessensibilizados ou internalizados (MARCEAU et al., 1998). Quando comparada ao receptor B₂, a estimulação do receptor B₁ causa ativação de sinais intracelulares geralmente muito mais prolongados, como o

aumento no nível intracelular de cálcio e de fosfoinosítídeos (MARCEAU et al., 1998). Estas evidências demonstram que apesar do receptor B₂ poder regular a expressão do receptor B₁, estes receptores produzem efeitos celulares bastante distintos.

Outro aspecto a ser observado é que a deleção gênica do receptor B₂ pode produzir alteração no funcionamento de outras proteínas, incluindo o aumento do angiotensinogênio, renina e calicreína renal, além da elevação nas atividades enzimáticas da enzima conversora de angiotensina e da calicreína tissular (YOSIPIV et al., 2001), assim como a redução na excreção de óxido nítrico e de GMP cíclico glomerular (SCHANSTRA et al., 2003). Porém, estas mudanças não produzem alteração na função renal (MILIA et al., 2001; SCHANSTRA et al., 2003). Estes dados sugerem que outros sistemas que funcionam de maneira redundante ajustam a ausência de receptores B₂ em camundongos.

Diferentes grupos de pesquisadores demonstraram que a deleção gênica do receptor B₂ não produz alteração na pressão arterial de camundongos (RHALEB et al., 1999; MILIA et al., 2001; SCHANSTRA et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que camundongos nocaute para o receptor são hipertensos (MADEDDU et al., 1997). Estes fenótipos divergentes parecem ser decorrente de diferentes fundos genéticos observados em animais nocautes (MADEDDU e EMANUELI, 1999; RHALEB et al., 1999). Um dos primeiros passos para a produção de animais com deleção gênica é a microinjeção de uma célula tronco embrionária contendo o gene mutado em um blastocisto em desenvolvimento (LARIVIERE et al., 2001). Um problema neste processo é que geralmente a célula tronco é originada de um camundongo da linhagem 129/SvJ e

o blastocisto é originado de camundongos da linhagem C57BL/6. Desta forma, os primeiros animais nocaute gerados possuem fundo genético misto entre estas duas linhagens, o que é um fator desfavorável para o uso experimental destes animais, pois estas linhagens possuem genótipos e fenótipos amplamente diferentes em vários aspectos. Uma forma de resolver este problema é o reestabelecimento de um fundo genético único por cruzamentos múltiplos com animais isogênicos selvagens (LARIVIERE et al., 2001). No caso dos animais com deleção gênica dos receptores para cininas utilizados no presente estudo, o fundo genético escolhido para os animais nocaute foi o 129/SvJ (PESQUERO et al., 2000; MILIA, 2001). Porém, os animais selvagens da linhagem 129/SvJ são mais resistentes aos estímulos nociceptivos em vários modelos experimentais quando comparados aos animais da linhagem C57BL/6 (MOGIL et al., 1999). Como os animais da linhagem 129/SvJ apresentaram respostas nociceptivas reduzidas em comparação a outras linhagens isogênicas de camundongos, este fato poderia facilitar o aparecimento dos intensos efeitos antinociceptivos produzidos pela deleção gênica do receptor B_1 para cininas nos modelos de dor crônica. Desta forma, os dados obtidos com a deleção gênica devem ser analisados cautelosamente. Porém, os resultados do presente estudo foram confirmados com o uso de antagonistas seletivos para os receptores das cininas, o que permitiu demonstrar de maneira clara a participação dos receptores para cininas em modelos experimentais de dor crônica causada pelo agente inflamatório CFA ou pela lesão do nervo ciático.

Recentemente, os primeiros antagonistas não peptídicos para os receptores B_1 para as cininas foram descritos por pesquisadores da indústria farmacêutica

Merck (WOOD et al., 2003). Estas substâncias são derivadas das benzodiazepinas e demonstram alta afinidade para os receptores B₁ de humanos e de ratos, com alta seletividade frente ao receptor B₂. Apesar das suas baixas biodisponibilidades após administração intravenosa, estas benzodiazepinas reduzem a hiperalgesia produzida pela carragenina em ratos (WOOD et al., 2003). A equipotentência destas substâncias no antagonismo de receptores B₁ de ratos e humanos é interessante pois os receptores B₁ de primatas possuem estrutura gênica e protéica distinta dos de roedores. O receptor B₁ de ratos possui inserção de aminoácidos básicos na primeira alça intracelular e redução no tamanho da porção citoplasmática carboxi terminal (JONES et al., 1999). Farmacologicamente, o receptor B₁ de humanos possui uma afinidade maior para a des-Arg¹⁰-calidina do que pela des-Arg⁹-bradicinina, enquanto que os receptores B₁ de ratos possuem maior afinidade para a des-Arg⁹-bradicinina (JONES et al., 1999). Desta forma, antagonistas de receptores B₁ que possuem excelente atividade anti-nociceptiva em roedores, não necessariamente o farão em humanos. Fenômenos semelhantes a este têm sido descrito para outros receptores, como por exemplo os receptores NK₁ para taquicinas (HILL, 2000). Recentemente, uma outra classe de antagonistas para receptores B₁ foi desenvolvida, também por pesquisadores da Merck (SU et al., 2003). Estes compostos da classe das dihidroquinoxalinonas possuem alta potência e alta afinidade (subnanomolar) para receptores B₁ de humanos e de coelhos, quando comparado aos receptores B₁ de ratos e cães. Além disto, estes compostos inibem a nocicepção causada pelo CFA em coelhos. Interessantemente, o receptor B₁ de coelhos é o que mais se parece

com o receptor humano, entre várias espécies não-primatas (MACNEIL et al., 1995; MARCEAU, 1997).

Em conclusão, os resultados do presente trabalho demonstram que os receptores para cininas, especialmente os receptores B₁, estão intimamente relacionados com a produção da dor crônica, tanto de origem inflamatória quanto de origem neuropática. Receptores para as cininas presentes na medula espinhal parecem ser importantes na mediação destes efeitos. Desta maneira, o desenvolvimento de antagonistas seletivos e ativos por via oral para o receptor B₁ podem representar uma nova e interessante alternativa para o tratamento da dor crônica. Considerando que a terapia atual carece de drogas efetivas e seguras para o tratamento das dores crônicas, esta área da pesquisa deverá receber muita atenção nos próximos anos por parte de várias indústrias farmacêuticas mundiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. 2000. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**: 94-98.
- AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. 2001. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* **7**: 1003-1009.
- Abelous JE, Bardier E. 1909. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Seances Soc Biol* **66**: 511.
- Aliberti J, Viola JPB, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J. 2003. Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* **170**: 5349-5353.
- Angers M, Drouin R, Bachvarova M, Paradis I, Marceau F, Bachvarov DR. 2000. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *J Cell Biochem*. **78**: 278-296.
- Araújo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva ACM, Pesquero JB, Bader M. 2001. Altered neutrophil homeostasis in kinin B₁ receptor-deficient mice. *Biol Chem* **382**: 91-95.
- Armstrong D. 1970. Pain. Cap. 1. In: Erdös, E.G (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. XXV. Bradykinin, kallidin and kallikrein. Berlin: Springer-Verlag, pp. 434-481.
- Ashburn MA, Staats PS. 1999. Management of chronic pain. *Lancet* **353**: 1865-1869.

- Baba H, Ji RR, Kohno T, Moore KA, Ataka T, Wakai A, Okamoto M, Woolf CJ. 2003. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. *Mol Cell Neurosci* **24**: 818-830.
- Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivee JF, Levesque L, Rioux F, Drapeau G, Marceau F. 1995. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. **275**: 1623-1630.
- Banik RK, Kozaki Y, Sato J, Gera L, Mizumura K. 2001. B2 receptor-mediated enhanced bradykinin sensitivity of rat cutaneous C-fiber nociceptors during persistent inflammation. *J Neurophysiol* **86**: 2727-2735.
- Barabé J, Babiuk C, Regoli D. 1982. Binding of [³H]des-Arg⁹-BK to rabbit anterior mesenteric vein. *Can J Physiol Pharmacol*. **60**: 1551-1555.
- Bascands JL, Schanstra JP, Couture R, Girolami JP. 2003. Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med Sci (Paris)* **19**: 1093-1100.
- Bennett GJ. 1999a. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7737-7738.
- Bennett GJ. 1999b. New frontiers in mechanisms and therapy of painful peripheral neuropathies. *Acta Anaesthesiol Sin* **37**: 197-203.
- Beraldo WT, Andrade SP. 1997. Discovery of bradykinin and the kallikrein-kinin system. In: Farmer SG (Ed.). *The Handbook of Immunopharmacology*. The kinin system. Londres: Academic Press, pp. 1-8.
- Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* **353**: 1610-1615.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44**: 1-44.

- Bileviciute I, Lundeberg T, Ekblom A, Theodorsson E. 1993. Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci Lett* **153**: 37-40.
- Billiau A, Matthys P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* **70**: 849-860.
- Blair SJ, Chinthagada M, Hoppenstedt D, Kijowski R, Fareed J. 1998. Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. *Acta Orthop Bel* **64**: 448-451.
- Blaukat A, Herzer K, Schroeder C, Bachmann M, Nash N, Muller-Esterl W. 1999. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry* **38**: 1300-1309.
- Blaukat A, Pizard A, Breit A, Wernstedt C, Alhenc-Gelas F, Muller-Esterl W, Dikic I. 2001. Determination of bradykinin B₂ receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem* **276**: 40431-40440.
- Blaukat A. 2003. Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia* **35**: 17-23.
- Bockmann S, Paegelow I. 2000. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol* **68**: 587-592.
- Boissonnas RA, Guttmann, Jaquenoud P-A, Kozett H, Stürmer E. 1960. Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia* **16**: 326-328.
- Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, Hess JF. 1995. Targeted disruption of a B₂ bradykinin receptor

- gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* **270**: 13706-13710.
- Boyce S, Rupniak NMJ, Carlson EJ, Webb J, Borkowski JA, Strader CD, Hill RG. 1996. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ bradykinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology* **33**: 333-335.
- Bron R, Klesse LJ, Shah K, Parada LF, Winter J. 2003. Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* **22**: 118-132.
- Brull, Dhamrait S, Myerson S, Erdmann J, Regitz-Zagrosek V, World M, Pennell D, Humphries SE, Montgomery H. 2001. Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. *Lancet* **358**: 1155-1156.
- Burch RM, Kniss DA. 1988. Modulation of receptor-mediated signal transduction by diacylglycerol mimetics in astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* **8**: 251-257.
- Burch RM, Tiffany CW. 1989. Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin, and other agonists. *J Cell Physiol* **141**: 85-89.
- Burdin TA, Graeff FG, Pela IR. 1992. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. *Physiol Behav* **52**: 405-410.
- Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP. 1989. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci* **9**: 3314-3325.
- Burgess GM, Perkins MN, Rang HP, Campbell EA, Brown MC, McIntyre P, Urban L, Dziadulewicz EK, Ritchie TJ, Hallett A, Snell CR, Wrigglesworth R, Lee W,

- Davis C, Phagoo SB, Davis AJ, Phillips E, Drake GS, Hughes GA, Dunstan A, Bloomfield GC. 2000. Bradyzide, a potent non-peptidic B₂ bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **129**: 77-86.
- Camargo ACM, Ramalho-Pinto FJ, Greene LJ. 1972. Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. *J Neurochem* **19**: 37-49.
- Camargo ACM, Shapanka R, Greene LJ. 1973. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochemistry* **12**: 1838-1844.
- Campbell DJ. 2001. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**: 1060-1065.
- Campbell DJ. 2003. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 784-791.
- Campbell JN. 2001. Nerve lesions and the generation of pain. *Muscle Nerve* **24**: 1261-1273.
- Campos MM, Calixto JB. 1995. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* **113**: 1005-1013.
- Campos MM, de Souza GE, Ricci ND, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. 2002. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B₁ receptors in rats. *Br J Pharmacol* **135**: 1107-1114.
- Campos MM, Souza GE, Calixto JB. 1998. Modulation of kinin B₁ but not B₂ receptors-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha. *Peptides* **19**: 1269-1276.

- Campos MM, Souza GE, Calixto JB. 1999. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol* **127**: 1851-1859.
- Casey KL. 1999. Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7668-7674.
- Cassim B, Mody G, Bhoola K. 2002. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther* **94**: 1-34.
- Caterina MJ, Julius D. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* **24**: 487-517.
- Cayla C, Merino VF, Cabrini DA, Silva JA Jr, Pesquero JB, Bader M. 2002. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int Immunopharmacol* **2**: 1721-1727.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. 1999. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* **23**: 617-624.
- Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS. 1987. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* **120**: 475-482.
- Chapman V, Dickenson AH. 1992. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol* **219**: 427-433.
- Chan C-F, Sun W-Z, Lin J-K, Lin-Shiau S-Y. 2000. Activation of transcription factors of nuclear kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **402**: 61-68.

- Chercuitte F, Beaulieu AD, Poubelle P, Marceau F. 1987. Carboxypeptidase N (kininase I) activity in blood and synovial fluid from patients with arthritis. *Life Sci* **41**: 1225-1232.
- Chen EY, Emerich DF, Bartus RT, Kordower JH. 2000. B₂ bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* **427**: 1-18.
- Cholewinski AJ, Stephens GJ, Mcdermott AM, Wilkin GP. 1991. Identification of B₂ binding sites on cultures rat cortical astrocytes. *J Neurochem* **57**: 1456-1458.
- Colman RW. 1998. The contact system: a proinflammatory pathway with antithrombotic activity. *Nat Med* **4**: 277-278.
- Correa F.M, Innis RB, Uhl GH, Snyder SH. 1979. Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1489-1493.
- Corrêa CR, Calixto JB. 1993. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol* **110**: 193-198.
- Corrêa CR, Kyle DJ, Chakraverty S, Calixto JB. 1996. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B₂ bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br J Pharmacol* **117**: 552-558.
- Couto LB, Corrêa FMA, Pelá IR. 1998. Brain sites involved in the anticonceptive effect of bradykinin in rats. *Br J Pharmacol* **125**: 1578 -1584.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**: 161-176.
- Couture R, Lindsey CJ. 2000. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion R, Björklund A,

- Hökfeld T. *Handbook of Chemical Anatomy*. Vol. **16**: Peptide receptors, part 1. Holanda: Elsevier, 241-298.
- Craig AD. 2003. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 500-505.
- Davis CJ, Naeem S, Phagoo SB, Campbell EA, Urban L, Burgess GM. 1996. B₁ bradykinin receptors and sensory neurones. *Br J Pharmacol* **118**: 1469-1476.
- De Campos RO, Alves RV, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB. 1996. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **316**: 277-286.
- De Campos RO, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB. 1999. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**: 278-286.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **26**: 335-341.
- Decaris E, Guingamp C, Chat M, Philippe L, Grillasca JP, Abid A, Minn A, Gillet P, Netter P, Terlain B. 1999. Evidence for neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. *Arthritis Rheum* **42**: 1951-1960.
- Dina OA, McCarter GC, de Coupade C, Levine JD. 2003. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. *Neuron* **39**: 613-624.

- Donaldson LF, Hanley MR, Villablanca AC. 1997. Inducible receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 171-181.
- Dray A, Patel IA, Perkins MN, Rueff A. 1992. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. *Br J Pharmacol* **107**: 1129-1134.
- Dray A, Perkins MN. 1997. Kinins and pain. In: Farmer SG (ed). *The Handbook of Immunopharmacology*. The kinin system. Londres: Academic Press, pp. 157-172.
- Dray A, Urban L, Dickenson A. 1994. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 190-197.
- Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4**: 161-174.
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. 2001. Vasoactive potential of the B₁ bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* **88**: 275-281.
- Duner T, Conlon JM, Kukkonen JP, Akerman KE, Yan YL, Postlethwait JH, Larhammar D. 2002. Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B₂-related receptor. *Biochem J* **364**: 817-824.
- Dunn PM, Rang HP. 1990. Bradykinin-induced depolarization of primary afferent terminals in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol* **100**: 656-660.

- Eckert A, Segond von Banchet G, Sopper S, Petersen M. 1999. Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. *Pain* **83**: 487-497.
- Eggerickx D, Raspe E, Bertrand D, Vassart G, Parmentier M. 1992. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1306-1313.
- Emim JAS, Souccar C, Castro MAS, Godinho RO, Cezari MHS, Juliano L, Lapa AJ. 2000. Evidence for activation of the tissue kallikrein-kinin system in nociceptive transmission and inflammatory responses of mice using a specific enzyme inhibitor. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1099-1107.
- Erdös EG. 1961. Enzymes that inactivates active polypeptides. *Biochem Pharmacol* **8**: 21P.
- Erdös EG, Skidgel RA. 1997 Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: Farmer SG (Ed.). *The Handbook of Immunopharmacology*. The kinin system. Londres: Academic Press, pp. 9-43.
- Farmer SG, Powell SJ, Wilkins DE, Graham A. 1998. Cloning, sequencing and functional expression of a guinea pig lung bradykinin B₂ receptor. *Eur J Pharmacol* **346**: 291-298.
- Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR. 1999. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* **48**: 881-889.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. 1993. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **110**: 1227-1231.

- Ferreira J, Santos AR, Calixto JB. 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* **38**: 835-842.
- Ferreira J. 2000. Caracterização do efeito hiperalgésico induzido pelas injeções intratecais de glutamato e cininas em camundongos. *Dissertação de Mestrado*. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, pp. 1-88.
- Ferreira J, Silva GL, Calixto JB. 2004. Involvement of vanilloid receptors in the overt nociception induced by B₂ kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol*, No prelo.
- Fox A, Wotherspoon G, McNair K, Hudson L, Patel S, Gentry C, Winter J. 2003. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B₁ bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* **104**: 683-691.
- Frey EK, Kraut H. 1928. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Path Pharmacol* **133**: 1-56.
- Gabra BH, Sirois P. 2003. Kinin B₁ receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* **37**: 36-44.
- Frey EK, Kraut H, Werle E. 1930. Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **189**: 97.
- Gabra BH, Sirois P. 2002. Role of bradykinin B₁ receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol* **457**: 115-124.

- Ganju P, Davis A, Patel S, Nunez X, Fox A. 2001. p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B₁ receptor-mediated component of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **421**: 191-199.
- Garry MG, Jackson DL, Geier HE, Southam M, Hargreaves KM. 1999. Evaluation of the efficacy of a bioerodible bupivacaine polymer system on antinociception and inflammatory mediator release. *Pain* **82**: 49-55.
- Gimpl G, Walz W, Ohlemeyer C, Kettenmann H. 1992. Bradykinin receptors in cultures astrocytes from neonatal brain are linked to physiological responses. *Neurosci Lett* **144**:139-142.
- Guimaraes JA, Borges DR, Prado ES, Prado JL. 1973. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem Pharmacol* **22**: 3157-3172.
- Gutowski S, Smrcka A, Nowak L, Wu DG, Simon M, Sternweis PC. 1991. Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem* **266**: 20519-20524.
- Habermann E. 1963. On pH-related modifications of kinin-producing alpha-globulin (kininogen) from bovine serum and the molecular weight of kininogen I. *Biochem Z* **337**: 440-448.
- Hall JM, Geppetti P. 1995. Kinins and kinin receptor in the nervous system. *Neurochem Int* **26**: 17-26.
- Hall JM, Morton IKM. 1997. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG (Ed.). *The Handbook of Immunopharmacology*. The kinin system. Londres: Academic Press, pp. 9-43.

- Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL. 1988a. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther* **44**: 613-621.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988b. A new and sensitive method for measure thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**: 77-88.
- Herrero JF, Laird JM, Lopez-Garcia JÁ. 2000. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* **61**: 169-203.
- Herwald H, Morgelin M, Olsen A, Rhen M, Dahlback B, Muller-Esterl W, Bjorck L. 1998. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* **4**: 298-302.
- Hess JF, Borkowski JA, Macneil T, Stonesifer GY, Fraher J, Strader CD, Ransom RW. 1994. Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. *Mol Pharmacol* **45**: 1-8.
- Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. 1992. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 260-268.
- Hess JF, Hey PJ, Chen TB, O'Brien J, Omalley SS, Pettibone DJ, Chang RS. 2001. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B₁ and B₂ bradykinin receptors. *Biol Chem* **382**: 123-129.
- Hess JF, Hey PJ, Chen TB, Pettibone DJ, Chang RS. 2002. Molecular and pharmacological diversity of the kinin B₁ receptor. *Int Immunopharmacol* **2**: 1747-1754.

- Hill R. 2000. NK1 (substance P) receptor antagonists: why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* **21**: 244-246.
- Hirayama Y, Kayakiri H. 2002. Bradykinin antagonist: current status and perspective. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **119**: 45-53.
- Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke S, Breipohl G, König W, Knolle J. 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* **102**: 769-773.
- Hogan Q. 2002. Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* **27**: 385-401.
- Hosli E, Hosli L. 1993a. Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport* **4**: 159-162.
- Hosli E, Hosli L. 1993b. Receptor for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **40**: 477-506.
- Hosli L, Hosli E, Kaeser H, Lefkovits M. 1992. Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. *Neurosci Lett* **148**:114-116.
- Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin pain in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Meth* **14**: 69-76.
- Hunskar S, Hole K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30**: 103-114
- Hunt SP, Mantyh PW. 2001. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* **2**: 83-91.
- Hylden JKL, Wilcox GL. 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* **67**: 313-316.

- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S. 2001. Evidence for bradykinin mediation of carrageenin-induced inflammatory pain: a study using kininogen-deficient Brown Norway Katholiek rats. *Biochem Pharmacol* **61**: 911-914.
- Innis RB, Manning DC, Stewart JM, Snyder SH. 1981. [³H]Bradykinin receptor binding in mammalian tissue membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2630-2634.
- Ji R-R, Woolf CJ. 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* **8**: 1-10.
- Jones C, Phillips E, Davis C, Arbuckle J, Yaqoob M, Burgess GM, Docherty RJ, Webb M, Bevan SJ, McIntyre P. 1999. Molecular characterisation of cloned bradykinin B1 receptors from rat and human. *Eur J Pharmacol* **374**: 423-433.
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203-210.
- Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. 2002. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* **109**: 195-209.
- Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T. 1985. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* **44**: 1892-1897.
- Kelly DC, Asghar AU, Marr CG, McQueen DS. 2001. Nitric oxide modulates articular sensory discharge and responsiveness to bradykinin in normal and arthritic rats in vivo. *Neuroreport* **12**: 121-125.
- Khasar SG, Miao FJ-P, Levine JD. 1995. Inflammation modulates the contribution of receptor subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* **69**: 685-690.

- Kingery WS. 1997. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* **73**: 123-139.
- Laneuville O, Couture R. 1987. Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of a nociceptive reflex in the rat. *Eur J Pharmacol* **137**: 281-285.
- Laneuville O, Raeder TA, Couture R. 1989. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in rat. *Eur J Pharmacol* **159**: 273-283.
- Lariviere WR, Chesler EJ, Mogil JS. 2001. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J Pharmacol Exp Ther* **297**: 467-473.
- Lee YJ, Zachrisson O, Tonge DA, McNaughton PA. 2002. Upregulation of bradykinin B₂ receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* **19**: 186-200.
- Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI. 1985. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol* **135**: 843s-847s.
- Levy D, Zochodne DW. 2000. Increased mRNA expression of the B₁ and B₂ bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* **86**: 265-271.
- Li Z, Tyor WR, Xu J, Chao J, Hogan EL. 1999. Immunohistochemical localization of kininogen in rat spinal cord and brain. *Exp Neurol* **159**: 528-537.
- Lin WW, Chuang DM. 1992. Regulation of bradykinin-induced phosphoinositide turnover in cultured cerebellar astrocytes: possible role of protein kinase C. *Neurochem Int* **21**: 573-579.

- Lopes P, Couture R. 1997. Localization of bradykinin-like immunoreactivity in the rat spinal cord: effects of capsaicin, melittin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* **78**: 481-497.
- Lopes P, Kar S, Tousignant C, Regoli D, Quirion R, Couture R. 1993. Autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse* **15**: 48-57.
- Lopes P, Kar S, Chretien L, Regoli D, Quirion R, Couture R. 1995. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* **68**: 867-881.
- Ma JX, Wang DZ, Chao L, Chao J. 1994. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B₂ receptor. *Gene* **149**: 283-288.
- Ma Q-P, Heavens R. 2001. Basal expression of bradykinin B₁ receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport* **12**: 2311-2314.
- Ma Q-P, Hill R, Sirinathsinghi D. 2000. Basal expression of bradykinin B₁ receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport* **11**: 4003-4005.
- Ma Q-P. 2001. The expression of bradykinin B₁ receptors on primary sensory neurones that give rise to small calibre sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* **107**: 665-673.
- MacNeil T, Bierilo KK, Menke JG, Hess JF. 1995. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. *Biochim Biophys Acta* **1264**: 223-228.

- Madeddu P, Varoni, MV, Palomba D, Emanuelli C, Demonstis MP, Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Anania V. 1997. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B₂-receptor gene. *Circulation* **96**: 3570-3578.
- Madeddu P, Emanuelli C. 1999. Can knockout mice help dissect relevant genes in hypertension? Evidence and confounding factors. *Hypertension* **34**: e14-15.
- Mahabeer R, Bhoola KD. 2000. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* **88**: 77-89.
- Malmberg AB, Basbaum AI. 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76**: 215-222.
- Manning DC, Raja SN, Meyer RA, Campbell JN. 1991. Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin Pharmacol Ther* **50**: 721-729.
- Marceau F. 1997. Kinin B₁ receptor induction and inflammation. In: Farmer SG (Ed.). *The Handbook of Immunopharmacology*. The kinin system. Londres: Academic Press, pp. 9-43.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. 1998. Kinin receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 357-386.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. 2002. Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol* **2**: 1729-1739.
- Marin-Castano ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL. 2002. Induction of functional bradykinin b(1)-

receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* **105**: 627-632.

Mason GS, Cumberbatch MJ, Hill RG, Rupniak NMJ. 2002. The bradykinin B₁ receptor antagonist B9858 inhibits a nociceptive spinal reflex in rabbits. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 264-268.

McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. 1991. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7724-7728.

McIntyre P, Phillips E, Skidmore E, Brown M, Webb M. 1993. Cloned murine bradykinin receptor exhibits a mixed B₁ and B₂ pharmacological selectivity. *Mol Pharmacol* **44**: 346-355.

McNair K, Kesingland A, Urban L, Fox A. 2001. The role of central and peripheral bradykinin B₁ receptors in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Br J Pharmacol* **134**: 158P.

Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**: 135-145.

Meller ST, Dykstra D, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF. 1994. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* **33**: 1471-1478.

Mendell JR, Sahenk Z. 2003. Painful sensory neuropathy. *N Engl J Med* **348**: 1243-1255.

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF. 1994. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**: 21583-21586.

- Merskey H, Bogduk N. 1994. *Classification of Chronic Pain*. EUA: Ed. Seattle, pp. 209-214.
- Milia AF, Gross V, Plehm R, De Silva JA Jr, Bader M, Luft FC. 2001. Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B(2) receptor. *Hypertension* **37**: 1473-1479.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**: 1-164.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* **80**: 67-82.
- Mogil JS, Yu L, Basbaum AI. 2000. Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci* **23**: 777-811.
- Negus SS, Butelman ER, Gatch MB, Woods JH. 1995. Effects of morphine and ketorolac on thermal allodynia induced by prostaglandin E₂ and bradykinin in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **274**: 805-814.
- Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J. 1998. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim Biophys Acta* **1442**: 177-185.
- Ni A, Yin H, Agata J, Yang Z, Chao L, Chao J. 2003. Overexpression of kinin B₁ receptors induces hypertensive response to des-Arg⁹-bradykinin and susceptibility to inflammation. *J Biol Chem* **278**: 219-225.
- Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. 2002. Relationships between pain-related mediators and both synovitis and joint pain in patients

- with internal derangements and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**: 328-332.
- Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tachibana T, Fukuoka T, Tokunaga A, Yoshikawa H, Noguchi K. 2003. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase in primary afferent neurons regulates brain-derived neurotrophic factor expression after peripheral inflammation and nerve injury. *J Neurosci* **23**: 4117-4126.
- Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, Simonato M, Couture R. 2003. Autoradiographic analysis of rat brain kinin B₁ and B₂ receptors: Normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* **461**: 506-519.
- Ostrom RS. 2002. New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains. *Mol Pharmacol* **61**: 473-476.
- Panesar MS, Gentry CT, Urban L, Walker K, Fox A. 1998. A model of persistent, inflammation-induced mechanical hyperalgesia in the mouse. *Br J Pharmacol* **125**, 122P.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**: 744-747.
- Parpura V, Liu F, Jeftinija KV, Haydon PG, Jeftinija SD. 1995. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. *J Neurosci* **15**: 5831-5839.
- Pelá IR, Rosa AL, Silva CAA, Huidobro-Toro JP. 1996. Central B₂ receptor involvement in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. *Br J Pharmacol* **118**: 1488-1492.

- Perkins MN, Campbell E, Dray A. 1993. Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹,[Leu⁸]-BK and Hoe 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* **53**: 191-197.
- Perkins MN, Kelly D. 1993. Induction of bradykinin-B₁ receptors "in vivo" in a rat model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol* **110**: 1441-1444.
- Perkins MN, Kelly D. 1994. Interleukin-1 β induced-desArg⁹bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* **33**: 657-660.
- Perry DC, Snider SH. 1984. Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* **43**: 1072-1080.
- Perry VH, Andersson PB, Gordon S. 1993. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 268-273.
- Pesquero JB, Pesquero JL, Oliveira SM, Roscher AA, Metzger R, Ganten D, Bader M. 1996. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 219-225.
- Pesquero JB, Bader M. 1998. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz J Med Biol Res* **31**: 1197-1203.
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva Jr, JA, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M. 2000. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8140-8145.
- Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM. 1999. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of

- receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**: 325-333.
- Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P. 1997. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol* **273**: R1550-R1556.
- Picciotto MR, Wickman K. 1998. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* **78**: 1131-1163.
- Powers CA, Nasjletti A. 1983. A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. *Endocrinology* **112**: 1194-1200.
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. 2002. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol* **193**: 275-286.
- Raidoo DM, Bhoola KD. 1997. Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol* **77**: 39-44.
- Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M, Ueda H. 2004. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. No prelo.
- Rees H, Sluka KA, Lu Y, Westlund KN, Willis WD. 1996. Dorsal root reflexes in articular afferents occur bilaterally in a chronic model of arthritis in rats. *J Neurophysiol* **76**: 4190-4193.
- Regoli D, Barabé J. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32**: 1-46.

- Regoli D, Rhaleb NE, Dion S, Drapeau G. 1990. New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B₂ receptor characterization. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 156-161.
- Rhaleb NE, Peng H, Alfie ME, Shesely EG, Carretero OA. 1999. Effect of ACE inhibitor on DOCA-salt- and aortic coarctation-induced hypertension in mice: do kinin B₂ receptors play a role? *Hypertension* **33**: 329-334.
- Ritchie, T.; COLE, R.; KIM, H.S.; DE VELLIS, J.; NOBLE, E.P. Inositol phospholipid hydrolysis in cultures astrocytes and oligodendrocytes. *Life Sci.*, **41**: 31-39, 1987.
- Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. 1949. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* **156**: 261-273.
- Rocha e Silva M, Antonio A. 1960. Release of bradykinin and the mechanism of production of a thermic edema (45 oC) in the rat's paw. *Med Exp* **3**: 371-382.
- Rupniak NMJ, Boyce S, Webb JK, Williams AR, Carlson EJ, Hill RG, Borkowski JA, Hess JF. 1997. Effects of the bradykinin B₁ receptor antagonist des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin and genetic disruption of the B₂ receptor on nociception in rats and mice. *Pain* **71**: 89-97.
- Russo CM, Brose WG. 1998. Chronic pain. *Annu Rev Med* **49**:123-133.
- Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, Marceau F. 2002. Agonist-induced translocation of the kinin B₁ receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* **61**: 546-553.

- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. 2001. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**: 471-475.
- Sawutz DG, Salvino JM, Dolle RE, Casiano F, Ward SJ, Houck WT, Faunce DM, Douty BD, Baizman E, Awad MM. 1994. The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4693-4697.
- Schanstra JP, Duchene J, Praddaude F, Bruneval P, Tack I, Chevalier J, Girolami JP, Bascands JL. 2003. Decreased renal NO excretion and reduced glomerular tuft area in mice lacking the bradykinin B₂ receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: H1904-1908.
- Schmaier AH. 2002. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* **109**: 1007-1009.
- Schroeder C, Beug H, Muller-Esterl W. 1997. Cloning and functional characterization of the ornithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE140, as a full agonist. *J Biol Chem* **272**: 12475-12481.
- Schwartz JC, Malfroy B, LA Baume SD. 1981. Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxipeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci* **29**: 1715-1740.
- Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujouny M, Carretero OA. 1984. Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens* **A6**: 1731-1738.
- Seabrook GR, Bowery BJ, Hill RG. 1995. Bradykinin receptors in mouse and rat isolated superior cervical ganglia. *Br J Pharmacol* **115**: 368-372.

- Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H., Sirinnathsinghi DJS, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG. 1997. Expression of B₁ and B₂ bradykinin receptor mRNA and their function roles in sympathetic ganglia and sensory root ganglia neurones from wild-type and B₂ receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **36**: 1009-1017.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**: 205-218.
- Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. 2002. Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacol* **2**: 1841-1849.
- Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris, Blake D. 2001. Pain, neurogenic inflammation and symmetry in medical practice. *Pain Rev* **8**: 27-34.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* **38**: 347-352.
- Shin J, Cho H, Hang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U. 2002. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10150-10155.
- Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. 2003. Localization of B₁ bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **465**: 372-384.
- Soskic V, Nyakatura E, Roos M, Muller-Esterl W, Godovac-Zimmermann J. 1999. Correlations in palmitoylation and multiple phosphorylation of rat bradykinin B₂ receptor in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **274**: 8539-8545.

- Stenger S, Modlin RL. 2002. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **14**: 452-457.
- Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snider SH. 1988. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3245-3249.
- Stephens GJ, Marriot DR, Djamgoz MBA, Wilkin GP. 1993. Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultures rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci Lett* **153**: 223-226.
- Su DS, Markowitz MK, DiPardo RM, Murphy KL, Harrell CM, O'Malley SS, Ransom RW, Chang RS, Ha S, Hess FJ, Pettibone DJ, Mason GS, Boyce S, Freidinger RM, Bock MG. 2003. Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist. *J Am Chem Soc* **125**: 7516-7517.
- Sufka KJ, Roach JT. 1996. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists in rats. *Pain* **66**: 99-103.
- Taiwo YO, Levine JD. 1998. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. *Brain Res* **458**: 402-406.
- Takahashi H, Ohkubo T, Shibata M, Narese S. 1984. A modified formalin test for measuring analgesia in mice. *Jpn J Oral Biol* **26**: 543-548.
- Tippmer S, Quitterer U, Kolm V, Faussner A, Roscher A, Mosthaf L, Muller-Esterl W, Haring H. 1994. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. *Eur J Biochem* **225**: 297-304.
- Todorov AG, Andrade D, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Stewart J, Gera L, Muller-Esterl W, Morandi V, Goldenberg RCS, Castro-Faria Neto H,

- Scharfstein J. 2003. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B₁/B₂) subtypes. *FASEB J* **17**: 73-75.
- Tracey DJ, Walker JS. 1995. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res* **44**: 407-411.
- Trevisani M, Schmidlin F, Tognetto M, Nijkamp FP, Gies JP, Frossard N, Amadesi S, Folkerts G, Geppetti P. 1999. Evidence for in vitro expression of B₁ receptor in the mouse trachea and urinary bladder. *Br J Pharmacol* **126**: 1293-1300.
- Ueno A, Oh-ishi S. 2003. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. *J Pharmacol Sci* **93**: 1-20.
- Vavrek RJ, Stewart JM. 1985. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* **6**: 161-164.
- Walker K, Perkins M, Dray A. 1995. Kinin and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* **26**: 1-16.
- Watkins LR, Maier SF. 2002. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* **82**: 981-1011.
- Watkins LR, Maier SF. 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 973-985.
- Werle E. 1937. Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Braunschpieldrüse und ihres äußeren Sekretes beim Hund. *Biochem Z* **290**: 129.
- Werle E. 1948. Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew Chem* **60**: 53.

- Werle E. Discovery of the most important kallikreins and kalikrein inhibitors. Cap. 1. In: Erdös, E.G (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. XXV. Bradykinin, kallidin and kallikrein. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-6, 1970.
- Werle E, Urhahn K. 1940. Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Braunchspeicheldrüse. *Biochem Z* **304**: 387-396.
- Werle E, Trautschold I, Leysath G. 1961. Isolation and structure of kallidine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **326**: 174-176.
- Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J. 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* **102**: 774-777.
- Wood MR, Kim JJ, Han W, Dorsey BD, Homnick CF, DiPardo RM, Kuduk SD, MacNeil T, Murphy KL, Lis EV, Ransom RW, Stump GL, Lynch JJ, O'Malley SS, Miller PJ, Chen TB, Harrell CM, Chang RS, Sandhu P, Ellis JD, Bondiskey PJ, Pettibone DJ, Freidinger RM, Bock MG. 2003. Benzodiazepines as potent and selective bradykinin B₁ antagonists. *J Med Chem* **46**: 1803-1806.
- Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. 1997. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* **121**: 417-424.
- Woolf CJ, Costigan M. 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7723-7730.
- Woolf CJ, Mannion RJ. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **353**: 1959-1964.
- Woolf CJ, Salter MW. 2000. Neural plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**: 1765-1768.

- Wotherspoon G, Winter J. 2000. Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* **294**: 175-178.
- Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, Nara Y, Matsuzaki S, Hoka S, Majima M. 2003. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. *Inflamm Res* **52**: 164-169.
- Yang HY, Erdos EG. 1967. Second kininase in human blood plasma. *Nature* **215**: 1402-1403.
- Yosipiv IV, Dipp S, El-Dahr SS. 2001. Targeted disruption of the bradykinin B(2) receptor gene in mice alters the ontogeny of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F795-801.
- Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP. 2003. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* **329**: 1-8.
- Zhou X, Polgar P, Taylor L. 1998. Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem J* **330**: 361-366.
- Zhou X, Prado GN, Chai M, Yang X, Taylor L, Polgar P. 1999. Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B₁ receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'-untranslated region. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**: 29-35.
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**: 109-110.
- Zochodne DW. 1993. Epineurial peptides: a role in neuropathic pain? *Can J Neurol Sci* **20**: 69-72.

Zuraw B. 2001. Bradykinin in protection against left-ventricular hypertrophy. *Lancet*
358: 1116-1117.

7. SUMMARY

Kinins are biologically active peptides involved in several pathophysiological processes, including blood pressure control, inflammation and pain. Experiments were designed to investigate the role of kinin B₁ and B₂ receptors in chronic models of pain. Intradermal injection of CFA produced time-dependent and marked hyperalgesic responses in both ipsilateral and contralateral paws of wild-type mice. Gene disruption of the kinin B₂ receptor did not significantly interfere with CFA-induced hyperalgesia, but ablation of the gene of the B₁ receptor reduced the hyperalgesia in both ipsilateral and contralateral paws. Treatment of wild-type mice with the selective B₁ antagonist des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK also reduced significantly CFA-evoked thermal hyperalgesia. The others inflammatory signs produced by CFA, such as paw oedema, neutrophil infiltration, increase in the local temperature and interleukin-1 β or prostaglandin E₂ elevation, were similar in wild-type and in B₁ receptor knockout mice.

Spinal cord seems to be an important site to the nociceptive action of kinins since the intrathecal injection of a B₁ receptor antagonist inhibits CFA-induced thermal hyperalgesia and formalin-induced persistent overt nociception. On the other hand, the B₂ receptor antagonist was able to inhibit formalin-induced transitory and persistent nociception, but it was not able to alter CFA-induced hyperalgesia. Moreover, the intrathecal administration of the kinin B₂ receptor agonist, bradykinin produced dose-related thermal hyperalgesia in wild-type mice and in B₁ receptor knockout mice, but not in B₂ receptor knockout mice. Similarly,

the i.t. injection of des-Arg⁹-bradykinin elicited thermal hyperalgesia in wild-type mice, but not in the B₁ receptor knockout mice. However, des-Arg⁹-bradykinin-induced hyperalgesia was more pronounced in the B₂ receptor knockout mice when compared with the wild-type mice. These data suggest a compensatory increase of B₁ receptor responses in B₂ receptor knockout mice.

Finally, we found no difference in the paw withdrawal responses to thermal or mechanical stimulation between B₁ receptor knockout mice and wild-type mice in the absence of neuropathy. However, partial ligation of the sciatic nerve in the wild type mouse produced a profound and long-lasting decrease of thermal and mechanical thresholds observed in the ipsilateral paw to nerve lesion. No change was detected in the threshold in neither sham-operated animals nor in paw contralateral to lesion. Ablation of B₁ receptor gene caused a significant reduction of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in nerve injured mice.

Collectively these results suggest that B₁ receptor activation seems to be important to inflammatory and neuropathic pain production. These findings support the notion that the development of an oral selective B₁ receptor antagonist might be expected to have an improved therapeutic potential in the management of chronic pain.

8. ANEXOS

- Ferreira J; Campos MM; Araújo R; Bader M; Pesquero JB; Calixto JB. 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 MM; Araújo R; Bader M.; Pesquero JB; Calixto JB. The use of kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal cord. *Neuropharmacology*, 43: 1188-1197, 2002.

- Calixto JB; Cabrini DA; Ferreira J; Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87: 1-5, 2000.

- Calixto JB; Cabrini DA; Ferreira J; Campos MM. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, 14: 519-526, 2001.

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

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS CININAS EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR CRÔNICA

JULIANO FERREIRA

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. João Batista Calixto

Florianópolis-SC

Fevereiro / 2004